

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**MARIA INÊS DE SOUZA MENDES**

**CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE CITROS  
VISANDO A OBTENÇÃO DE PLANTAS  
LIVRES DE DOENÇAS**

**CRUZ DAS ALMAS**

**2013**

**MARIA INÊS DE SOUZA MENDES**

**CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE CITROS  
VISANDO A OBTENÇÃO DE PLANTAS  
LIVRES DE DOENÇAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas, outorgado pela  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Co-orientador: Dr. Antônio da Silva Souza

**CRUZ DAS ALMAS-BA**

**2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M538

Mendes, Maria Inês de Souza.

Cultivo *in vitro* de *Ápices caulinares* de citros visando a obtenção de plantas livres de doenças / Maria Inês de Souza Mendes. – Cruz das Almas, BA, 2013.

34f.; il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.

Coorientador: Antônio da Silva Souza.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

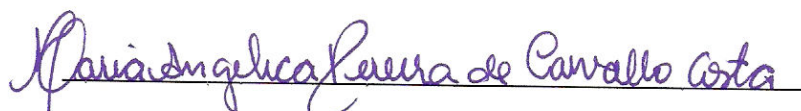
1.Citros – Cultivo. 2.Micropropagação – In vitro. 3.Doenças - Controle. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.3

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO DE MARIA INÊS DE SOUZA MENDES



Prof. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

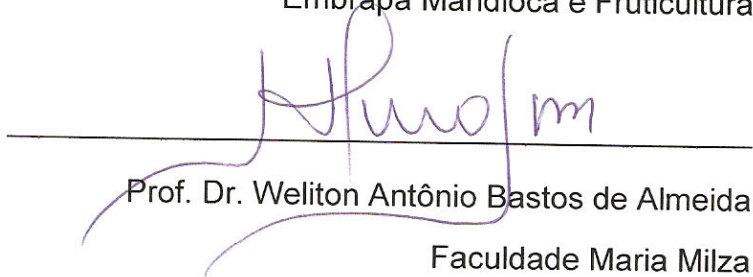
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

(Orientadora)



Dra. Tatiana Góes Junghans

Embrapa Mandioca e Fruticultura



Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida

Faculdade Maria Milza

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2013

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me capacitado, permitindo mais essa realização em minha vida.

Aos meus pais Benedito e Tomazia, e toda minha família por estarem sempre próximos e acreditarem no meu potencial.

Aos Drs. Antônio Souza, Cristiane Barbosa, Luiz Francisco Souza e Maria Angélica Costa pela oportunidade, orientações e força na realização deste trabalho, bem como em toda minha caminhada acadêmica.

A equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura que muito contribuiu no meu aprendizado.

À Embrapa, Fapesb e CNPq que permitiram a partir da concessão de bolsas a realização dessa pesquisa.

Aos mestres da UFRB que grandemente contribuíram na minha formação.

E a todos os amigos, em especial Camila Chabi que cooperaram para obtenção desse mérito.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para a limpeza de vírus através da micropropagação, visando o desenvolvimento de condições de cultivo *in vitro* para a regeneração de plantas de citros a partir de ápices caulinares. Explantes de diferentes tamanhos e genótipos de citros foram cultivados em meio de cultura WPM com variadas constituições dos fitorreguladores ANA, BAP e GA<sub>3</sub>. Foram avaliadas a taxa de sobrevivência e o desenvolvimento dos ápices nos diversos tratamentos. Os meios suplementados com os reguladores vegetais ANA e BAP proporcionaram melhor desenvolvimento dos ápices, sendo o citrange 'Carrizo' o genótipo que apresentou melhor resposta. A presença do GA<sub>3</sub> não influenciou no processo de desenvolvimento dos explantes. O fitorregulador BAP demonstrou-se essencial no desenvolvimento *in vitro* de ápices caulinares do limão 'Rugoso Mazoe'. Os meios suplementados com fitorreguladores vegetais proporcionaram melhor resposta organogênica para todos os genótipos. Apesar de sua importância na promoção da limpeza clonal, os ápices caulinares menores encontram maior dificuldade na regeneração.

**PALAVRAS-CHAVES:** Patógenos sistêmicos. Cultura de ápices. Regeneração. Condições de cultivo. *Citrus* spp.

## ABSTRACT

The aim of this research was establish a protocol to cleaning of virus through micropropagation, looking for the development of cultivate conditions in vitro for regeneration of citrus plants from shoot apices. Explants of different sizes and genotypes of citrus were cultivated on medium culture WPM with different constitutions of growth regulators ANA, BAP and GA<sub>3</sub>. We evaluated the survival rate and the development of the apices in different treatments. The medium supplemented with growth plant regulators ANA and BAP provided better development of the shoot tips, and the "Carrizo" citrange genotype were that showed the best response. The presence of GA<sub>3</sub> did not affect the development process of the explants. The phytohormone BAP demonstrated to be essential in the development of in vitro Lemon 'Rough Mazoe'. Despite its importance in promoting clonal cleaning, the shoot apices smaller have a greater difficulty in regeneration. Others experiments are needed to continue the creation of a protocol, taking into consideration the size of the explants and cleaning clonal in citrus.

**KAY-WORD:** Systemics pathogens. Culture of shoot apices. Regenerations. Conditions of cultivation. *Citrus* spp.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Plantas de citros previamente cultivadas in vitro, utilizadas para excisão de ápices caulinares.....	21
FIGURA 2 - Materiais usados em câmara de fluxo laminar no processo de extração de ápices caulinares de citros.....	21
FIGURA 3 - Excisão de ápice caulinar em câmara de fluxo laminar com auxílio de estereomicroscópio.....	23
FIGURA 4 - Ápices de citros inoculados no meio de cultura.....	23
FIGURA 5 - Ápice caulinar oxidado do limoeiro 'Cravo' clone comum.....	24
FIGURA 6 - Da esquerda para a direita, ápices caulinares do limoeiro 'Cravo' clone comum (A), citrange 'Carrizo' (B) e LCREEL (TR X LCR) 001 (C) nos meios 1, 2 e 3.....	26
FIGURA 7 - Plantas regeneradas de ápices de limoeiro 'Rugoso Mazoe' com 1 e 2 mm de tamanho em meios com doses variadas de ANA e BAP.....	28



