

Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce

Somatic embryogenesis from calli of sweet orange cultivars

Livia Mendes de Castro^I Francisco de Assis Alves Mourão Filho^{I*}
Beatriz Madalena Januzzi Mendes^{II} Luzia Yuriko Miyata^I

- NOTA -

RESUMO

A regeneração de plantas, por organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro*, é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a embriogênese somática a partir de calos embriogênicos das cultivares de laranjeiras doces 'Hamlin', 'Pêra', 'Natal', 'Lima Verde' e 'Westin', em função da composição dos meios de cultura relacionada à fonte e concentração de diferentes carboidratos, utilizando-se meio de cultura MT modificado com 500mg L⁻¹ de extrato de malte, acrescido de sacarose, galactose, glicose, sorbitol, lactose ou maltose, nas concentrações de 18, 37, 75, 110 ou 150mM à 27°C. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial cinco (cultivares) x seis (fontes de carboidratos) x cinco (concentrações das fontes de carboidratos no meio de cultura), com cinco repetições. A formação de embriões somáticos variou conforme a cultivar, e as laranjeiras 'Hamlin' e 'Natal' registraram o maior número de embriões, enquanto 'Lima Verde' e 'Westin' apresentaram menores números. A melhor fonte de carboidratos para indução de embriogênese somática foi a maltose, seguida pela lactose, nas concentrações de 37 e 75mM. Embriogênese somática não foi observada nos meios de cultura contendo galactose, glicose ou sorbitol para nenhuma cultivar estudada.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, cultura de tecidos vegetais, embrião.

ABSTRACT

Plant regeneration, by organogenesis or somatic embryogenesis, from cell cultures and *in vitro* plant tissue culture is the basis for biotechnology usage in plant breeding. This research aimed to evaluate somatic embryogenesis from

embryogenic calli of 'Hamlin', 'Pêra', 'Natal', 'Lima Verde', and 'Westin' sweet orange cultivars related to culture medium composition as source and concentration of carbohydrates with the use of MT culture medium modified with 500mg L⁻¹ of malt extract, supplemented with sucrose, galactose, glucose, maltose, lactose, or sorbitol at concentrations of 18, 37, 75, 110 or 150mM at 27°C. Statistical design were complete randomized, in a factorial five (cultivars) x six (carbohydrate source) x six (carbohydrate concentration in culture medium) with five replicates. The production of somatic embryos varied with the genotype, as 'Hamlin' and 'Natal' cultivars registered higher number of embryos, whereas 'Lima Verde' and 'Westin' showed lower numbers. The best carbohydrate source was maltose, followed by lactose at concentrations of 37 and 75mM. Somatic embryogenesis was not observed on culture media supplemented with galactose, glucose or sorbitol in any studied cultivar.

Key words: *Citrus sinensis*, plant tissue culture, embryo.

A embriogênese somática consiste no processo de regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro*, em que células somáticas ou haploides desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de gametas. É considerada um sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores, apresentando aplicações biotecnológicas potenciais, tais como sementes sintéticas, micropropagação e transformação genética (BISPO et al., 2007; FERNANDES et al., 2008).

^IDepartamento de Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: famourao@esalq.usp.br. *Autor para correspondência

^{II}Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), USP, Piracicaba, SP, Brasil.

A embriogênese somática em citros tem sido observada a partir de calos embriogênicos cuja produção pode ocorrer a partir de nucelos, óvulos abortados, óvulos não desenvolvidos, anteras, estigmas; assim como folhas, epicótilos, cotilédones e segmentos de raízes. Embora ocorra variação no potencial embriogênico de *Citrus* em função do genótipo e do tipo de explante, melhores resultados foram obtidos em protocolos de regeneração envolvendo o uso de explantes de origem nucelar (FIORE et al., 2002).

Diferentes modificações têm sido empregadas no meio de cultura para indução à embriogênese somática, pois esse processo é altamente dependente de sua composição, principalmente, das fontes de carboidratos e reguladores vegetais. Os carboidratos nas plantas atuam, principalmente, como fonte de carbono e energia, agentes osmóticos e protetores contra estresse (LIPAVSKÁ & KONRÁDOVÁ, 2004). Em citros, a embriogênese somática é induzida tanto pela ausência de reguladores vegetais, como pela redução da concentração de carboidratos no meio de cultura, em contraste com outras espécies de plantas (KAYIM & KOC, 2006). Dos componentes do meio de cultura, os carboidratos, além de proporcionarem uma fonte de energia ao explante, são fundamentais para indução da embriogênese somática e cultivo dos embriões, sendo a sacarose o carboidrato mais comumente utilizado.

A embriogênese somática a partir de calos tem se mostrado, muitas vezes, limitante ao processo do melhoramento genético de citros e tem sido alvo de diversas pesquisas com o intuito de maximizar a regeneração de plantas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi otimizar protocolos de embriogênese somática em citros em função da composição dos meios de cultura relacionada a fontes e concentrações de diferentes carboidratos.

