

Indução e cultivo in vitro de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azeda

Rosely Pereira da Silva⁽¹⁾, Beatriz Madalena Januzzi Mendes⁽²⁾ e Francisco de Assis Alves Mourão Filho⁽¹⁾

⁽¹⁾Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: rpsilva@esalq.usp.br, famourao@esalq.usp.br ⁽²⁾Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Caixa Postal 96, CEP 13409-970 Piracicaba, SP. E-mail: bmendes@cena.usp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a indução e a formação de gemas adventícias em explantes de laranja-azeda, pelo uso de fitorreguladores. Em experimentos de organogênese in vitro foram avaliados 6-benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ) e cinetina (CIN), em diferentes concentrações e sob duas condições de luminosidade; BAP e CIN combinados ou não com ácido naftalenoacético (ANA); e BAP e CIN isoladamente ou combinados entre si. Segmentos de epicótilo de 1 cm de comprimento, provenientes de plântulas de laranja-azeda germinadas in vitro, foram utilizados como explantes. Para induzir a formação de gemas, os segmentos foram cultivados em meio MT com ou sem adição de fitorreguladores. O material foi cultivado a 27°C em ausência de luz por 30 dias, seguidos de fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro ou cinco repetições, a depender do experimento e, cada repetição foi constituída de placa de Petri com 20 explantes. Após 60 ou 70 dias de cultivo foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas por explante. A adição de BAP ao meio de cultura, combinada ou não com ANA, e em combinações com CIN promovem melhor resposta organogênica.

Termos para indexação: *Citrus aurantium*, fitorregulador, micropropagação, organogênese.

In vitro induction and culture of adventitious buds in epicotyl segments of sour orange

Abstract – The objective of this work was to evaluate the induction and formation of adventitious buds in sour orange explants through the use of plant regulators. In vitro organogenesis experiments were conducted to evaluate the effect of BAP, TDZ, and KIN in different concentrations and under two light conditions; BAP and KIN, combined or not with NAA; BAP and KIN, separately or in combined concentrations. Sour orange epicotyl segments (1 cm length), from in vitro germinated plants, were used as explants. In order to induce bud formation, the explants were cultured in MT medium with or without the addition of plant regulators. The material was cultivated at 27°C in the absence of light for 30 days, followed of culture under a 16-hour photoperiod. The experimental design was completely randomized, with four or five replicates, depending on the experiment; each replicate comprised one Petri dish with 20 explants. After 60 or 70 days of cultivation, the percentage of responsive explants and the number of buds were evaluated. The addition of BAP to the culture medium, combined or not with ANA, and in combinations with CIN, induces better organogenic response.

Index terms: *Citrus aurantium*, organogenesis, growth regulator, micropropagation

Introdução

A regeneração de plantas in vitro pode ocorrer via organogênese ou via embriogênese somática (Thorpe, 1994). A organogênese é caracterizada pela formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta (Grattapaglia & Machado, 1998). Vários trabalhos têm relatado a organogênese in vitro para as diversas espécies e cultivares de citros. Por outro lado, o sucesso para qualquer via de regeneração in vitro depende de vários fatores, como:

o genótipo, o tipo, a idade e o tamanho dos explantes, a composição dos meios de cultura, as condições de cultivo e os tipos e dosagens de reguladores vegetais adicionados ao meio, os quais têm-se destacado como os principais controladores da morfogênese in vitro (Thorpe, 1994; Moreira-Dias et al., 2001; Silva et al., 2005a). A utilização de fitorreguladores tem se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e da determinação dos tecidos em responder à indução da embriogênese somática, condições essas necessárias à formação de meristemas caulinares e/ou radiculares em tecidos cultivados in vitro (Kerbauf, 1999).

O desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos tem sido bastante estudado em espécies cítricas e levado à regeneração de plantas *in vitro* para todos os sistemas de cultivo, a exemplo da cultura de calos (Kochba et al., 1982), cultura de células em suspensão (Cabasson et al., 1995), indução da embriogênese somática (Kunitake et al., 1995; Ricci, 2002), indução da organogênese (Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Moura et al., 2001; Almeida et al., 2002; Silva et al., 2005a; Schinor et al., 2006) e o isolamento e cultivo de protoplastos (Grosser & Gmitter Junior, 1990; Mendes-da-Glória et al., 2000).

A laranja-azedada, quando utilizada como porta-enxerto, apresenta boa adaptação a solos argilosos e arenosos e induz altas produções de frutos de boa qualidade, que permanecem na planta por longo período, sem perder suas características. Além disso, apresenta resistência à gomose de *Phytophthora*, é tolerante à exocorte e à xiloporose, é moderadamente resistente à salinidade e à alcalinidade e induz às copas grande resistência ao frio (Pompeu Junior, 2005). A utilização da laranja-azedada foi limitada pela presença do vírus da tristeza e foi substituída pelo limão 'Cravo' que não apresenta sintomas na presença do vírus. Com o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, dos estudos relacionados às técnicas de cultura de tecidos e de transformação genética para resistência a doenças, em especial, pela resistência derivada do patógeno, quando se trata de vírus, esse porta-enxerto poderia voltar a ser introduzido na citricultura, se com a aplicação desses estudos apresentasse resistência ao patógeno.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a indução e a formação de gemas adventícias em explantes de laranja-azedada, pelo uso de fitorreguladores, e fornecer subsídios para futuros trabalhos de transformação genética.

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Os explantes, oriundos de segmentos de epicótilo, foram obtidos a partir de sementes extraídas de frutos maduros de laranja-azedada (*Citrus aurantium* L.) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma do

Centro APTA Citros Sylvio Moreira. As sementes foram lavadas para retirada da mucilagem e secadas à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, essas sementes tiveram seus tegumentos retirados e foram submetidas à desinfestação em solução 3:1 de água e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), durante 20 min, sob agitação. Após esse período, foram lavadas três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas, e incubadas *in vitro*, em tubos de ensaio (150x25 mm) com 15 mL do meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com 2 g L⁻¹ de Phytigel e 25 g L⁻¹ de sacarose, e pH 5,8.

Para obtenção do epicótilo alongado, a incubação foi realizada em ausência de luz durante 30 dias, a 27°C. Posteriormente, as plântulas germinadas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas por 10 a 15 dias, e utilizadas como fonte de explantes, que se constituíram de segmentos de epicótilo de 0,8–1,0 cm de comprimento.

Foram realizados três experimentos para avaliação da indução da formação e regeneração de gemas adventícias. No primeiro experimento, segmentos de epicótilo (0,8–1,0 cm de comprimento) foram introduzidos em placas de Petri com 20 mL de meio de cultura MT sem fitorregulador ou suplementado com TDZ (thidiazuron) (0,01 e 0,02 mg L⁻¹), BAP (6-benzilaminopurina) (0,5 e 1 mg L⁻¹) ou CIN (cinetina) (1 e 2 mg L⁻¹). As placas com os explantes foram incubadas a 27°C, por 30 dias em ausência de luz, seguidos de 30 dias em fotoperíodo de 16 horas ou diretamente em fotoperíodo de 16 horas por 60 dias, o que constituiu-se em duas condições de cultivo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7x2 (meios de cultivo e condição de luminosidade), com cinco repetições, em que cada repetição era constituída de uma placa de Petri com 20 explantes. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados o percentual de explantes responsivos (explantes que desenvolveram gemas) e o número de gemas por explante responsivo.