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Taxa de sobrevivência de ápices caulinares de citros em meio WPM em função do genótipo.....	24
TABELA 2 - Taxa de sobrevivência de ápices caulinares de citros em função do genótipo e do meio de cultura.....	25
TABELA 3 - Análise de variância dos ápices do limoeiro 'Rugoso Mazoe' quanto as variáveis número de ápices vivos, numero de folhas vivas e peso da matéria fresca da planta, considerando o tamanho dos ápices e a presença dos fitorreguladores ANA e BAP.....	27
TABELA 4 - Médias do efeito do tamanho do explante sobre o número de ápices vivos, número de folhas vivas e peso da matéria fresca da planta.....	28
TABELA 5 - Médias das interações entre tamanho de ápices e BAP sobre o peso da matéria fresca da planta.....	29
TABELA 6 - Efeitos do tamanho do explante e das concentrações de ANA e BAP sobre as variáveis altura da planta, coloração da parte aérea, presença de raiz e número de ápices mortos.....	30

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANA - Ácido naftalenoacético

BAP - Benzilaminopurina

CV - Coeficiente de variação

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FV - Fonte de variação

GA<sub>3</sub> - Ácido giberélico

GL - Grau de liberdade

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LCT - Laboratório de Cultura de Tecidos

MS - Meio de Cultura Murashige & Skoog (1962)

pH - potencial hidrogeniônico

QM - Quadrado médio

RENASEM - Registro Nacional de Sementes e Mudas

WPM - Meio de cultura LLOYD e McCOWM (1980)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>12</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Citricultura brasileira.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Cultura de tecidos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Cultura de ápices caulinares.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Microenxertia.....</b>	<b>17</b>
<b>3.5 Meio de cultura.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6 Fitorreguladores vegetais.....</b>	<b>19</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Objetivo geral.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Cultivo de ápices caulinares de diferentes genótipos de citros em meio WPM com composições variadas.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Cultivo de diferentes tamanhos de ápices caulinares de limoeiro 'Rugoso Mazoe' em meio WPM suplementado com ANA e BAP.....</b>	<b>22</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>6.1 Cultivo de ápices caulinares de diferentes genótipos de citros em meio WPM com composições variadas.....</b>	<b>23</b>
<b>6.2 Cultivo de diferentes tamanhos de ápices caulinares de limoeiro 'Rugoso Mazoe' em meio WPM suplementado com ANA e BAP.....</b>	<b>26</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira há décadas vem ocupando posição de destaque no ramo da produção mundial de citros e o País recebe com essa cultura grande contribuição econômica e geração de empregos diretos e indiretos. O Brasil possui 50% da produção mundial de suco de laranja, exportando 98% do que produz e consegue incríveis 85% de participação no mercado mundial (NEVES et al., 2010). De acordo com dados do IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2012), o Estado de São Paulo é o maior produtor do País com 76,3% da produção nacional, tendo também grande relevância na citricultura brasileira os estados da Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e Paraná.

Apesar da posição de destaque na citricultura, diversas doenças sistêmicas podem afetar a produção de citros no Brasil, como a tristeza dos citros, a clorose variegada, a morte súbita, o greening, entre outras patologias, que podem ocasionar danos a cultura e acarretar em prejuízos ao setor citrícola. Neves et al. (2010) relatam que a mortalidade de árvores cítricas decorrente de pragas e doenças é de 7,5%, levando a perdas de quase 80 milhões de caixas por ano, sendo, mais recentemente uma das preocupações mais sérias do setor o greening, que avança com grande rapidez.

Para Grosser et al. (1996), a introdução de técnicas biotecnológicas como cultura de células e tecidos, genética molecular, fusão de protoplastos, transformação genética, entre outras, pode melhorar os problemas associados ao melhoramento das espécies cítricas, permitindo a obtenção e utilização das variedades disponíveis.

A cultura de tecidos vegetais vem sendo constantemente utilizada como auxílio em programas de melhoramento genético. A regeneração de plantas pela organogênese direta ou indireta constitui uma alternativa para elevar a produção de mudas livres de vírus em laboratório. A técnica da cultura de ápices caulinares, que consiste na introdução de uma pequena porção meristemática apical em um meio nutritivo, vem sendo bastante utilizada na obtenção de plantas livres de doenças. Os meristemas apicais têm a capacidade genética e fisiológica de manter a divisão e diferenciação celular, gerando novos tecidos e órgãos e, conseqüentemente formando indivíduos completos com as mesmas características (GEORGE et al., 2008). Nessas células, por serem indiferenciadas, há poucas possibilidades da

presença de patógenos, todavia é necessário que este ápice caulinar seja suficientemente pequeno, ou seja, tendo entre 0,2 e 0,5 mm para que isso ocorra.

Porém, quando se trata de espécies frutíferas e essências florestais, a cultura de ápices caulinares apresenta limitações, uma vez que, ao serem colocados diretamente no meio de cultura não regeneram uma planta completa, havendo geralmente, morte ou oxidação do explante, que, ainda pode permanecer viável, todavia sem desenvolvimento de parte aérea e raízes. Como alternativa para solucionar o problema surgiu a técnica da microenxertia, que no geral é utilizada para plantas lenhosas na recuperação de plantas livres de vírus (NAVARRO et al., 1975).

Na última década, muitos trabalhos têm sido realizados com êxito no desenvolvimento de protocolos para os diversos métodos da cultura de tecidos em citros. Mas, vários impasses são ainda encontrados na micropropagação de plantas cítricas a partir da cultura de ápices caulinares.

Por outro lado, Silva et al. (2005) relatam ainda a cerca da influência de vários fatores para o sucesso de qualquer via de regeneração *in vitro*, como: genótipo, tipo, idade e tamanho dos explantes, composição dos meios de cultura, condições de cultivo e tipos e dosagens de reguladores vegetais adicionados ao meio, os quais têm-se destacado como os principais controladores da morfogênese *in vitro*.

A micropropagação através da cultura de ápices caulinares e gemas axilares permite a obtenção de um grande número de plantas geneticamente iguais em curto espaço de tempo, desde que sejam fornecidas condições ideais, principalmente no que diz respeito ao meio de cultura (PASQUAL e ANDO, 1989).

Meios contendo 0,05 a 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP têm sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Os mesmos relatam ainda a utilização em menor frequência e concentrações mais baixas de auxinas e giberelinas na regeneração de meristemas, uma vez que altas concentrações de auxinas estimulam a formação de calos.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A citricultura compreende um dos setores mais competitivos e de grande potencial econômico do agronegócio brasileiro, e há décadas vem contribuindo com

o desenvolvimento do País tanto na geração de empregos como de renda. Sem o agronegócio, a balança comercial brasileira passaria de um superávit de US\$ 24,6 bilhões para um déficit de US\$ 30 bilhões, o que comprometeria a estabilidade econômica e o real. A cultura de citros assume nesse sentido grande importância, principalmente por adquirir poucos insumos para sua exportação, diferente do que ocorre para outros produtos. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, cerca de 230 mil posições, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões (NEVES et al., 2010).