Linhagens de calos embriogênicos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) das cultivares 'Hamlin', 'Pêra', 'Natal', 'Lima Verde' e 'Westin' foram subcultivadas a cada quatro semanas em meio de cultura MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969) modificado com 500mg L⁻¹ de extrato de malte e 50g L⁻¹ de sacarose. Esses mesmos calos foram então utilizados para indução da embriogênese somática pela transferência e pelo cultivo em meio MT modificado com adição de 500mg L⁻¹ de extrato de malte e suplementação de uma das seis fontes de carboidratos para indução da embriogênese somática: sacarose, galactose, glicose, sorbitol, lactose ou maltose, nas concentrações de 18, 37, 75, 110 e 150mM. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do agente

solidificante (8g L⁻¹ de ágar) e da autoclavagem (121°C por 20 minutos). As condições de crescimento foram sob luz indireta (300 lux), com fotoperíodo de 16h e 27°C±2°C. Foram utilizados 50mg de calos embriogênicos em placas de Petri descartáveis (Corning™) (100x15mm). A avaliação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico (Nikon 102), aos 30 dias de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial cinco (cultivares) x seis (fontes de carboidratos) x cinco (concentrações das fontes de carboidratos no meio de cultura), com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. Utilizou-se estatística descritiva para análise dos dados cujas variáveis analisadas foram média ± erro padrão.

Aos 30 dias após o plaqueamento de calos embriogênicos nos meios de indução à embriogênese somática, constatou-se que as cultivares se diferenciaram quanto ao número de embriões induzidos e formados, e as laranjas 'Hamlin' e 'Natal' registraram maior número de embriões, enquanto 'Lima Verde' e 'Westin' apresentaram menores números (Tabela 1). A formação de embriões somáticos variou conforme o genótipo. Ressalta-se ainda que foram observados embriões somáticos em diferentes estádios (globular, cordiforme e cotiledonar) para todas as cultivares. Embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento também foram registrados em outras pesquisas envolvendo embriogênese somática *in vitro*, em várias espécies e cultivares do gênero *Citrus* (PEREZ et al., 1998; TOMAZ et al., 2001; RICCI et al., 2002), o que indicou a ausência de sincronismo celular durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de citros.

Das seis fontes de carboidratos avaliadas, a maltose foi a que resultou em maiores produções de embriões somáticos nas cinco cultivares de laranja doce quando comparada às outras fontes de carboidratos, principalmente em laranjas 'Hamlin', 'Natal' e 'Pêra', seguida pela lactose para as laranjas 'Hamlin' e 'Pêra', e pela sacarose para a laranja 'Natal'. Os resultados deste trabalho corroboram os de TOMAZ et al. (2001), os quais concluíram que a maltose foi o carboidrato que estimulou produção de maior número de embriões somáticos para a laranja 'Valência' e foi o segundo maior carboidrato para a laranja 'Caipira'. Esse efeito positivo da maltose no estímulo à embriogênese somática em cultivares de citros também foi observado por MENDES-DA-GLÓRIA et al. (2000), com aumento significativo da formação de embriões a partir do cultivo de calos oriundos de fusão de protoplastos pela substituição da sacarose por maltose. A maltose tem sido eficiente no estímulo à embriogênese somática a

Tabela 1 - Embriogênese somática em cinco cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*), em função de diferentes fontes e concentrações de carboidratos.

Carboidrato*	mM	Cultivares				
		'Pêra'	'Westin'	'Lima Verde'	'Hamlin'	'Natal'
		Número de embriões de 30 dias após cultivo				
		Média ± erro padrão				
Sacarose	18	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	0
	75	0	0	30 ± 10	0	32 ± 13
	110	0	4 ± 1	0	0	37 ± 25
	150	0	0	0	0	23 ± 16
Maltose	18	0	0	35 ± 17	125 ± 25	0
	37	110 ± 21	2 ± 0	0	465 ± 104	469 ± 148
	75	244 ± 60	3 ± 1	0	507 ± 30	0
	110	64 ± 5	7 ± 2	52 ± 12	432 ± 44	55 ± 15
	150	19 ± 4	5 ± 1	0	262 ± 29	0
Lactose	18	16 ± 6	3 ± 0	0	12 ± 3	0
	37	19 ± 4	0	0	144 ± 21	0
	75	11 ± 3	0	0	336 ± 34	0
	110	17 ± 2	2 ± 2	0	481 ± 27	0
	150	8 ± 3	0	0	56 ± 5	0

* Embriogênese somática não foi registrada para nenhuma cultivar de laranja doce cultivada em meio de cultura suplementado com galactose, glicose ou sorbitol.

partir de calos embriogênicos de citros e possui papel tanto como fonte de carbono, como também regulador osmótico (PEREZ et al., 1998). Em outras espécies, a maltose aumenta o número de embriões somáticos e melhora sua morfologia e viabilidade. Em coníferas, a maltose provou ser superior à sacarose para formação de embriões maduros (LIPAVSKÁ & KONRÁDOVÁ, 2004).

