



---

## **EFEITO DO NITRATO DE PRATA NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE CITROS**

MARIANE DE JESUS DA SILVA DE CARVALHO<sup>1</sup>; EMANUELA BARBOSA SANTOS<sup>2</sup>;  
MARIA GEROLINA SILVA CARDOSO<sup>3</sup>; ANTÔNIO DA SILVA SOUZA<sup>4</sup>; FERNANDA  
VIDIGAL DUARTE SOUZA<sup>4</sup>; CARLOS ALBERTO DA SILVA LEDO<sup>4</sup>

### **INTRODUÇÃO**

Na área de estudos sobre o cultivo *in vitro* de vegetais, uma das linhas de pesquisa mais explorada atualmente é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes que influenciam na formação e ação destes gases, que afetam diretamente a resposta do explante, principalmente no que diz respeito à embriogênese e conservação *in vitro* de germoplasma. Entre eles, o etileno é o principal gás envolvido, ocasionando diferentes influências conforme a espécie (ADKINS et al., 1993; NISSEN, 1994). Diversos trabalhos mostraram o efeito do etileno sobre as plantas doadoras (AGARWAL; BHOJWANI, 1993), o seu efeito e dos seus antagonistas adicionados ao meio de cultura, assim como a relação destes com outros componentes do meio, principalmente auxinas. Devido à ação negativa do etileno nas culturas *in vitro*, há estudos sobre os inibidores de etileno (PASQUAL et al., 2002), sendo um deles é o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) que age inibindo a ação deste gás (AL-KHAYRI; AL-BAHRANY, 2001). De acordo com Giridhar et al. (2001), o uso de nitrato de prata tem efeito positivo nos estudos de multiplicação e enraizamento *in vitro*.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia. Como material vegetal utilizou-se microestacas de plantas de laranjeira 'Pêra' e das tangerineiras 'Dancy', 'Sunki Maravilha' e 'Sunki da Flórida' com

---

<sup>1</sup>Eng. Agr., estudante de pós-graduação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-BA, e-mail: marianejs@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Estudante de Eng. Agr., bolsista FAPESB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-BA, e-mail: emanuela\_bs@hotmail

<sup>3</sup>Eng. Agr., Cruz das Almas-BA, e-mail: ninaconceicao@hotmail.com

<sup>4</sup>Eng. Agr., pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura-BA, e-mail: assouza@cnpmf.embrapa.br; fernanda@cnpmf.embrapa.br; ledo@cnpmf.embrapa.br

aproximadamente 1 cm de tamanho. Estas foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 mL do meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com diferentes concentrações de nitrato de prata (0, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>), 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. As microestacas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h durante 12 meses.

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, no esquema fatorial 4 x 4, sendo cada parcela experimental constituída de um tubo de ensaio contendo uma microestaca. Aos 12 meses, foram avaliadas as variáveis altura de planta (AP, em cm), número de folhas vivas (NFV), número de folhas mortas (NFM), número de microestacas (NM) e peso de matéria seca da planta (PMSP, em g). As variáveis número de folhas vivas, mortas e de microestacas foram transformadas para  $\sqrt{x+0,5}$ . Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância. As médias dos acessos de citros do experimento foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias das concentrações de nitrato de prata foram ajustados modelos de regressão polinomial. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados modelos de regressão polinomial para AP, NFV, NM e PMSP na avaliação do efeito do nitrato de prata em função dos genótipos utilizados. Ajustou-se modelos de 1° e 2° com R<sup>2</sup> variando de 73,45% a 97,19%. Para AP, não houve diferença significativa entre as doses de nitrato de prata utilizadas nas tangerineira ‘Dancy’ e ‘Sunki da Flórida’, com médias de altura de 0,89 cm e 1,10 cm, respectivamente. Já para a laranjeira ‘Pêra’ e tangerineira ‘Sunki Maravilha’, as doses que proporcionaram menor altura de planta foram, respectivamente, 4 e 5,10 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato de prata, com valores estimados de 1,13 cm e 0,98 cm, respectivamente. O maior NFV para a laranjeira ‘Pêra’, tangerineiras ‘Sunki da Flórida’ e ‘Sunki Maravilha’ foi obtido na ausência de nitrato de prata, com valores estimados de 9,61 e 12,51 e valor observado de 13,13, respectivamente. Entretanto, para a tangerineira ‘Dancy’ o maior NFV está relacionado à concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato de prata com valor observado de 13,56. Para NFM e PMSP, independente do acesso avaliado, a ausência de nitrato de prata no meio propiciou os melhores resultados. Para todos os acessos utilizados, o NM foi maior no meio sem nitrato de prata, sendo que para a tangerineira ‘Dancy’ não houve diferenças significativas entre as doses de nitrato de prata (Tabela 1). Os melhores resultados foram obtidos com a ausência de nitrato de prata no meio de cultura, sendo que para as variáveis AP, NFV e NM, o comportamento in vitro das plantas é dependente dos genótipos (Tabelas 2).

