



RESGATE DE EMBRIÕES IMATUROS OBTIDOS POR
POLINIZAÇÃO
NATURAL E CONTROLADA DE TANGERINEIRA PONCÃ

GUILHERME PEREIRA ALVES

2000

GUILHERME PEREIRA ALVES

**RESGATE DE EMBRIÕES IMATUROS OBTIDOS POR POLINIZAÇÃO
NATURAL E CONTROLADA DE TANGERINEIRA PONCÃ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Alves, Guilherme Pereira

Resgate de embriões imaturos obtidos por polinização natural e controlada de tangerineira poncã/ Guilherme Pereira Alves. – Lavras : UFLA, 2000.

88 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Tangerina poncã. 2. Embrião. 3. Sacarose. 4. Agar. 5. Polinização. 6. Fotoperiodismo. 7. Armazenamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.31

GUILHERME PEREIRA ALVES

**RESGATE DE EMBRIÕES IMATUROS OBTIDOS POR POLINIZAÇÃO
NATURAL E CONTROLADA DE TANGERINEIRA PONCÃ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 18 de agosto de 2000

Prof. Nilton Nagib Jorge Chalfun

UFLA

Prof. José Darlan Ramos

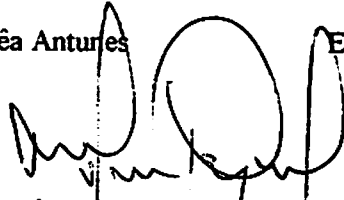
UFLA

Prof. Samuel Pereira Carvalho

UFLA

Pesq. Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes

EPAMIG



Prof. Dr. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

À memória de meu pai, Manoel, de meu sogro Aristarcho,
que sempre incentivaram, com honestidade, dedicação
e carinho, a formação de seus filhos,
netos e genros.

À minha mãe, Alba e minha sogra Ritta,
pela dedicação e amor.

Aos meus irmãos e cunhados, que mesmo distantes sempre são
fortes e de fontes inesgotáveis de pensamentos, incentivos
e de amizade

OFEREÇO

Aos meus amados filhos, Luiz Guilherme e Luana Maria, e a
minha querida esposa Ana Lucia, pela sua infinita compreensão,
apoio e amizade que possibilitaram-me alcançar esse objetivo.

DEDICO

BIOGRAFIA DO AUTOR

GUILHERME PEREIRA ALVES, filho de Manoel Raimundo Alves e Alba Pereira Alves, nasceu em Belém do Pará, a 05 de agosto de 1948.

Graduou-se em Agronomia pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), em dezembro de 1976.

Foi bolsista do Instituto do Desenvolvimento Econômico-Social do Pará (IDESP), no período de 1974 a 1976.

Participou do curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” em Agroengenharia (FCAP), em 1982.

Concluiu o curso de Pós-Graduação “Strictu Sensu” em Agronomia/ Fitotecnia “Mestrado”: ESALQ-USP, em 1995.

Iniciou o curso de Doutorado na Universidade Federal de Lavras – UFLA, em setembro de 1996.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos bons e adversos de minha vida.

A meus pais, pelo amor, carinho e amizade.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização deste Curso de Pós-Graduação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, pela liberação para a realização deste curso.

Ao Professor Moacir Pasqual, pela orientação, amizade e constante incentivo para a execução deste trabalho.

Aos professores, José Darlan Ramos, Samuel Pereira Carvalho e Nilton Nagib Jorge Chalfun, pelo auxílio, orientação e amizade.

Aos professores Paulo Luiz Contente de Barros e Waldenei Travassos de Queiróz, pela compreensão, carinho, amizade e constante incentivo neste trabalho.

Às colaboradoras e amigas: Renata da Silva Mann (Doutoranda) e Dinara Matioli de Lima (Bolsista) do Laboratório de Análise de Sementes, pela infinita colaboração na realização deste trabalho.

Aos laboratoristas Antônio Claret de Oliveira e Vantuil Antônio Rodrigues pelo apoio na realização dos trabalhos, a minha gratidão.

Aos funcionários do Pomar do Departamento de Agricultura a minha gratidão e amizade.

Aos alunos de Graduação: Daniela Rezende Finotti, Luciene de Oliveira Ribeiro e Rafael Pio, minha gratidão pela feliz colaboração neste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação a minha amizade e respeito, pelos momentos de troca de conhecimentos e de alegria.

Aos meus irmãos e cunhados, pelo carinho, presença e apoio pelo meu sucesso.

À minha mãe Alba Alves e a minha sogra Ritta dos Santos, pela ajuda material e espiritual durante a ausência de nossa família.

À minha esposa Ana Lucia e aos meus filhos Luana Maria e Luiz Guilherme, todo o meu amor e dedicação pelo sucesso alcançado na realização deste curso.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração, execução e término deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1 Introdução | 1 |
| 2 Referencial Teórico | 3 |
| 3 Referências Bibliográficas | 7 |
| CAPÍTULO 2: Cultivo <i>in vitro</i> de embriões imaturos de frutos de <i>Citrus reticulata</i> Blanco 'Poncã' oriundos de polinização natural: sais do meio MS e sacarose..... | 10 |
| 1 Resumo | 10 |
| 2 Abstract | 11 |
| 3 Introdução | 12 |
| 4 Material e Métodos | 15 |
| 5 Resultados e Discussão | 16 |
| 6 Conclusões | 26 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 27 |
| CAPÍTULO 3: Cultivo <i>in vitro</i> de embriões imaturos de frutos de <i>Citrus reticulata</i> Blanco 'Poncã' oriundos de polinização natural: pH e ágar..... | 29 |
| 1 Resumo | 29 |
| 2 Abstract | 30 |
| 3 Introdução | 31 |
| 4 Material e Métodos | 34 |
| 5 Resultados e Discussão | 35 |
| 6 Conclusões | 43 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 44 |

| | Página |
|---|--------|
| CAPÍTULO 4: Cultivo <i>in vitro</i> de embriões imaturos de frutos de <i>Citrus reticulata</i> Blanco 'Poncã' oriundos de polinização por <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck 'Pera': Fotoperíodo..... | 46 |
| 1 Resumo | 46 |
| 2 Abstract | 47 |
| 3 Introdução | 48 |
| 4 Material e Métodos | 51 |
| 5 Resultados e Discussão | 53 |
| 6 Conclusões | 58 |
| 7 Referências Bibliográficas | 59 |
| | |
| CAPÍTULO 5: Cultivo <i>in vitro</i> de embriões imaturos de frutos de <i>Citrus reticulata</i> Blanco 'Poncã' obtidos de polinização por <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck 'Pera': Armazenamento de frutos e sacarose | 62 |
| 1 Resumo | 62 |
| 2 Abstract | 63 |
| 3 Introdução | 64 |
| 4 Material e Métodos | 69 |
| 5 Resultados e Discussão | 71 |
| 6 Conclusões | 81 |
| 7 Referências Bibliográficas | 82 |

RESUMO

ALVES, Guilherme Pereira. **Resgate de embriões imaturos obtidos por polinização natural e controlada de tangerineira poncã.** Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Tese – Doutorado em Agronomia)*

Objetivou-se avaliar a influência de diversas concentrações de sais do meio MS, sacarose e ágar, níveis de pH, fotoperíodo e armazenamento de frutos no cultivo *in vitro* de embriões imaturos oriundos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco cv 'Poncã' obtidos de polinização natural e ou artificial por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv 'Pera'. Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Lavras (Lavras-MG, Brasil). Todos os embriões foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS, com 0,3 mg.L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico) e de 1.0 g.L⁻¹ de carvão ativado com os seguintes experimentos: 1) sais de MS (0,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0%), associados a diferentes concentrações de sacarose (0,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 g.L⁻¹); 2) concentrações de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g.L⁻¹), em meio ajustado a diferentes pHs (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7); 3) fotoperíodos de 8, 10, 12, 14, 16, 18 horas e luz contínua; 4) frutos armazenados em geladeira à temperatura de 5 ± 1°C por até 135 dias, sendo que a cada 15 dias uma amostra era retirada, seus embriões excisados e cultivados *in vitro*, em meio com sacarose nas concentrações (0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 e 24,0 g.L⁻¹). As características observadas foram: altura da parte aérea, número de folhas, peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca da parte aérea, comprimento de raiz, peso da matéria fresca das raízes e peso da matéria seca das raízes. Pode-se concluir que: melhores resultados foram obtidos com o uso de 100% dos sais do meio MS e 15-30 g.L⁻¹ de sacarose; melhor desenvolvimento em meio de cultura ajustado em pH 3,7-4,7 na ausência ou em baixas concentrações de ágar (3,5 g.L⁻¹); fotoperíodos com menores números de horas (8 a 14) proporcionaram melhor desenvolvimento da parte aérea e com maiores números de horas (14 a 24) proporcionaram melhor desenvolvimento do sistema radicular; frutos com 120 dias após a polinização podem ser armazenados por até 135 dias sem prejuízo da viabilidade dos embriões.

*Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), José Darlan Ramos – UFLA, Samuel Pereira Carvalho – UFLA

ABSTRACT

ALVES, Guilherme Pereira. Recovery of immature embryos obtained by natural and controlled pollination of poncã mandarin. Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Thesis - Doctorate in Agronomy)*

It was aimed to evaluate the influence of several concentrations of salts of the MS medium, sucrose and agar, pH levels, photoperiod and storage of fruits in the *in vitro* immature embryos culture of *Citrus reticulata* Blanco cv Poncã fruits obtained from natural or artificial pollination by *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Pera. The experiments were accomplished in the Universidade Federal de Lavras (Federal University of Lavras) Lavras-MG, Brazil. All the embryos were excised and inoculated individually in test tubes, containing 15 mL of the MS medium, with 0.3 mg.L⁻¹ gibberellic acid (GA₃) and 1.0 g.L⁻¹ activated charcoal with the following experiments: 1) MS salts (0.0; 25.0; 50.0; 100.0 and 200.0%), associated with different sucrose concentrations (0.0; 15.0; 30.0; 45.0 and 60.0 g.L⁻¹); 2) agar concentrations (0.0; 3.5; 7.0; 10.5 and 14.0 g.L⁻¹), in medium adjusted to different pHs (3.7; 4.7; 5.7 and 6.7); 3) photoperiods of 8, 10, 12, 14, 16, 18 hours and continuous light; 4) fruits stored in refrigerator at 5±1°C temperature for until 135 days, being that every 15 days a sample was removed, its embryos excised and *in vitro* cultivated in medium with sucrose at the concentrations (0.0; 1.5; 3.0; 6.0; 12.0; 18.0 and 24.0 g.L⁻¹). The evaluated characteristics were: aerial part height, number of leaves, fresh and dry matter of the aerial part weight, root length, and root fresh matter weight and root dry matter weight. It can be concluded that: better results were obtained with the use of 100% of the salts of the MS medium and 15-30 g.L⁻¹ sucrose; better development in culture medium adjusted in pH 3.7-4.7, either in the absence or at low concentrations of agar (3.5 g.L⁻¹); photoperiods with lower numbers of hours (8 to 14) provided better aerial part development and with higher numbers of hours (14 to 24) provided better development of the root system; fruits aged 120 days after the pollination can be stored for until 135 days without any damage to the viability of the embryos.

*Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Major Professor), José Darlan Ramos – UFLA, Samuel Pereira Carvalho - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A cultura dos citros é de grande importância para a economia brasileira, pois ocupa lugar de destaque no panorama internacional como o principal produtor de frutos cítricos e de suco de laranja concentrado congelado.

A produção nacional de frutos (laranjas e tangerinas) alcançou cerca de 115.486.931 toneladas em 1998, numa área colhida de 1.060.238 ha (IBGE, 1999).

Apesar desta liderança mundial de produção, a citricultura brasileira * apresenta uma série de problemas e entraves à sua maior competitividade no mercado externo. Dentre eles, pode-se citar apomixia, poliembrião, elevadas taxas de heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade masculina e feminina, além de longo período de juvenilidade e disseminação de viroses (Cameron e Frost, 1968; Soost e Cameron, 1975).

Além destes problemas, os melhoristas de citros deparam-se com * dificuldades para a distinção precoce de plântulas resultantes de embriões zigóticos, quando comparadas àquelas oriundas da multiplicação somática do tecido nucelar que se desenvolve em uma mesma semente. Isso leva a compreender a necessidade de desenvolver plântulas que cheguem até a frutificação, envolvendo um considerável período de cinco ou mais anos, para que os embriões zigóticos possam ser identificados (Ramos, 1990).

Diante desse contexto, os objetivos principais buscados pelo * melhoramento dos citros em todo o mundo têm sido maior resistência ao frio, resistência às moléstias (gomose, cancrose, leprose, entre outras), melhor coloração dos frutos, ampliação do período de safra, menor número de sementes, porte menor, tolerância à tristeza e efeito ornamental (Moreira e Pio, 1991),

adaptação de cultivares (Vasquez Araujo, 1991) e aumento da produtividade (Machado et al., 2000).

Uma das metas para o melhoramento de citros no Brasil é obter copas de variedades (tangerinas) ou híbridos (tangor) de alto valor comercial que possibilitem conviver com o cancro cítrico (Moreira e Pio, 1991).

✱✱ A inclusão do grupo das tangerineiras e seus híbridos se deve ao fato de as mesmas apresentarem boa resistência ao frio quando comparadas a outras espécies ou variedades cítricas cultivadas comercialmente. Desse grupo, a tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) possui diversas características desejáveis, como alta produtividade, podendo atingir 250 kg por planta, frutos de forma achatada, com 5 a 8 sementes e com massa média de 138 g, de cor alaranjada forte. O suco corresponde a 43% da massa do fruto, com teores médios de brix - 10,8%, acidez -0,85% e "ratio" de 12,7. A cultivar apresenta maturação dos frutos de meia estação de maio a julho (Figueiredo, 1991). Existe a possibilidade desta cultivar possuir resistência à CVC (clorose variegada dos citros).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do programa de melhoramento, não necessariamente no desenvolvimento direto de novos cultivares (Ferreira et al., 1998).

Dentre as aplicações da cultura de tecidos no melhoramento, têm-se a cultura de embriões, que é usada para a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis; micropropagação clonal; superação de dormência e esterelidade de sementes e estudo da fisiologia de embriogênese (Hu e Ferreira, 1998).

Este trabalho teve como objetivo estudar a obtenção de plântulas de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' através da cultura de embriões imaturos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Melhoramento genético de citros

Diversas instituições de pesquisa, tanto nacionais como internacionais, interessam-se em realizar estudos que possam servir de sustentação para o desenvolvimento do melhoramento genético de citros. Poucos são, entretanto, os conhecimentos disponíveis sobre o controle genético da grande maioria dos caracteres relacionados a esse importante grupo de plantas.

Devido a elevada heterosigose observada nos citros, em progênie de natureza zigótica proveniente de hibridações, os caracteres fenotípicos, não são uniformes, conforme se verifica por uma ampla variação de fenótipos na geração F_1 , sendo a ocorrência de herança simples raramente verificada (Furr, 1969). Ocasionalmente, há segregação de um caráter em progênie de citros, indicando a ação de um ou poucos genes (Soost e Cameron, 1975). A grande variabilidade das progênie zigóticas parece ser constante em todos as cultivares que produzem embriões nucelares, sendo constatada mesmo quando os pais são da mesma espécie, de espécies diferentes ou gêneros diferentes. Às vezes, as diferenças entre plantas zigóticas de mesmos pais, devido à alta heterozigose, são maiores entre si do que entre duas variedades. Frequentemente, porém, os híbridos apresentam caracteres semelhantes aos dos pais ou parentes próximos.

Os maiores objetivos do melhoramento genético de citros têm sido: obtenção de variedades porta-enxertos ananizantes com a finalidade de diminuir os espaçamentos e, conseqüentemente, aumentar o estande e a produtividade; obtenção de variedades porta-enxertos resistentes ou tolerantes à seca e salinidade e de variedades copas precoces e meia estação (Hoffmann e Fachinelo, 1980; Pompeu Junior, Figueiredo e Pio, 1983; Koller, 1994).

Há necessidade de intensificar esforços no sentido de se obter maior

variabilidade, principalmente com porta-enxertos, pois o uso generalizado de *Citrus limonia* Osbeck 'Cravo' acarreta grande vulnerabilidade genética (Passos, 1980).

As perspectivas de condução de um trabalho de melhoramento de citros (Machado et al., 2000), são favoráveis pelas seguintes razões: a) alta demanda do setor produtivo por plantas com tolerância à clorose variegada dos citros (CVC), tristeza, gomose e principais pragas; b) a existência de um banco de germoplasma com alta variabilidade genética a ser explorada, que são usados em algumas etapas do programa de melhoramento.

A poliembrionia é um fenômeno comum em muitas espécies e cultivares dos gêneros *Citrus* (incluindo *Poncirus* e *Fortunela*), *Mangifera* e *Syzigium* que possuem característica de reproduzir-se agamicamente por apomixia e poliembrionia, formando vários embriões a partir da diferenciação de células individuais do nucelo. Via de regra, as progênes constituem-se em mistura de híbridos e de clones nucleares idênticos ao progenitor feminino e em consequência disso, surge a dificuldade de identificação das plantas híbridas originadas de cruzamento controlado (Ballve et al., 1991).

Existe, em citros, elevado grau de heterozigose devido à polinização cruzada, facilidade de mutações espontâneas e prevalectimento da poliembrionia. Alelos recessivos são acumulados, tendo a poliembrionia um papel importante na diferenciação evolucionária (Cameron e Frost, 1968).

2.2 Cultura de Tecidos

O princípio básico da cultura de tecidos é a aplicação da totipotência celular, isto é, regenerar plantas a partir de células isoladas não diferenciadas ou a partir de órgãos e tecidos vegetais. Tais células, colocadas em um meio apropriado, podem dividir-se indefinidamente e até diferenciar-se, o que irá propiciar a regeneração de parte da planta ou então da planta inteira. Desta

forma, milhares de clones podem ser produzidos a partir de uma ou algumas células (Ramalho et al., 1997).

Ramalho et al. (1997) enfatizam que a cultura de tecidos é uma forma de multiplicação assexuada visando a propagação de determinadas plantas. A diferença fundamental é que a cultura de tecidos possibilita a multiplicação do indivíduo a partir de uma única célula ou de um pequeno número de células, sendo, desta forma, uma importante ferramenta não só na genética e melhoramento de plantas, como também em inúmeras outras áreas da agricultura.

Devido aos inúmeros problemas apresentados pelo gênero *Citrus* como esterilidade gamética, longo período juvenil, incompatibilidade gamética e poliembrionia, a biotecnologia apresenta alternativas viáveis que podem quando utilizadas racionalmente, ser uma ferramenta valiosa, principalmente em trabalhos de melhoramento (Ramos, 1990).

Atualmente, a cultura de tecidos em citros já se encontra bastante difundida, com trabalhos que vão desde a micropropagação (Pinto et al., 1988; Ramos et al. 1996) até a obtenção de mutantes resistentes às condições estressantes através da irradiação gama em protoplastos (Ramos, 1990).

2.3.1 Cultura de embriões

Esta terminologia tem sido empregada para descrever os processos de desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (Rappaport, 1954). Entretanto, é necessário ressaltar que, no estudo da embriogênese *in vitro* ou *in vivo*, devem-se incluir os embriões de origem não zigótica como os originários das células somáticas (nucelos ou calo); embriões originários do pólen via androgênese e aqueles originários da oosfera não fertilizada ou outras células do saco embrionário (Hu e Ferreira, 1998).

O meio de cultura mais utilizado para a cultura de embriões é o MS (Murashige & Skoog, 1962), com algumas variações de hormônios, dependendo do genótipo e estágio do embrião, sendo que quanto mais jovem for o embrião, mais complexa será a exigência nutricional que permita o seu desenvolvimento (Hu e Ferreira, 1998) e menor será a taxa de germinação (Bruck e Walker, 1985).

