

## DESEMPENHO DE DIFERENTES ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS NO CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE 'PÊRA RIO' x 'PONCÃ'<sup>1</sup>

EDVAN ALVES CHAGAS<sup>2</sup>, MOACIR PASQUAL<sup>3</sup>, LEONARDO FERREIRA DUTRA<sup>3</sup>, ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA<sup>3,4</sup>, JAIRO OSVALDO CAZETTA<sup>2</sup>, FLÁVIA CARVALHO SANTOS<sup>3</sup>, POLLYANA CARDOSO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Objetivou-se verificar qual o melhor estágio embrionário para o cultivo de embriões imaturos oriundos de frutos provenientes de hibridação entre 'Pêra Rio' x 'Poncã', bem como o efeito de diferentes concentrações do meio de cultura MT. Os embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (globulares, torpedado e cordiforme) foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MT com diferentes concentrações (0; 50; 100 e 150% da composição original e acrescido de 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose). Após a inoculação, os embriões foram incubados a 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Após 90 dias, avaliou-se o comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa fresca e número de folhas das plântulas. Melhor desenvolvimento dos embriões imaturos foi obtido em estágio cotiledonar e com a concentração de 150% do meio MT.

**Termos para indexação:** *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, meio de cultura, cultura de embriões

### PERFORMANCE OF DIFFERENT EMBRYO STAGE OF SWEET ORANGE x MANDARIN CULTIVATED *in vitro*

**ABSTRACT** – Embryos obtained from *Citrus sinensis* Osbeck 'Pêra Rio' x *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã' crossings were excised in diverse phases of development and cultivated in different medium concentrations. Embryos in globular, torped and cotyledonary stage were excised and inoculated individually in test tubes with 15 mL in distinct MT medium concentrations (0; 50; 100 and 150% of original composition and added sucrose (50 g.L<sup>-1</sup>)). After inoculation, the embryos were maintained in growth room at 27±1°C, 16 hour photoperiod and 32 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> irradiance. After 90 days, the length of the aerial part and roots system, fresh mass and number of leaves, were evaluated. The best results were obtained by incubating embryos in the cotyledonary stage, in MT medium with concentrations of 150%.

**Index terms:** *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, culture medium, embryos culture

Os métodos clássicos de melhoramento, utilizados na obtenção de novos híbridos em *Citrus* e gêneros afins, estão limitados por problemas como apomixia, elevadas taxas de heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade masculina e feminina, além de longo período de juvenildade (Cameron & Frost, 1968; Soost & Cameron, 1975). A elevada taxa de poliembrião, generalizada entre as espécies de *Citrus*, resulta normalmente em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre ele pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos (Soost & Cameron, 1975). Entretanto, esses embriões podem ser resgatados via cultivo *in vitro* em meio de cultura adequado (Sharma et al., 1996).

O sucesso no resgate de embriões híbridos dependerá, principalmente, do estágio em que o embrião está sendo excisado e da composição do meio de cultura utilizado no cultivo *in vitro*. De maneira geral, o embrião, durante o seu desenvolvimento, passa pelas fases globular, cordiforme, torpedado e cotiledonar, sendo que o cumprimento destas fases é imprescindível para a perfeita formação da plântula. Ocorre, porém, que embriões em estádios de desenvolvimento globular e cordiforme são mais exigentes em relação ao meio de cultivo, pois quanto mais jovens os embriões, mais difícil é o cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho e danos durante a excisão e, mais complexas são suas exigências nutricionais (Hu & Ferreira, 1998).

