

EFEITOS DA SACAROSE E DO NITROGÊNIO INORGÂNICO SOBRE A MULTIPLICAÇÃO "IN VITRO" DE BROTAÇÕES DE PORTA-ENXERTO DE CITROS (1)

EDUARDO OSSAMU NAGAO (2), MOACIR PASQUAL (3,4) e JOSÉ DARLAN RAMOS (3)

RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar os efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico (NH_4NO_3 e KNO_3) sobre a multiplicação "in vitro" de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Brotos apicais obtidos através de sucessivas repicagens em meio Murashige & Skoog (MS) acrescido de BAP 1,0 mg/l e ANA 1,0 mg/l, foram transferidos para novo meio MS suplementado com as combinações de sacarose (0; 7,5; 15; 30; 45 e 60 g/l) e nitrogênio inorgânico (0; 1/4; 1/2; 1 e 2 MS) dos níveis presentes no meio MS. Os brotos foram mantidos a 2.500 Lux por 16 horas diárias, com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 45 dias de cultivo, avaliaram-se o número total de brotos e o número de brotos com medidas superiores a 1 cm de comprimento. Observou-se que as doses da sacarose e do nitrogênio inorgânico afetaram as características avaliadas, sendo as melhores respostas obtidas quando se utilizaram concentrações entre 30 e 45 g/l da sacarose associadas ao dobro da dose (2 MS) do nitrogênio inorgânico presente no meio MS.

Termos de indexação: cultura de tecido, *Citrus*, sacarose, nitrogênio inorgânico.

ABSTRACT

EFFECTS OF SUCROSE AND INORGANIC NITROGEN ON MULTIPLICATION OF "IN VITRO" CULTURE OF *PONCIRUS TRIFOLIATA*

It was studied the effects of sucrose and inorganic nitrogen on multiplication of (NH_4NO_3 and KNO_3) "in vitro" culture of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Apex buddings from successive multiplications in MS medium added with BAP 1.0 mg/l and ANA 1.0 mg/l were placed into new MS media where different tested combinations of sucrose (0; 7.5; 15; 30; 45 and 60 g/l) and inorganic nitrogen levels (0 MS;

(1) Recebido para publicação em 29 de novembro de 1993 e aceito em 27 de maio de 1994.

(2) Instituto de Ciências Biológicas da Fundação Universidade do Amazonas, 69020-390 Manaus (AM).

(3) Escola Superior de Agricultura de Lavras, Caixa Postal 37, 37200-000 Lavras (MG).

(4) Bolsista do CNPq.

1/4 MS; 1/2 MS; 1 MS and 2 MS) present in MS medium were tested. The buddings were maintained under the 2,500 lux for 16 daily hours at $27 \pm 2^\circ\text{C}$. After 45 days they were evaluated according characteristics of total number of buds and number of buds higher than 1 cm long. The sucrose and inorganic nitrogen doses affected the rated characteristics. The best responses observed were between 30 to 45 g/l of sucrose associated with double (2 MS) dose of inorganic nitrogen.

Index terms: tissue culture, *Citrus*, sucrose, inorganic nitrogen.

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação em associação com outras técnicas da cultura de tecidos de plantas permite a obtenção, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, de grande número de plantas com boa qualidade fitossanitária e autenticidade varietal.

No caso dos citros, essa técnica é uma alternativa na propagação de porta-enxertos, principalmente daqueles com características importantes como o *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., que apresenta tolerância a temperaturas baixas (Hearn et al., 1974).

O sucesso da micropropagação depende não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos) como, também, das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida e do meio de cultura apropriado que permite a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias. As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições "in vitro" variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, o que torna necessária a otimização dos meios de cultura.

Na literatura encontram-se várias formulações de meio de cultura para as mais diversas espécies cultivadas "in vitro". Tais meios geralmente são compostos de uma fonte de carboidrato, macro- e micronutrientes e outras substâncias orgânicas. Normalmente, para o cultivo de citros, utilizam-se o meio M.S. (Murashige & Skoog, 1962) e/ou o M.T. (Murashige & Tucker, 1969).

A sacarose tem sido o carboidrato preferencialmente utilizado no meio de cultivo, em vista

de certas características, como alta solubilidade e rápida metabolização pela maioria das células vegetais (Thorpe & Beaudoin-Eagan, 1984).