A elevada taxa de poliembrionia, generalizada entre as espécies do gênero *Citrus* (Soost et al., 1980), que resulta normalmente em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre eles pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos, é um dos entraves à exploração de cruzamentos por polinização controlada. A cultura de embriões é uma prática de grande importância no melhoramento de citros, possibilitando o resgate de embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos interespecíficos (Soost et al., 1980).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P et al. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, abr., 1991.
- BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. Cell determination during embriogenesis in *Citrus jambhiri*. II. Epidermal differentiation as a out-time event. *American Journal of Botany*, Baltimore, v.72, n.10, p.1602-1609, Oct., 1985.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics breeding and nucellar embriony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (ed.). *The Citrus Industry*. Berkeley, University of California Press, v.2, p.325-370, 1968.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Aplicações a cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p.21-43.
- FIGUEIREDO, I.O. de. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; PONPEU JR., I.; AMARO, A.A. *Citricultura brasileira*. Campinas: Fundação CARGILL, v.1, p.228-264, 1991.
- FURR, J.R. Citrus breeding for the arid South-Western United States. In: CHAPMANN, H.D. *Proceedings of the First International Citrus Symposium*. Riverside, Riverside Color Press, 1969, v.1, p.191-197.
- HOFFMANN, S.M.; FACHINELLO, J.C. Uso de porta-enxertos em fruticultura. *Agros*, Pelotas, v.15, n.1, p. 21-38, 1980.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPH, v.2, p.371-393, 1998.
- KOLLER, O.C. *Citricultura: laranja, limão, tangerina*. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.

- IBGE. (Rio de Janeiro, RJ). **Produção nacional de laranja em 1998.** <http://www.ibge.gov.br>, 10 de nov. de 1999.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; COLETTA FILHO, H.D. et al. Melhoramento de citros para resistência à doença. In: BRUCKNER, C.H. et al. (eds.). **II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS**, Viçosa, UFV, *Anais...*, mar. 2000, p.82-86.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; PONPEU JR., I.; AMARO, A.A. *Citricultura brasileira*. Campinas: Fundação CARGILL, 1991, v.1, p.228-264.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASSOS, O.S. **Melhoramento de citros na Califórnia (EUA) e sugestões para a citricultura brasileira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1980. 9p.
- PINTO, J.E.B.P.; BARBOSA, M.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação *in vitro* do porta-enxerto 'Cravo' por cultura de segmentos nodais e internodais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. *Anais...* Campinas: SBF, v.1, p.401-406, 1988.
- POMPEU JÚNIOR, I.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, M.R. Melhoramento de variedades copas e porta-enxertos. In: SEMANA DA CITRICULTURA, 5, Cordeirópolis, 1983. *Anais...* Cordeirópolis: EEL-IAC, 1983. n.4, p.305-318.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**. 6.ed. São Paulo: Globo, 1997. 359p.
- RAMOS, J.D. Taxa de poliembrionia e identificação do embrião sexual *in vitro* dos porta-enxertos *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Lavras: ESAL, 1990. 73p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; ANTUNES, I.E.C. Efeito do triadimenol e da benzilaminopurina na multiplicação de brotos *in vitro* do porta-enxerto 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. Ex. Tan.). *Revista Ceres*, Viçosa, v.243, n.43, p.147-156, 1996.

- RAPPAPORT, J. *In vitro* cultures of plant embryos and factors controlling their growth. **Botanical Review**, Bronx, v.20, p.201-225, 1954.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette, Indiana, Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- SOOST, R.K.; WILLIAMS, T.E.; TORRES, A.W. Identification of nucelar and zygotic seedlings of *Citrus* with leaf isozymes. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.6, p.728-729, 1980.
- VÁSQUEZ ARAÚJO, J.E. Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus spp*) mediante características morfológicas. Cruz das Almas: EAUFBA, 1991. 74p. (Dissertação-Mestrado em Agonomia).

CAPÍTULO 2

1 RESUMO

ALVES, Guilherme Pereira. *Cultivo in vitro* de embriões imaturos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' oriundos de polinização natural: sais do meio MS e sacarose. Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Tese - Doutorado em Agronomia)

Objetivou-se estudar a influência dos sais do meio MS e da sacarose no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) oriundos de polinização natural. O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) e os tratamentos consistiram dos níveis de sais 0,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0%, associados a diferentes concentrações de sacarose (0,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 g.L⁻¹), acrescidos de 0,3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e de 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. Estes tratamentos ficaram por 48 horas no escuro e depois em sala de crescimento à temperatura de 27±1°C, com 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de 35 μmol.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 3 tubos com 15 mL do meio de cultura, em esquema fatorial 5x5. Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base nas seguintes características: altura da parte aérea, número de folhas, comprimento das raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea, peso da matéria fresca e seca das raízes. Foram observadas influências da sacarose e dos níveis de sais do meio MS, no crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea como no sistema radicular das plântulas originadas de embriões de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã'. Melhores resultados para as variáveis relacionadas à parte aérea foram obtidos com o uso de 100% dos sais do meio MS e 15-30 g.L⁻¹ de sacarose. As variáveis relacionadas com o desenvolvimento do sistema radicular apresentaram melhores resultados com o uso de 100% dos sais do meio MS na ausência ou com 15 g.L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: Rutaceae, *Citrus reticulata*, citricultura, cultura de tecidos, cultura de embriões, melhoramento.

2 ABSTRACT

ALVES, Guilherme Pereira. *In vitro* culture of *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' immature embryos from natural pollination: MS medium salts and sucrose. Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Thesis - Doctorate in Agronomy).

It was sought to study the influences of the MS medium salts and of the sucrose in the *in vitro* culture of immature embryos of mandarin fruits 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) from natural fertilization. The used culture medium was the MS and the treatments consisted of its levels of salts (0.0; 25.0; 50.0; 100.0 and 200.0%), associated with different sucrose concentrations (0.0; 15.0; 30.0; 45.0 and 60.0 g.L⁻¹), added with 0.3 mg.L⁻¹ gibberellic acid (GA₃) and 1.0 g.L⁻¹ activated charcoal. Those treatments remained for 48 hours in darkness, and afterwards in growth room at the temperature of 27 ± 1°C with a daily 16-hour photoperiod and light intensity of 35 μ.mol.m⁻².s⁻¹. The statistical analysis used was entirely randomized, with four replicates, each one constituted by three tubes with 15 mL of the culture medium, in 5 × 5 factorial scheme. After 60 days, the seedlings were evaluated on the basis of the following characteristics: height of the aerial part, number of leaves, length of the roots, weight of the fresh and dry matter of the aerial part, weight of the fresh and dry matter of the roots. Influences of sucrose and the levels of salts in the MS medium on the growth and development of the aerial part of the seedlings, root system from embryos of *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã'; Better results for the variables related to the aerial part are obtained with the use of 100% of the MS medium salts and 15-30 g.L⁻¹ sucrose. The variables related to the root system development present better results with 100% of the MS medium salts in the absence or with 15 g.L⁻¹ sucrose.

Key words: Rutaceae, mandarin fruits, citrus culture, embryo culture, tissue culture, Biotechnology, improvement.

3 INTRODUÇÃO

Os meios de cultivos devem suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com substâncias essenciais como macro e micronutrientes para o crescimento das células. A formulação salina de Murashige e Skoog (1962) – MS é uma das mais usadas como meio básico para a cultura de embriões. Utiliza-se também um carboidrato que fornece energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o desenvolvimento celular. Os carboidratos desempenham importante papel na manutenção de osmolaridade adequada do meio de cultura. Geralmente utiliza-se sacarose, pois esse açúcar suporta altas taxas de crescimento de espécies e é a fonte comum de cadeia carbonada energética usada (Hu e Ferrerira, 1990).

Freqüentemente, a origem do embrião e o meio de cultura são fatores que aliados ao conhecimento prévio das células e tecidos cultivados causam o sucesso da cultura *in vitro* (Gamborg, 1982). Diversas formulações de meio têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. A diferença básica entre estas formulações está na concentração dos sais utilizados. O meio MS é seguramente o de maior utilização na cultura de tecidos da maioria das espécies atualmente estudadas, sendo seguido pelo de Gamborg - B₅ (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). O meio MS é muito rico em sais e é freqüentemente utilizado na fase de multiplicação e como meio básico para os trabalhos de cultura de embriões, mas pode causar toxidez e outros problemas fisiológicos em algumas espécies (Sato, 1994). Todavia, na procura de otimizar o crescimento *in vitro*, modificações visando melhor adaptá-lo às exigências dos explantes são usualmente utilizadas.

As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂, e às vezes não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente

o crescimento (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

Apesar de não realizarem fotossíntese, células de *Acer* em suspensões de baixa densidade exigiram CO₂ na atmosfera do vasilhame durante a incubação para crescerem (Gathercole et al., 1976 citados por Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). O CO₂ foi incorporado nos ácidos málico e glutâmico, principalmente. Portanto, as células possuem o potencial para a fotossíntese *in vitro*, mas o crescimento da maioria das culturas é sustentado pelas fontes de carboidratos adicionados ao meio. Os carboidratos, nas concentrações efetivas do meio de cultura, podem estimular determinado processo e inibir outro, e muitas vezes as concentrações utilizadas para promover o crescimento dos explantes são inibitórias para a síntese de clorofila (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). Entre os carboidratos, a sacarose é a mais utilizada, seja pela sua alta solubilidade ou pela rápida metabolização. A faixa de concentração normalmente empregada varia de 1 a 5% (Pierik, 1987). Abaixo disso, ocorre clorose generalizada, e acima ocorre excessivo potencial osmótico, deteriorando as culturas (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990; Grattapaglia e Machado, 1990).

Os carboidratos podem sofrer variações com a autoclavagem (Pierik, 1987). A hidrólise ou caramelização do açúcar ocorre em autoclavagem excessiva, conferindo uma coloração escura ao meio, devido a formação de compostos escuros e de alto peso molecular, capazes de inibir o crescimento celular (Smith, 1992). A autoclavagem hidrolisa uma pequena parte da sacarose inicial em glicose e frutose (Mezzetti, Conte e Rosati, 1991), entretanto não ocasiona qualquer redução no teor total de carboidratos do meio (Singha, Oberly e Townsend, 1987).

Na cultura de embriões, é importante evitar a sua germinação precoce *in vitro*, pois as plântulas resultantes serão anormais ou fracas, podendo faltar estruturas ou só aparecem aquelas presentes no momento da excisão (Sharma, Kaur e Kumar, 1996). A germinação precoce pode ser evitada de várias formas,

tais como alta pressão osmótica, baixa tensão de oxigênio, elevado nível de potássio e de nitrogênio, inclusão ao meio de ácido abscísico (ABA), além de polietilenoglicol (Andreoli, 1985). Segundo Pasqual e Pinto (1988), meios com alta concentração de sacarose têm sido usados para minimizar esse processo. Cultura *in vitro* de diferentes estádios de desenvolvimento do embrião de *Datura* requerem distintas concentrações de sacarose (8-12%) para crescimento, e na maturidade o embrião pode crescer em meio desprovido de sacarose (Hu e Ferreira, 1998). Entretanto, para os citros, concentrações ótimas podem variar de 2-7% de acordo com o tipo de explante utilizado (Navarro, Ortiz e Juarez, 1985).

O aumento da disponibilidade de carbono facilmente assimilável, como a sacarose, aumenta a síntese de celulose e hemicelulose (Silva et al., 1993).

Depois da sacarose, os minerais representam o grupo mais importante do meio de cultura. Geralmente, a concentração de macronutrientes é a que mais sofre variações com o propósito de alcançar uma taxa de multiplicação adequada (Pierik, 1987).

A alta concentração de sais do meio MS, comparada a outros meios, e especificamente aos níveis de amônio (NH_4) e nitrato (NO_3^-), pode ser crítica no processo de morfogênese e crescimento (Sakuta e Komamine, 1987).

Nitratos de potássio e de amônio são as fontes de nitrogênio inorgânico mais frequentemente usadas. A utilização de nitrogênio numa destas duas formulações depende da espécie e do grau de maturidade do embrião. O emprego da amônia favorece, ou é necessário, para embriões de orquídeas, *Datura* e *Capsella*, enquanto o nitrato é benéfico para embriões de *Corchorus* e crucíferas. Quando a amônia é adicionada no meio de cultura de embrião, é preferível combiná-la com ácido orgânico, especialmente málico ou cítrico (Hu e Ferreira, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência de sais do meio MS e da sacarose no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). Foram utilizados frutos de polinização natural com aproximadamente 120 dias de idade, coletados em plantas de tangerineiras 'Poncã' previamente selecionadas. As sementes foram removidas e tratadas com álcool 70% por cinco minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio 2% por vinte minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água destilada e autoclavadas.

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 (Ribeiro, 1997).

Todos os embriões, independentemente dos estádios em que se encontravam, foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio Murashige e Skoog (1962) com diferentes concentrações de sais (0,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0%) do meio MS, acrescido de sacarose (0,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 g.L⁻¹) e de 0,3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e de 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado, em todas as combinações possíveis. Esses tratamentos, após permaneceram 48 horas no escuro, foram transferidos para sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1°C com fotoperíodo de 16 horas diárias e intensidade luminosa de 35 µmol.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 3 tubos com 15 mL do meio de

cultura, em esquema fatorial 5x5.

Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base nas seguintes características: altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA), comprimento das raízes (CR), peso da matéria fresca das raízes (PMFR) e peso da matéria seca das raízes (PMSR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está apresentado o resumo da análise de variância dos testes utilizados para a avaliação de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose.

TABELA 1 - Resumo da análise de variância para APA, NF, PMFPA, PMSPA, CR, PMFR e PMSR, de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

| Causa de Variação | G.L | QM | | | | | | |
|-------------------|-----|--------|---------|-----------|----------|---------|----------|----------|
| | | APA | NF | PMFPA | PMSPA | CR | PMFR | PMSR |
| Sais | 4 | 7,79** | 47,34** | 1843,82** | 168,12** | 15,14** | 728,49** | 130,07** |
| Sacarose(S) | 4 | 0,69* | 4,43** | 440,71** | 10,49** | 2,22** | 1,93** | 10,66** |
| Sais x S | 16 | 0,35** | 4,54** | 484,43** | 13,57** | 2,14** | 22,84** | 23,02** |
| Residuo | 75 | 0,05 | 0,13 | 3,19 | 0,37 | 0,05 | 0,19 | 0,05 |
| % | | 16,2 | 9,9 | 9,4 | 9,9 | 15,6 | 5,0 | 6,3 |

* e **: significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Houve efeito significativo tanto para sais e sacarose como para a interação entre os dois fatores, a 1% de probabilidade, em todas as variáveis

testadas (Tabela 1).

A análise de regressão para altura da parte aérea (Figura 1) mostra que o aumento da concentração de sais do meio MS até o nível de 100% promove um correspondente incremento no desenvolvimento das plântulas, em todas as concentrações de sacarose utilizadas. O melhor resultado foi alcançado com 100% dos sais associados a $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose. Houve redução na altura da parte aérea em concentrações de sais superiores a 100% do meio MS, para todas as concentrações de sacarose, exceto com 60 g.L^{-1} , que com maior nível de sais (200%), mostrou um crescente aumento da altura da parte aérea.

Os resultados obtidos demonstram que o meio MS, nas concentrações originais de sais (100%) e de sacarose (30 g.L^{-1}), promove suficiente desenvolvimento da parte aérea de plantas oriundas de embriões imaturos de citros. O menor crescimento da parte aérea verificado em níveis mais elevados de sais foi atribuído à provável toxidez e outros problemas de origem fisiológica, apontados por Sato (1994) quando do uso do meio MS para determinadas espécies. A constatação de que na ausência, bem como em concentrações inferiores e superiores a 30 g.L^{-1} de sacarose, ocorre menor crescimento da parte aérea, corrobora as afirmações de Caldas, Haridasan e Ferreira (1998) de que nas concentrações efetivas do meio de cultura, os carboidratos podem estimular determinados processos e inibir outros. E muitas vezes as concentrações utilizadas para promover o crescimento dos explantes podem ser inibitórias para a síntese de clorofila.

Outro fato que precisa ser levado em conta é que foram utilizados embriões em diferentes fases de desenvolvimento, os quais, por conseguinte têm exigências diferentes quanto ao potencial osmótico.

$$\begin{aligned}
 (0 \text{ g.L}^{-1}) Y_1 &= 0,5085 + 2,0338 X - 0,8033 X^2 \\
 (15 \text{ g.L}^{-1}) Y_2 &= 0,3743 + 3,2667 X - 1,4158 X^2 \\
 (30 \text{ g.L}^{-1}) Y_3 &= 0,4458 + 4,1354 X - 1,7953 X^2 \\
 (45 \text{ g.L}^{-1}) Y_4 &= 0,4055 + 2,3653 X - 0,9165 X^2 \\
 (60 \text{ g.L}^{-1}) Y_5 &= 0,4080 + 2,2019 X - 0,7510 X^2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 &= 72.6 \\
 R^2 &= 97.6 \\
 R^2 &= 95.1 \\
 R^2 &= 90.8 \\
 R^2 &= 96.0
 \end{aligned}$$

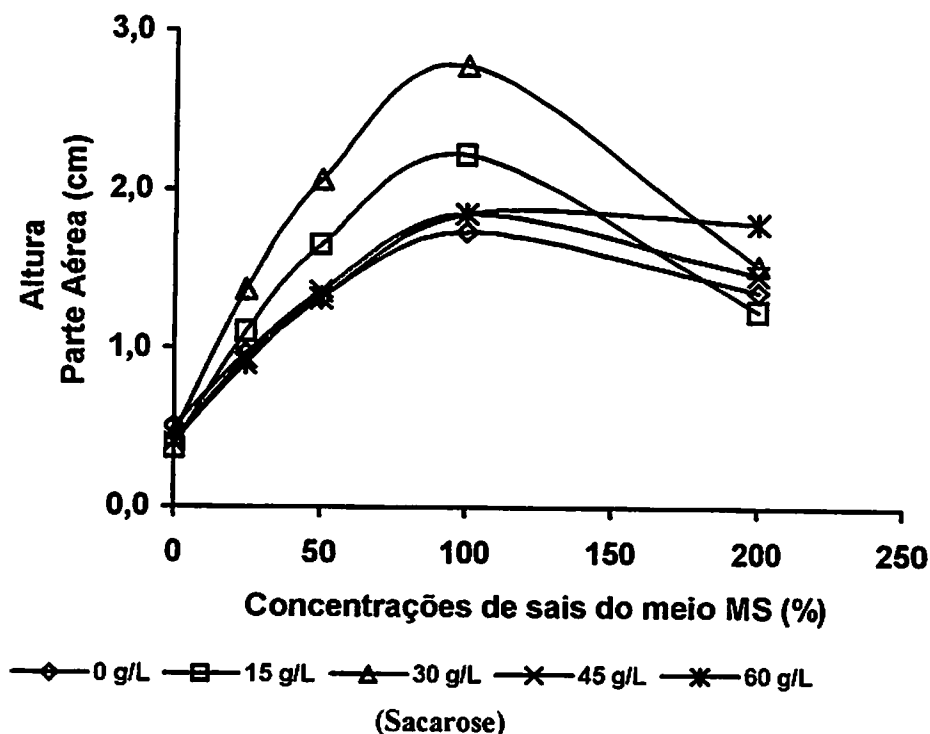


FIGURA 1. Altura da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Para a variável número de folhas (Figura 2), a análise de regressão mostra que o melhor resultado foi verificado com 100% de sais, porém com 15,0 g.L⁻¹ de sacarose. Verificou-se tendência de decréscimo no número de folhas em concentrações de sais superiores a 100% do meio MS, em todas as concentrações de sacarose.