No segundo experimento, segmentos de epicótilo foram cultivados em placas de Petri com 20 mL de meio de cultura MT sem regulador, ou suplementado com BAP (1, 2 e 3 mg L⁻¹), ou CIN (1, 2 e 3 mg L⁻¹), em concentrações combinadas ou não com ácido naftalenoacético (ANA) (0,3 mg L⁻¹), para a avaliação da indução de brotações adventícias. O material

foi incubado a 27°C durante 35 dias em ausência de luz, quando foi realizada a primeira avaliação, seguidos de 35 dias em fotoperíodo de 16 horas, época da avaliação final, quando foram observados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas por explante responsivo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, e cada repetição foi constituída de uma placa de Petri com 20 explantes. No terceiro experimento, os explantes foram cultivados em meio de cultura MT sem fitorregulador ou suplementado com concentrações de BAP (1 e 2 mg L⁻¹), CIN (1 e 2 mg L⁻¹), BAP + CIN (1 + 1 mg L⁻¹), BAP + CIN (1 + 2 mg L⁻¹) e BAP + CIN (2 + 1 mg L⁻¹). O material foi incubado a 27°C, em ausência de luz, por 30 dias e, em seguida, submetido a fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas e/ou brotações por explante responsivo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, em que cada repetição constituiu-se de uma placa de Petri com 20 segmentos.

Resultados e Discussão

Observou-se o efeito de TDZ, BAP e CIN no meio de cultivo na indução de brotações adventícias em duas condições de luminosidade. Ocorreu interação entre meio de cultivo x condições de luminosidade. O cultivo dos explantes diretamente em fotoperíodo de 16 horas promoveu melhor resposta, tanto para o percentual de explantes responsivos, quanto para o número de gemas regeneradas por explante em todos os meios de cultivo utilizados, ou seja, independentemente da ausência ou presença de fitorregulador nas suas diferentes concentrações (Tabela 1).

O cultivo dos explantes diretamente em fotoperíodo de 16 horas e a adição de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 1 mg L⁻¹ de BAP ou 2 mg L⁻¹ de CIN constituíram-se condição favorável à regeneração de gemas adventícias, de forma que, partindo-se de 100 explantes, pôde-se obter, respectivamente, cerca de 104, 107 e 100 gemas. O TDZ demonstrou ser o menos indicado à indução de resposta morfogênica em segmentos de epicótilo de laranja-azedada.

Melhores respostas na indução e regeneração de gemas adventícias, em segmentos de epicótilo de citrange 'Troyer' (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*)

e laranja 'Pêra' (*C. sinensis*), foram observadas por Moreira-Dias et al. (2000) e Silva et al. (2005a), respectivamente, quando cultivaram os explantes sob fotoperíodo de 16 horas. Entretanto, em outro trabalho, a máxima proliferação de gemas adventícias de tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni*) foi observada quando os explantes (segmentos de epicótilo) foram incubados, primeiramente, em ausência de luz por 30 dias (Silva et al., 2005b). A incubação de explantes de laranja 'Pineapple' (*C. sinensis*), em ausência de luz, também aumentou a regeneração de gemas e brotações e a conseqüente conversão em plantas. Entretanto, naquele caso foram utilizados segmentos internodais como explantes (Duran-Vila et al., 1992). Mendes et al. (2002) constataram, na transformação genética de laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*), que o co-cultivo de segmentos de epicótilo com *Agrobacterium tumefaciens*, na ausência de luminosidade, foi mais eficiente na regeneração e na obtenção de brotos adventícios que expressam o transgene. As diferenças encontradas entre os resultados obtidos neste trabalho e os obtidos em trabalhos que utilizaram segmentos de epicótilo, nos quais foi adicionado BAP ao meio de cultivo, se devem, provavelmente, aos diferentes genótipos estudados. Em citros, muitos trabalhos têm

Tabela 1. Explantes responsivos e gemas regeneradas por explante de laranja-azedada, cultivados em meio MT sem e com fitorregulador, em duas condições de cultivo (fotoperíodo de 16 horas e ausência de luz por 30 dias, seguidos de fotoperíodo de 16 horas), após 60 dias de incubação⁽¹⁾.