De acordo com Koller (2001), as frutas cítricas ultrapassam o volume de consumo anual *per capita*, comparativamente à banana, situando-se mais distante, em terceiro lugar, a maçã. Porém, apesar da posição de liderança, diversas ameaças de origem fitossanitária e dificuldades na propagação afetam a cultura de citros e acarretam em prejuízos no setor citrícola.

Condições de desenvolvimento da planta matriz, tipo e tamanho de explante, estiolamento, quebra da dominância apical, influência sazonal, termoterapia, eletroterapia, quimioterapia, meios e condições de cultura são os principais fatores que podem contribuir na recuperação de plantas livres de vírus, segundo Torres et al. (1998b).

Com os adventos tecnológicos na citricultura e as exigências referentes a produção de mudas de qualidade genética e fitossanitárias, a tendência é de aumentar o número de produtores em busca da adoção dessas melhorias para aumento da produção. A qualidade genética e sanitária da muda é considerada característica de fundamental importância para o sucesso da implantação de um pomar comercial, uma vez que a fruticultura moderna está baseada em pomares produtivos e o sucesso do empreendimento depende também da utilização de mudas de qualidade (FACHINELLO, 2000).

As leis de números 10.711 (05/08/2003) e 5.153 (23/07/2004) e respectivas atualizações, instituem e regulamentam o RENASEM (Registro Nacional de Sementes e Mudanças), submetem e atribuem aos produtores de sementes, mudas e materiais de multiplicação (sementes, enxertos, estacas etc.) a várias exigências e responsabilidades quanto ao registro em si e, principalmente, quanto à responsabilidade sobre a qualidade genética e sanitária.

Almeida e Passos (2011) relatam ainda que atenção especial deve ser dada aos problemas fitossanitários que atingem a citricultura, pois estes podem pressionar

o custo médio unitário de produção, aumentando o custo variável com a compra e aplicação de defensivos e reduzindo a produtividade do pomar.

Os problemas fitossanitários e as barreiras impostas pela biologia reprodutiva dos citros são fatores que dificultam seu melhoramento pelo método convencional. Diante dessa situação, se evidencia a grande importância do desenvolvimento dos programas de melhoramento genético para a obtenção de variedades que apresentem tolerância a pragas e doenças para um bom desempenho da citricultura em direção a uma melhora na qualidade dos frutos, aumento na produtividade e diminuição no custo de produção. E, nesse contexto, como afirmam Machado et al. (2005), as técnicas biotecnológicas podem colaborar efetivamente, como de fato já está ocorrendo com o ganho ou potencialização de características das plantas.

Nos citros, a técnica de cultura de tecidos utilizada na propagação das plantas, em virtude de não haver um sistema mais eficiente para a eliminação de vírus em materiais infectados, é a microenxertia, que, porém, consiste de um procedimento complexo e de baixo rendimento. Sendo assim, a utilização da técnica de ápices caulinares, considerando-se condições de cultivo, como concentrações de reguladores vegetais e tamanho de explantes, podem fornecer melhores condições para o desenvolvimento de plantas micropropagadas de citros.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Citricultura brasileira**

A citricultura brasileira tem histórico exemplar. Desde seu início foi responsável pela geração de mais de US\$ 50 bilhões em divisas para o País e sempre se caracterizou pela liderança mundial, tanto em participação de mercado como em inovações, logística e posicionamento (NEVES e JANK, 2006).

De origem asiática, a laranja foi introduzida no Brasil durante o período inicial da colonização pelos jesuítas portugueses por volta do ano 1530 nos estados da Bahia e de São Paulo, onde permaneceu por mais de quatro séculos sem instituir uma atividade econômica. O objetivo inicial da introdução dessa planta cítrica era de criar um estoque de vitamina C, para utilização como antídoto do escorbuto, mas esta apresentou adaptações climáticas bastantes favoráveis, o que contribuiu com o desenvolvimento da cultura (NEVES e JANK, 2006).

A citricultura destacou-se em vários estados, porém, foi a partir da década de 1920 que se instituiu o primeiro núcleo citrícola nacional nos contornos de Nova Iguaçu no Estado do Rio de Janeiro (NEVES et al., 2010). A partir daí se iniciou as exportações de laranja para os países europeus e a cultura foi se expandindo no Brasil, alcançando posição de destaque que dura até os dias atuais.

No final da década de 1930 foram identificados os primeiros casos da tristeza dos citros, doença que acabou em poucos anos com todas as plantas enxertadas sobre a laranjeira azeda, único porta-enxerto em uso na época. Almeida e Passos (2011) relatam que ainda hoje a monocitricultura e a falta de uma eficiente barreira que possa evitar a rápida proliferação de pragas e doenças nos principais pomares de laranja do País expõem a citricultura brasileira a uma situação de vulnerabilidade e de alto custo de manutenção.

Na década de 1960 foi estabelecido um “Registro de Plantas Matrizes de Citros” e passou a ser obrigatório aos viveiristas usarem somente gemas provenientes das matrizes registradas, garantindo assim a sanidade das mudas (NEVES e JANK, 2006).

Mudanças atuais têm ocorrido na citricultura brasileira, proporcionando o aumento da produção no País, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Estas mudanças referem-se a alterações nos padrões tecnológicos como o aumento da densidade de árvores por hectare, correspondendo hoje a mais de três vezes a densidade de plantio utilizada há três décadas, e a utilização de mudas de boa qualidade genética e fitossanitária.

### **3.2 Cultura de tecidos**

A cultura de tecidos vem sendo bastante utilizada em programas de melhoramento genético de plantas. Ela consiste em um conjunto de técnicas que permitem o cultivo in vitro e sob condições assépticas de um explante, em um meio de cultura, e em condições adequadas de temperatura e luminosidade.

Haberlandt, em 1902, tentou o cultivo, sem êxito, de células de tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva, e, dois anos mais tarde, Hanning, em 1904, alcançou plantas viáveis de embriões maduros de duas crucíferas. Mas somente a partir do século 20 é que as evoluções na cultura de tecidos de plantas aconteceram. (Torres et al., 1998a)



As principais vantagens oferecidas pela cultura de tecidos na propagação vegetal são: a) pequeno número de explantes pode ser utilizado para regenerar milhares de plantas; b) genótipos idênticos à planta matriz são produzidos; c) curto espaço de tempo requerido para produção de grandes quantidades de mudas; d) espaço físico mínimo em comparação aos métodos convencionais de propagação; e e) eliminação de contaminantes (SOUZA et al., 2006).

A cultura de tecidos vegetais tem grande importância também para a conservação de bancos de germoplasma, já que permite manter um grande número de plantas em um espaço pequeno, reduzindo perdas genéticas e custos (FIGUEIREDO e TAKITA, 2004).