(0 g/L) $Y_1 = 2,0009 + 4,6349 X - 2,0778 X^2$
 (15 g/L) $Y_2 = 1,3365 + 10,2677 X - 5,0117 X^2$
 (30 g/L) $Y_3 = 0,8529 + 7,9793 X - 3,4722 X^2$
 (45 g/L) $Y_4 = 1,1337 + 7,7977 X - 3,3479 X^2$

$R^2 = 80,9$
 $R^2 = 99,9$
 $R^2 = 96,9$
 $R^2 = 83,9$

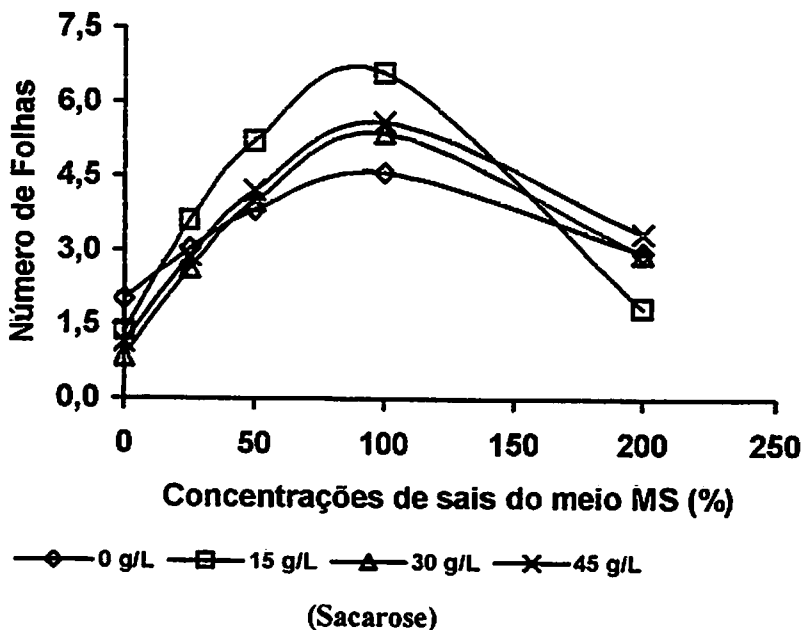


FIGURA 2. Número de folhas de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Para a variável peso da matéria fresca da parte aérea, observa-se pela Figura 3, que os resultados obtidos demonstram que com 100% de sais do meio MS, o melhor desenvolvimento foi verificado com a concentração 15,0 g.L⁻¹ de sacarose. Tanto para 15,0 como para 30,0 g.L⁻¹ de sacarose houve tendência de aumento no peso da matéria fresca da parte aérea até a concentração de 100% dos sais de MS e conseqüente redução em níveis mais elevados. Usando-se 60 g.L⁻¹ de sacarose, registrou-se aumento do peso da matéria fresca até a concentração de 50% de sais. Posteriormente verificou-se um decréscimo ao

nível de 100% de sais e, finalmente, registrou-se um leve aumento no desenvolvimento até o nível 200% de sais do meio MS

$$\begin{array}{ll}
 (15 \text{ g/L}) Y_1 = 4,3600 + 84,9855 X - 39,2838 X^2 & R^2 = 91,9 \\
 (30 \text{ g/L}) Y_2 = 6,8231 + 7,2797 X + 43,4877 X^2 - 22,5859 X^3 & R^2 = 86,3 \\
 (60 \text{ g/L}) Y_3 = 2,7161 + 68,9322 X - 84,0852 X^2 + 27,0295 X^3 & R^2 = 98,3
 \end{array}$$

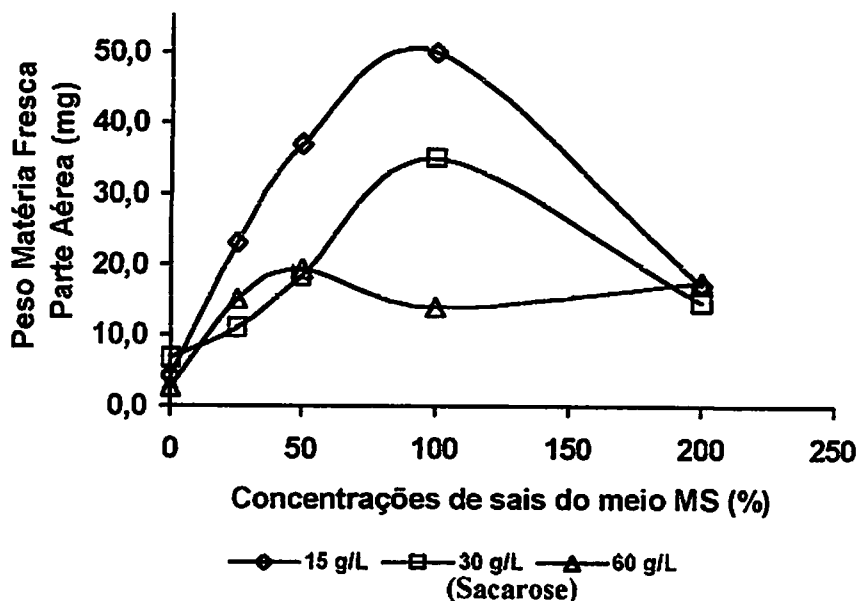


FIGURA 3. Peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Para o peso da matéria seca da parte aérea (Figura 4), os melhores resultados foram obtidos com 100% de sais do meio MS, na concentração de 15 g.L⁻¹ de sacarose. Registrou-se tendência de aumento no peso da matéria seca da parte aérea até a concentração de 100% dos sais de MS e uma redução em concentrações superiores.

Houve redução também no peso da matéria seca da parte aérea como consequência do aumento das concentrações de sacarose. Estes dados concordam com afirmações de Hoffmann (1999) de que há decréscimo no

número de folhas e raízes em decorrência da elevação da concentração de sacarose, de 15 para 60 g.L⁻¹, em microestacas de macieira. Estes dados devem estar associados à ocorrência de vitrificação, pois, carboidratos podem afetar o estado hídrico dos explantes.

| | |
|--|--------------|
| (0 g/L) $Y_1 = 1,9515 + 14,7254 X - 6,3968 X^2$ | $R^2 = 74,3$ |
| (15 g/L) $Y_2 = 1,4634 + 21,1540 X - 9,5896 X^2$ | $R^2 = 96,9$ |
| (30 g/L) $Y_3 = 1,9992 + 16,3554 X - 7,3676 X^2$ | $R^2 = 93,2$ |
| (45 g/L) $Y_4 = 2,8381 + 9,3563 X - 4,1330 X^2$ | $R^2 = 78,1$ |
| (60 g/L) $Y_5 = 2,0309 + 20,6260 X - 23,3576 X^2 + 6,9552 X^3$ | $R^2 = 71,1$ |

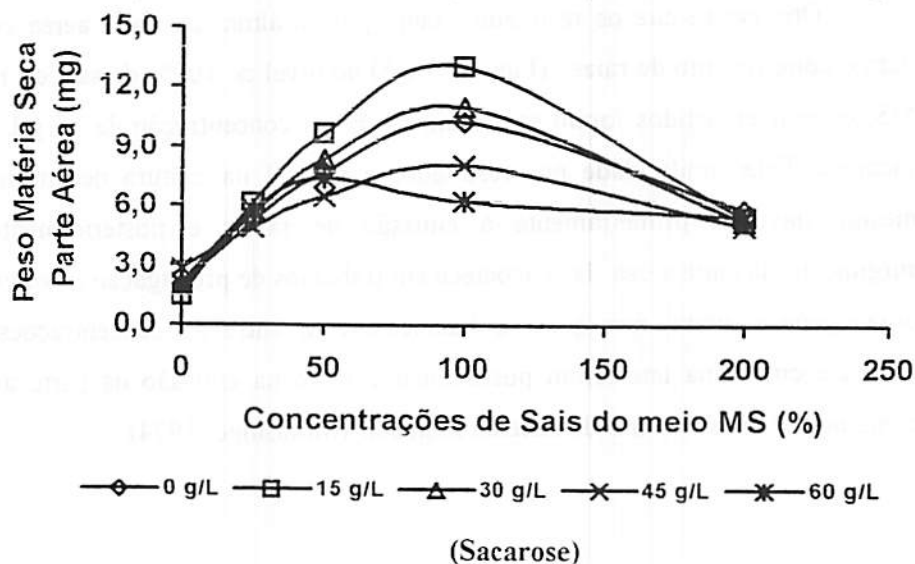



FIGURA 4. Peso da matéria seca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira ‘Poncã’ cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Considerando que a matéria seca é constituída principalmente pelos carboidratos insolúveis presentes na parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), o aumento da disponibilidade de carbono facilmente assimilável, como a sacarose, aumenta a síntese destes compostos até determinado limite. Estas frações, denominadas “sistemas de proteção”, foram estudadas por Silva et al.



(1993) em mudas micropropagadas de amora-preta. Os autores observaram maiores teores de celulose e hemicelulose em plantas aclimatizadas. Teores reduzidos destes compostos foram associados com a elevada sensibilidade a estresses em plantas cultivadas *in vitro*.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que com aumento dos níveis de sais do meio MS até 100%, houve um significativo incremento no comprimento de raízes para todas as concentrações de sacarose. O melhor resultado foi alcançado com 100% de sais, porém com 15,0 g.L⁻¹ de sacarose.

Observa-se que os resultados, tanto para a altura da parte aérea como para o comprimento de raízes (Figuras 1 e 5) no nível de 100% de sais do meio MS, os índices obtidos foram semelhantes, com a concentração de 15 g.L⁻¹ de sacarose. Esta similaridade nos resultados é normal na cultura de embriões, mesmo havendo primeiramente a emissão de raízes e posteriormente o surgimento da parte aérea. Isso acontece em trabalhos de propagação *in vitro* via organogênese direta, nos quais o balanceamento entre as concentrações de auxina e citocinina interferem positivamente tanto na emissão da parte aérea como no desenvolvimento do sistema radicular (Murashige, 1974).

| | |
|---|--------------|
| (0 g/L) $Y_1 = -0.5035 + 4.7133 X - 1.9374 X^2$ | $R^2 = 81.2$ |
| (15 g/L) $Y_2 = 0.3968 + 5.0879 X - 2.3167 X^2$ | $R^2 = 75.1$ |
| (30 g/L) $Y_3 = 0.2055 + 3.2991 X - 1.4209 X^2$ | $R^2 = 88.9$ |
| (60 g/L) $Y_4 = 0.1173 + 3.7973 X - 1.5421 X^2$ | $R^2 = 71.0$ |

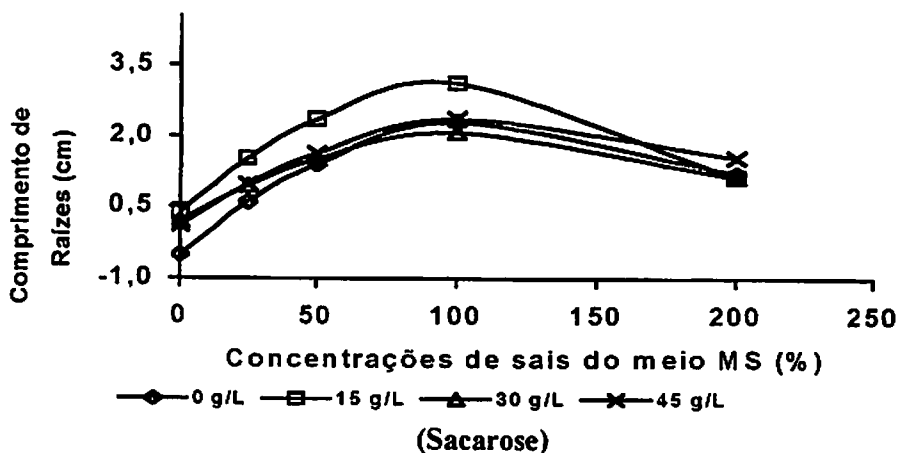


FIGURA 5. Comprimento de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Observa-se, pela Figura 6, um significativo aumento do peso da matéria fresca de raízes com a elevação da concentração de sais até o nível de 100%, para todas as concentrações de sacarose, exceto na concentração de 60 g.L⁻¹. Na concentração 60 g.L⁻¹ de sacarose, o melhor nível de sais foi 50%.

Independentemente da concentração de sacarose utilizada, o aumento dos níveis de sais acima de 100% do meio MS promoveu suave redução do peso da matéria fresca de raízes, exceto na concentração de 60 g.L⁻¹.

É importante ressaltar que tanto para o peso da matéria fresca da parte aérea como para o peso da matéria fresca das raízes (Figuras 3 e 6) na concentração de 60 g.L⁻¹ de sacarose, os resultados foram semelhantes ao nível de 50% de sais do meio MS.

| | |
|--|--------------|
| (0 g/L) $Y_1 = -1,7154 + 29,4180 X - 10,7487 X^2$ | $R^2 = 83,0$ |
| (15 g/L) $Y_2 = -0,4554 + 25,6887 X - 9,6034 X^2$ | $R^2 = 99,0$ |
| (30 g/L) $Y_3 = 0,2414 + 23,8689 X - 9,2221 X^2$ | $R^2 = 90,1$ |
| (45 g/L) $Y_4 = 1,6038 + 18,4214 X - 6,7340 X^2$ | $R^2 = 88,9$ |
| (60 g/L) $Y_5 = -1,0400 + 53,3059 X - 59,1610 X^2 + 17,9635 X^3$ | $R^2 = 87,5$ |

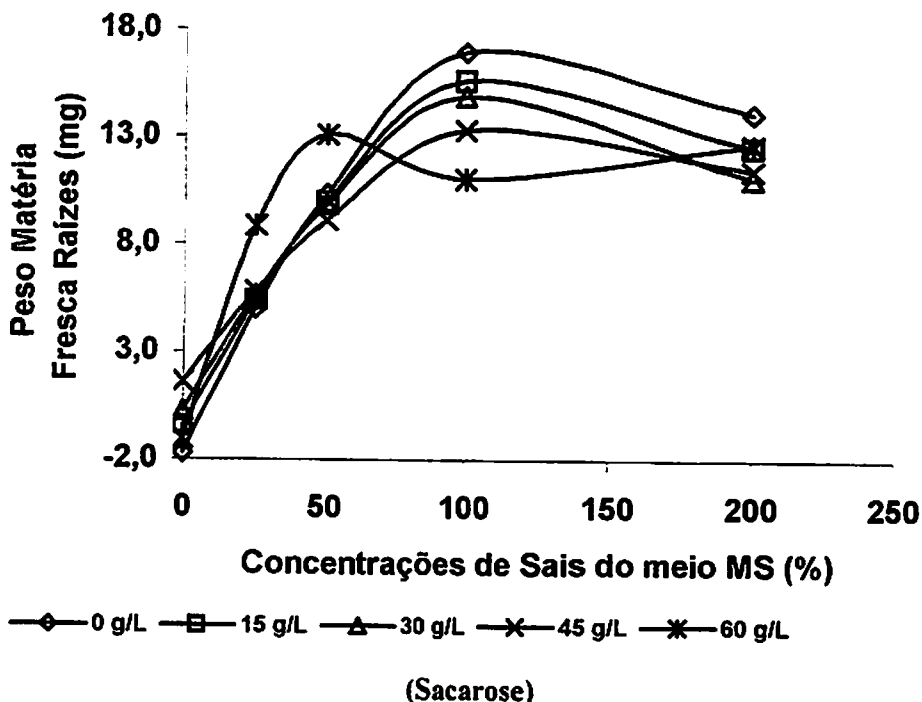


FIGURA 6. Peso da matéria fresca das raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Os dados verificados para a variável peso da matéria seca de raízes (Figura 7) evidenciam significativo aumento até o nível de 100% de sais do meio MS e redução em níveis mais elevados, nas concentrações 0,0; 15,0 e 30,0 g.L⁻¹ de sacarose. O melhor resultado foi atingido na ausência de sacarose com 100% dos sais do meio MS.

Observa-se que para as variáveis peso da matéria fresca (Figura 3) e seca (Figura 4) da parte aérea e peso da matéria fresca (Figura 6) e seca (Figura 7) das raízes, houve certa similaridade nos dados ao nível de 50% de sais do meio

MS, na concentração de 60,0 g.L⁻¹ de sacarose. Pode-se notar que a formação do sistema radicular exigiu menores concentrações de sacarose em relação ao desenvolvimento da parte aérea. As plântulas na fase de enraizamento começam a apresentar atividade fotossintética, pois, possuem folhas clorofiladas e podem crescer em meio livre de açúcar, desde que sejam proporcionadas maiores concentrações de CO₂ dentro do frasco e intensidade luminosa (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). Nestas condições, a sacarose tende a inibir a atividade da enzima Ribulose-1-5-Bifosfato Carboxilase Oxigenase; portanto, a eficiência fotossintética. Neste experimento, a inibição citada nem sempre esteve presente, pois em alguns casos a concentração mais elevada de sacarose promoveu efeitos similares à ausência desse carboidrato.

| | |
|--|--------------|
| (0 g/L) $Y_1 = -1,6340 + 17,2597 X - 6,7626 X^2$ | $R^2 = 86,8$ |
| (15 g/L) $Y_2 = -0,4591 + 14,2579 X - 5,6798 X^2$ | $R^2 = 93,9$ |
| (30 g/L) $Y_3 = -0,0400 + 9,0741 X - 3,0615 X^2$ | $R^2 = 99,9$ |
| (60 g/L) $Y_4 = -0,8737 + 42,7374 X - 56,4007 X^2 - 18,2145 X^3$ | $R^2 = 79,0$ |

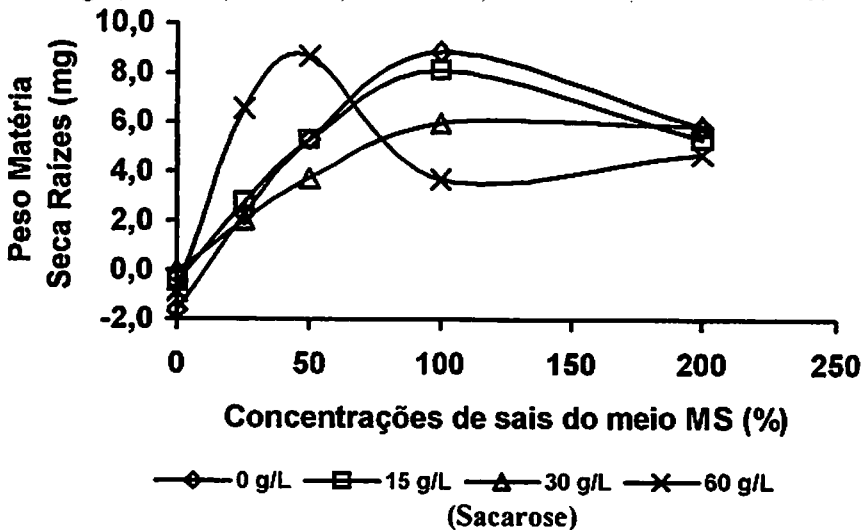


FIGURA 7. Peso da matéria seca de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2000.

6 CONCLUSÕES

Para as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- Há influência da sacarose e dos níveis de sais do meio MS, sobre o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã';
- Melhores resultados para as variáveis relacionadas à parte aérea são obtidos com uso de 100% dos sais do meio MS e 15-30 g.L⁻¹ de sacarose;
- As variáveis relacionadas ao desenvolvimento do sistema radicular, quanto ao peso de matéria seca, apresentam melhores resultados com uso de 100% dos sais do meio MS, na ausência ou com 15 g.L⁻¹ de sacarose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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: EMBRAPA-CNPH/ABCTP, 1990. p. 37-70.
- GAMBORG, O.L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. **Plant tissue culture methods**. Saskatoon: National Research Council of Canada, 1982. p.1-9.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH/ABCTP, 1990. p.37-70.
- HOFFMANN A. **Enraizamento e aclimação de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'**. Lavras, UFLA, 1999, 240p. (Tese – Doutorado em Agronomia)
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CBAB, 1998. p.371-394.
- 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: EMBRAPA-CNPH/ABCTP, 1990. p. 37-70
- MEZZETTI, B.; CONTE, L.S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa* 'in vitro'. II. Growth and exogenous carbohydrates utilizations by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.26, n.3, p.153-160, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultivars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.

- NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M.; JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. *Hortscience*, Alexandria, v.20, n.2, p.214-215, Apr. 1985.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília:EMBRAPA-CNPQ/ABCTP, v.9, p.2-12, 1988.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension culture of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 71, p. 459-463, June, 1987.
- SATO, A.Y. Propagação de gébera de vaso através da cultura de tecidos. Lavras: ESAL, 1994. 95p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- SHARMA, D.R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants - a review. *Euphytica*, v. 89, p. 325-337, 1996
- SILVA, A.T.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.A.; BASTOS, E.G. Multiplicação vegetativa da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.): II. Análise de componentes do sistema de proteção. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 15, n. 1, p. 9-13, 1993
- SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.2, p.209-220, 1987.
- SMITH, R.H. Media components and preparation. In: *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, cap.2, p.7-18, 1992.

CAPÍTULO 3

1 RESUMO

ALVES, Guilherme Pereira. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco ‘Poncã’ oriundos de polinização natural: pH e ágar. Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Tese – Doutorado em Agronomia)

Objetivou-se estudar a influência do pH e do ágar no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de tangerineira ‘Poncã’ (*Citrus reticulata* Blanco) oriundos de polinização natural. Foram testadas diversas combinações entre concentrações de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g.L⁻¹), em meio de cultura MS ajustado a diferentes pHs (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7), e posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Esses tratamentos permaneceram por 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 μmol.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 3 tubos com 15 mL do meio de cultura, em esquema fatorial 5x4. Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base nas seguintes características: altura da parte aérea, número de folhas, comprimento de raízes, peso da matéria fresca e seca da parte aérea, peso da matéria fresca e seca das raízes. Há influência das concentrações de ágar e dos níveis de pH sobre o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões de *Citrus reticulata* Blanco ‘Poncã’; As plântulas obtidas do cultivo *in vitro* de embriões de *Citrus reticulata* Blanco ‘Poncã’, alcançaram melhor desenvolvimento em meio de cultura ajustado em pH 3,7-4,7 na ausência ou em baixas concentrações de ágar (3,5 g.L⁻¹).