Meio de cultura e fitorregulador (mg L ⁻¹)	Condição de cultivo	
	Fotoperíodo de 16 horas	Ausência de luz por 30 dias
Explantes responsivos (%)		
MT	51,0Ac	23,0Bab
MT+0,01 TDZ	58,8Abc	2,5Bc
MT+0,02 TDZ	56,7Ac	1,7Bc
MT+0,5 BAP	80,0Aab	25,0Ba
MT+1 BAP	82,5Aa	21,3Bab
MT+1 CIN	65,0Aabc	24,0Ba
MT+2 CIN	83,0Aa	26,0Ba
Gemas regeneradas por explante		
MT	1,2A ^{ns}	1,1Ba
MT+0,01 TDZ	1,4A ^{ns}	0,5Bbc
MT+0,02 TDZ	1,4A ^{ns}	0,3Bc
MT+0,5 BAP	1,3A ^{ns}	1,0Bab
MT+1 BAP	1,3A ^{ns}	1,1Ba
MT+1 CIN	1,3A ^{ns}	1,2Ba
MT+2 CIN	1,2A ^{ns}	1,0Bab

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ^{ns}Não-significativo.

evidenciado grande influência da espécie ou cultivar, seja na organogênese in vitro (Ghorbel et al., 1998; Schinor, 2006), ou na transformação genética (Peña et al, 1995; Gutiérrez-E et al., 1997), o que sugere a necessidade de estudos específicos para ajustes de protocolos de regeneração in vitro.

Diferentes concentrações de BAP e TDZ foram testadas em combinação ou não com ANA, na propagação in vitro de toranja (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) (Paudyal & Haq, 2000). Foi verificado que o BAP mostrou-se muito eficaz na indução de múltiplas brotações, apesar de o número de brotos por explante decrescer gradualmente em concentrações superiores a 2,2 μM . O maior número de brotos foi obtido na concentração 1,8 μM de BAP. Entretanto, TDZ não mostrou resultados satisfatórios para todas as concentrações utilizadas, o que acarretou em uma alta taxa de mortalidade dos explantes.

Neste trabalho, as concentrações de TDZ utilizadas, 0,01 e 0,02 mg L^{-1} – correspondentes a 0,05 e 0,1 μM , respectivamente – não prejudicaram a resposta organogênica nos explantes cultivados sob fotoperíodo de 16 horas. Contudo, a maior dose utilizada refletiu numa resposta menos favorável e, inclusive, levou à morte de explantes quando cultivados em ausência de luz.

A suplementação de combinações de citocininas e auxinas nos meios de cultura têm apresentado resposta variada na indução e formação de gemas adventícias em explantes de citros cultivados in vitro. No segundo experimento, diferentes concentrações de BAP e CIN combinadas ou não com ANA foram testadas

para avaliação da resposta organogênica in vitro de segmentos de epicótilo de laranja-azedada. Os explantes foram incubados em ausência de luz por 35 dias e, em seguida, avaliados e submetidos a fotoperíodo de 16 horas. A suplementação de BAP em combinação ou não com ANA mostrou-se favorável à obtenção de explantes responsivos. Entretanto, 1 mg L^{-1} de CIN e, 1 mg L^{-1} de CIN e 3 mg L^{-1} de CIN, combinados com 0,3 mg L^{-1} de ANA, não demonstraram indução de organogênese (Tabela 2). Posteriormente, com o cultivo sob condições de fotoperíodo de 16 horas, o percentual de explantes que desenvolveu gemas aumentou substancialmente em cultivo com 3 mg L^{-1} de BAP e 0,3 mg L^{-1} de ANA, o que correspondeu a 76,7% de explantes responsivos. Schinor et al. (2006) constataram que a suplementação com BAP (1 mg L^{-1}) foi fundamental para citrange 'Carrizo', que elevou de 40,7 para 93,3% o número explantes responsivos. Porém, nesse mesmo trabalho, essa suplementação não foi favorável à laranja-azedada e às laranjas 'Natal' e 'Pêra', que obtiveram maiores percentuais (77,3, 92 e 77,2%, respectivamente), nos explantes cultivados em meio MT sem fitoregulador. Com isso, esses autores consideraram que, embora o uso de reguladores estimule a organogênese, nem sempre sua utilização no meio de cultura é considerada essencial. As diferentes respostas quanto à necessidade do uso de reguladores na regeneração in vitro tem sido relatada (Bordón et al., 2000; Moreira-Dias et al., 2000; Silva et al., 2005a), e pode ser atribuída a fatores como tipo e estado fisiológico do explante (Grattapaglia & Machado, 1998).