Ultimamente vários estudos têm utilizado plantas cultivadas *in vitro* para fornecimento de explantes, como observado em trabalho desenvolvido por Silva et al. (2010). Esses estudos direcionam para o desenvolvimento de condições adequadas ao cultivo dos explantes, e vários deles já apontam para a importância de alguns fatores, como a presença do fitorregulador BAP.

### **3.3 Cultura de ápices caulinares**

O meristema caulinar consiste de células indiferenciadas e com grande capacidade de formação de tecidos e órgãos. Essa formação depende exclusivamente da manutenção e do direcionamento adequado de um grupo de células indiferenciadas para a constituição de órgãos. Trata-se do tecido situado distal ao mais novo primórdio foliar e, de acordo com Torres et al. (1998b), seu tamanho não deve exceder 0,1 mm, diferente do ápice caulinar que consiste do meristema apical com primórdios foliares subjacentes e tamanho variável de 0,3 a 20 mm ou mais.

A cultura de ápices caulinares é uma estratégia bastante utilizada para o desenvolvimento de estoques de plantas matrizes livres de vírus. O tamanho do ápice é dependente do objetivo da micropropagação. Ele constitui um fator de fundamental importância na aquisição de material livre de patógenos, sendo que quanto maior o tamanho maior o nível de diferenciação celular e, conseqüentemente, menor a possibilidade de limpeza sistêmica. No caso da recuperação de plantas isentas de doenças, deve-se procurar o tamanho de explante ideal que esteja livre de microorganismos e que ao mesmo tempo, consiga se estabelecer e crescer, uma vez isolado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os meristemas apicais têm a capacidade genética e fisiológica de manter a divisão e diferenciação celulares, gerando novos tecidos, órgãos e formando indivíduos completos com as mesmas características. Os ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

### **3.4 Microenxertia**

A microenxertia consiste em uma variação da técnica de ápices caulinares. Esta foi descrita pela primeira vez por Murashige et al. (1972), restaurando plantas de citros livres de vírus, e depois de aperfeiçoada passou a ser aplicada a outras espécies.

Essa técnica consiste em microenxertar, em condições assépticas, um ápice caulinar contendo de dois a três primórdios foliares, retirado de uma planta matriz, sobre um porta-enxerto originado de sementes germinadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

A microenxertia é uma técnica particularmente adequada para limpeza clonal de espécies lenhosas, quando houver exigência da manutenção de características adultas e problemas de regeneração de meristemas no meio de cultura (FIGUEIREDO e TAKITA, 2004). Esta técnica vem sendo utilizada há décadas em frutíferas e essências florestais, visando a obtenção de plantas livres de vírus, uma vez que essas plantas lenhosas apresentam dificuldades para regeneração a partir de ápices caulinares cultivados diretamente no meio nutritivo.

Dessa forma, essa técnica permite a obtenção de mudas saudáveis, livres de doenças sistêmicas transmissíveis normalmente pela enxertia convencional, uma vez que as espécies cítricas são obtidas assexuadamente por esta via, o que as tornam suscetíveis a patógenos. E, de acordo com Fisher (1993), a microenxertia adquire ampla importância em face da ausência de um processo eficiente de controle de doenças, quando as plantas estão instaladas no pomar.

Apesar da sua eficiência na eliminação de patógenos, a microenxertia se constitui em uma técnica complexa, meticulosa e de baixo rendimento.

### 3.5 Meios de cultura

De acordo com Caldas et al. (1998), os meios nutritivos utilizados na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento, controlando em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Dessa forma, os mesmos processos funcionais que ocorrem naturalmente nas plantas são proporcionados às células cultivadas *in vitro*, no que se refere as exigências de nutrientes minerais, uma vez que nessas condições ocorre a inativação de alguns processos como o da fotossíntese.

No desenvolvimento dos meios nutritivos para a cultura de tecidos de plantas, houve desde o início uma busca por meios definidos, de composição conhecida e controlada (CALDAS et al., 1998). Os meios nutritivos são compostos basicamente por água, macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, vitaminas, mio-inositol e um agente gelificante.

A água é o componente utilizado em maior quantidade. Deve ser destilada e deionizada, por se tratar de uma fonte de impurezas que pode influenciar no desenvolvimento do explante (CALDAS et al., 1998).

Os macronutrientes são os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o desenvolvimento da planta e são geralmente adicionados ao meio na forma de sais inorgânicos. Os micronutrientes são utilizados em menor quantidade no meio e são considerados essenciais para plantas clorofiladas (CALDAS et al., 1998).

Nas plantas os carboidratos atuam, principalmente, como fonte de carbono e energia, agentes osmóticos e protetores contra estresse (LIPAVSKÁ & KONRÁDOVÁ, 2004). Nos meios de cultura, o carboidrato mais utilizado é a sacarose.

As vitaminas são necessárias para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A tiamina, ácido nicotínico e piridoxina formam uma combinação de vitaminas que foram usadas em estudos iniciais com cultura de raízes e são empregadas até hoje como uma mistura básica no meio (CALDAS et al., 1998).

O mio-inositol é um componente usado em vários meios com efeito de estimulador de crescimento e formação de gemas. A dose mais utilizada nos meios de cultura é de 100 mg/L (CALDAS et al., 1998).

### 3.6 Fitorreguladores

A composição e concentração de hormônios no meio nutritivo são fatores determinantes no crescimento e padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS et al. 1998). Alguns tecidos são capazes de sintetizar as quantidades necessárias de nutrientes para o seu desenvolvimento *in vitro*, outros não; neste caso, é necessária a adição de fontes exógenas.

De acordo com Silva et al. (2005) o crescimento ou desenvolvimento de determinadas partes da planta pode sofrer influência também das concentrações, assim como das combinações entre os fitorreguladores. Estes são utilizados de acordo com o objetivo do meio de cultura.

Os hormônios vegetais empregados no cultivo *in vitro* são as auxinas, que possuem respostas variadas entre suas diferentes classes, as citocininas, que podem promover a formação de grande número de brotos e altas taxas de multiplicação, as giberelinas, que, todavia, têm demonstrado respostas em poucas culturas *in vitro*, o ácido abscísico, que é um inibidor do crescimento *in vitro*, e o etileno, que tem influência no padrão de desenvolvimento das culturas (CALDAS et al. 1998).

Cada hormônio terá efeito no processo de crescimento e desenvolvimento da planta, sendo dependente da espécie vegetal utilizada, do tipo de explante em que é aplicado, do estágio de desenvolvimento e do tecido da planta, da concentração hormonal utilizada, da interação entre esses, além de fatores ambientais podendo, assim, diferentes explantes referentes a uma mesma planta responderem de forma diferenciada ao hormônio utilizado (TOMBOLATO & COSTA., 1998).