Palavras-chave: Fruticultura, propagação, citricultura, cultura de tecidos, cultura de embriões, biotecnologia, melhoramento, tangerina

3 -ABSTRACT

ALVES, Guilherme Pereira. *In vitro* culture of *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' immature embryos from natural fertilization: pH and agar. Lavras: UFLA, 2000. 85p. (Thesis - Doctorate in Agronomy).

It was aimed to study the influence of pH and ágar on the *in vitro* culture of immature embryos of mandarin fruits 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) from natural pollination. Several combinations were tested among agar concentrations (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 and 14,0 g.L⁻¹), in MS culture medium adjusted to different pHs (3,7; 4,7; 5,7 and 6,7), and later sterilized in autoclave at 121 °C for 20 minutes. Those treatments remained for 48 hours in darkness and, afterwards in growth room at 27 ± 1°C temperature with 16 daily hours' photoperiod under light intensity of 35 µmol.m⁻².s⁻¹. The experiment was conducted in completely randomized in 5 x 4 factorial with four replicates, each one constituted by three test tubes. After 60 days, the seedlings were evaluated on he basis of the following characteristics: height of the aerial part, number of leaves, length of roots, weight of the fresh and dry matter of the aerial part, weigh of the fresh and dry matter of the roots. There are influences of the ágar concentrations and of the pH levels on the growth and development both of the aerial part and root system of seedlings from embryos of *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã'; The seedlings obtained from the *in vitro* culture of *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' embryos, reached better development in culture medium adjusted to pH 3,7 - 4,7 in the absence or at low agar concentrations (3,5 g.L⁻¹).

Key-words: Fruit-growing, citrus culture, tissue culture, embryo culture, biotecnology, improvement, mandarin fruits.

3 INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos. O ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas, é o agente solidificante mais comumente usado. Para alguns explantes, o meio líquido fornece melhores resultados em função principalmente da maior disponibilidade de nutrientes e possibilidade de diluição de substâncias fenólicas liberadas no meio de cultura pelo próprio explante. Meios líquidos normalmente exigem algum tipo de suporte ou agitação para fornecer oxigênio necessário à respiração do explante (Caldas et al., 1990).

O pH é um fator crítico e muito importante do meio de cultura, influenciando a disponibilidade de nutrientes, fitoreguladores e no grau de solidificação do ágar. Se bem ajustado, o pH pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Por exemplo, o pH influi na utilização do amônio como fonte de nitrogênio em células vegetais. Para um crescimento adequado da maioria das espécies, o pH ideal é de 5,0 a 6,5 (Pierik, 1987). Se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, poderá ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento do explante *in vitro* (Murashige, 1974).

A variação de pH no meio de cultura pode ser devida à absorção diferencial do cátion (amônio) e do ânion (nitrito), sendo que a absorção preferencial de NH_4^+ acarreta redução no pH, podendo o meio tornar-se líquido, dependendo da qualidade e da concentração de ágar (Singha, Oberly e Townsend, 1987).

Normalmente, o pH do meio de cultura é ajustado aplicando-se hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl), tornando o meio mais alcalino ou mais ácido (Pierik, 1987). A maior ou a menor variação do pH pode influenciar direta ou indiretamente na absorção de nutrientes pelo explante, implicando no

crescimento e desenvolvimento do embrião. A regeneração e a sobrevivência de brotos de *Actinidia deliciosa* foram intensamente reduzidas em níveis de pH superiores a 5,7; entretanto, as melhores respostas de crescimento de calo foram encontradas nos valores de pH 7,0 e 7,5 (Marino e Battistini, 1990).

O ágar é reconhecido como agente gelificante e comumente utilizado nos meios de cultura (Singha, 1984; George, 1993). Algumas vantagens foram atribuídas ao ágar (George, 1993). Por sua ação solidificante, uma vez adicionado à água, forma um colóide, que submetido a 100°C torna-se líquido e solidifica-se a 45°C, mantendo-se estável nas temperaturas de incubação, tendo a propriedade de não ser digerido pelas enzimas vegetais e não reagir com os constituintes do meio de cultura.

Existem várias marcas comerciais disponíveis de ágar (Singha, 1984; George, 1993), que usualmente são utilizadas em concentrações que variam de 0,4 a 1,0% (Caldas et al., 1998). Entretanto, recomenda-se minimizá-lo ou otimizá-lo no preparo do meio pelo fato do ágar ser considerado o componente de maior custo do meio de cultura (Singha, 1984; George, 1993; Peixoto e Pasqual, 1995).

Diferentes resultados foram atribuídos ao ágar por Scholten e Pierik (1996) ao analisarem as suas propriedades físicas e químicas. Alguns tipos de ágar com elevado poder gelificante mostraram os melhores desempenhos. Bons resultados foram também mostrados, como efeito do pH de uma suspensão de ágar a um baixo conteúdo de enxofre. O índice de difusão de íons de enxofre no ágar, diferiu entre os géis, porém isso não explicaria as diferenças no desenvolvimento do ágar. O tempo de autoclavagem tem um efeito marcante sobre o poder gelificante, entretanto afeta extremamente o seu desempenho. Análises químicas revelaram grandes diferenças entre os tipos de ágar. Os melhores apresentaram conteúdo de sais relativamente baixo. Um dos melhores ágars apresentou alto conteúdo de micronutrientes. As impurezas, especialmente

de micronutrientes, estavam fortemente ligadas ao ágar. Concentrações de sais do meio Murashige e Skoog (MS) superiores a 30% foram totalmente imobilizadas no gel. Em pH 4,2 foi observado maior percentual de nitrogênio e de potássio no meio MS do que em pH 5,7. O cloro pode ser completamente exaurido, parecendo ser um bom indicador para a pureza e qualidade do ágar. Na presença do AgNO_3 , a contaminação por cloro pode facilmente ser visualizada.

Tanto a presença de inibidores orgânicos e inorgânicos ligados ao ágar (Pierik, 1987), quanto a qualidade e a concentração de ágar, afetam as características químicas e físicas do meio de cultura (Debergh, 1983), e em razão disso, o crescimento do explante *in vitro* também será afetado (Rombarger e Tabor, 1971).

Os meios sólidos ou semi-sólidos, são mais comuns na fase de multiplicação. Os meios líquidos, apesar de serem homogêneos, de preparo rápido e de menor custo, devido ausência de ágar, necessitam suportes físicos ou sistemas de agitação, para fornecer oxigênio suficiente à respiração do explante (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e Grattapaglia e Machado, 1990).

Singha (1982), observou maior disponibilidade e absorção de nutrientes pelos explantes, quando estes foram colocados em meios líquido e semi-sólido. Os melhores resultados obtidos nestes meios ocorrem devido a maior facilidade de absorção de nutrientes e reguladores de crescimento, e ao maior contato entre o explante e o meio, o que não ocorre nos meios sólidos, onde há somente contato basal. O exudado proveniente do explante será mais facilmente diluído em meio líquido do que em meio com ágar sólido, evitando desta maneira o acúmulo de tais compostos tóxicos (Pierik, 1987).

A ocorrência de vitrificação dos explantes em meios líquidos ou menos geleificados foi observada por Peixoto e Pasqual (1995), os quais apresentaram anormalidade no seu desenvolvimento, resultando em plantas menos vigorosas, com folhas grandes, translúcidas e hastes lenhosas. Essa vitrificação, por ser um

distúrbio fisiológico que normalmente ocorre em plantas cultivadas *in vitro* (Kevers et al., 1984), é bastante comum em meios líquidos ou com baixa concentração de ágar ou quando a planta possui grande disponibilidade de água (Pierik, 1987).

Grattapaglia e Machado (1990) e Brand (1993) verificaram decréscimo de explantes vitrificados quando a concentração de agente solidificante foi aumentada no meio de cultura, porém ocorreu redução significativa na multiplicação e crescimento de brotos. Debergh (1983) evitou a vitrificação em *Cynara scolymus* usando ágar 1,1%.

Para a obtenção de uma consistência adequada do meio de cultura, a concentração de ágar necessária varia conforme o tipo de explante a ser cultivado, a qualidade do ágar e o pH do meio (Murashige, 1974).

Objetivou-se, com o presente trabalho, estudar a influência do pH e do ágar no resgate *in vitro* de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). Foram utilizados frutos de polinização natural com aproximadamente 120 dias de idade, coletados em plantas de tangerineira (*Citrus reticulata* Blanco) '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 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 (Ribeiro, 1997).

Todos 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 e Skoog, 1962), modificado em relação ao ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g.L⁻¹), ajustados em diferentes valores de pH (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7), em todas as combinações possíveis. Esses tratamentos permaneceram por 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 μmol.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 3 tubos com 15 mL do meio de cultura, em esquema fatorial 5x4.

Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base nas seguintes características: altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA), comprimento das raízes (CR), peso da matéria fresca das raízes (PMFR), peso da matéria seca das raízes (PMSR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está apresentado o resumo da análise de variância dos testes utilizados para a avaliação de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro*. em diferentes concentrações de ágar e pH.

Para a variável número de folhas, observa-se, pela Figura 2, que em pH 3,7, o melhor resultado foi obtido com 7,0 g.L⁻¹ de ágar. Para as demais afeições de pH 5,7 e 6,7, os resultados foram satisfatórios na concentração 3,5 g.L⁻¹ de ágar. Deve-se ressaltar, também, que para esta variável não houve afeições estudadas.

Resultados similares foram obtidos por Ribeiro et al. (1997), que ao analisar o desenvolvimento de plântulas originadas de embriões de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) para a variável comprimento da haste caulinar, observaram que o pH 4,7 promoveu maior crescimento entre todas as superiores de ágar.

Na Figura 1 pode se verificar que a ausência e 14,0 g.L⁻¹ de ágar promoveu os melhores resultados para a variável altura da parte aérea, com o pH afeído em 4,7. Percebe-se redução na altura das brotações à medida que aumentou a concentração de ágar até 7,0 g.L⁻¹, e aumento para as concentrações superiores de ágar.

Houve efeito significativo a 1% de probabilidade tanto para ágar e pH como para a interação entre os dois fatores em todas as variáveis testadas (Tabela 1).

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

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 1 - Resumo da análise de variância para APA, NF, PMFPA, PMSPA, CR, PMFR e PMSR, de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

qualquer significância para pH 4,7 em todos os níveis de ágar.

$$(\text{pH } 4,7) Y_1 = 2,1174 - 0,2735X + 0,0237X^2 \quad R^2 = 83,7$$

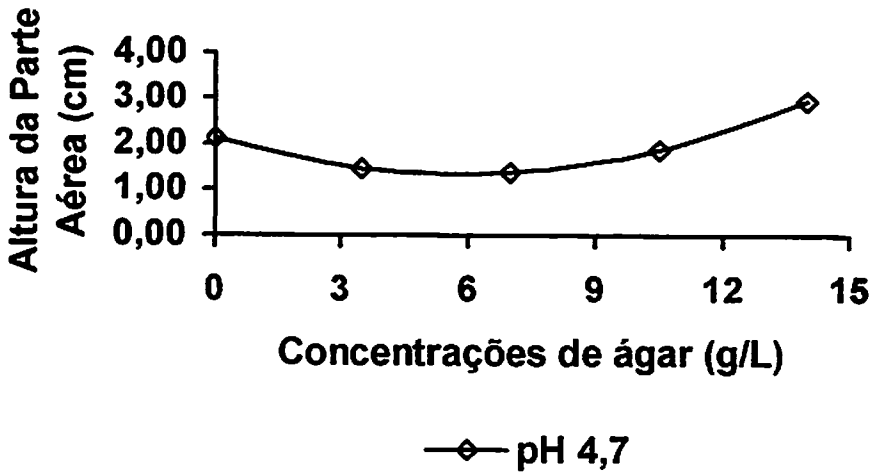


FIGURA 1. Altura da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro*, em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Comparando-se as Figuras 1 e 2, observa-se que no melhor nível de pH (4,7 para altura da parte aérea e 3,7 para número de folhas), as curvas são inversas, ou seja, o favorecimento ao crescimento da parte aérea se dá em detrimento do número de folhas formadas. Este fato pode estar ligado à maior homogeneidade do meio líquido, pois gradientes de nutrientes se estabelecem com o crescimento dos tecidos, sobre meio sólido, que não se formam em meio líquido. É possível também que as concentrações ótimas de sais em meio sólido sejam mais elevadas que as concentrações ótimas para crescimento em meio líquido, devido às restrições na velocidade de difusão de nutrientes que o meio

sólido impõe. Outra explicação é que o uso de elevadas concentrações de ágar contornam o problema de vitrificação normalmente verificado em culturas realizadas em meio líquido, conforme citação de Debergh (1983).

$$\begin{aligned} (\text{pH } 3,7) \quad Y_1 &= 4,4644 + 1,5036X - 0,1014X^2 & R^2 &= 73,1 \\ (\text{pH } 5,7) \quad Y_2 &= 5,1247 + 2,0134X - 0,3659X^2 + 0,1153X^3 & R^2 &= 82,5 \\ (\text{pH } 6,7) \quad Y_3 &= 3,9334 + 2,3181X - 0,4594X^2 + 0,0209X^3 & R^2 &= 98,1 \end{aligned}$$

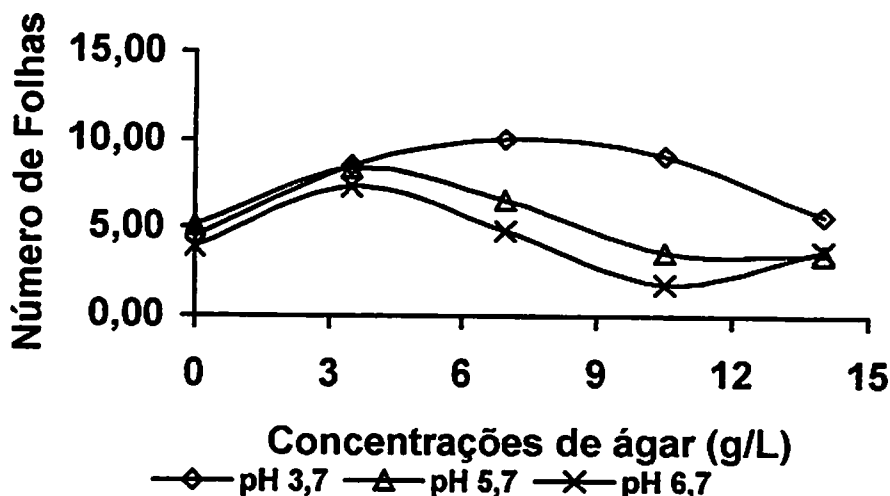


FIGURA 2. Número de folhas de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

O melhor peso da matéria fresca da parte aérea (Figura 3) foi obtido em pH 3,7 e 3,5 g.L⁻¹ de ágar. Para as demais aferições de pH 4,7; 5,7 e 6,7, houve resposta mais expressiva na ausência de ágar, observando-se queda quase linear com o aumento dos níveis de ágar. Estes resultados podem ser explicados pela tendência de absorção de água pelos tecidos das plântulas quando cultivadas em meio mais aquoso (Williams e Leopold, 1989), causa esta atribuída à hidrólise do ágar autoclavado em meio mais acidificado (Caldas et al., 1998).

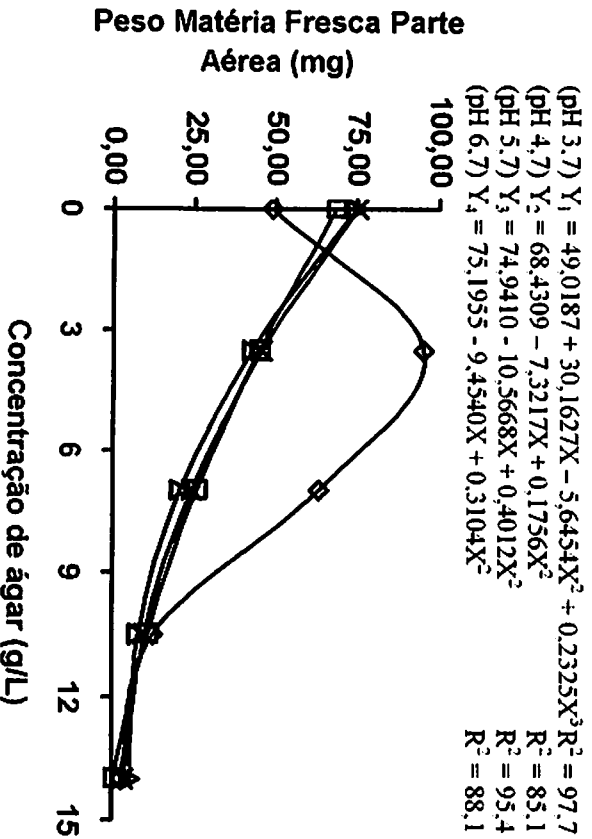


FIGURA 3. Peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro*, em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Para a variável peso da matéria seca da parte aérea, observa-se pela Figura 4, que para a aferição de pH 4,7 com o nível 3,5 g.L⁻¹ de ágar, foram registrados os melhores resultados. Uma certa similaridade foi observada para a aferição de pH 6,7, com a mesma concentração de ágar. Para as demais aferições de pH 3,7 e 5,7, diferentes resultados foram alcançados na mesma concentração de ágar.

$$\begin{aligned}
 (\text{pH } 3,7) \quad Y_1 &= 28,2938 + 1,2784X - 0,2540X^2 & R^2 &= 78,8 \\
 (\text{pH } 4,7) \quad Y_2 &= 26,3119 + 10,4673X - 2,5038X^2 + 0,1178X^3 & R^2 &= 82,9 \\
 (\text{pH } 5,7) \quad Y_3 &= 19,4448 + 3,7051X - 1,1039X^2 + 0,0547X^3 & R^2 &= 88,8 \\
 (\text{pH } 6,7) \quad Y_4 &= 25,9459 + 10,6563X - 2,6028X^2 + 0,1244X^3 & R^2 &= 83,9
 \end{aligned}$$

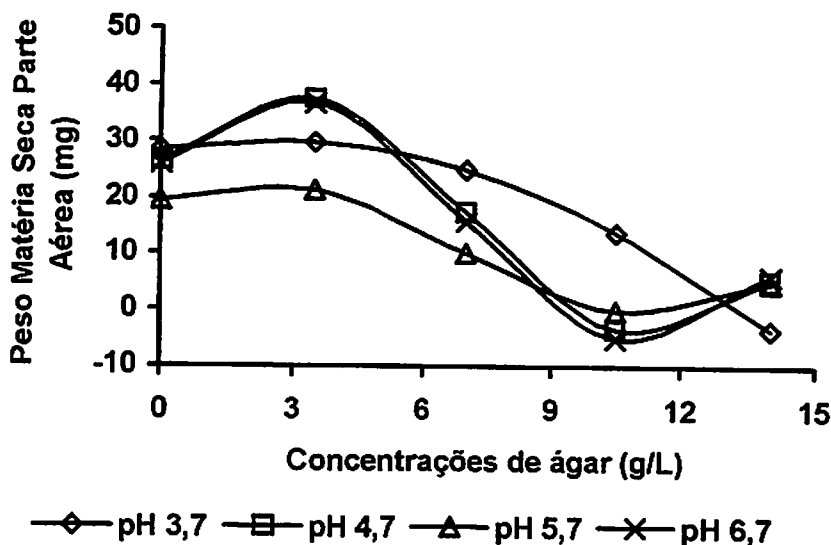


FIGURA 4. Peso da matéria seca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira ‘Poncã’ cultivados *in vitro*, em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Esses resultados obtidos para a variável peso da matéria seca da parte aérea, no cultivo de embriões imaturos de tangerineira ‘Poncã’, foram similares aos alcançados por Rezende (1996) no estudo da multiplicação ‘*in vitro*’ de Kiwi (*Actinidia deliciosa* Liang e Ferguson var. *deliciosa*) s. ‘Hayward’ e ‘Matua’, segundo os quais melhores resultados foram alcançados com concentrações mais baixas de ágar (0,48%) e pH ajustado para 4,2.