Tabela 2. Explantes responsivos e gemas regeneradas por explante de laranja-azedada, cultivados em meio MT sem e com fitoregulador, avaliados aos 35 dias em ausência de luz e aos 70 dias de cultivo, sendo 35 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 horas⁽¹⁾.

Meio de cultura e fitoregulador (mg L^{-1})	35 dias de cultivo		70 dias de cultivo	
	Explantes responsivos (%)	Gemas por explante	Explantes responsivos (%)	Gemas por explante
MT	3,3ab	0,67	70,0ab	1,17d
MT+1 BAP	16,3ab	1,08	51,3abc	1,59bcd
MT+2 BAP	13,8ab	1,08	56,3abc	2,37a
MT+3 BAP	5,0ab	0,83	61,7abc	2,09ab
MT+1BAP+0,3 ANA	20,0ab	1,13	58,3c	1,42cd
MT+2 BAP+0,3 ANA	21,7a	1,23	35,0c	2,08ab
MT+3 BAP+0,3 ANA	18,3ab	1,26	76,7a	1,86abc
MT+1 CIN	0,0b	0,00	73,3ab	1,18d
MT+2 CIN	2,5ab	0,50	70,0ab	1,15d
MT+3 CIN	2,5ab	0,25	71,3ab	1,30cd
MT+1 CIN+0,3 ANA	0,0b	0,00	68,3ab	1,17d
MT+2 CIN+0,3 ANA	1,6ab	0,33	56,7abc	1,12d
MT+3 CIN+0,3 ANA	0,0b	0,00	46,7bc	1,18d

⁽¹⁾Médias seguidas de letra iguais na coluna, em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾Não-significativo.

A concentração de fitorreguladores influenciou a indução de gemas por explante responsivo, e os maiores valores foram observados em meio de cultivo com 2 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 2). A utilização de CIN não favoreceu a indução de gemas, mas aquelas formadas tornaram-se brotações bem desenvolvidas.

Ao avaliarem o efeito da interação BAP x cultivares de citros, Almeida et al. (2002) verificaram que a concentração 1 mg L⁻¹ de BAP promoveu os maiores percentuais de explantes responsivos, nos explantes que desenvolveram brotações com cerca de 1 cm, para as laranjas 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin', com 85,4, 75 e 71,4%, respectivamente, e também foi a mais indicada para regeneração de brotos adventícios para essas cultivares que apresentaram, respectivamente, médias de 1,59, 1,76 e 2,43 brotações por explante responsivo. Em limão 'Cravo', não houve influência do BAP avaliado em diferentes concentrações (0–4,5 mg L⁻¹) para o percentual de explante responsivo. Entretanto, o maior número de brotações – 1,57 por explante – foi obtido em meio MT suplementado com 3 mg L⁻¹ de BAP.

Combinações entre BAP e ANA foram estudadas na organogênese de limão 'Cravo' e laranja-azedada por Schinor (2006), e constatou que a presença do BAP foi fundamental para induzir resposta morfogenética e, em combinações com baixos níveis de ANA, estimulou a regeneração de gemas a partir de segmentos internodais.

Neste trabalho, considerou-se satisfatório o número de gemas que se desenvolveram em brotações com mais de 0,5 cm de comprimento. Suplementações com 2 ou 3 mg L⁻¹ de BAP e 0,3 mg L⁻¹ de ANA, ao meio MT, constituíram-se nas melhores condições para induzir resposta organogênica em segmentos de epicótilo de laranja-azedada, o que proporcionou um número médio de 133 e 142 gemas regeneradas, respectivamente, a cada 100 explantes introduzidos. Outros trabalhos também demonstraram que baixas concentrações de ANA, combinadas com BAP, estimularam a indução de gemas adventícias no cultivo in vitro de citrange 'Troyer' (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) (Edriss & Burger, 1984; Moreira-Dias et al., 2000), lima 'Mexicana' (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing.) e tangerina 'Monica' (*Citrus reticulata* Blanco cv. Monica) (Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997).