Estudos realizados em *Citrus* (SCHINOR, 2006) têm demonstrado induções de repostas morfogênicas com a presença de BAP e regeneração de gemas a partir da combinação deste com baixos níveis de ANA.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um protocolo para a limpeza de vírus mediante a regeneração de plantas de citros a partir de explantes de ápices caulinares.

## 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferentes concentrações dos hormônios ANA, BAP e GA<sub>3</sub> no meio WPM para o desenvolvimento de ápices caulinares dos genótipos limoeiro 'Cravo' clone comum, citrange 'Carrizo' e LCREEL (TR X LCR) 001;
- Determinar tamanhos ideais de explantes de ápices caulinares do limoeiro 'Rugoso Mazoe' que favoreçam seu desenvolvimento no meio de cultura;
- Eliminar a presença de agentes de natureza viral em plantas de citros.

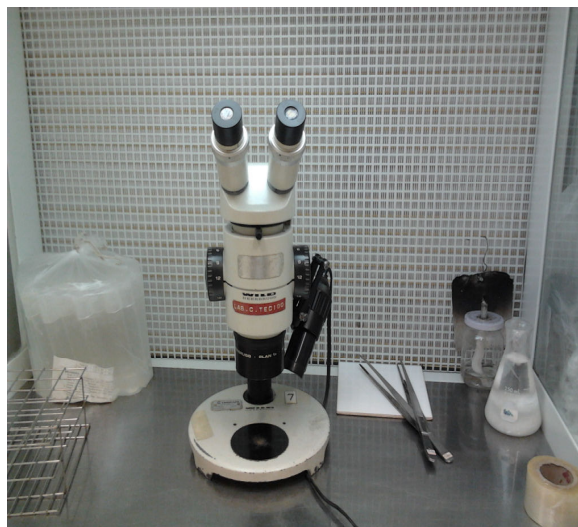
## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Cultivo de ápices caulinares de diferentes genótipos de citros em meio WPM com composições variadas

No Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram utilizados ápices caulinares de plantas previamente cultivadas *in vitro* (Figura 1) dos genótipos limoeiro 'Cravo' clone comum, citrange 'Carrizo' e LCREEL (TR X LCR) 001. Os ápices caulinares foram excisados com 0,2 mm a 0,5 mm de tamanho em câmara de fluxo laminar, com auxílio de microscópio estereoscópio, em aumentos de 10 a 40X, utilizando um bisturi, (Figura 2), e na sequência introduzidos rapidamente em tubos de ensaio de 14 mm x 100 mm, contendo 2,5 mL do meio de cultura básico WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). Em seguida os ápices caulinares foram incubados em condições de temperatura de 27±1°C, intensidade luminosa de 30 µmol/m<sup>2</sup>/s e fotoperíodo de 16 horas.



**Figura 1.** Plantas de citros previamente cultivadas *in vitro*, utilizadas para excisão de ápices caulinares.



**Figura 2.** Materiais usados em câmara de fluxo laminar no processo de extração de ápices caulinares de citros.

O experimento constou de três tratamentos, sendo estes correspondentes aos genótipos limoeiro ‘Cravo’ clone comum, citrange ‘Carrizo’ e LCREEL (TR X LCR) 001, com 20 repetições cada.

Passado o período de 75 dias, os ápices caulinares foram avaliados quanto a taxa de sobrevivência.

Após avaliação, os ápices sobreviventes de cada genótipo foram transferidos para três meios distintos, sendo esses: meio WPM sem reguladores de crescimento (meio 1); meio WPM suplementado com doses de 0,01 mg/L de ácido naftalenoacético-ANA e 0,02 mg/L de benzilaminopurina-BAP (meio 2); e meio WPM com 0,5 mg/L de ANA e de BAP e 0,25 mg/L de ácido giberélico-GA<sub>3</sub> (meio 3). Todos os meios foram suplementados com sacarose (30 g/L), solidificados com ágar (7 g/L) e pH ajustado em 5,7 a 5,8. O delineamento experimental foi no esquema fatorial de 3 x 3 (três genótipos e três meios de cultura), com sete repetições, exceto para o meio 1, o qual teve duas, quatro e cinco repetições para os genótipos limoeiro ‘Cravo’ clone comum, citrange ‘Carrizo’ e LCREEL (TR X LCR) 001, respectivamente.

Após 90 dias, foi feita uma segunda avaliação dos ápices quanto a porcentagem de sobrevivência nos diferentes meios de cultura.

## **5.2 Cultivo de diferentes tamanhos de ápices caulinares de limoeiro 'Rugoso Mazoe' em meio WPM suplementado com ANA e BAP**

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram utilizados como explantes segmentos de ápices caulinares de 1 mm ou 2 mm da variedade limoeiro 'Rugoso Mazoe' previamente cultivado *in vitro* no meio de cultura WPM.

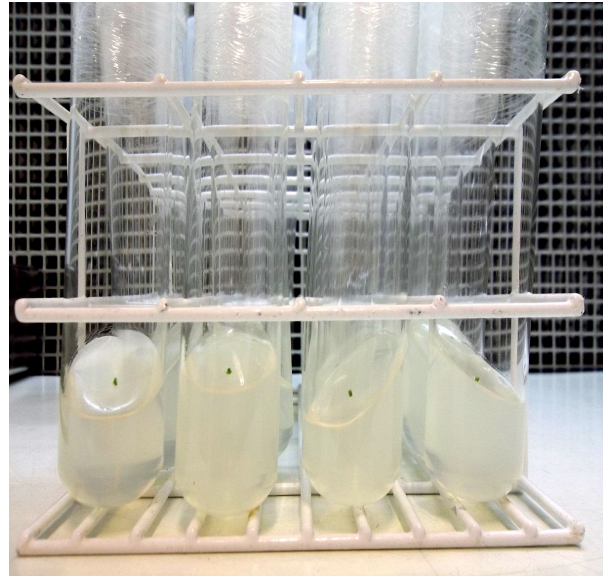
O meio de cultivo WPM foi acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, dos reguladores de crescimento ANA, nas concentrações de 0,0 mg/L ou 0,01 mg/L, e BAP, nos níveis de 0,0 mg/L; 0,02 mg/L ou 0,04 mg/L, e gelificado com 7 g/L de ágar, com pH ajustado para 5,7-5,8 antes da autoclavagem.