A sacarose, carboidrato muito usado na composição de meios de cultura para manutenção e cultivo de calos de citros, não apresentou resultados satisfatórios no estímulo da produção de embriões somáticos. Tais resultados concordam com os estudos realizados por RICCI et al. (2002), nos quais a sacarose também mostrou pouca ou nenhuma eficiência no estímulo da embriogênese somática das cultivares estudadas.

Os carboidratos galactose e glicose não induziram a formação de nenhum embrião. Trabalhos envolvendo a avaliação de seis fontes de carboidratos em diferentes concentrações, em laranja 'Washington Navel', tangerina 'Clementina' e limões 'Kutdiken' e 'Zagara Bianca', também indicaram que a glicose apresentou pouco ou nenhum rendimento na formação de embriões somáticos (KAYIM & KOC, 2006). Por outro lado, BENEDITO et al. (2000) concluíram que a

galactose foi responsável pelas melhores respostas, seguida pela glicose na indução de embriões somáticos de diversas cultivares. RICCI et al. (2002) também verificaram que a galactose levou à formação de grande número de embriões somáticos para as tangerinas e laranjas doces. O carboidrato sorbitol apresentou nenhum rendimento na formação de embriões das cinco cultivares estudadas, discordando de trabalhos anteriores (KAYIM & KOC, 2006) em que os carboidratos sorbitol e galactose tiveram um grande efeito estimulante na embriogênese somática das espécies cítricas estudadas depois do glicerol.

Não somente a fonte de carboidrato tem grande influência na indução da embriogênese somática, como também sua concentração efetiva. Considerando-se a concentração dos carboidratos avaliados, para a maltose, verificou-se maior formação de embriões na concentração de 75mM, seguida da concentração de 37mM, para as cultivares 'Hamlin' e 'Pêra', e 37mM, para a cultivar 'Natal'. Para a lactose, verificou-se maior produção de embriões na concentração de 75 e 110mM para a laranja 'Hamlin' e 37mM para laranja 'Pêra' (Tabela 1).

Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho poderão auxiliar os programas de melhoramento genético visando à obtenção de híbridos

de citros resistentes a diversas pragas e/ou doenças, como, por exemplo à *Alternaria alternata* f. sp. citri, já que algumas laranjeiras doces são classificadas como resistentes à mancha-marrom-de-alternária (CHAGAS et al., 2007).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a formação de embriões somáticos variou com as cultivares, e as laranjeiras 'Hamlin' e 'Natal' apresentaram maior rendimento na formação de embriões somáticos. A melhor fonte de carboidrato foi a maltose, seguida pela lactose, nas concentrações de 37 e 75mM.

REFERÊNCIAS

- BENEDITO, V.A. et al. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, p.33-38, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-9016200000100007>. Acesso em: 25 ago. 2009. doi: 10.1590/S0103-9016200000100007.
- BISPO, N.B. et al. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.890-893, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782007000300047&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi: 10.1590/S0103-84782007000300047.
- CHAGAS, E.A. et al. Identificação de híbridos de citros resistentes à mancha-marrom-de-alternária por meio de AFLP e testes de patogenicidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.975-983, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2007000700009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 05 jun. 2010. doi: 10.1590/S0100-204X2007000700009.
- FERNANDES, E.H. et al. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.2604-2607, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000900031&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 18 maio, 2010. doi: 10.1590/S0103-84782008000900031.
- IORE, S. et al. Effect of 2,4-D e 4-CPMU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.68, p.57-63, 2002. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/77x2m361qwp2766/?p=618f688773b24c0bb7847b4396a54909&pi=0>>. Acesso em: 20 mar. 2009. doi: 10.1023/A:1012944100210.
- KAYIM, M.; KOC, N.K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in *citrus callus* culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.109, p.29-34, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 12 jul. 2009. doi: 10.1016/j.scienta.2006.01.040.
- LIPAVSKÁ, H.; KONRÁDOVÁ, H. Invited review: somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v.40, p.23-30, 2004. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/2m261m36402773x3/fulltext.pdf>>. Acesso em: 9 jun. 2010. doi: 10.1079/IVP2003482.
- MENDES-DA-GLORIA, F.J. et al. Caipira sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potencial for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.661-665, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141547572000000300026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 jun. 2009. doi: 10.1590/S1415-47572000000300026.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. V.3, p.1155-1161.
- PEREZ, R.M. et al. Embryogenesis in vitro of several citrus species and cultivars. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v.73, p.796-802, 1998. Disponível em: <<http://www.jhortscib.org/members/showdocument?session=377>>. Acesso em: 12 maio, 2010.
- RICCI, A.P. et al. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1.p. 41-46, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010390162002000100005&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 13 mar. 2009. doi: 10.1590/S0103-90162002000100005.
- TOMAZ, M.L. et al. Somatic embryogenesis in *Citrus* spp.: carbohydrate stimulation and histodifferentiation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v.37, p.446-452, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/nt721xtg84422037/fulltext.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2009. doi: 10.1007/s11627-001-0078-y.