No terceiro experimento, as citocininas BAP e CIN também foram avaliadas em concentrações isoladas e combinadas entre si, na indução e formação de gemas adventícias. Não houve influência desses fitorreguladores no percentual de explantes responsivos (Tabela 3). Com relação ao número de gemas por explantes responsivos, os maiores valores observados (3,14 por explante) foram obtidos no meio de cultivo suplementado com 1 mg L⁻¹ de CIN e 2 mg L⁻¹ de BAP.

O efeito dos fitorreguladores BAP, CIN e ANA, isoladamente e em combinações, foi avaliado na multiplicação in vitro de brotos de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing, a partir de segmentos nodais (Al-Bahrany, 2002). O maior número de brotos (nove por explante) foi obtido no cultivo em meio com 2 mg L⁻¹ de BAP, 1 mg L⁻¹ de CIN e 1 mg L⁻¹ de ANA. Constatou-se ainda que, dependentemente das concentrações de BAP e CIN, ANA inibiu, estimulou ou não afetou a multiplicação de brotos. O comprimento máximo de brotos foi observado quando se utilizou 0,5 mg L⁻¹ de BAP combinado com 1 mg L⁻¹ de CIN e 0,5 mg L⁻¹ de ANA, e o maior desenvolvimento foliar dos brotos foi observado no meio com 0,5 mg L⁻¹ de CIN e 0,5 mg L⁻¹ de ANA.

Neste trabalho verificou-se que, mesmo não tendo diferido em quantidade de gemas adventícias formadas, o uso de CIN favoreceu o desenvolvimento dessas gemas em brotações com mais de 0,5 cm de comprimento. Por isso, foram avaliadas as combinações de citocininas, a fim de maximizar a resposta organogênica, já que a utilização de BAP promove o desenvolvimento, em

Tabela 3. Explantes responsivos, gemas regeneradas e brotações por explante de laranja-azedada, cultivados em meio MT sem e com fitorregulador, após 60 dias de cultivo – 30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 horas⁽¹⁾.

Meio de cultura e Fitorregulador (mg L ⁻¹)	Explantes responsivos (%)	Gemas por explante	Brotações por explante ⁽²⁾
MT	65	1,09d	0,91
MT+1 BAP	65	2,77ab	1,69
MT+1 CIN	45	1,18d	0,85
MT+1 BAP+1 CIN	45	1,69bcd	0,84
MT+2 BAP	80	2,57ab	1,00
MT+2 CIN	50	1,28cd	0,77
MT+1 BAP+2 CIN	55	2,45abc	1,27
MT+1 CIN+2 BAP	70	3,14a	0,86

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais na coluna, em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ⁽²⁾Gemas que se desenvolveram em brotações com aproximadamente 1 cm de comprimento.

^{ns}Não-significativo.

sua maioria, de pequenos brotos, provavelmente em razão da quantidade regenerada por explante. Contudo, os resultados não mostraram diferença no número de brotações desenvolvidas (Tabela 3).

A composição e concentração de fitorreguladores no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Diferenças entre as citocininas têm sido relatadas, em que o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, enquanto que CIN e 2iP têm permitido apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (Caldas et al., 1998).

Na indução de gemas adventícias, em segmentos de epicótilo de laranja-azedada, a melhor resposta foi obtida em meio MT sem BAP. Por outro lado, a adição de 1 mg L⁻¹ de BAP ao meio, proporcionou maiores números de gemas por explante de citrange 'Carrizo' (3,2), limão 'Volkameriano' (1,5) e laranja 'Natal' (1,42) (Schinor et al., 2006). Com relação à laranja-azedada, esses resultados diferem daqueles obtidos neste trabalho, em que foi verificado, que a adição de citocininas assegurou melhores respostas na indução da organogênese *in vitro*. Apenas a suplementação com 1 mg L⁻¹ de CIN ao meio de cultura apresentou resultados semelhantes àqueles em que não foi utilizado fitorregulador. Vale ressaltar que variações obtidas na resposta morfogênica, associadas à utilização ou não de fitorreguladores, devem estar relacionadas, entre outros fatores, à concentração endógena de auxinas e citocininas no tecido vegetal.