**Tabela 1** - Equações de regressão, coeficientes de determinação, doses ótimas e valores estimados para altura de planta (cm), número de folhas vivas, número de folhas mortas, número de microestacas e peso da matéria seca da planta inteira (g) em função do genótipo e das concentrações de nitrato de prata ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

Genótipos	Equação	R <sup>2</sup> (%)	Dose ótima de AgNO <sub>3</sub>	Valor estimado
Altura de plantas				
LPE	$\hat{y}^+$	-	4,00 <sup>++</sup>	1,13 <sup>++</sup>
TODA	$\hat{y}^{\text{ns}} = 0,89$	-	0,00	0,89
TSKMA	$\hat{y}^{**} = 2,0846 - 0,4315x + 0,0423x^2$	91,85	5,10	0,98
TSKFL	$\hat{y}^{\text{ns}} = 1,10$	-	0,00	1,10 <sup>1</sup>
Número de folhas vivas				
LPE	$\hat{y}^{**} = 9,6113 - 1,6101x + 0,1984x^2$	89,41	0,00	9,61
TODA	$\hat{y}^+$	-	2,00 <sup>++</sup>	13,56 <sup>++</sup>
TSKMA	$\hat{y}^+$	-	0,00 <sup>++</sup>	13,13 <sup>++</sup>
TSKFL	$\hat{y}^{\text{ns}} = 12,51$	-	0,00	12,51 <sup>1</sup>
Número de folhas mortas				
Todas	$\hat{y}^{**} = 0,0943 + 0,2779x - 0,0334x^2$	77,85	0,00	0,09
Número de microestacas				
LPE	$\hat{y}^* = 1,4644 - 0,0541x$	73,45	0,00	1,46
TODA	$\hat{y}^{\text{ns}} = 1,03$	-	0,00	1,03 <sup>1</sup>
TSKMA	$\hat{y}^{**} = 2,6459 - 0,7381x + 0,0687x^2$	93,64	0,00	2,65
TSKFL	$\hat{y}^{**} = 1,4773 - 0,2582x + 0,0249x^2$	97,19	0,00	1,48
Peso da matéria seca da planta				
Todas	$\hat{y}^{**} = 0,0784 - 0,0128x + 0,0012x^2$	93,29	0,00	0,08

\*\* e \* significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F. <sup>ns</sup> não significativo a 5% de probabilidade.  $\hat{y}^+$  sem ajuste de modelo com significado biológico e alto R<sup>2</sup>. <sup>++</sup> baseado nos valores observados. <sup>1</sup> baseado na média dos valores observados. LPE: laranjeira ‘Pêra’; TDA: tangerineira ‘Dancy’; TSKMA: tangerineira ‘Sunki Maravilha’; TSKFL: tangerineira ‘Sunki da Flórida’.

Por causa de sua ação negativa, há vários estudos sobre os inibidores do etileno, como, por exemplo, o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) que, a  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ , favoreceu a indução de embrioides em anteras de *Capsicum annuum* L. (LUZ et al., 1999). Em pimenta, Nervo et al. (1994) verificaram que a presença de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  teve efeito favorável na androgênese, provavelmente pelo fato de bloquear a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, permitindo um maior desenvolvimento dos mesmos. Já em cacau, Teixeira et al. (2002) observaram que a adição do nitrato de prata em todos os meios, mesmo em concentrações baixas ( $1 \mu\text{M}$ ) foi suficiente para inibir completamente a indução de formação de calos embriogênicos, o que sugere algum papel do etileno no processo embriogênico de cacau.

## CONCLUSÕES

A conservação in vitro de genótipos de citros apresentou melhores resultados na ausência de nitrato de prata no meio de cultura, com comportamento diferenciado dependendo do genótipo.

## REFERÊNCIAS

- ADKINS, S. W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S. J.; ADKINS, A. L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 269, p. 1829-1835, 1993.
- AGARWAL, P. K.; BHOJWANI, S. S. Enhanced pollen grain embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. **Euphytica**, v. 70, p. 191-196, 1993.
- AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 291-298, 2001.
- GIRIDHAR, P.; REDDY, B.; RAVISHANKAR, G. A. Silver nitrate influences in vitro shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. **Current Science**, v.81, n.9, p.1166-1170, 2001.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, n. 30, p. 421-427, 1980.
- LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. B. P. P.; EHLERT, P. A. D.; CERQUEIRA, E. S.; BEDIN, I. Ação do etileno em combinação com thidiazuron, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico na cultura de anteras de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 226-230, 1999.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M. T.; ROTINO, G. L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 8., 1994, Firenze. **Anais...** Firenze: IAPTC, 1994. v. 8, p. 92.
- NISSEN, P. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 397-403, 1994.
- PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; CAMPOS, K. P. de; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R. J. C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas in vitro. **Ciência Agrotecnológica**, v.26, n.1, p.71-76, 2002.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.
- TEIXEIRA, J. B., MARBACH, P. A. S.; SANTOS, M. de O. **Otimização da metodologia da embriogênese somática visando à propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 34 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 79).