Diversos meios de cultura ou suas modificações têm sido utilizados no cultivo *in vitro* de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário de acordo com o gênero, espécie ou variedades. Entretanto, definir o meio de cultura e/ou sua composição, com possibilidade de sustentar o crescimento e desenvolvimento de embriões imaturos, se constitui no aspecto mais importante da cultura de embriões *in vitro* (Pasqual et al., 2001). Em razão disso, têm sido realizados inúmeros trabalhos com o objetivo de elucidar os efeitos de diversos fatores no cultivo *in vitro* de embriões de citros, dentre eles a concentração ótima de macro e micronutrientes, vitaminas e misturas complexas do meio de cultura MT (Morais, 1997), além de estudos de iden-

tificação dos estádios de desenvolvimento embrionário (Ribeiro et al., 1999).

Desta forma, objetivou-se estudar o cultivo de embriões imaturos em diversos estádios embrionários oriundos de frutos provenientes da hibridação entre laranja 'Pêra Rio' x tangerineira 'Poncã', bem como o comportamento destes em diferentes concentrações do meio MT.

Utilizaram-se frutos com 3 a 4 cm de diâmetro, provenientes de hibridações entre *Citrus sinensis* Osbeck 'Pêra Rio' x *Citrus reticulata* Blanco 'Poncã'. As sementes foram removidas e tratadas com álcool 70% por cinco minutos e, posteriormente, com hipoclorito de sódio 2%, por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Em condições assépticas, os embriões no estágio globular, torpedado e cotiledonar foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MT (Murashige e Tucker, 1969), modificado com diferentes concentrações de sais e vitaminas do próprio meio (0; 50; 100 e 150%), acrescido de 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Após a inoculação, os embriões foram incubados em sala de crescimento a 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo cada repetição constituída por três tubos, em esquema fatorial 3 x 4. Após 90 dias, as plântulas foram avaliadas com base no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa fresca e número de folhas.

O maior comprimento da parte aérea (1,63 cm) foi obtido com embriões no estágio cotiledonar, seguido por aqueles no estágio torpedado, independentemente da concentração do meio de cultura utilizado (Tabela 1). O comprimento da parte aérea aumentou linearmente com o incremento das concentrações do meio de cultura MT para todos os estádios (Figura 1A). Embora a concentração de sais do meio MT seja alta, o que poderia causar toxidez aos embriões, provavelmente a alta concentração de sacarose (50 g.L<sup>-1</sup>) atua como um atenuador do meio, evitando danos aos embriões. Hu & Ferreira (1998) citam que os

<sup>1</sup> (Trabalho 066/2003). Recebido: 10/06/2003. Aceito para publicação: 01/10/2003. Parte da dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras (UFLA) para obtenção do título de mestre.

<sup>2</sup> FCAV/UNESP - Departamento de Tecnologia, Rod. Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900. Jaboticabal, SP. E-mail: cazetta@fcav.unesp.br, edyvanchagas@bol.com.br.

<sup>3</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cx. Postal, 37, 37200-000. Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

<sup>4</sup> Bolsista BAT/FAPEMIG.

**TABELA 1** - Comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas oriundas de embriões imaturos em diferentes estádios embrionários provenientes do cruzamento controlado entre laranjeira 'Pêra Rio' x tangerineira 'Poncã' quando cultivados em diferentes concentrações do meio MT. UFLA, Lavras, MG, 2002.

| Estádios de desenvolvimento | CPA (cm) |
|-----------------------------|----------|
| Globular                    | 0,97 c   |
| Torpedo                     | 1,22 b   |
| Cotiledonar                 | 1,63 a   |

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de probabilidade, segundo o teste de Tukey.

carboidratos desempenham importante papel na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura. Os mesmos autores ainda descrevem que quanto mais jovem for o embrião, mais alta deverá ser a osmolaridade do meio.