Em câmara de fluxo laminar foram extraídos os explantes apicais das plantas de citros cultivadas *in vitro* (Figura 3), nos tamanhos de 1 mm e 2 mm, com o auxílio de uma lupa, e, em seguida, inoculados nos diferentes meios de cultura (Figura 4). Após instalado o experimento, as plantas foram conservadas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 µmol/m/s e fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 3 x 2 (duas concentrações de ANA, três concentrações de BAP e dois tamanhos de explantes), com 12 repetições. Foi realizada uma avaliação após 85 dias de desenvolvimento, observando-se as seguintes variáveis: altura de plantas (< 1 cm; > 1 cm), número de ápices vivos, número de ápices mortos/oxidados, número de folhas vivas e folhas mortas, presença de raiz (< 1,0 cm; 1,0 cm- 2,0 cm; > 2,0 cm), coloração da parte aérea e o peso da matéria fresca da planta. A análise estatística foi efetuada comparando-se as médias obtidas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAS (Sas Institute, 2004).



**Figura 3.** Excisão de ápice caulinar em câmara de fluxo laminar com auxílio de estereomicroscópio.



**Figura 4.** Ápices de citros inoculados no meio de cultura.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Cultivo de ápices caulinares de diferentes genótipos de citros em meio WPM com composições variadas

No geral, os ápices apresentaram pequeno desenvolvimento inicial, mas após determinado período o crescimento se manteve estável. A taxa de sobrevivência obtida entre os genótipos variou de 80% a 95%, sendo que o maior índice foi obtido com o genótipo LCREEL (TR X LCR) 001, seguido do citrange ‘Carrizo’ e limoeiro ‘Cravo’ clone comum (Tabela 1), apresentando, portanto, este último, maior número de ápices mortos (Figura 5). Esses dados apontam para uma resposta em nível de genótipo, pois os ápices apresentaram diferentes comportamentos no mesmo meio de cultura. Isso evidencia o fato de que as condições para o desenvolvimento de uma espécie pode variar entre os genótipos, como relatam Grattapaglia e Machado (1998), uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para o seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas.



**Tabela 1.** Taxa de sobrevivência de ápices caulinares de citros em meio WPM em função do genótipo.

Genótipos	Taxa de Sobrevivência (%)
Citrango 'Carrizo'	90
LCREEL (TR X LCR) 001	95
Limoeiro 'Cravo' clone comum	80



**Figura 5:** Ápice caulinar oxidado do limoeiro 'Cravo' clone comum.

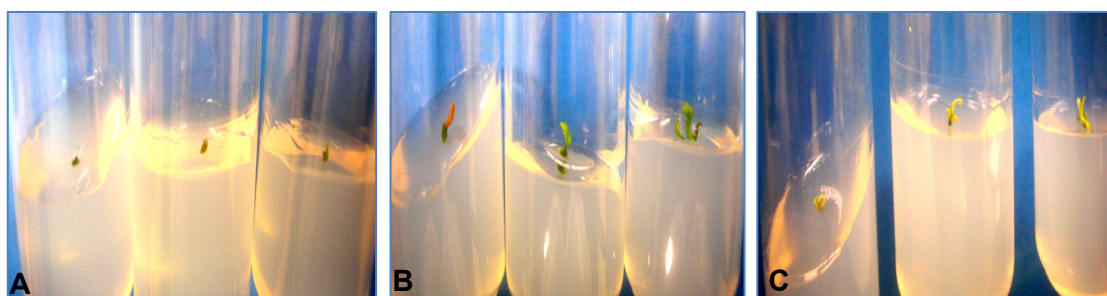
Na segunda avaliação, além do genótipo levou-se em consideração o meio de cultura. O híbrido LCREEL (TR X LCR) 001 apresentou uma taxa de sobrevivência de 100% nos meios estudados (meios 1, 2 e 3). O citrango 'Carrizo' também mostrou a taxa de sobrevivência de 100% nos ápices cultivados nos meios 2 e 3, e de 75% no meio de cultura 1. Este resultado difere do obtido para o limoeiro 'Cravo' clone comum que teve taxas de sobrevivência entre 50% e 86%, sendo o menor valor referente ao meio 1 (Tabela 2). Em experimentos com micropropagação de macieira, Santa Catarina *et al.* (2001) obtiveram 30% de crescimento *in vitro* de ápices meristemáticos de 2 a 4 mm de tamanho cultivados no meio MS com concentrações de 4,4  $\mu\text{m}$  de BAP, 2,5  $\mu\text{m}$  de AIB e 0,3  $\mu\text{m}$  de GA<sub>3</sub>.

O meio 2 e 3 proporcionaram melhores taxas de sobrevivência para o citrango 'Carrizo'. Com relação ao híbrido LCREEL (TR X LCR) 001, os diferentes meios de culturas favoreceram 100 de sobrevivência dos ápices caulinares. Para o Limoeiro 'Cravo' clone comum o meio 3 foi o mais eficiente (Tabela 2)

**Tabela 2.** Taxa de sobrevivência de ápices caulinares de citros em função do genótipo e do meio de cultura.

<b>Genótipos</b>	<b>Meio</b>	<b>Taxa de sobrevivência (%)</b>
Citrange 'Carrizo'	1	75
Citrange 'Carrizo'	2	100
Citrange 'Carrizo'	3	100
LCREEL (TR X LCR) 001	1	100
LCREEL (TR X LCR) 001	2	100
LCREEL (TR X LCR) 001	3	100
Limoeiro 'Cravo' clone comum	1	50
Limoeiro 'Cravo' clone comum	2	57
Limoeiro 'Cravo' clone comum	3	86

Os meios de cultura 2 e 3 possibilitaram o desenvolvimento da parte aérea para o citrange 'Carrizo' e LCREEL (TR X LCR) 001 (Figura 6B e 6C). Evidenciando a influencia dos fitoreguladores no processo da organogênese para estes genótipos. Entretanto, o mesmo não foi verificado para o Limoeiro 'Cravo' clone comum (Figura 6A). O que implica respostas diferenciadas entre genótipos da mesma espécie, embora os meios suplementados com fitorreguladores tenham sido mais eficientes comparados a testemunha.



**Figura 6.** Da esquerda para a direita, ápices caulinares do limoeiro ‘Cravo’ clone comum (A), citrange ‘Carrizo’ (B) e LCREEL (TR X LCR) 001 (C) nos meios 1, 2 e 3.