Em relação ao crescimento médio de raízes, observa-se, na Figura 5, que o maior crescimento foi obtido com pH 3,7 na ausência de ágar. Observa-se também que pH 5,7 promoveu crescimento satisfatório, porém ao nível 3,5 g.L⁻¹

de ágar. Para esta variável, em todas as concentrações de ágar, não houve significância para a aferição do pH em 4,7.

$$\begin{aligned} (\text{pH } 3,7) \quad Y_1 &= 9,4016 - 1,9879X + 0,3300X^2 - 0,0154X^3 & R^2 &= 78,9 \\ (\text{pH } 5,7) \quad Y_2 &= 3,4933 + 3,5326X - 0,6491X^2 + 0,0277X^3 & R^2 &= 83,0 \\ (\text{pH } 6,7) \quad Y_3 &= 3,7629 + 1,7548X - 0,3275X^2 + 0,0136X^3 & R^2 &= 89,9 \end{aligned}$$

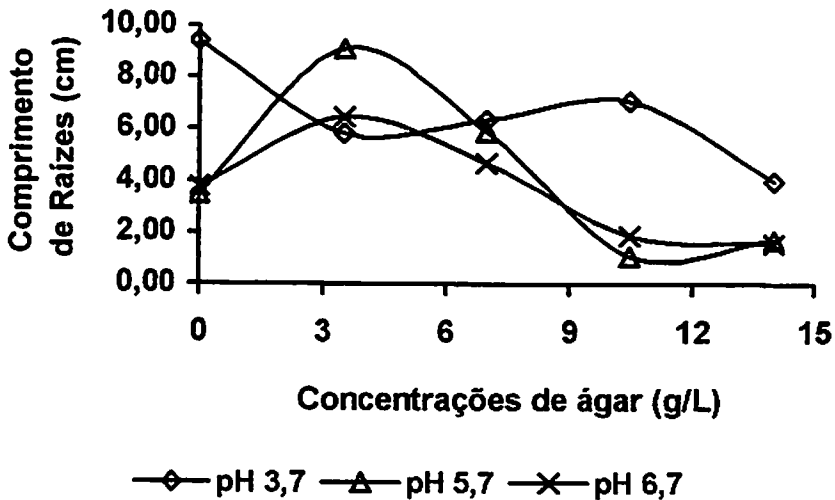


FIGURA 5. Comprimento de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro*, em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Já o maior peso da matéria fresca das raízes como pode-se observar na Figura 6, foi obtido com a aferição de pH 4,7, na ausência de ágar. Para as aferições de pH 5,7 e 6,7, os resultados obtidos foram similares ao pH 4,7, na ausência de ágar. Uma queda quase linear é observada com o aumento das concentrações de ágar em qualquer ajuste de pH.

Maior peso da matéria seca das raízes (Figura 7) foi obtido para a aferição de pH 4,7, na ausência de ágar. Para as aferições de pH 5,7 e 6,7, melhores resultados foram alcançados para o peso da matéria seca das raízes com o nível 3,5 g.L⁻¹ de ágar. Houve tendência de redução no peso da matéria

seca de raízes à medida que aumentaram as concentrações de ágar, para todos os ajustes de pH.

$$\begin{aligned}
 (\text{pH } 3,7) \quad Y_1 &= 51,0442 + 9,9394X - 2,8780X^2 + 0,1393X^3 & R^2 &= 90,6 \\
 (\text{pH } 4,7) \quad Y_2 &= 64,7036 - 9,0222X + 0,3268X^2 & R^2 &= 96,4 \\
 (\text{pH } 5,7) \quad Y_3 &= 65,0774 - 8,8368X + 0,3107X^2 & R^2 &= 96,3 \\
 (\text{pH } 6,7) \quad Y_4 &= 67,0691 - 10,5031X + 0,4225X^2 & R^2 &= 93,5
 \end{aligned}$$

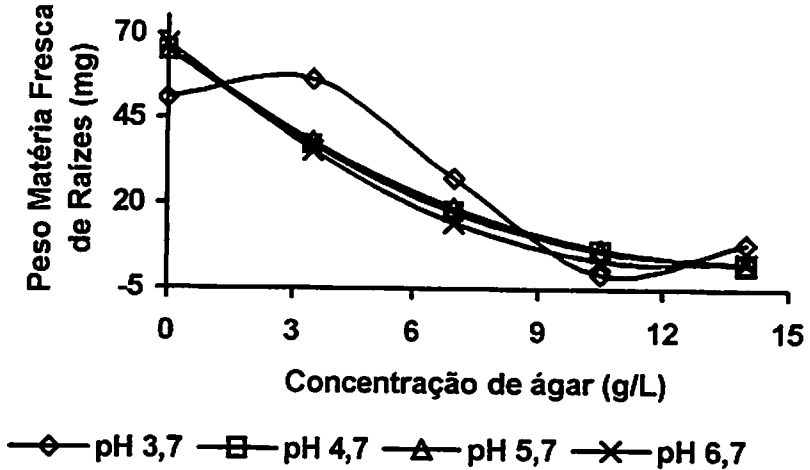


FIGURA 6. Peso da matéria fresca das raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira ‘Poncã’ cultivados *in vitro*, em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Os resultados obtidos para o cultivo *in vitro* de embriões de *Citrus reticulata* Blanco não foram compatíveis com os de Pierik (1987) para a aferição de pH 3,7, o qual menciona que em níveis de pH abaixo de 4,5, o crescimento e desenvolvimento *in vitro* ficam prejudicados. Uma hipótese que pode explicar este melhor comportamento dos embriões em pH mais ácido é a elevada concentração de nitrogênio existente na formulação do meio MS, normalmente considerada excessiva. Há indícios de que o pH mais ácido dificulta a utilização do amônio como fonte de nitrogênio em células vegetais, enquanto pH mais alcalino diminui a utilização do nitrato.

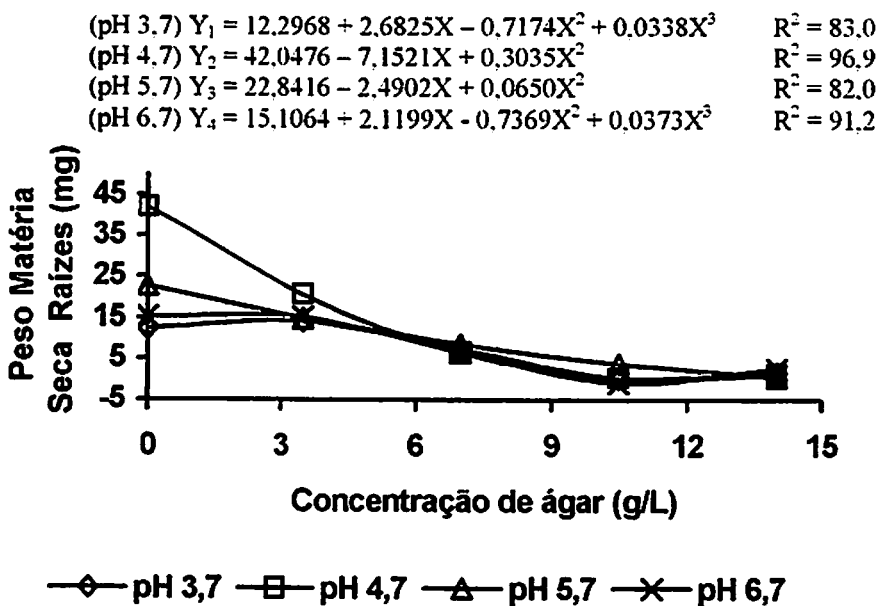


FIGURA 7. Peso da matéria seca de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro*, em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS. UFLA, Lavras-MG, 2000.

6 CONCLUSÕES

Para as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- Há influência das concentrações de ágar e dos níveis de pH sobre o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã';
- Plântulas obtidas do cultivo *in vitro* de embriões de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã', alcançam melhor desenvolvimento em meio de cultura ajustado em pH 3,7-4,7 na ausência ou em baixas concentrações de ágar ($3,5 \text{ g.L}^{-1}$), exceto para o peso da matéria fresca da raiz na ausência de ágar em pH 6,7.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*, Dordrecht, v.35, n.3, p.203-209, Dec. 1993.
- 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 transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998, p.87-132.
- 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: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1990, p.37-70.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.59, p.270-276, 1983.
- GEORGE, E.F. The components of tissue media. In: *Plant propagation by tissue culture*. 2.ed. Great Britain: Exegetics, 1993, v.9, p.273-343.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1990, p.37-70.
- KEVERS, C.; COUMANS-GILLES, M.F.; GUSPAR, T. Physiological and biochemical event leading to vitrification of plants culture *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.61, n.1, p.69-74, May 1984.
- MARINO, G.; BATTISTINI, S. Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of medium pH. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.280, p.37-44, 1990.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. *Revista Ceres*, Viçosa, v.42, n.242, p.432-443, jul./ago. 1995.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Hyghoff publishers, 1987. 344p.
- REZENDE, M.E. de. Multiplicação *in vitro* de Kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Ling e Ferguson var. deliciosa] s. 'Hayward' e 'Mutua': Influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH. Lavras: UFLA, 1996. 71p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- 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 'Pera'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.11, p.1147-1152, nov. 1997.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abix* shoot apical meristem in culture. *American Journal of Botany*, Lancaster, v.58, p.131-140, 1971.
- SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports*, v.17, n.3, p.230-235, 1996.
- SINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. *Hortscience*, Alexandria, v.19, n.2, p.227-228, Apr. 1984.
- SINGHA, 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, n.4, p.657-660, July 1982.
- 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*, Dordrecht, v.2, p.209-220, 1987.
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology*, Maryland, v. 89, p. 977-981, 1989.

CAPÍTULO 4

1 RESUMO

ALVES, Guilherme Pereira. **Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco ‘Poncã’ oriundos de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pera’: Fotoperíodo.** Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Tese – Doutorado em Agronomia)

Objetivou-se estudar, nas condições *in vitro*, a influência do fotoperíodo sobre embriões imaturos oriundos de frutos do cruzamento entre *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pera’ vs. *Citrus reticulata* Blanco ‘Poncã’. Os embriões foram inoculados em meio MS de cultura, adicionado de ácido giberélico (GA₃) - 0,3 mg.L⁻¹ e carvão ativado - 1,0 mg.L⁻¹, previamente esterilizado a 121 °C por 20 minutos. Os tratamentos constaram dos seguintes fotoperíodos: 8, 10, 12, 14, 16, 18 horas e luz contínua, à temperatura de 27°C, transferidos para estufas tipo B.O.D.. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 3 tubos com 15 mL do meio de cultura. Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base nas seguintes características: altura da parte aérea, número de folhas, peso da matéria fresca da parte aérea, comprimento das raízes e peso da matéria fresca das raízes. Fotoperíodos com menores números de horas (8 a 14) proporcionaram melhor desenvolvimento da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos do cruzamento *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco. Fotoperíodos com maiores números de horas (14 a 24) proporcionaram melhor desenvolvimento do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões imaturos de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco.

Palavras-chave: Fruticultura, citricultura, hibridação, cultura de embriões, fotoperíodo, melhoramento, tangerina, laranja.

2 ABSTRACT

ALVES, Guilherme Pereira. *In vitro* culture of immature embryos from fruits of *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' fertilized by *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera'. Photoperiod Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Thesis - Doctorate in Agronomy).

It was aimed to study the in the in vitro conditions the influence of photoperiod on immature embryos from cross between *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' versus *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera'. The embryos were inoculated in MS culture medium, added with gibberellic acid (GA_3) $-0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ and activated charcoal $-1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, previously sterilized at $121 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 minutes. The treatments consisted of the following photoperiods: 8, 10, 12, 14, 16, 18 hours and continuous light at temperature of $27 \text{ }^\circ\text{C}$, transferred to B.O.D.types stoves: The experiment was conducted in completely randomized design with four replicates, each one constituted by three tube tubes. After 60 days the seedlings were evaluated on the basis of the following characteristics: aerial part height, number of leaves, aerial part fresh matter weight, roots length and root fresh matter weight. Photoperiods with smaller numbers of hours (8 to 14) provided better development of the aerial part of seedlings from immature embryos of pollination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco. Photoperiods with larger numbers of hours (14 to 24) provided better development of the root system of seedlings from immature embryos of pollination of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco.

Key-words: Citrus production, hybridization, embryos culture, photoperiod, temperature, breeding.

3 INTRODUÇÃO

O crescimento das plantas é controlado por fatores genéticos e ambientais, os quais atuam conjuntamente através de processos fisiológicos. A luz interfere nos processos fotossintéticos e de fotomorfogênese, através da qualidade (comprimento de onda), quantidade (intensidade luminosa ou fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo) (Economu e Read, 1987).

O fotoperíodo afeta os níveis hormonais endógenos das plantas e, conseqüentemente, modifica o seu crescimento atuando diferentemente para cada espécie (Salisbury e Ross, 1991).

Para haver efeito fotoperiódico, a quantidade de energia luminosa total necessária é insignificante, pois, na realidade, a duração do período do escuro é que atua como agente controlador de diversos processos fisiológicos das plantas (Bolonhezi, 1991; Salisbury e Ross, 1991; Thomas e Vince-Prue, 1997).

Garner e Allard (1920) estiveram entre os primeiros a realizarem trabalhos com algumas espécies, como o fumo e a soja, com objetivo de estudar a influência da luz sob o ponto de vista do comprimento do dia como o principal fator sincronizador do florescimento dessas espécies. A esses estudiosos deve-se a introdução dos termos “fotoperíodo e fotoperiodismo”, os quais expressam a duração do dia e a resposta dos organismos vivos a mudanças sazonais em seu ambiente, ou seja, à duração relativa do dia e da noite (Hilman, 1969).

Garner e Allard (1923) consideraram que a inflorescência, crescimento radicular, formação de pigmentos vegetais, tuberização de raízes, dormência de gemas, germinação de sementes, formação de órgãos de armazenamento e crescimento vegetativo, estão sob controle fotoperiódico.

Câmara (1991) relata que a floração é o fenômeno mais estudado, sendo o período escuro o mais importante para a sua indução. De acordo com Logan e Krotkov (1968), a produção de matéria seca é o melhor índice de crescimento e

pode ser útil para avaliar as condições relativas de luz requeridas pelas espécies. A quantidade total de matéria seca acumulada pela planta (Benincasa, 1988) é um reflexo direto da fotossíntese líquida, somada a quantidade de nutrientes absorvidos, o que corresponde a uma pequena parcela dela.

Em embriões rudimentares de *Ilex* já foi demonstrado que a embriogênese tardia é afetada pela luz (Hu e Ferreira, 1998). Após 48 ou 72 horas, parece haver perda do controle da luz sobre a embriogênese tardia neste gênero de plantas. No cultivo de embriões das espécies cítricas, alguns pesquisadores recomendam que após a inoculação, estas devem permanecer por 48 horas no escuro e, posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas diárias em $35 \mu\text{Mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Ao estudar a batata-doce (*Ipomoea batata*), Folquer (1978) afirmou que os elementos climáticos que estimulam o crescimento vegetativo são o fotoperíodo longo, altas luminosidade e temperatura, enquanto os requerimentos contrários seriam as condições necessárias para a tuberização. No entanto, Bonsi et al. (1992) verificaram que apesar da batata-doce ser normalmente cultivada sob fotoperíodo superior a 12 h, três cultivares sob condições controladas e submetidas a fotoperíodos de 12 e 24 h, em luz contínua, produziram mais raízes tuberosas do que as cultivadas sob fotoperíodo de 12 h, indicando que a luz contínua não inibiu a iniciação das raízes tuberosas nas cultivares testadas. Por outro lado, 16 h de luz promoveram crescimento da parte aérea e incremento em matéria seca, enquanto o número de tubérculos foi promovido em fotoperíodo de 9 horas.

McDavid e Alamu (1980) constataram que a produção de raízes tuberosas de *Ipomoea batatas*. foi maior sob fotoperíodo de 11,5 a 12,5 h, do que sob condições de 18 h e 8 h de luz. Constataram também, que esta espécie não possui obrigatoriedade em termos fotoperiódicos para a produção de tubérculos, pois produziu raízes tuberosas sob dias curtos (8 h luz), dias neutros

(12 h luz) e dias longos (18 h luz), sugerindo que o estímulo para a tuberização seja independente do fotoperíodo.

Trabalhando com plântulas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam., cultivadas *in vitro*, Figueiredo (1995) demonstrou que o fotoperíodo promoveu o crescimento vegetativo das plântulas, mas não teve efeito algum sobre a formação de raízes tuberosas *in vitro*.

Moser e Hess (1968), trabalhando com dália (*Dahlia variabilis* Willd) sob casa-de-vegetação, verificaram que a tuberização das raízes, foi regulada por um fotoperíodo de 11 a 12 horas.

Em espécies tropicais como a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a produção de raízes tuberosas é maior sob dias curtos (Faria, 1998), podendo esta produção estar associada a um número maior de raízes ou a uma redução de crescimento na parte aérea. De acordo com Moser e Hess (1968), o crescimento da parte aérea tem resposta oposta aos órgãos de reserva, tanto que o fotoperíodo regula uma relação competitiva entre estas partes.

Estudando os efeitos de várias concentrações de sacarose em diferentes fotoperíodos, Souza (1995) demonstrou que a melhor combinação para o porta-enxerto de macieira, 'MM.111', foi de 60 g.L⁻¹ de sacarose com fotoperíodo de 8 horas, para a cultivar Ébano de amora-preta, 35,2 g.L⁻¹ de sacarose e fotoperíodo de 16 horas.

Estudos com plântulas e segmentos caulinares de algumas espécies apresentaram resultados conflitantes com relação à influência de diferentes fotoperíodos (Delgado et al., 1996), o que tem sido atribuído ao fato de que luz é um entre os vários fatores que interferem no crescimento e desenvolvimento vegetal.

Trabalhando com plantas de *Solidaster puteus*, híbrido (*Solidago hybriden* vs. *Aster ptarmicoide*), em casa-de-vegetação, Roncancio et al. (1996) testaram os fotoperíodos de 8h, 12h, 14h, 16h, 18h e 20h e luz contínua (24h),

no outono-inverno e 8h e 20h, no período de verão-outono. Os resultados demonstraram que o padrão de desenvolvimento das plantas variou em função do fotoperíodo e da temperatura. O período outono-inverno, apresentou um aumento no comprimento do caule e decréscimo no número de folhas mantidas em fotoperíodos mais longo que 16 h. Em contrapartida, o fotoperíodo até 16 h, o número de folhas foi crescente nas plantas. Houve formação de brotos basais, sob fotoperíodos curtos e de ramificações laterais e florais sob fotoperíodos longos. O período outono-verão, apresentou um aumento do comprimento do caule e do número de ramificações laterais, florais sob o fotoperíodo de 20 h. Em fotoperíodo de 8 h (verão-outono), houve redução do número de ramificações laterais. Constatou-se também que, a indução floral ocorreu em todos os fotoperíodos com maior ocorrência em fotoperíodos de 16 h ou mais

Objetivou-se testar a influência de fotoperíodo sobre o cultivo *in vitro* de embriões híbridos oriundos da polinização controlada de *Citrus sinensis* Osbeck 'Pera' x *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã'.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

Plantas adultas de laranjeira 'Pera' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco), apresentando bom estado nutricional e fitossanitário foram, respectivamente, selecionadas como progenitores masculino e feminino para os trabalhos de hibridação controlada.

Botões florais de *Citrus sinensis* no estágio de balão foram coletados e armazenados em placas de petri por aproximadamente 48 horas até a antese e

abertura das anteras, quando foram polinizadas as inflorescências da tangerineira 'Poncã', que também se encontrava no estádio de balão.

As polinizações foram executadas nos períodos de insolação mais branda do dia, ou seja, até as 9:00 h e após as 16:00 h, utilizando apenas uma planta, totalizando 102 cruzamentos interespecíficos.

As flores femininas foram emasculadas, e depois de friccionar as anteras das flores do progenitor masculino em fase de liberação de grãos de pólen sobre seus estigmas, cada flor foi protegida com saco de papel e etiquetada, eliminando-se as demais flores, deixando apenas uma flor por ramo. Dentre as flores polinizadas, apenas 12 flores foram fecundadas, havendo queda fisiológica de 4 frutos. Os frutos que permaneceram na planta, foram coletados para análise ao final de 120 dias após a hibridação.

Foi realizada uma única coleta e os frutos foram colocados em vários sacos de polietileno de cor preta, tamanho 20 x 28 x 0,03 cm com aberturas laterais (atmosfera modificada), e em seguida armazenados em geladeira à temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 135 dias. A cada 15 dias uma amostra era retirada, seus embriões excisados e cultivados *in vitro*.

Para o tratamento referente à testemunha (período zero), logo após a coleta dos frutos, estes foram lavados, cortados ao meio no sentido transversal e suas sementes foram removidas com auxílio de uma espátula. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a assepsia com álcool-70% por cinco minutos e hipoclorito de sódio-2% por 20 minutos, e posteriormente lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Com auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila, tomando-se sempre o cuidado de não provocar danos aos embriões ao serem excisados (Ribeiro, 1997).