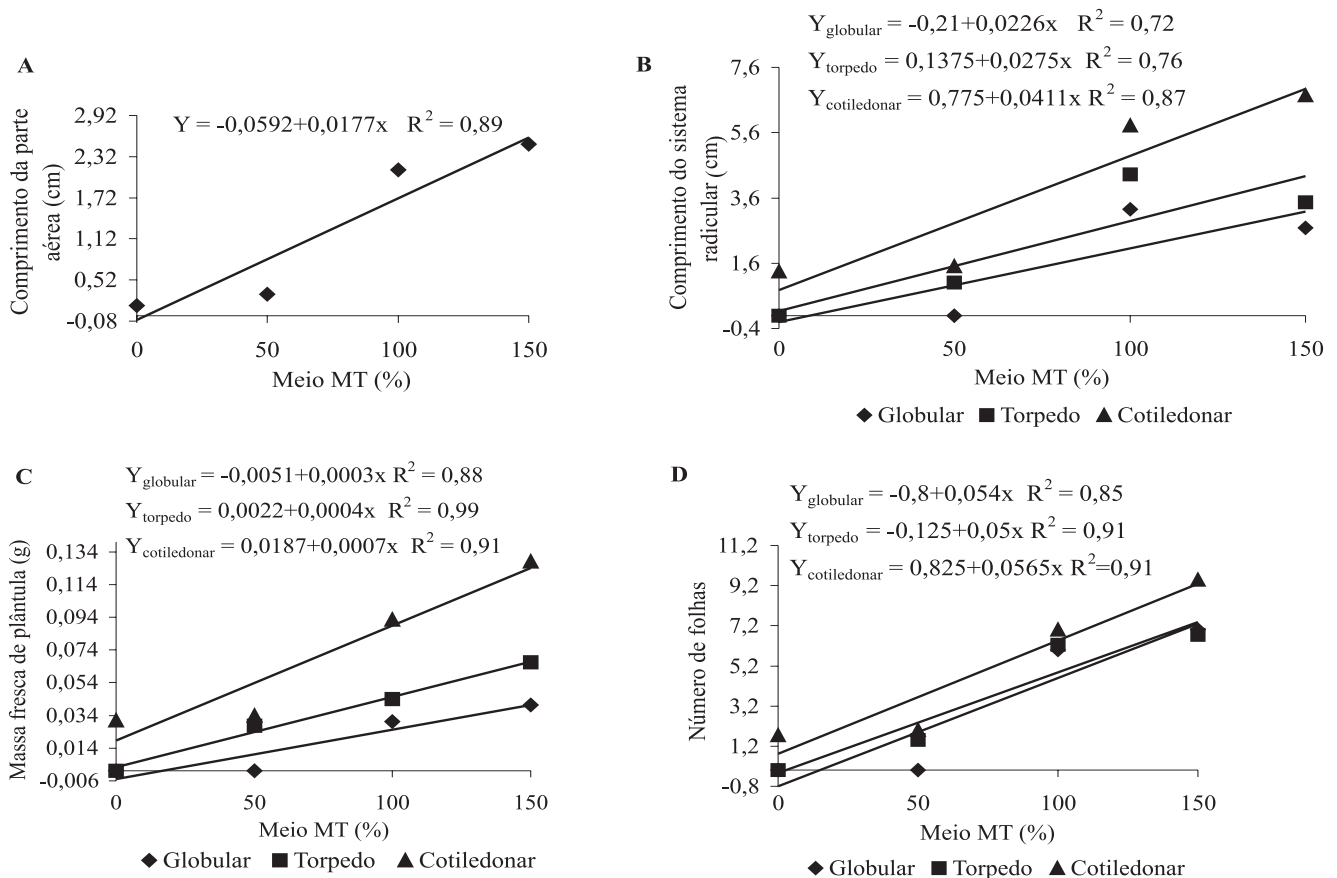
O comprimento do sistema radicular, massa fresca e número de folhas por plântula aumentou linearmente com o incremento das concentrações do meio MT para os embriões nos estádios globular, torpedo e cotiledonar. Os maiores valores para as variáveis analisadas foram obtidos com embriões no estágio cotiledonar, seguidos por aqueles no estágio torpedo e globular (Figuras 1B, 1C e 1D).