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 e 4%. Para os citros, as concentrações ótimas de sacarose podem variar de 2 a 7% de acordo com os explantes utilizados (Chaturverdi & Mitra, 1974; Navarro et al., 1985; Pasqual, 1985; Said & Murashige, 1987).

De acordo com Gamborg (1970), a concentração de sacarose afeta a assimilação de nitrogênio do meio de cultura pelas células, e o efeito da citocinina na divisão celular pode também depender da disponibilidade do açúcar. Meios contendo concentração alta de sacarose e baixa de citocinina favorecem a diferenciação e crescimento de brotações.

O nitrogênio, juntamente com a sacarose, é o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do seu potencial osmótico. Grey (1987) observou, em seus estudos, que a taxa de consumo de sacarose presente no meio de cultura estaria relacionada com o nível e com a natureza da fonte de nitrogênio.

O crescimento e a morfogênese de células e tecidos de plantas cultivadas "in vitro" são marcadamente influenciados pela disponibilidade e pela forma na qual o nitrogênio é suplementado no meio de cultivo. De acordo com Dougall (1980), o nitrogênio, além de exercer um papel

importante no crescimento, pode influenciar na produção de metabólitos secundários em plantas superiores.

O nitrogênio inorgânico é geralmente fornecido no meio de cultura na forma de sais de nitrato e/ou de amônio. Esses íons são de grande importância no controle de um pH adequado no meio de cultura, pois atuam como agente tamponeante, favorecendo a absorção de outros íons presentes nesse meio.

Vários são os relatos evidenciando que não só a quantidade relativa de nitrato ou amônio, mas também sua concentração total, podem ser críticas no processo de morfogênese e no crescimento dos tecidos (Gamborg, 1970; Sakuta, 1987).

Objetivou-se, com o presente trabalho, determinar doses de sacarose e nitrogênio inorgânico que propiciassem alta taxa de multiplicação de *P. trifoliata* (L.) Raf.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em Lavras (MG), com o *P. trifoliata* (L.) Raf., um porta-enxerto bastante utilizado na citricultura.

O meio de cultura utilizado nos ensaios foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), com exceção das concentrações de nitrogênio inorgânico total (KNO_3 e NH_4NO_3), suplementado com os seguintes reguladores de crescimento: ácido naftalenoacético (ANA), 1,0 mg/l, e benzilaminopurina (BAP), 1,0 mg/l, de acordo com Pasqual (1985).

Os explantes, obtidos de material já mantido "in vitro", constituídos de brotações apicais com 1 cm de comprimento e duas gemas, foram cuidadosamente inoculados nos tubos de ensaio distribuídos nos devidos tratamentos.

Os meios de cultura, com pH ajustado para 5,7 e após solidificados com 0,7% de ágar, foram distribuídos em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) e esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

Os ensaios foram realizados em sala de crescimento com temperatura de $\pm 26^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2.500 lux. Testaram-se seis concentrações de sacarose e 5 de nitrogênio inorgânico total, num fatorial simples 6 x 5, com 5 repetições, cada qual constituída por 10 tubos de ensaio.

As concentrações utilizadas de sacarose em gramas/litro foram as seguintes 0,0; 7,5; 15; 30; 45 e 60. Para maior facilidade de interpretação, as concentrações do nitrogênio inorgânico a testar nos meios de cultura foram obtidas de acordo com diluições ou múltiplos das quantidades existentes no meio básico MS: 0, 1/4, 1/2, 1 e 2.

As avaliações foram realizadas 45 dias após a instalação do experimento, através da contagem do número total de brotos e número de brotos maiores que 1 cm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises da variância e regressão para o número total de brotos e de brotos superiores a 1 cm de comprimento encontram-se no quadro 1. Verifica-se que houve diferença significativa, ao nível de 1%, pelo teste F, entre os tratamentos contendo diversos níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico, bem como para a interação desses fatores, para ambas as características avaliadas.