Todos os embriões, independentemente dos estádios em que se encontravam, foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 15 mL do meio MS, acrescido de 0,3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, e depois foram acondicionados em estufas tipo B.O.D., sob temperatura constante de 27 °C e intensidade luminosa de 43 μmol.m⁻².s⁻¹, sendo que os tratamentos constaram dos seguintes fotoperíodos: 8, 10, 12, 14, 16, 18 horas e luz contínua. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, cada uma constituída por três tubos de ensaio.

Após 60 dias as plântulas foram avaliadas em relação as seguintes características: altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), comprimento das raízes (CR) e peso da matéria fresca das raízes (PMFR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está apresentado o resumo da análise de variância dos testes utilizados para a avaliação de plântulas oriundas de frutos de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' polinizados por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera' em diversos fotoperíodos.

Houve efeito significativo de fotoperíodo, a 1% de probabilidade, para todas as características analisadas, exceto para número de folhas que não mostrou significância (Tabela 1).

TABELA 1 - Resumo da análise de variância para APA, NF, PMFPA, CR e PMFR, de plântulas de embriões imaturos oriundos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' polinizados por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera' em diversos fotoperíodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

| Causa de variação | G.L. | QM | | | | |
|-------------------|------|----------|--------|-----------|----------|-----------|
| | | APA | NF | PMFPA | CR | PMFR |
| Tratamento | 6 | 0,3091** | 1,5942 | 90,8199** | 2,1374** | 10,3724** |
| Resíduo | 21 | 0,0800 | 1,1662 | 18,9663 | 6,3087 | 0,9857 |
| % | | 16,6 | 29,5 | 13,9 | 24,4 | 18,0 |

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade

Para a altura da parte aérea, os embriões expostos à 8 h diárias luz, apresentaram plântulas maiores (Figura 1), apesar de não terem sido identificadas diferenças significativas para os tratamentos com 10, 12, 14, 18 e 24 h de exposição à luz. Foi observado, que os embriões cultivados sob regime de 16 h de luz e 8 h de escuro, condição padrão para a maioria dos cultivos realizados em laboratório, proporcionaram o pior resultado em termos de altura da parte aérea de plântulas. Estes dados podem estar relacionados ao fato de que, na sala de crescimento, onde foram mantidas as culturas com tratamento "16 h luz e 8 h escuro", existe uma maior desuniformidade das condições de temperatura e luz. Além disso, nessas condições, a quantidade de radiação fotossinteticamente ativa é sensivelmente menor ($32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) que aquela observada na estufa tipo B.O.D. ($43 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Na Figura 2, pode-se observar, que os resultados obtidos para a variável número de folhas foram estatisticamente iguais, portanto, não houve variação em relação a fotoperíodos.

Verificou-se, no entanto, tendência de maior número de folhas no tratamento "24 h luz contínua" e diferenças significativas talvez não tenham sido identificadas em razão do alto coeficiente de variação (29,5%) diagnosticado para esta característica.

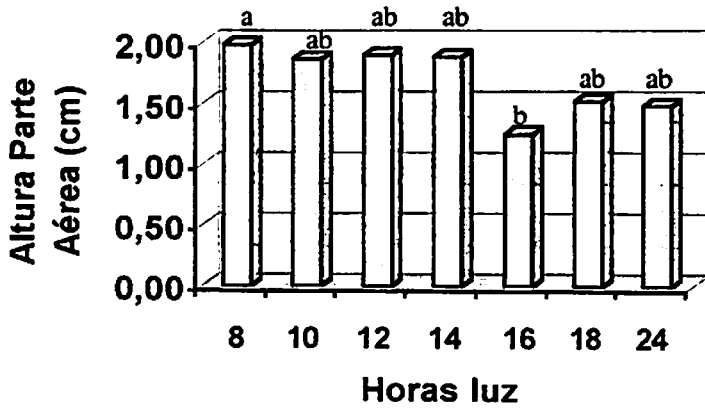


FIGURA 1. Altura da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos excisados de frutos de *Citrus reticulata* Blanco, 'Poncã', originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 'Pera', em diversos fotoperíodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

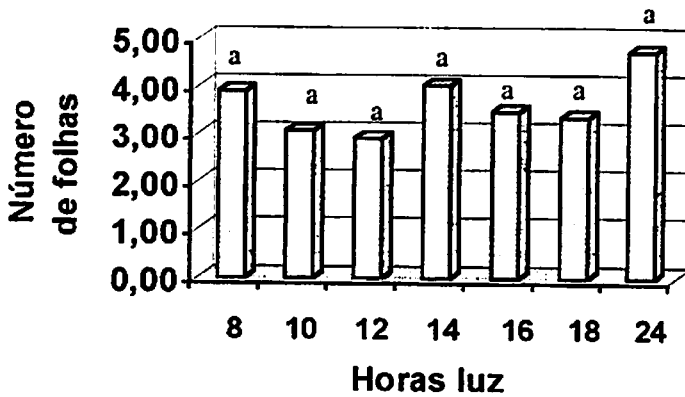


FIGURA 2. Número de folhas de plântulas oriundas de embriões imaturos excisados de frutos de *Citrus reticulata* Blanco, 'Poncã' originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 'Pera', em diversos fotoperíodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Observa-se na Figura 3, que os melhores fotoperíodos para peso da matéria fresca da parte aérea, foram 10, 12 e 14, e o tratamento “16 h luz e 8 h escuro” foi inferior aos demais. Estes resultados são similares aos da Figura 1, para altura da parte aérea.

Quanto as respostas dos fotoperíodos em relação ao comprimento das raízes, o tratamento “24 h luz” foi superior aos demais, não diferindo estatisticamente do tratamento “14 h de luz” (Figura 4).

Isso mostra que a eficiência do crescimento pode estar relacionada à habilidade de adaptação das plantas às condições de luz do ambiente *in vitro*, à intensidade de luz (Ferreira e Hu, 1989), ou à qualidade desta (Hu e Ferreira, 1989), podendo também influenciar o desenvolvimento embrionário. Os embriões rudimentares no estágio cordiforme em inúmeras espécies de *Ilex* são sensíveis à luz, quando excisadas e cultivadas *in vitro* (Hu, 1976; Ferreira e Hu, 1984).

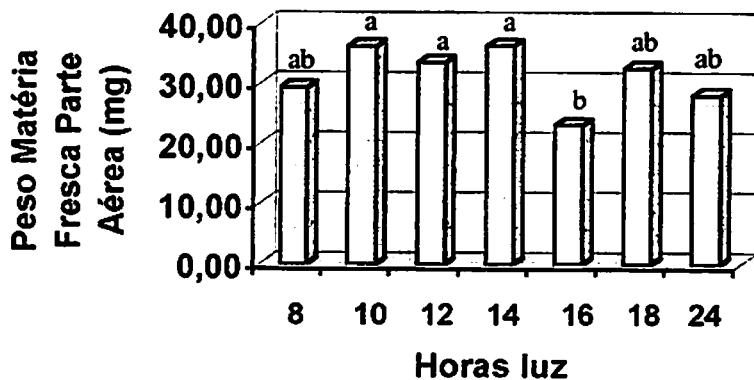


FIGURA 3. Peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas, oriundas de embriões imaturos, excisados de frutos de *Citrus reticulata* Blanco, ‘Poncã’, originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, ‘Pera’, em diversos fotoperíodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

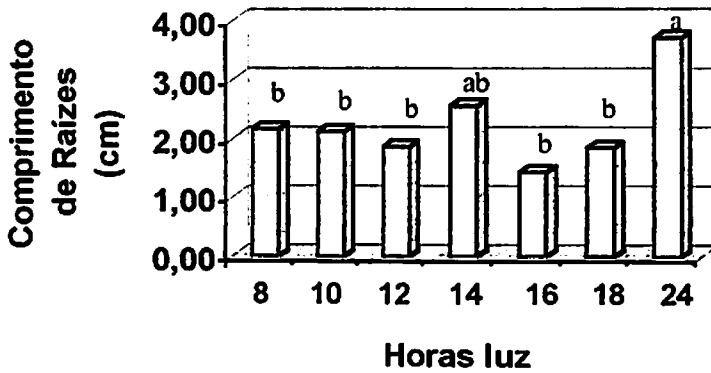


FIGURA 4. Comprimento de raízes de plântulas, oriundas de embriões imaturos excisados, de frutos de *Citrus reticulata* Blanco, 'Poncã', originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 'Pera', em diversos fotoperíodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

A sensibilidade destes embriões desaparece após 4 dias de incubação no escuro e eles crescem até a maturidade, na luz. Em outras palavras, depois de ser iniciado, o processo fisiológico não pode ser mais revertido (Hu e Ferreira, 1998), o que notadamente aconteceu em relação ao tratamento 24 h luz, que mostrou uma total sensibilidade a duração da luz ou do fotoperíodo.

O comprimento das raízes foi beneficiado pelo aumento do número de horas de luz. O que poderia explicar os resultados obtidos, é uma possível degradação do ácido indol acético, presente nos brotos pela elevada quantidade de luz, fazendo com que essa redução no conteúdo de auxina, pudesse ter determinado a redução no número de raízes por broto e aumentasse o comprimento das mesmas.

Os resultados obtidos para a variável peso da matéria fresca das raízes (Figura 5) mostraram que o melhor tratamento foi "24 h luz", não diferindo no entanto de "18 e 14 h luz". O tratamento "16 h luz", da mesma forma que em características anteriores, foi inferior aos demais.

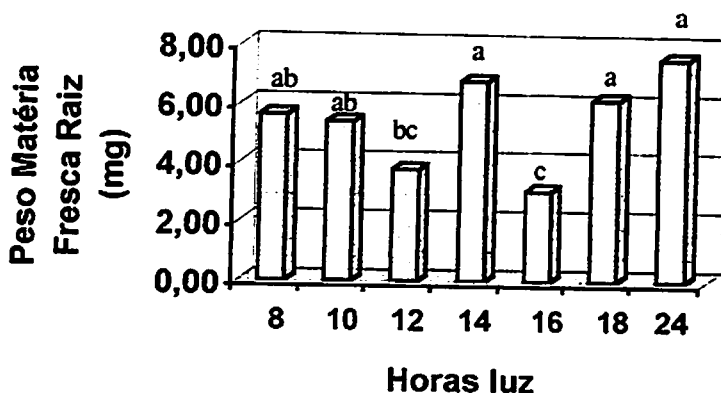


FIGURA 5. Peso da matéria fresca das raízes de plântulas, oriundas de embriões imaturos excisados de frutos de *Citrus reticulata* Blanco, 'Poncã', originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 'Pera', em diversos fotoperíodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Entre as variáveis em estudo, o tratamento "16 h luz/8 h escuro" foi inferior para altura da parte aérea, comprimento das raízes, peso da matéria fresca da parte aérea e das raízes. Entretanto, para número de folhas, este tratamento mostrou-se igual aos demais.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- Fotoperíodos com menores números de horas (8 a 14) proporcionam melhor desenvolvimento da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos do cruzamento *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco.
- Fotoperíodos com maiores números de horas (14 a 24) proporcionam melhor desenvolvimento do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões imaturos do cruzamento *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas.** Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1988. 41p.
- BOLONHEZI, A.C. **Influência do fotoperíodo sobre o desenvolvimento da planta e produção de raízes tuberosas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).** Piracicaba: ESALQ-USP, 1991. 228p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- BONSI, C.K.; LORETAN, P.A.; HILL, W.A.; MORTLEY, D.G. Response of sweet potato to continuous light. **Hortscience**, Alexandria, v.27, n.5, p.471, May 1992.
- CÂMARA, G.M.S. **Efeito do fotoperíodo e da temperatura no crescimento, florescimento e maturação de cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill).** Viçosa, UFV, 1991. 266 p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- DELGADO, G.E.; SALATINO, M.L.; HANDRO, W. Enhancement of anthocyanin and anthocyanidin synthesis by light, growth regulators and sucrose in *in vitro* plants of sweet potato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 111-115, 1996
- ECONOMU, A.S.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, n.5, p.751-754, Oct. 1987.
- FARIA, L.L. **Influência do fotoperíodo no crescimento, composição química e indução de raízes tuberosas do feijão jacatupé (*Pachyrrhizus tuberosus* Lam. Spreng).** Lavras: UFLA, 1998. 46p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- FERREIRA, A.G.; HU, C.Y. Influência da luz na embriogênese tardia de *Ilex* – cultura *in vitro*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34., Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: SBB, 1984, p.441-449.
- FERREIRA, A.G.; HU, C.Y. Light-mediated inhibition of *in vitro* late embryogeny of *Ilex*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.114, p.819-823, 1989.

- FIGUEIREDO, S.A. Influência de reguladores de crescimento e fotoperíodo no crescimento secundário de raízes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. **Brazlândia Branca em condições *in vitro***. Lavras: UFLA, 1995. 78p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- FOLQUER, F. **La batata (camote): estudio de la planta y su produccion comercial**. San José, 1978. 144p.
- GARNER, W.W.; ALLARD, H.A. Effect of relative length of day and night and others factors of the environment on growth and reproduction in plants. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.18, n.11, p.553-606, Mar. 1920.
- GARNER, W.W.; ALLARD, H.A. Further studies in photoperiodism, the response of the plant to relative length of day on night. **Journal Agricultural Research**, Washington, v.23, n.11, p.871-919, Mar. 1923.
- HILLMAN, W.S. Photoperiodism, chelating agents and flowering of *Lemna perpusilla* and *L. gibba* in aseptic culture. In: McELDOY, W.D.; GLASS, B. **Light and life**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1969. p.673-686.
- HU, C.Y. Light-mediated inhibition of *in vitro* development of rudimentary embryos of *Ilex opaca*. **American Journal of Botany**, v.63, p.651-656, 1976.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: PARÉ, J.; BUGNICOURT, M. **Some aspects and actual orientations in plant embryology**. Amiens: University of Picardie, p.76-90, 1989.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. p.371-394.
- LOGAN, K.T.; KROTKOV, G. Adaptations of the photosynthetic mechanism of sugar maple (*Acer saccharum*) seedlings grown in various light intensities. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.22, n.1, p.104-116, Jan. 1968.
- MCDONALD, C.P.; ALAMU, S. Effect of day length on the growth and development of whole plants and rooted leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 57, n. 2, p. 115-119, Apr. 1980

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- MOSER, B.C.; HESS, C.E. The physiology of tuberous root development in dahlia. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.33, n.6, p.595-603, Nov. 1968.
- RONCANCIO, V.J.F. Influência do fotoperíodo em interação com a temperatura no desenvolvimento de plantas de *Solidaster luteus*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.8, n.2, p.131-138, 1996.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont, Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p.
- SOUZA, A.S. Efeitos da sacarose e do fotoperíodo na propagação *in vitro* da cv. Ébano de amora-preta e dos porta-enxertos de macieira 'MM.111' e pereira *Pyrus calleryana* Deene. Lavras: UFLA, 1995. 36p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. **Photoperiodism in plants**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 428p.

CAPÍTULO 5

1 RESUMO

ALVES, Guilherme Pereira. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' obtidos de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera': Armazenamento de frutos e sacarose. Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Tese - Doutorado em Agronomia)

Objetivou-se avaliar a influência de diversas concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de embriões imaturos oriundos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã', obtidos de polinização controlada *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera', armazenados por vários períodos de tempo à baixas temperaturas. Em uma única coleta, os frutos foram colocados em sacos pretos de polietileno, com aberturas laterais e em seguida armazenados em geladeira à temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 135 dias. A cada 15 dias uma amostra era retirada, seus embriões excisados e cultivados *in vitro*. Todos os embriões, independentemente dos estádios de desenvolvimento em que se encontravam, foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS, acrescido de sacarose nas concentrações (0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 e 24,0 g.L⁻¹), de 0,3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e de 1,0 g.L⁻¹ de carvão ativado. Esses tratamentos permaneceram por 48 horas no escuro e, posteriormente em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 h em intensidade luminosa de 32 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nos primeiros 45 dias após a instalação do experimento, foram avaliadas as plântulas do período zero de armazenamento dos frutos e, sucessivamente, da mesma forma, os demais períodos de armazenamento. As características avaliadas foram: altura da parte aérea, número de folhas, peso da matéria fresca da parte aérea, peso da matéria seca da parte aérea, comprimento de raiz, peso da matéria fresca das raízes e peso da matéria seca das raízes. Pôde-se concluir que: é possível armazenar frutos imaturos para posterior excisão e cultura de embriões; frutos com 120 dias após a hibridação podem ser armazenados por até 135 dias sem prejuízo da viabilidade dos embriões; melhor desenvolvimento, tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões de *Citrus reticulata* Blanco, é observado em meio MS acrescido de 12-18 g.L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chave: Fruticultura, embriões, sacarose, melhoramento, propagação, armazenamento.

2 ABSTRACT

ALVES, Guilherme Pereira. *In vitro* culture of immature embryos from *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' fruits fertilized by *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera': Storage of fruits and sucrose. Lavras-MG: UFLA, 2000. 85p. (Thesis-Doctorate in Agronomy).

It was aimed in the present work to evaluate the influence of several sucrose concentrations on the *in vitro* culture of immature embryos from *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' fruits obtained from controlled pollination by *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera', stored for several periods of time at low temperatures. A single collection was performed, the fruits were put into black polyethylene bags with side openings and next stored in refrigerator at the temperature of 5 ± 1 °C for up to 135 days. Every fifteen days, one sample was removed, its embryos excised and cultured *in vitro*. All the embryos regardless of the developmental stages in which they were excised and inoculated individually into test tubes containing 15 mL of the MS medium, added with sucrose at the concentrations of (0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 and 24,0 g.L⁻¹), 0,3 mg.L⁻¹ gibberellic acid (GA₃) and 1,0 g.L⁻¹ activated charcoal. Those treatments remained for 48 hours in darkness and afterwards in growth room at the temperature of 27 ± 1 °C with 16 h photoperiod and light intensity of 32 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. In the first 45 days after the installation of the experiment, the seedlings were evaluated of the period zero of storage. The evaluated characteristics were: height of the aerial part, number of leaves, weight of the fresh of the aerial part, weight of the dry matter of the aerial part, root length, weight of the fresh matter of roots and weight of the dry matter of roots. It may be concluded: it is possible to store immature fruits for posterior incision and embryo cultivation. Fruits aged 120 days after pollination may be stored for up to 135 days without any damage to the viability of embryos: better development both of the aerial part and root system of seedlings from embryos of *Citrus reticulata* Blanco was observed in MS medium added with 12-18 g.L⁻¹ of sucrose.

Key-words: Fruit-growing, embryos, sucrose, improvement, propagation, storage.

3 INTRODUÇÃO

Em qualquer programa de melhoramento, milhares de hibridações são realizadas para aumentar a possibilidade de obtenção do indivíduo almejado com os objetivos inicialmente propostos. No caso particular do melhoramento de citros, usa-se a cultura de embriões imaturos para dar condições aos embriões zigóticos de se desenvolverem, para permitir a identificação precoce de plântulas originadas de embriões zigóticos. O armazenamento destes frutos permite que os embriões sejam excisados e cultivados ao longo de um maior período de tempo.

A conservação de frutos em câmaras com baixas temperaturas pode minimizar os processos que levam ao envelhecimento do fruto. O objetivo da conservação de frutos cítricos em câmaras frias é mantê-los durante o mais longo período de tempo possível num estado de maturação já adquirido, pois ao contrário dos outros, os cítricos não sofrem alterações drásticas na composição após a colheita. Isto se deve à sua baixa atividade respiratória, ou seja, são frutos não climatéricos e, por isso, de fácil armazenamento (Cheftel e Cheftel, 1976). Portanto, como nos frutos climatéricos, a conservação dos frutos cítricos em baixas temperaturas visa principalmente evitar perdas de peso por desidratação e ataque de fungos. A desidratação ou perda de peso ocorre devido à diferença de pressão de vapor entre o fruto e o ambiente que o cerca (Bem-Yehoshua, 1979).

Baixas temperaturas de conservação dos frutos, mesmo sendo superiores ao ponto de congelamento, podem produzir danos de frio nos frutos com sintomas variados. Normalmente essas alterações aparecem após a saída da câmara, quando em temperatura ambiente (Cuquerella et al., 1983). Entre os frutos cítricos, o limão parece ser o mais sensível às baixas temperaturas de armazenamento, podendo apresentar sintomas como depressões na casca, que depreciam o fruto e geram perdas (Castro e Ferraz, 1982). Castro (1985) relatou que limões conservados a 5°C apresentaram-se ainda verdes mas com sintomas

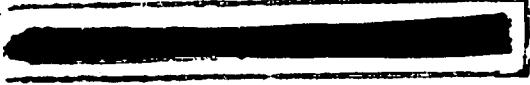
de danos fisiológicos causados pelo frio após 4 a 5 semanas. Nos frutos conservados a 10°C, o autor não observou tais sintomas, mas os limões estavam completamente amarelos após 2 a 3 semanas de armazenamento.