De maneira geral, o maior desenvolvimento de embriões foi obtido no estágio cotiledonar, seguido pelo estágio torpedo. Independentemente do estágio em que foram excisados, houve desenvolvimento significativo dos embriões com o incremento das concentrações do meio de cultura MT (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D). Esse maior potencial de desenvolvimento dos embriões nos estádios cotiledonar e torpedo, juntamente com a disponibilidade de nutrientes do meio de cultura, provavelmente induziu o maior desenvolvimento destes tipos de embriões no presente trabalho.

Carimi et al. (1998) verificaram que a germinação dos embriões de citros foi máxima naqueles que se encontravam no estágio cotiledonar. Em contrapartida, aqueles no estágio globular tiveram baixa germinação e desenvolvimento lento. Quando os embriões estão em fases mais desenvolvidas adquirem uma capacidade autotrófica e, por vezes, podem responder melhor às condições do meio de cultura (Raghavan, 1976 & 1980). Devido ao fato de apresentarem maior tamanho ( $\geq 5$  mm), estes embriões germinam mais facilmente provavelmente pela maior quantidade de reservas nutritivas presente em seus cotilédones. Ribeiro et al. (1999), trabalhando com estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros, também observaram que embriões zigóticos que alcançaram o pleno desenvolvimento encontravam-se no estágio cotiledonar, caracterizando menor dependência de suprimentos exógenos para germinar e desenvolver.

Os embriões no estágio globular tenderam a apresentar menor desenvolvimento, resultados estes que concordam com o afirmado por Bruck & Walker (1985) ao mencionarem que o cultivo de embriões é dependente do genótipo e estágio de desenvolvimento, sendo a taxa de germinação inversamente proporcional à idade do embrião. Raghavan (1976 & 1980) descreve que embriões em fase inicial de desenvolvimento são heterotróficos e, muitas vezes, as condições ideais de nutrição são desconhecidas. Entretanto, é interessante que se estude as condições que viabilizem o cultivo de embriões globulares, pois, devido à depressão endogâmica, bastante comum no gênero *Citrus*, quanto mais cedo resgatá-los, maior a possibilidade de sobrevivência e melhor desenvolvimento dos embriões zigóticos que são os mais importantes nos programas de melhoramento.

O melhor desenvolvimento de embriões imaturos dos cruzamentos 'Pêra Rio' x 'Poncã' é obtido quando os mesmos são excisados no estágio cotiledonar e incubados na concentração de 150% do meio de cultura MT.



**FIGURA 1** - Comprimento da parte aérea (A) e do sistema radicular (B), massa fresca (C) e número de folhas (D) de plântulas oriundas de embriões em diferentes estádios embrionários provenientes de hibridação entre laranjeira 'Pêra Rio' x tangerineira 'Poncã', cultivados em diferentes concentrações do meio MT. UFLA, Lavras, MG, 2002.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v.146, n.2, p.188-195, 1985.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. Ed. **Citrus Industry**, Bartow, v.2, p.325-370, 1968.
- CARIMI, F.; PASQUALE, F. de; PUGLIA, A.M. *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. **Plant Breeding**, Berlin, v.117, n.3, p.261-266, 1998.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH/CBAB, 1998. v.2, p.371-393.
- MORAIS, L.S. **Ajuste do meio de Murashige e Tucker (MT) para o cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina "Cleópatra"** 1997. 86f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA., 1997.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1169.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; DUTRA, L.F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. 2001. 79p. Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" (Especialização em Cultura de Tecidos Vegetais: tecnologia e aplicações)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants**. London: Academic, 1976.
- RAGHAVAN, V. Embryo culture. **International Revision Cytology**, n.11, p.209-240, 1980.
- RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; BEARZOTI, E.; NETO, S.D. Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1327-1333, 1999.
- SHARMA, D.R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants - a review. **Euphytica**, Dordrecht, v.89, p.325-337, 1996.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette, Indiana: Purdue University, 1975. p.507-540.