Os melhores resultados obtidos tanto para o número total de brotos (Quadro 2) como para o número de brotos superiores a 1,0 cm de comprimento (Quadro 3), foram com 40 g/l de sacarose associada ao dobro (2 MS) da concentração de nitrogênio inorgânico presente no meio MS, com 13,4 e 5,9 novas brotações por explante respectivamente (Figuras 1 e 2).

Os resultados desse trabalho mostram a necessidade da sacarose e do nitrogênio inorgânico na indução de brotações e são condizentes com a literatura consultada (Gamborg, 1970; Brown & Thorpe, 1982).

Segundo Thorpe & Beaudoin-Eagan (1984), a sacarose também estaria relacionada com o

aumento de metabolismo de carboidratos, via pentose fosfato, fornecendo uma produção extra de ATP, NADP e compostos intermediários requeridos para o processo de multiplicação celular. A necessidade de nitrogênio está relacionada com bios-

síntese de aminoácidos e compostos nitrogenados. A energia gerada pelo metabolismo da sacarose também é utilizada nos processos de absorção de compostos orgânicos estruturais ou metabólicos e de outros íons presentes no meio.

Quadro 1. Resumo da análise da variância e regressão para o número total de brotos (NTB) e número de brotos superiores a 1,0 cm de comprimento (NBS) de *P. trifoliata* obtidos em culturas com diferentes níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico

Causas da variação	G.L.	Quadrados médios e significância	
		N.T.B.	N.B.S.
Sacarose	(5)	38,08**	25,83**
Linear	1	0,98*	32,22**
Quadrática	1	129,19*	85,92*
Cúbica	1	1,6	8,25
Nitrogênio	(4)	137,36**	24,26**
Linear	1	229,46*	67,69**
Quadrática	1	254,53*	23,59*
Cúbica	1	59,80	6,29
Sac. x Nitro	26	0,97**	6,64**
Resíduo	120	0,06	0,03
C.V. (%)		2,93	6,28
R ²		0,99	0,95

* Significativo ao nível de 5%. ** Significativo ao nível de 1%.

Quadro 2. Médias do número total de brotos por explante de *P. trifoliata* obtidos "in vitro", em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio

Sacarose	Nitrogênio Inorgânico					Média
	0 MS ⁽¹⁾	1/4 MS	1/2 MS	1 MS	2 MS	
g/l						
0,0	5,60aD ⁽²⁾	8,15cA	7,85dAB	7,70eB	6,30eC	7,12f
7,5	4,90bcD	9,80bB	11,10bA	11,10bA	9,30dC	9,24c
15	5,30abD	11,80aB	11,15bC	13,50aA	10,85cC	10,52a
30	5,50aD	7,85cdC	12,50aA	11,45bB	11,70bB	9,80b
45	4,50cE	7,80cdD	8,40cC	10,20cB	12,45aA	8,67d
60	5,50aE	7,50dD	8,30cC	8,95dB	9,60dA	7,97e
Média	5,21D	8,81C	9,88B	10,48A	10,03B	—

⁽¹⁾ MS - meio de cultura Murashige & Skoog (1962). ⁽²⁾ As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para nitrogênio e minúscula para sacarose) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 1%.

Quadro 3. Número médio de brotos maiores que 1 cm de comprimento por explante obtido "in vitro" de *P. trifoliata* em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio

Sacarose g/l	Nitrogênio Inorgânico					Média
	0 MS ⁽¹⁾	1/4 MS	1/2 MS	1 MS	2 MS	
0,0	1,05Ca ⁽²⁾	1,05Ea	1,30Fa	1,15Fa	1,10Ea	1,13E
7,5	1,10Ce	3,20Bb	3,55Ca	2,45Dc	1,40Dd	2,39D
15	1,15Ce	3,90Ac	4,30Ab	4,60Ba	2,80Cd	3,35B
30	1,55Bd	2,80Cc	3,95Bb	6,20Aa	6,00Aa	4,10A
45	1,50Be	2,25Dd	3,00Dc	3,35Cb	6,00Aa	3,22B
60	2,05Ac	2,10Dc	2,40Eb	2,55Db	4,85Ba	2,79C
Média	1,40e	2,55d	3,08c	3,38b	3,69a	--

⁽¹⁾ MS - meio de cultura Murashige & Skoog (1962). ⁽²⁾ As médias seguidas da mesma letra (minúscula para nitrogênio e maiúscula para sacarose) não diferem entre si pelo teste de Duncan a 1%.