## **6.2 Cultivo de diferentes tamanhos de ápices caulinares de limoeiro ‘Rugoso Mazoe’ em meio WPM suplementado com ANA e BAP**

Na Tabela 3 estão apresentados os resumos da análise de variância referentes às variáveis número de ápices vivos, número de folhas vivas e peso da matéria fresca da planta (g), considerando o tamanho dos explantes (1 mm e 2 mm) e a presença de ANA e BAP nas concentrações de 0,0 mg/L e 0,01 mg/L, e, 0,0 mg/L, 0,02 mg/L e 0,04 mg/L, respectivamente. Todas as variáveis apresentaram valor do quadrado médio significativo a 1% apenas para o fator tamanho, enquanto a matéria fresca da planta mostrou significância para a interação entre tamanho de ápices e BAP a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Nenhuma dessas variáveis foi influenciadas pelo fitorregulador ANA bem como pelas interações envolvendo o mesmo. Cantagallo et al. (2005) também não observaram influência do ANA na micropropagação do citrumelo ‘Swingle’, assim como na sua interação com o BAP em relação ao número médio de brotações. Por outro lado, esses autores observaram influência significativa para as diferentes concentrações de BAP, sendo que a ausência desse regulador vegetal resultou em baixa produção de brotos do citrumelo ‘Swingle’.

**Tabela 3.** Análise de variância dos ápices do limoeiro ‘Rugoso Mazoe’ quanto as variáveis número de ápices vivos, número de folhas vivas e peso da matéria fresca da planta (g), considerando o tamanho dos ápices e a presença dos fitorreguladores ANA e BAP.

FV	GL	QM		
		Número de ápices vivos	Número de folhas vivas	Peso da matéria fresca da planta (g)
TAM	1	3,2478 **	193, 8843 **	0,0100 **
ANA	1	0,1741 <sup>ns</sup>	19,2448 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>
BAP	2	0,4137 <sup>ns</sup>	8,2019 <sup>ns</sup>	0,0007 <sup>ns</sup>
TAM*ANA	1	0,0924 <sup>ns</sup>	3,0658 <sup>ns</sup>	8,7618 <sup>ns</sup>
TAM*BAP	2	0,4529 <sup>ns</sup>	6,7552 <sup>ns</sup>	0,0007 *
ANA*BAP	2	0,2371 <sup>ns</sup>	13,0644 <sup>ns</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>
TAM*ANA*BAP	2	0,2295 <sup>ns</sup>	6,4464 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>
CV (%)		33,75	68,45	65,99
Média geral		1,1709	3,8119	0,0193

\*\* Significativo a 1% pelo teste de Tukey

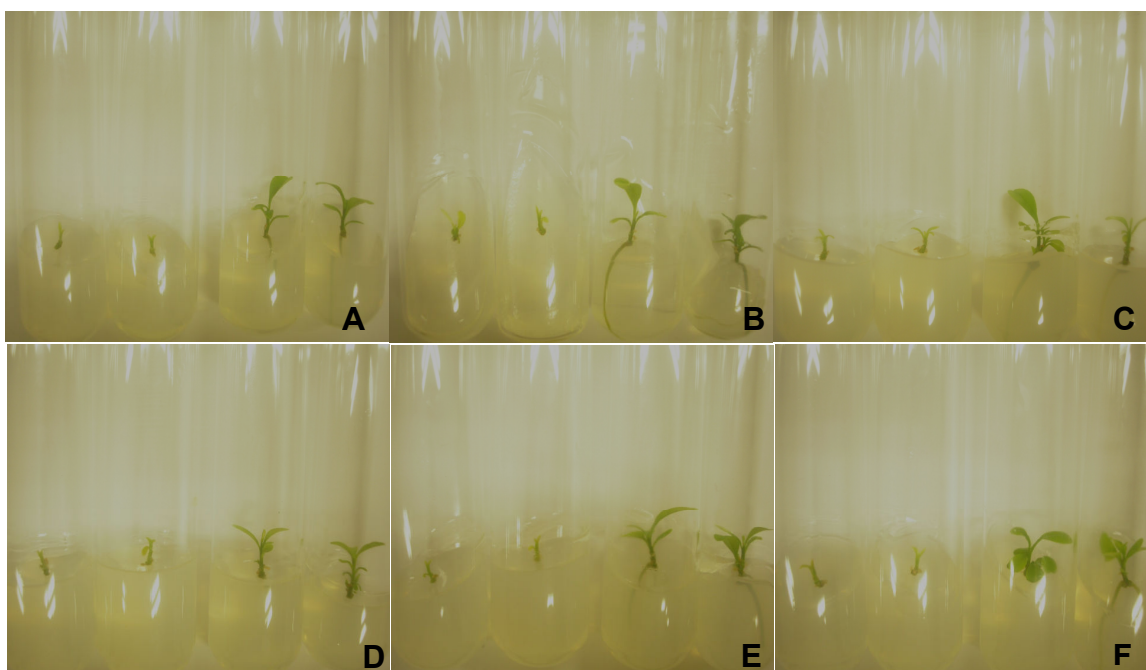
\* significativo a 0,5 % pelo teste de Tukey

Nas variáveis números de ápices vivos, número de folhas vivas e peso da matéria fresca da planta as maiores médias foram obtidas no cultivo de ápices com 2 mm de tamanho (Tabela 4). Assim o fator tamanho dos ápices teve relevante influência nas respostas dos mesmos quanto a essas variáveis (Figura 7). Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que o tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência, já que os muito pequenos frequentemente não conseguem crescer ou demoram bastante para iniciar o crescimento.

**Tabela 4.** Médias do efeito do tamanho do explante sobre o número de ápices vivos, número de folhas vivas e peso da matéria fresca da planta (g) do limoeiro ‘Rugoso Mazoe’.

Tamanho do ápice (mm)	Média
Número de ápices vivos	
1	1,0000 b
2	1,3333 a
Número de folhas vivas	
1	2,4912 b
2	5,0666 a
Peso da matéria fresca da planta (g)	
1	0,0098 b
2	0,0283 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Figura 7.** Plantas regeneradas de ápices do limoeiro ‘Rugoso Mazoe’ com 1 e 2 mm de tamanho em meios sem a presença de ANA e com BAP nas doses de 0,0 mg/L (A); 0,02 mg/L (B) e 0,04 mg/L (C) e suplementados com 0,01 mg/L de ANA e com BAP nas doses de 0,0 mg/L (D); 0,02 mg/L (E) e 0,04 mg/L (F).

Para a variável peso da matéria fresca da planta, houve significância apenas na interação entre tamanho e BAP. Sendo esta interação observada somente para os ápices cultivados com 2 mm e na presença de BAP nas doses de 0,02 mg/L e 0,04 mg/L, as quais não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os ápices de 1 mm não houve interação do tamanho com o BAP nem diferenças estatísticas entre as doses utilizadas (Tabela 5).