A suplementação do meio de cultura com citocinina, principalmente o BAP, tem sido considerada fundamental para se obter melhores respostas na organogênese *in vitro*, em espécies cítricas (Moreira-Dias et al., 2001; Almeida et al., 2002; Silva et al., 2005a, 2005b), e isso foi verificado também neste trabalho.

Conclusões

1. A organogênese *in vitro* de laranja-azedada, a partir de segmentos de epicótilo, é favorecida pela adição de 6-benzilaminopurina, em combinação ou não com ácido naftalenoacético.

2. O meio de cultura suplementado com 6-benzilaminopurina, em combinações com cinetina, favorece à formação de gemas adventícias.

3. A ausência de luz prejudica a organogênese *in vitro* de laranja-azedada.

4. A adição de thidiazuron ao meio de cultura não favorece a resposta organogênica.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa.

Referências

- AL-BAHRANY, A.M. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm) Swing. *Scientia Horticulturae*, v.95, p.285-295, 2002.
- ALMEIDA, W.A.B. de; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*, v.59, p.35-40, 2002.
- BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. *Annals of Botany*, v.86, p.159-166, 2000.
- CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DAMBIER, D.; DALNIC, R.; TEISSON, C. Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. *Physiologia Plantarum*, v.93, p.464-470, 1995.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.87-132.
- DURÁN-VILA, N.; GORGOCENA, Y.; ORTEGA, V.; ORTIZ, J.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.): effect of temperature and photosynthetic radiation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.29, p.11-18, 1992.
- EDRISS, M.H.; BURGER, D.W. *In vitro* propagation of 'Troyer' citrange from epicotyl segments. *Scientia Horticulturae*, v.23, p.159-162, 1984.
- GHORBEL, R.; NAVARRO, L.; DURÁN-VILA, N. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v.73, p.323-327, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.184-250.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews*, v.8, p.339-374, 1990.
- GUTIÉRREZ-E, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and

- production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, v.16, p.745-753, 1997.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TÔRRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1999. v.2. p.519-531.
- KOCHBA, J.; SPEIGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v.105, p.359-368, 1982.
- KUNITAKE, H. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.280-298. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30).
- MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; ALMEIDA, W.A.B. de. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Hamlin sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.955-961, 2002.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplast of Brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.727-732, 2000.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, v.85, p.103-110, 2000.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.
- MOURA, T.L. de; ALMEIDA, W.A.B. de; MENDES, J.M.B.; MOURÃO FILHO, F. de A.A. Organogênese in vitro de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.240-245, 2001.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. p.1155-1169.
- PAUDYAL, K.P.; HAQ, N. *In vitro* propagation of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck). **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.36, p.515-516, 2000.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v.104, p.183-191, 1995.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Mandarin by direct organogenesis. **HortScience**, v.32, p.931-934, 1997.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. p.63-104.
- RICCI, A.P.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J.; PIEDADE, S.M. de S. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agricola**, v.59, p.41-46, 2002.
- SCHINOR, E.H. **Organogênese in vitro e transformação genética em Citrus sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 88p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G. de; AZEVEDO, F.A. de; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J. Organogênese in vitro a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.463-466, 2006.
- SILVA, R.P. da; COSTA, M.A.P. de C.; SOUZA, A. da S. ALMEIDA, W.A.B. de. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1153-1159, 2005a.
- SILVA, R.P. da; SOUZA, E. dos S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B. de. Otimização de protocolos para regeneração de plantas in vitro de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.484-487, 2005b.
- THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p.17-36.

Recebido em 15 de abril de 2008 e aprovado em 8 de setembro de 2008