		R ²	Ponto de máxima
0 MS: Y = 5,47 - 0,02X + 0,0004X ²		0,75	-
1/4 MS: Y = 9,27 + 0,03X - 0,0012X ²		0,78	12,50
1/2 MS: Y = 8,79 + 0,20X - 0,0037X ²		0,81	27,02
1 MS: Y = 8,94 + 0,23X - 0,0041X ²		0,81	28,04
2 MS: Y = 6,64 + 0,33X - 0,0040X ²		0,95	41,20

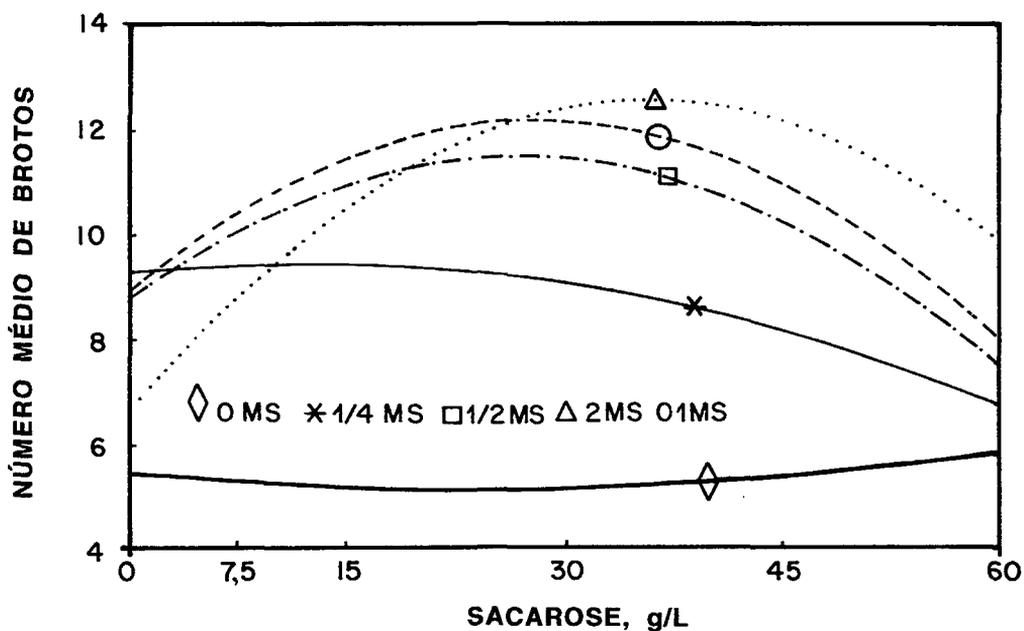


Figura 1. Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio no número médio de brotos de *P. trifoliata* "in vitro".

		R ²	Ponto de máxima
0 MS:	$Y = 1,048 + 0,07X + 0,0001X^2$	0,92	-
1/4 MS:	$Y = 1,900 + 0,97X - 0,0016X^2$	0,92	30,3
1/2 MS:	$Y = 2,008 + 0,145X - 0,0020X^2$	0,88	38,2
1 MS:	$Y = 1,160 + 0,263X - 0,0040X^2$	0,81	37,2
2 MS:	$Y = 0,036 + 0,250X - 0,0028X^2$	0,91	44,4