A baixa temperatura durante o armazenamento retarda os processos de maturação e o envelhecimento precoce dos frutos. Se muito baixa, ela impede certos distúrbios fisiológicos que podem ocorrer em temperaturas inadequadas (Bleinroth, 1986).

Gomes (1995) estudou a influência da idade, coloração externa e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.), obtidas de frutos com idade de 30, 35, 40 e 45 dias após a antese, armazenadas em condições ambientais de galpão fechado durante zero, quatro, oito e 12 dias. O armazenamento beneficiou a qualidade das sementes, em especial as sementes dos frutos mais novos.

O armazenamento de sementes requer considerável atenção para a manutenção dos embriões viáveis. Quando acontece a deterioração, a perda da germinação é apenas uma conseqüência mensurável, ocorrendo juntamente com outras mudanças detrimenais. Alguns fatores, como umidade, temperatura, característica genética, maturidade, gases, luz e dormência, afetam a longevidade das sementes em condições ambientais ou durante o armazenamento em ambiente controlado (Barton, 1961). Temperatura e umidade do ar destacam-se como sendo os principais fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente (Corrêa, 1997). Em geral, a conservação é conseguida pela redução da atividade metabólica das sementes, através da diminuição da umidade, temperatura e concentração de oxigênio do ambiente (Barton, 1961; Roberts, 1972).

Janick (1966) observou que as melhores temperaturas exigidas para o armazenamento de sementes dependem da espécie e do período desejado. Para a maioria delas, as temperaturas de 0°C e umidade relativa de 50-60% são



consideradas apropriadas para manter plena viabilidade, pelo menos durante um ano.

Bachi (1958) manteve a viabilidade de sementes de limão Cravo (*Citrus limonia* Osb.) e laranja caipira (*Citrus sinensis* Osb.) por quatorze meses, em temperaturas de 2-3°C e teor de umidade das sementes ao redor de 30%.

Krishna e Shanker (1977) estudaram a longevidade de sementes de *Citrus karna*, *C. jambhiri*, *C. limonia* e Citrange Rusk (*Poncirus trifoliata* vs. *Citrus sinensis*) armazenando-as sob temperaturas ambientes e de 8°C, em recipientes herméticos, em sacos plásticos ou de papel, com ou sem dessecantes, por cinco meses. *Citrus karna* e Citrange Rusk mostraram 100% de viabilidade das sementes, enquanto *C. jambhiri* e *C. limonia* mostraram, respectivamente, viabilidade de 84 e 80% quando armazenadas em sacos plásticos com CaCl₂, em baixas temperaturas.

Trabalhando com maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), Almeida et al. (1988) estudaram o efeito do armazenamento na germinação usando sementes colhidas em diferentes estádios de maturação e concluíram que as sementes retiradas de frutos coletados 70 dias após a antese apresentaram maiores porcentagens de germinação. As sementes foram armazenadas sob três condições (ambiente natural, câmara seca e câmara fria), para então avaliar a sua viabilidade aos seis e 12 meses de armazenamento. Os autores concluíram, também, que houve aumento na germinação das sementes após seis meses de armazenamento nos três ambientes, porém; as sementes, após 12 meses conservadas sob condições ambientais, não germinaram igual a zero.

A armazenagem das sementes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa*) pode ser feita colocando-as secas dentro de sacos de polietileno e armazenando-as por cerca de um ano em refrigerador, à temperatura de 5 a 10°C (São José, 1991; Ruggiero et al., 1996). Sementes de marmeleiro (*Cydonia*

oblonga Mill.) podem ser armazenadas por 24 meses em embalagens de plástico em ambiente frigorífico, com 80% de emergência (Dall'Orto et al., 1985).

Apesar da existência de relatos sobre os efeitos de fatores ambientais, não é fácil postular o efeito de um fator em particular (Sharma, Kaur e Kumar, 1996). De modo geral, os embriões excisados de plantas próprias do clima temperado requerem temperaturas mais baixas que aqueles excisados de plantas de clima tropical ou subtropical (Narayanaswami e Norstog, 1964). Por exemplo, temperatura ótima para embriões de batata é 20°C, enquanto para embriões de algodão é 32°C.

Luz durante os primeiros dias de cultura deve ser evitada, pois, induz germinação precoce dos embriões. No entanto, alta intensidade de luz pode suprimir germinação precoce em alguns casos (Rijven, 1952).

No caso de cultura de embriões de pessegueiro (Zagaja et al., 1960), cerejeira e ameixeira (Zagaja, 1962a) e pereira (Zagaja, 1962b), tratamento de embriões com baixas temperaturas é um fator essencial. Embriões não sujeitos a baixa temperatura exibiram baixa vitalidade e germinação, produziram plantas com folhas deformadas e crescimento em forma de rosetas. Estas deformações não foram evitadas mesmo com repetidos tratamentos à base de GA₃ (Zagaja, 1962a; Zagaja et al., 1963). Embriões submetidos a temperaturas de 1-5°C formaram plântulas com crescimento normal após serem transferidos para meio de cultura por um período de pelo menos 40 dias.

A sacarose e outros açúcares constituem o grupo de substâncias mais utilizadas para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Os carboidratos são a principal fonte de carbono e a principal origem da energia necessária para a manutenção de todos os processos bioquímicos e fisiológicos das plantas após a separação da planta-mãe (Caldas et al., 1998).

As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições de iluminação e concentração de CO₂ e às vezes não apresentam

teores de clorofila suficientes para realizar a fotossíntese ou a realizam em níveis muito baixos. O crescimento da maioria das culturas é sustentado pela fonte de carboidrato adicionada ao meio, que fornece energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como a celulose, enfim, todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

A sacarose (Strickland et al., 1987) é o dissacarídeo mais amplamente encontrado na natureza e a principal forma pela qual os carboidratos são transportados na maioria das espécies de plantas. Assim, tem-se que a sacarose esta é o melhor carboidrato para a suplementação dos meios de cultura para plantas *in vitro*, sendo composta por uma molécula de glicose e uma de frutose unidas por uma ligação glicosídica α -1,2. A sacarose não é um açúcar redutor e embora seja extremamente sensível à hidrólise ácida, é quimicamente inerte e altamente solúvel em água (Goodwin e Mercer, 1983).

Para Swedlund e Locy (1993), a maioria dos estudos na utilização de carboidratos *in vitro* tem por objetivo encontrar uma fonte de carbono que proporcione ótimo crescimento. Na maioria dos casos, a sacarose, a glicose e a frutose proporcionam os maiores ganhos em peso das culturas, geralmente com pequenas diferenças entre elas, o que leva à conclusão de que a sacarose é a melhor fonte de carbono a ser usada, já que além de proporcionar crescimento ótimo, é de custo baixo (Mello, 1998).

Não só a fonte de açúcar tem grande influência nos processos de cultivo *in vitro* como sua concentração efetiva. Para muitas espécies, a sacarose é empregada nos meios de cultura em uma concentração entre 2-4%. Abaixo desta faixa, pode ocorrer clorose generalizada na cultura, e acima dela podem ocorrer problemas de excessivo potencial osmótico do meio, o que leva a uma deterioração das culturas (Grattapaglia e Machado, 1990).

De acordo com Caldas, Haridasan e Ferreira (1998), a multiplicação e o crescimento de plantas *in vitro* também dependem do explante e a concentração de sacarose pode ser limitante para a atividade da redutase de nitrato, que possui atividade *in vitro* e é responsável pela utilização do nitrato pelas células.

Várias concentrações são utilizadas em espécies cítricas para diversas finalidades, assim como 5% de sacarose (Beloualy, 1991; Gavish et al., 1991). Todavia, concentração acima de 5% apresentou melhor resultado para o processo de microenxertia em *Citrus* (Navarro et al., 1975). Já a concentração de 3% proporcionou satisfatório desenvolvimento em cultura de gemas axilares de laranja 'Valência' (Pasqual e Ando, 1989a,b).

O presente trabalho objetivou avaliar a influência de diversas concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de embriões imaturos oriundos de frutos de *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã', obtidos de polinização artificial por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pera', armazenados por vários períodos de tempo à baixas temperaturas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA).

Plantas adultas de Laranjeira 'Pera' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) apresentando bom estado nutricional e fitossanitário foram, respectivamente, selecionadas como progenitores masculino e feminino para os trabalhos de hibridação controlada.

Botões florais de *Citrus sinensis* no estágio de balão foram coletados e armazenados em placas de petri por aproximadamente 48 horas até a antese e

abertura das anteras, quando foram polinizadas as inflorescências da tangerineira 'Poncã', que também se encontrava no estágio de balão.

As polinizações foram executadas nos períodos de insolação mais branda do dia, ou seja, até as 9:00 h e após as 16:00 h, utilizando apenas uma planta, totalizando 102 cruzamentos interespecíficos.

As flores femininas foram emasculadas, e depois de friccionar as anteras das flores do progenitor masculino em fase de liberação de grãos de pólen sobre seus estigmas, cada flor foi protegida com saco de papel e etiquetada, eliminando-se as demais flores, deixando apenas uma flor por ramo. Dentre as flores polinizadas, apenas 12 flores foram fecundadas, havendo queda fisiológica de 4 frutos. Os frutos que permaneceram na planta foram coletados para análise ao final de 120 dias após a hibridação.

Foi realizada uma única coleta e os frutos foram colocados em vários sacos de polietileno de cor preta, tamanho 20 x 28 x 0,03, cm com aberturas laterais (atmosfera modificada), e em seguida armazenados em geladeira à temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por até 135 dias. A cada 15 dias, uma amostra era retirada, seus embriões excisados e cultivados *in vitro*.

Para o tratamento referente à testemunha (período zero), logo após a coleta dos frutos, estes foram lavados, cortados ao meio no sentido transversal e suas sementes foram removidas com auxílio de uma espátula. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a assepsia com álcool-70% por cinco minutos e hipoclorito de sódio-2% por 20 minutos, e posteriormente lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Com auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila, tomando-se sempre o cuidado de não provocar danos aos embriões ao serem excisados (Ribeiro, 1997).

Todos os embriões, independentemente dos estádios de desenvolvimento em que se encontravam, foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS, acrescido de sacarose nas concentrações 0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 18,0 e 24,0 g.L⁻¹, de 0,3 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e de 1.0 g.L⁻¹ de carvão ativado. Todos os tratamentos permaneceram por 48 horas no escuro e, posteriormente em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 32 μmol.m⁻².s⁻¹.

Esse critério foi aplicado a todos os tratamentos testados (0,0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120 e 135 dias de armazenamento). Quarenta e cinco dias após a instalação de cada tratamento, foram avaliadas as plântulas foram avaliadas em relação às seguintes características: altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA), comprimento das raízes (CR), peso da matéria fresca das raízes (PMFR) e peso da matéria seca das raízes (PMSR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 está apresentado o resumo da análise de variância dos testes utilizados para a avaliação de plântulas oriundas de embriões imaturos cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose, excisados de frutos de *Citrus reticulata* Blanco cv Poncã, originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv Pera, armazenados por diversos períodos.

Houve efeito significativo tanto para período de armazenamento como para sacarose além da interação entre os dois fatores a 1% de probabilidade, em todas as variáveis testadas (Tabela 1).

TABELA 1: Resumo da análise de variância para APA, NF, PMFPA, PMSPA, CR, PMFR e PMSR, de plântulas oriundas de embriões imaturos cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose, excisados de frutos de *Citrus reticulata* Blanco cv, Poncã originados de polinização por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv, Pera, armazenados por diversos períodos. UFLA, Lavras-MG, 2000.

| Causa de Variação | G.L | QM | | | | | | |
|-------------------|-----|--------|---------|------------|----------|----------|------------|----------|
| | | APA | NF | PMFPA | PMSPA | CR | PMFR | PMSR |
| Tempo (T) | 9 | 5,31** | 39,61** | 14481,77** | 959,76** | 104,05** | 3453,59** | 452,23** |
| Sacarose (S) | 6 | 5,68** | 43,61** | 2406,77** | 809,13** | 214,42** | 10092,23** | 1946,49* |
| T x S | 54 | 0,85** | 6,09** | 757,56** | 117,86** | 16,60** | 914,41** | 149,14** |
| Resíduo | 210 | 0,30 | 3,24 | 179,74 | 52,80 | 6,01 | 274,94 | 56,68 |
| CV % | | 39,7 | 39,4 | 31,3 | 59,8 | 59,8 | 64,4 | 87,4 |

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

A Figura 1 mostra um aumento da altura da parte aérea à medida que aumentou o tempo de conservação dos frutos, para todas as concentrações de sacarose utilizadas. Observa-se que o melhor resultado foi registrado na concentração de 12 g.L⁻¹ de sacarose e 135 dias de armazenamento, não diferindo de 18 g.L⁻¹ de sacarose a 135 dias de armazenamento. Com a maior concentração de sacarose (24 g.L⁻¹) aos 135 dias de armazenamento, foi obtida a menor altura de plântulas.

| | |
|---|--------------|
| (12 g/L) $Y_1 = 0,5134 + 0,0499X - 0,0007X^2 + 0,000003X^3$ | $R^2 = 74,1$ |
| (18 g/L) $Y_2 = 0,5817 + 0,0167X$ | $R^2 = 80,6$ |
| (24 g/L) $Y_3 = 0,7847 + 0,0108X$ | $R^2 = 77,0$ |

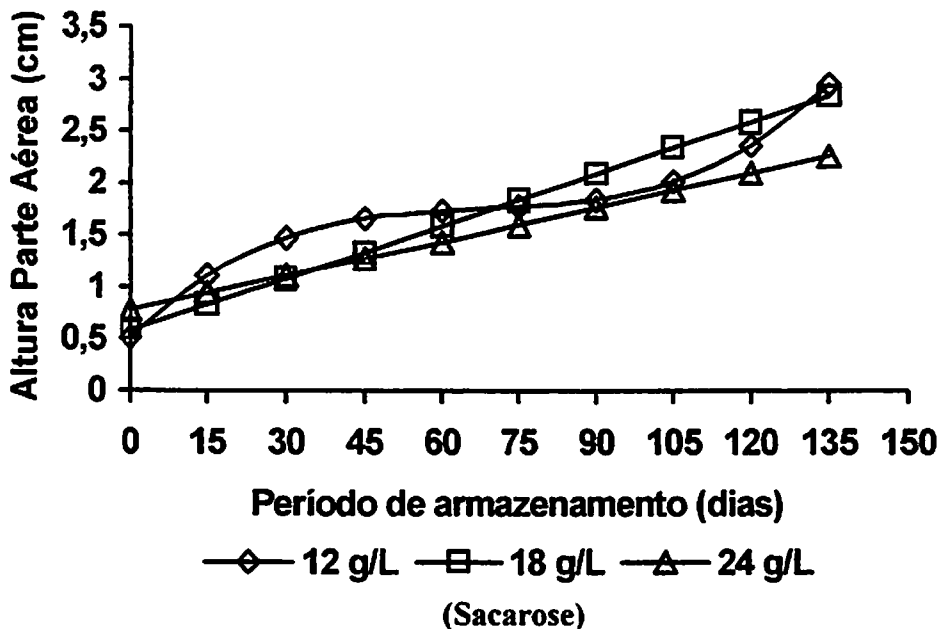


FIGURA 1. Altura da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose ($g\ L^{-1}$), a partir de sementes que foram coletadas em diversos períodos de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Maior número de folhas foi obtido com $12\ g\ L^{-1}$ de sacarose aos 90 dias de armazenamento (Figura 2). Na ausência de sacarose, pode-se observar tendência de elevação no número de folhas à medida que aumentou o tempo dos frutos em baixas temperaturas, registrando-se produção satisfatória de folhas no período de 135 dias de armazenamento dos frutos.

$$(0 \text{ g/L}) Y_1 = 1,0039 + 0,0202X$$

$$(12 \text{ g/L}) Y_2 = 1,7323 + 0,1088X - 0,0006X^2$$

$$R^2 = 81,4$$

$$R^2 = 72,9$$

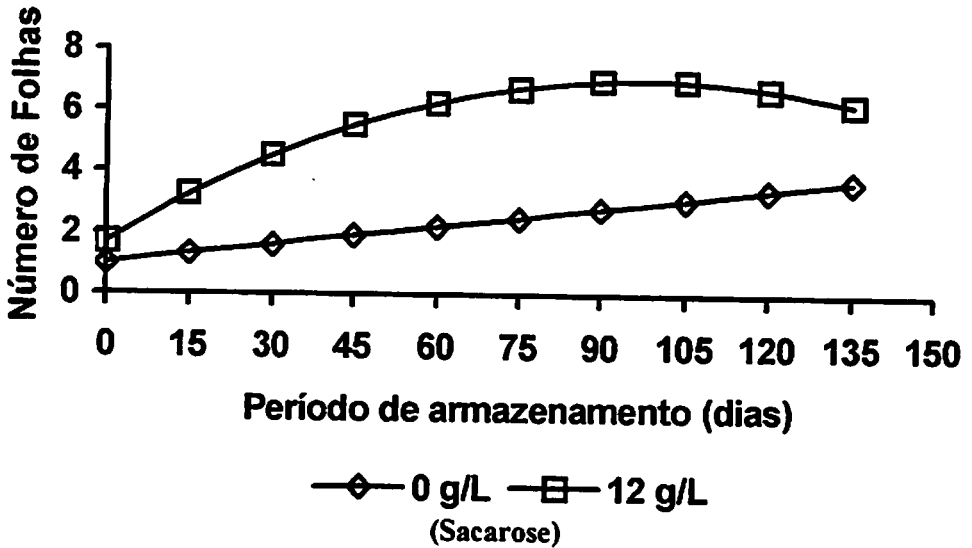


FIGURA 2. Número de folhas em plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose (gL^{-1}), a partir de sementes que foram coletadas em diversos períodos de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Analisando-se a Figura 3, pode-se observar que há leve tendência de redução no peso da matéria fresca da parte aérea com a elevação do tempo de conservação dos frutos a até aproximadamente 60 dias. A partir deste limite, até os 135 dias usados para a conservação dos frutos em baixas temperaturas e para todas as concentrações de sacarose testadas, ocorreu o inverso, ou seja, aumento do peso da matéria fresca da parte aérea.

| | |
|--|--------------|
| (0 g/L) $Y_1 = 21,2633 - 0,7960X + 0,0097X^2$ | $R^2 = 83,3$ |
| (3 g/L) $Y_2 = 39,2047 - 0,6147X + 0,0063X^2$ | $R^2 = 73,9$ |
| (6 g/L) $Y_3 = 46,0080 - 0,4124X - 0,0040X^2 + 0,00008X^3$ | $R^2 = 89,9$ |
| (12 g/L) $Y_4 = 53,1547 - 1,1812X + 0,0121X^2$ | $R^2 = 71,0$ |
| (18 g/L) $Y_5 = 47,1760 - 0,8108X + 0,0091X^2$ | $R^2 = 83,9$ |
| (24 g/L) $Y_6 = 54,6229 - 0,9725X + 0,0090X^2$ | $R^2 = 72,2$ |

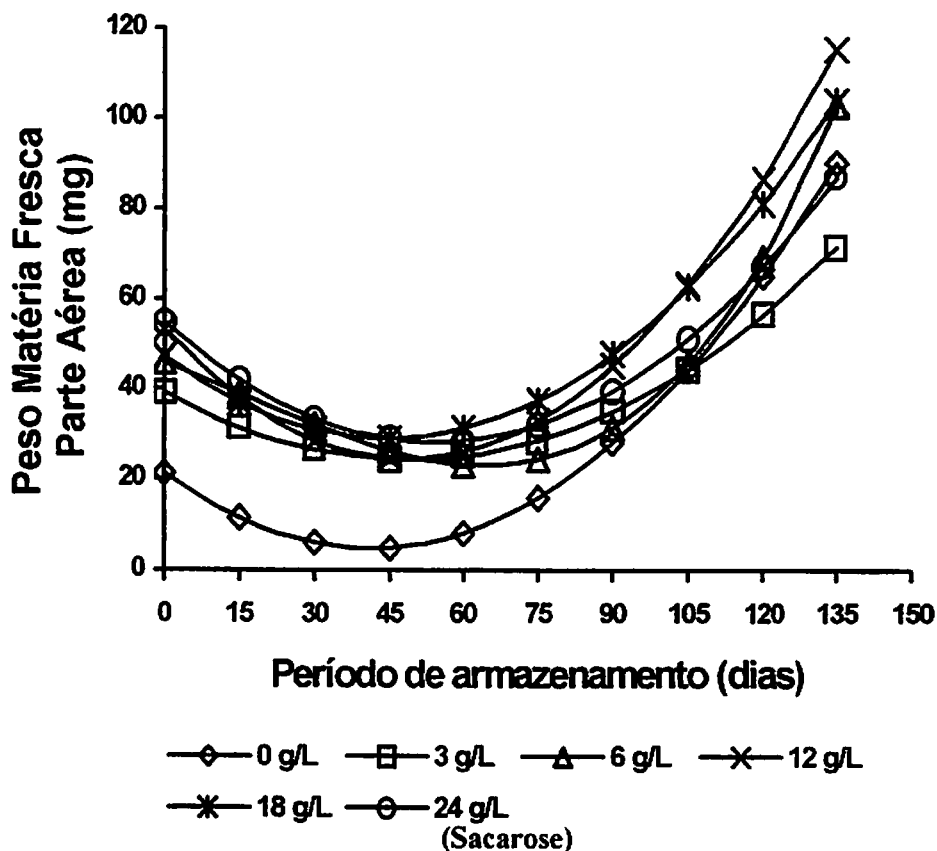


FIGURA 3. Peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose (g.L^{-1}), a partir de sementes que foram coletadas em diversos períodos de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

Nota-se que o melhor resultado foi encontrado com 12 g.L^{-1} de sacarose e 135 dias de armazenamento. As demais concentrações de sacarose também

mostraram resultados bem expressivos aos 135 dias de armazenamento. Portanto, a concentração de 3 g.L⁻¹ de sacarose induziu o menor peso de massa fresca da parte aérea.