Dessa forma, a presença de BAP demonstrou-se necessária no desenvolvimento dos explantes. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al. (2010), que obtiveram maiores médias de explantes responsivos de laranjeira 'Pera' quando cultivados em meio de cultura contendo BAP. Respostas similares também foram comprovadas por Schinor et al. (2006) e Bassan et al. (2011), que detectaram ser essencial a presença de BAP para o desenvolvimento de gemas adventícias de *Citrus* sp.

**Tabela 5.** Médias das interações entre tamanho de ápices e BAP sobre o peso da matéria fresca da planta do limoeiro 'Rugoso Mazoe'.

Tamanho do ápice (mm)	BAP (mg L)		
	0,0	0,02	0,04
1	0,0088 bA	0,0094 bA	0,0110 bA
2	0,0200 aB	0,0370 aA	0,0280 aAB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna (BAP) ou maiúscula em cada linha (Tamanho) não diferem significativamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Foram observados melhores resultados para as variáveis altura da planta, coloração da parte aérea, presença de raiz e números de ápices mortos quando utilizados explantes maiores (Tabela 6).

De modo geral, para essas variáveis não foi possível observar uma influência significativa dos fitorreguladores ANA e BAP e nem da interações entre eles nas doses empregadas.

**Tabela 6.** Efeitos do tamanho do explante e das concentrações de ANA e BAP sobre as variáveis altura da planta (< 1 cm ou > 1 cm), coloração da parte aérea (verde:V; amarelada: A e verde amarelada: VA), presença de raiz e número de ápices mortos no limoeiro 'Rugoso Mazoe', levando-se em consideração número de plantas por tratamento.

Tamanho do ápice (mm)	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Altura da planta (cm)		Coloração da parte aérea			Presença de raiz	Número de ápices mortos
			<1	>1	V	A	V-A		
1	0,0	0,0	7	1	4	0	4	2	2
1	0,0	0,02	8	1	0	4	5	0	1
1	0,0	0,04	10	0	1	2	7	2	0
1	0,01	0,0	10	0	4	1	5	0	0
1	0,01	0,02	9	1	5	1	4	2	0
1	0,01	0,04	10	0	0	3	7	0	0
2	0,0	0,0	6	4	5	3	2	6	0
2	0,0	0,02	4	6	8	1	1	7	0
2	0,0	0,04	4	6	2	2	6	7	0
2	0,01	0,0	2	8	4	3	3	3	0
2	0,01	0,02	3	7	5	3	2	6	0
2	0,01	0,04	4	6	2	3	5	6	0

Considerando os resultados obtidos novos experimentos são necessários para dar continuidade à tentativa de estabelecer um protocolo para a regeneração completa de plantas de citros a partir de ápices caulinares, conciliando tamanho e limpeza clonal.

## 7 CONCLUSÕES

Os meios suplementados com fitorreguladores vegetais proporcionaram melhor resposta organogênica para todos os genótipos.

O Limoeiro 'Cravo' clone comum apresentou menor resposta organogênica *in vitro* comparado a Citrange 'Carrizo' e LCREEL (TR X LCR) 001

Os genótipos citrange 'Carrizo' e LCREEL (TR X LCR) 001 apresentaram respostas similares para o desenvolvimento dos ápices caulinares.

Apesar de sua importância na promoção da limpeza clonal, os ápices caulinares menores encontram maior dificuldade na regeneração

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. O.; PASSOS, A. O. **Citricultura brasileira**: em busca de novos rumos desafios e oportunidades na região Nordeste. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2011. p. 9-19.

BASSAN, M. M. MOURÃO FILHO, F. A. A.; MIYATAI, L. Y.; MENDES, B. M. J. Organogênese *in vitro* a partir de segmentos internodais derivados de plantas adultas de laranja doce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 6, p. 672-674, Jun 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100204X2011000600015&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100204X2011000600015&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 22 Mar. 2013.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1998, v. 1, p. 87-132.

CANTAGALLO, F. S.; AZEVEDO, F. A.; SCHINOR, E. H.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 136-138, 2005.

FACHINELLO, J. C. Problemáticas das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGO, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. p.25-40.

FIGUEIREDO, L. H. M.; TAKITA, M. A. Cultura de tecidos e transformação genética de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.439-459, 2004.

FISHER, J. Youtsey urges growers to buy quality trees. **Citrus Industry**, Bartow, v. 3, n. 3, p. 86-89, Mar. 1993.



GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. v. 1, p. 183-260.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, GEERT-JAN. **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3<sup>rd</sup> edition, V.01, The Netherlands, 501 p. 2008.

GROSSER, J.W.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; GMITTER JUNIOR, F.; LOUZADA, E.S.; JIANG, J.; BAERGEN, K.; QUIROS, A.; CABASSON, C.; SCHELL, J.L.; CHADLER, J.L. Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.577- 582, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistematico da produção agrícola 2012**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 18 fev. 2013.

KOLLER, O. L. Citricultura catarinense – Seus números e suas necessidades. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.14, n.1, p. 54-61, 2001.

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: 23 fev. 2013.

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.

MACHADO, M. A., CRISTOFANI, M., AMARAL, A. M., OLIVEIRA, A. C. Citros: Capítulo 09: **Genética, Melhoramento e biotecnologia dos citros**. FAPESP: Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005. p. 223-277.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **HortScience**, Alexandria, v. 7, n. 2, p. 118-119, 1972.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.100, p.471-479, 1975.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. (Coord.). Perspectivas da cadeia produtiva de laranja no Brasil: a Agenda 2015. **Pensa Boletim Online**, São Paulo, 2006. Disponível em: <[http://www.pensa.org.br/downloads/Agenda\\_Citrus\\_2015\\_PENSAICONE.p](http://www.pensa.org.br/downloads/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.p)>. Acesso em: 05 mar. 2013.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. v. 1, p. 1-46.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da laranja 'Valência' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.6, p.723-726, 1989.

SANTA CATARINA, C.; MACIEL, S. C.; DENARDI, F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira 'seleção 69' tolerante à podridão do colo (*phytophthora cactorum*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.757-762, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCHINOR, E. H.; PAOLI L. G.; AZEVEDO, F. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 463-466, dez. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010029452006000300027&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452006000300027&lng=pt&nrm=iso)>. acesso em 22 mar. 2013.

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. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

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, 2005.

SILVA, R. P.; SOUZA, A. J.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Regeneração de gemas de laranja-azeda e desenvolvimento in vitro de plantas em função da composição do meio de cultura e tipo de explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 001-008, mar. 2010 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01002945201000010003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01002945201000010003&lng=en&nrm=iso)>. acesso oem 22 Mar. 2013

SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. p. 11-37.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, Campinas, 1998. p. 18-21. (Boletim Técnico, 174).

TORRES tecidos, A. C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998a. v. 1, p. 11-16.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998b. v. 1, p. 133-142.