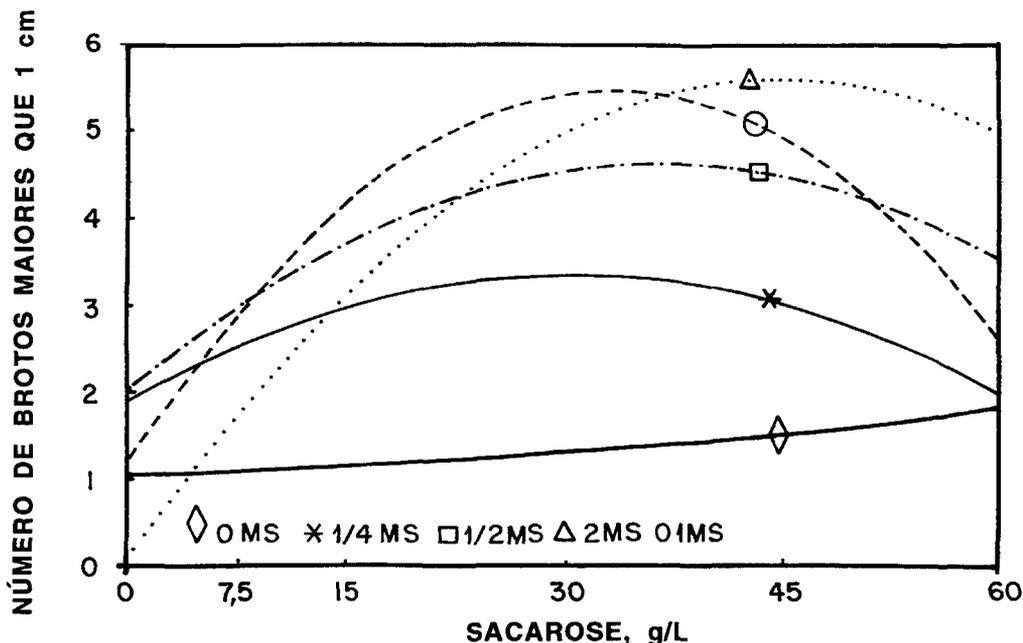


Figura 2. Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio sobre o número médio de brotos maiores que 1 cm de comprimento de *P. trifoliata* "in vitro".

De acordo com Gamborg (1970) os níveis de sacarose e nitrogênio podem atuar na eficiência de alguns reguladores de crescimento, como as citocininas, responsáveis pela promoção de novas brotações. Zenk et al. (1977) observaram que altas concentrações de sacarose induziam a biossíntese de compostos indólicos e conseqüentemente, a síntese de auxinas, as quais, juntamente com as gibberelinas, promoveriam o alongamento das brotações, contribuindo para aumentar as novas brotações.

4. CONCLUSÃO

As combinações entre a sacarose e o nitrogênio inorgânico foram positivas na multiplicação de brotos, sendo que 40 g/l de sacarose, associada ao dobro da dose de nitrogênio inorgânico presente no meio MS (2 MS), proporcionaram os

melhores resultados, tanto para o número de novas brotações como para o de brotos superiores a 1cm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, D.C.W. & THORPE, T.A. Mitochondria activity during shoot formation and growth in tobacco callus. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **54**:125-130, 1982.
- CHATURVERDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus culture. *Hortscience*, Alexandria, **9**(2):118-120, 1974.
- DOUGALL, D.K. Nutrition and metabolism. In: STABA, E.J., ed. *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. Boca Raton, CRC Press, 1980. p.51-58.

- GAMBORG, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology, Lancaster*, **45**:372-375, 1970.
- GREY, M. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., eds. *Cell and tissue culture in forestry. II*. Dordrecht, Marthinus Nijhoff, 1987.
- HEARN, C.J.; HUTCHINSON, D.J. & BARRET, H.C. Breeding citrus rootstock. *Hortscience, Alexandria*, **9**:357-358, 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, Copenhagen*, **15**:473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D., ed. INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1969. *Proceedings*. Riverside, University of California, 1969. p.1155-1161.
- NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M. & JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures "in vitro". *HortScience, Alexandria*, **20**(2):214-215, 1985.
- PASQUAL, M. *Regeneração de plantas "in vitro" e radiosensitividade de tecidos nucleares de citros*. Piracicaba, 1985. 107p. Tese (Doutorado em Agronomia) - ESALQ-USP, 1985.
- SAID, A.G.E. & MURASHIGE, T. Continuous cultures of tomato and citron roots "in vitro". *In vitro, Gaithersburg*, **15**(8):459-463, 1987.
- SAKUTA, M. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum, Copenhagen*, **71**:459-463, 1987.
- THORPE, T.A. & BEAUDOIN-EAGAN, L.D. C-metabolism during growth and shoot formation in tobacco callus cultures. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie, Stuttgart*, **113**:337-346, 1984.
- ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STOCKIGTH, J.; WEILER, E.W. & DEUS, B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in culture suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M., eds. *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Berlin, Springer Verlag, 1977. p.27-43.