Na Figura 4, observa-se que o peso da matéria seca da parte aérea foi igual nas concentrações 12 e 18 g.L⁻¹ de sacarose aos 135 dias de armazenamento dos frutos. Nota-se que o peso da matéria seca com a concentração de 18 g.L⁻¹ de sacarose de frutos recém colhidos foi bem expressiva se comparada ao valor alcançado pela concentração de 12 g.L⁻¹ de sacarose no mesmo período de armazenamento. Este fato é devido ao maior requerimento de sacarose no meio de cultivo para os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões (Rietsema et al., 1953).

$$(12 \text{ g/L}) Y_1 = 7,3617 - 0,0588X + 0,0017X^2$$

$$R^2 = 70,6$$

$$(18 \text{ g/L}) Y_2 = 23,7436 - 0,9168X + 0,0143X^2 - 0,00005X^3$$

$$R^2 = 77,9$$

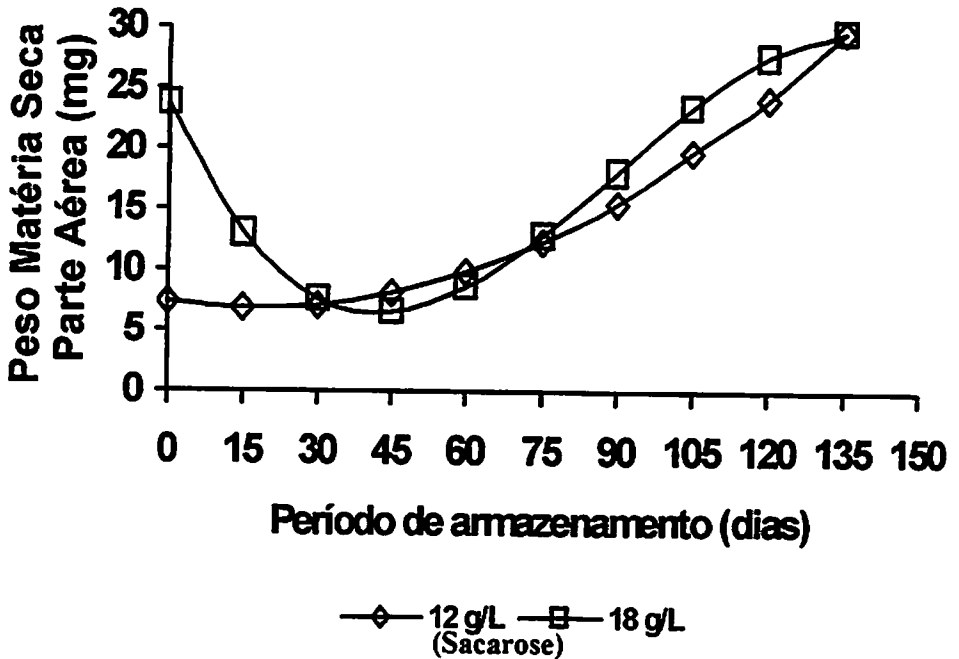


FIGURA 4. Peso da matéria seca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose (g.L⁻¹), a partir de sementes que foram coletadas em diversos períodos de armazenamento (dias). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Com relação ao comprimento de raízes (Figura 5), melhores resultados de armazenamento dos frutos, foram observados tanto com 12 g.L⁻¹ como com 18 g.L⁻¹ de sacarose e 135 dias.

$$(12\text{g/L}) Y_1 = 0,0725x + 1,5436 \quad R^2 = 1$$

$$(18\text{ g/L}) Y_2 = 0,0681x + 1,6409 \quad R^2 = 1$$

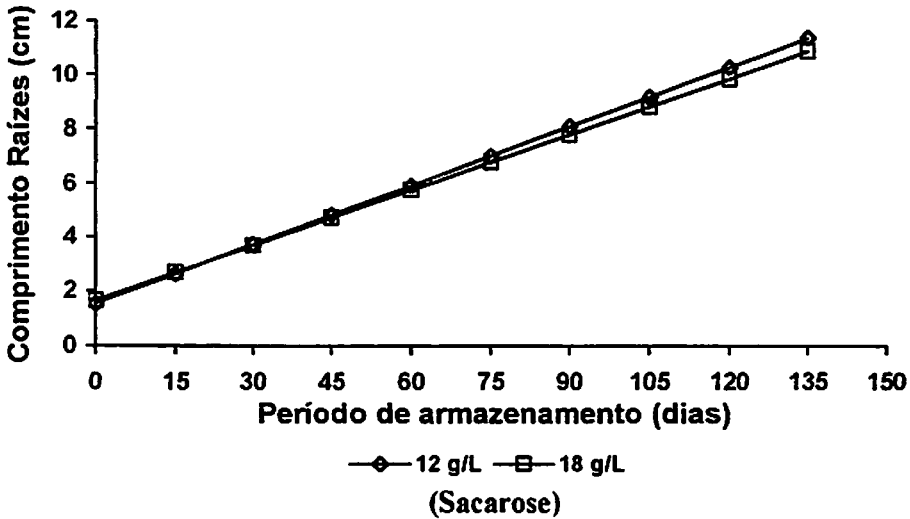


FIGURA 5. Comprimento de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose (g.L⁻¹), a partir de sementes que foram coletadas em diversos períodos de armazenamento. UFLA, Lavras-MG, 2000.

O maior peso da matéria fresca das raízes foi alcançado com a concentração de 12 g.L⁻¹ de sacarose e 135 dias de armazenamento (Figura 6). A concentração 18 g.L⁻¹ de sacarose expressou tendência de aumento no peso da matéria seca de raízes com a elevação do período de armazenamento.

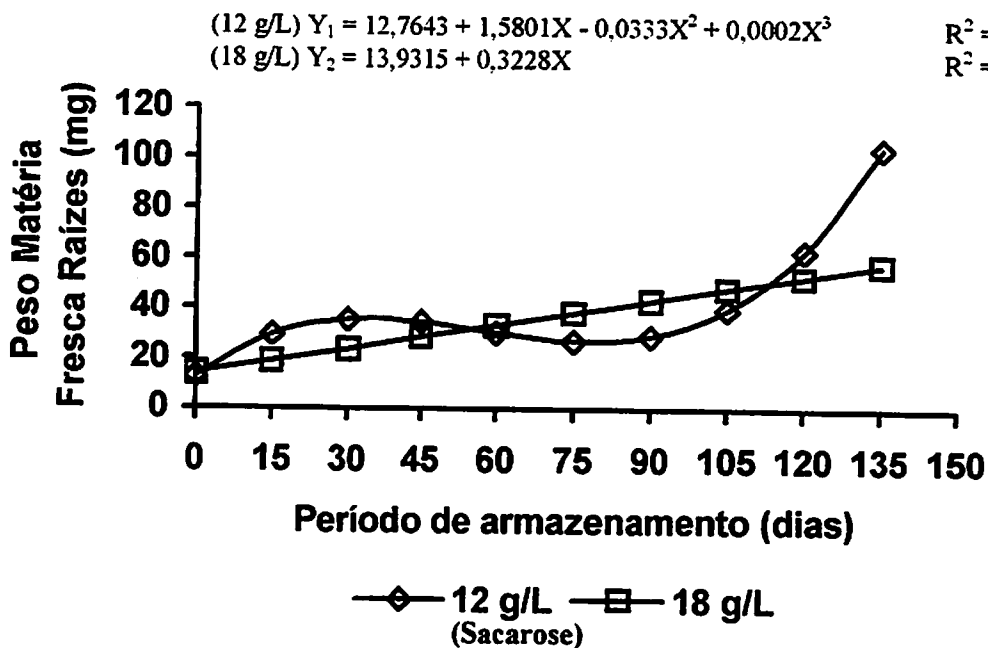


FIGURA 6. Peso da matéria fresca de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose (gL^{-1}), a partir de sementes que foram coletadas em diversos períodos de armazenamento (dias). UFLA, Lavras-MG, 2000.

Os resultados obtidos, de modo geral, concordam com Gomes (1995), que armazenando frutos jovens de pepino, observou que o armazenamento, mesmo em condições ambientais naturais, beneficiou a qualidade das sementes. Com certeza, as condições em que os frutos foram preservados eram apropriadas, pois elas são fundamentais para a manutenção da viabilidade dos embriões. Temperatura e umidade, conforme citações de Barton (1961) e Roberts (1972), afetam a longevidade de sementes, tanto em ambiente natural como em condições controladas, interferindo na qualidade fisiológica das mesmas.

A conservação de frutos com embriões viáveis por mais de quatro meses, corrobora afirmações de Chacks e Singh (1970) de que a melhor condição para

armazenamento de sementes de *Citrus paradisi* foi elevado teor de umidade e temperatura entre 5 e 8°C. No presente trabalho, umidade não foi fator estudado, porém, pode-se afirmar que no interior dos frutos conservados a umidade se mantém alta por período considerável, contribuindo para a preservação da viabilidade das sementes e conseqüentemente dos embriões. Estes dados estão de acordo também com aqueles obtidos por Almeida et al. (1989), que registraram germinação de sementes de maracujá após seis meses de armazenamento, tanto em condições ambientais naturais, como em câmara seca e câmara úmida. Porém, neste caso, em condições naturais, após 12 meses a viabilidade das sementes de maracujá à temperatura de 5 a 10°C por aproximadamente um ano e sementes de marmeleiro, após 24 meses de conservação em ambiente frigorífico, ainda registraram 80% de emergência (Dall'Orto et al. 1995).

Este elevado índice de viabilidade dos embriões, registrado após 135 dias de armazenamento, pode ser atribuído também à ausência de luz, uma vez que os frutos é que foram armazenados. Nestas condições, a germinação precoce dos embriões foi evitada, dando oportunidade para que os mesmos completassem seu desenvolvimento, com maiores chances posteriores de originarem plântulas vigorosas. Esta observação confirma afirmação de Rijven (1952) de que luz deve ser evitada nos primeiros dias de cultura de embriões.

A temperatura utilizada na conservação dos frutos foi também fator importante na preservação das características dos embriões. Basta observar citações de Zagaja et al. (1960) e Zagaja (1962a,b) de que embriões de pessegueiro, cerejeira, ameixeira e pereira, respectivamente, não tratados com baixas temperaturas, exibiram baixa vitalidade e germinação e produziram plantas anormais.

O fato de que em um mesmo fruto encontram-se embriões em diferentes fases de desenvolvimento e que, por conseguinte, têm exigências diferentes

quanto ao potencial osmótico, levaria, segundo Sharma, Kaur e Kumar (1996), à maior necessidade de sacarose no sentido de evitar a germinação precoce dos embriões. A afirmação destes autores não foi integralmente confirmada, uma vez que concentrações intermediárias de sacarose (12 a 18 g.L⁻¹) tiveram comportamento mais expressivo que concentrações mais elevadas. Estes mesmos autores fazem referência à dificuldade de se postular os efeitos de cada fator do ambiente em particular, apesar da existência de inúmeros relatos sobre os efeitos de fatores ambientais.

Observa-se, na Figura 7, que o melhor peso de matéria seca de raízes, foi registrado com 135 dias de armazenamento dos frutos com a concentração de 24 g.L⁻¹ de sacarose.

| | |
|--|--------------|
| (3g/L) $Y_1 = 0,2296 + 0,0537 X$ | $R^2 = 33,5$ |
| (12g/L) $Y_2 = 4,5261 + 0,1064 X$ | $R^2 = 57,4$ |
| (18 g/L) $Y_3 = -0,4032 + 0,3845 X - 0,0017 X^2$ | $R^2 = 75,0$ |
| (24g/L) $Y_4 = 8,5333 + 0,1470 X$ | $R^2 = 53,1$ |

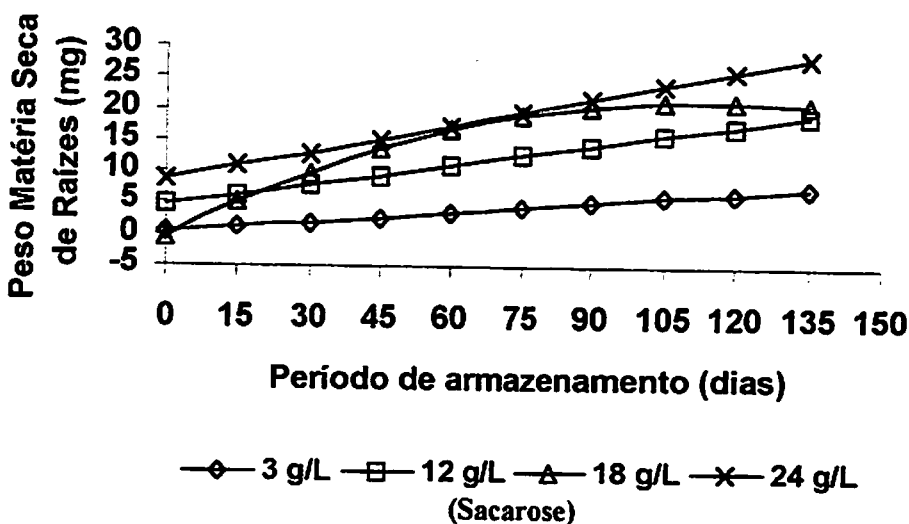


FIGURA 7. Peso da matéria seca de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira Poncã, cultivados *in vitro* no meio MS com diferentes teores de sacarose (g.L⁻¹), a partir de sementes que foram coletados em diversos períodos de armazenamento (dias). UFLA, Lavras-MG, 2000.

6 CONCLUSÕES

Para as condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- É possível armazenar frutos imaturos para posterior excisão e cultura de embriões.
- Frutos com 120 dias após a hibridação podem ser armazenados por até 135 dias sem prejuízo da viabilidade dos embriões.
- Melhor desenvolvimento tanto da parte aérea como do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões de *Citrus reticulata* Blanco é observado em meio MS acrescido de 12-18 g.L⁻¹ de sacarose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M. de; NAKAGAWA, J.; ALMEIDA, R.M. de. Efeito de armazenamento na germinação de sementes de maracujá amarelo de diferentes estádios de maturação. I. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, 1988, Campinas. Anais... Campinas: S.B.F., 1988, v.9, p.603-608.
- BACCHI, O. Estudo sobre a conservação de sementes de café. *Bragantia*, v.15, n.8, p.83-91, 1958.
- BARTON, L.V. *Seed preservation and longevity*. London: Leonard Hill Books, 1961. 216p.
- BELOUALY, N. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.24, p.29-34, 1991.
- BEM-YEHOSHUA, S. Some physiological effects of delaying deterioration of citrus fruits by individual seal packaging in high density polyethylene film. *Journal American Horticultural Science*, Alexandria, v.104, n.6, p.868-872, 1979.
- BLEINROTH, E.W. Recomendações para armazenamento. *Toda Fruta*, São Caetano do Sul, v.1, p.79-91, 1986.
- 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.
- CASTRO, D.V. de. Estudo do dano fisiológico causado pelo frio em Limão Taiti (*Citrus latifolia* Tanaka). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Brasília, v.1, 1985. Anais... Brasília: EMBRAPA-SBF/CNPq, p.215-220, 1985.
- CASTRO, P.R.C.; FERRAZ, L.C.C.B. Aspecto da fisiologia dos citros. *Planta Cítrica*, Cordeirópolis, v.1, p.109-124, 1982.

- CHACKO, E.K.; SINGH, R.M. Studies on the germination and longevity of fruit-trees-seeds, *Citrus* spp. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v.25, n.3-4, p.94-103, 1969.
- CHEFTEL, J.; CHEFTEL, L.H. **Introduction a la bioquímica e tecnologia de los alimentos**. Zaragoza, v.1, 333p, 1976.
- CORRÊA, F.L.O. Efeito da embalagem e do armazenamento na germinação e vigor de sementes de goiabeira (*Psidium guajava* L.). Lavras: UFLA, 1997. 57p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- CUQUERELLA, J.; MARTINEZ, J.M.; JIMENEZ, M. Frigo-conservacion de citricos. **Joja técnica**, Valência, v.45, p.1-20, 1983.
- DALL'ORTO, F.A.C.; OJIMA, M.; FERRAZ, E.S. de B. et al. Conservação de sementes de marmeleiro. **Bragantia**, Campinas, v.44, n.1, p.347-356, 1985.
- GAVISH, H.; VERDI, A.; FLUHR, R. Extra cellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucelar cell cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, p.606-616, 1991.
- GOMES, S.M. de S. **Influência de idade, coloração externa e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.)**. Viçosa: UFV, 1995. 80p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to Plant Biochemistry**. New York: Pergamon Press, 1983. 667p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-160.
- JANICK, J. **A Ciência da Horticultura**. Rio de Janeiro: USAID, 1966, p.266-269.
- KRISHNA, M.P.R.; SHANKER, G. Studies on the longevity of citrus seed under various storage conditions. **Plant Science**, Limerick, v.6, p.103-104, 1977.
- MELLO, M.O. **Utilização das fontes de carbono, sacarose, galactose, sorbitol e glicerol por células *in vitro* de plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. 94p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).

- NARAYANASWAMI, S.; NORSTOG, K. Plant embryo culture. *Botany Review*, v.30, p.587-628, 1964.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Alexandria, v.100, n.5, p.471-479, 1975.
- PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação de *Trifoliata* através de cultura de gemas axilares *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.2, p.217-220, fev. 1989a.
- PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da laranja 'Valência' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.6, p.723-726, jun. 1989b.
- RIJVEN, A.H.G.C. *In vitro* studies on the embryos of *Copsella bursa pastoris*. *Acta Botanica*, Netherlands, v.1, p.157-200, 1952.
- ROBERTS, E.H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E.H. (ed.). *Viability of seeds*. Syracuse: Syracuse University Press, 1972. Cap.2, p.14-58.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.; VOLPE, C. et al. Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: FRUPEX-EMBRAPA, 1996. 63p.
- SÃO JOSÉ, A.R. Propagação do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VALE, R.L. *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.25-41.
- SHARMA, D.R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants – a review. *Euphytica*, Netherlands, v.89, p.325-337, 1996.
- STRICKLAND, S.G.; NICHOL, J.W.; McCALL, C.M.; STUART, D.A. Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Science*, v.48, 1987, p.113-121.
- SWEDLLUND, B.; LOCY, R.D. Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiology*, v.103, 1993, p.1339-1346.

- ZAGAJA, S.W.; HOUNG, L.F.; BAILE, C.H. The response of miniature peach embryos to low temperature treatments. **Proceeding American Society Hortscience**, v.75, p.171-180, 1960.
- ZAGAJA, S.W. The effect of gibberellic acid on cherry seedling growth. **Horticultural Research**, v.1, p.81-84, 1962a.
- ZAGAJA, S.W. After-ripening requirements of immature fruit trees embryos. **Horticultural Research**, v.2, p.19-34, 1962b.
- ZAGAJA, S.W.; WISNIEWKA, J.; ZAGAJA, W. The growth of seedlings from immature sweet cherry embryos. **Proceeding Institute Sadaw Skierniew**, v.7, p.3-13, 1963.