

PAULA CRISTINA SILVA

ORGANOGENESE *IN VITRO* EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE  
TANGERINEIRA 'CLEÓPATRA'

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

**PAULA CRISTINA SILVA**

**ORGANOGENESE *IN VITRO* EM EXPLANTES DE EPICÓTILO DE  
TANGERINEIRA 'CLEÓPATRA'**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADO: \_13\_ de agosto de 2001.

---

Prof. Aloisio Xavier

---

Prof. Dalmo Lopes de Siqueira

---

Prof. Júlio César Lima Neves  
(Conselheiro)

---

Prof. Luiz Carlos Chamhum Salomão  
(Conselheiro)

---

Prof. José Maria Moreira Dias  
(Orientador)

À minha mãe Arlete, por sempre acreditar em meus sonhos  
e me incentivar a sonhar cada vez mais.

"Depois de algum tempo você aprende ... que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso...e você começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão... você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais..."

William Shakespeare

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor José Maria Moreira Dias, pela orientação e exemplo de trabalho e acima de tudo pela amizade, confiança e respeito.

Aos professores Cláudio Horst Bruckner, Júlio César Lima Neves e Luiz Carlos Chamhum Salomão, pelas críticas, sugestões e ajuda no desenvolvimento do trabalho. Além da confiança, amizade e respeito.

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos transmitidos.

À equipe de trabalho no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais, Márcio Rocha e Cenira Fialho, pela amizade, pela convivência e ajuda, o que tornou o trabalho mais agradável.

Aos funcionários e professores do Setor de Fruticultura e do Departamento de Fitotecnia, pela atenção e amizade, em especial a Mara Rodrigues pela constante ajuda e carinho.

À todos da minha família, que compreenderam minha ausência em determinados momentos, em especial a minha irmã Cláudia pela confiança, carinho e apoio e ao meu irmão Vitor pelo carinho, apoio e por sua presença em momentos difíceis.

À minha mãe, por todos os ensinamentos e por fazer com que a distância entre nós fosse apenas física.

À Raiani, Júlia e Alice, por torcerem pela tia e compreenderem que mesmo à distância eu as acompanhava.

Às minhas amigas Elise, Leonarda, Lucíula e Patrícia, por me incentivarem e me acompanharem durante todo o período.

À Flávia, Lucimara e Silvane, pelo carinho, respeito e companheirismo, construídos por uma amizade sólida, sem a qual os dias teriam sido insuportavelmente solitários.

Ao Marcio Akira, pela imensa ajuda na realização de todos os experimentos e pela sua amizade.

Aos colegas Délcio, Fernando, Gisela, Gustavo e Virgínia pela convivência e ajuda o que tornou os dias sempre mais agradáveis.

A todos aqueles que, mesmo não tendo seus nomes citados aqui, de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

PAULA CRISTINA SILVA, filha de João Carlos Silva e Arlete Parrilha Sendra, nasceu em Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, em 14 de maio de 1975.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, em janeiro de 1999.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa em 13 de agosto de 2001.

# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Morfogênese <i>in vitro</i> de plantas cítricas.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Embriogênese somática .....	5
2.1.2. Organogênese .....	5
2.1.2.1. Fatores que afetam o processo de organogênese .....	6
Genótipo .....	6
Idade fisiológica .....	7
Estádio de desenvolvimento e vigor do material de partida .....	7
Órgão de procedência do explante .....	8
Posição do órgão do qual se obtém o explante .....	9
Colocação dos explantes no meio de cultivo.....	10
Meio de cultivo .....	10
Condições de incubação .....	12
2.1.3. Viabilidade das brotações formadas .....	13
<b>2.2. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Obtenção de plântulas axênicas a partir de sementes .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Efeito da adição de 6-benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na organogênese, em explantes de epicótilo cultivados verticalmente e incubados em três condições de luz.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Efeito do ácido naftaleno acético, ácido indolbutírico e ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4D) no processo de enraizamento de ápices de plântulas .....</b>	<b>36</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>

<b>4.1. Obtenção de plântulas axênicas a partir de sementes .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Efeito da adição de 6-benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na organogênese, em explantes de epicótilo cultivados verticalmente e incubados em três condições de luz .....</b>	<b>47</b>
4.2.1. Formação de gemas .....	47
4.2.1.1. Condição de incubação: luz .....	47
4.2.1.2. Condição de incubação: escuro/luz .....	49
4.2.1.3. Condição de incubação: escuro .....	50
4.2.2. Desenvolvimento de brotos .....	51
4.2.2.1. Condição de incubação: luz .....	51
4.2.2.2. Condição de incubação: escuro/luz .....	52
4.2.2.3. Condição de incubação: escuro .....	54
4.2.3. Formação de calos.....	60
4.2.4. Formação de calos.....	60
4.2.4.1. Condição de incubação: luz .....	60
4.2.4.2. Condição de incubação: escuro/luz .....	60
4.2.4.3. Condição de incubação: escuro .....	61
4.2.5. Formação de gemas .....	64
4.2.5.1. Condição de incubação: luz .....	64
4.2.5.2. Condição de incubação: escuro/luz .....	66
4.2.5.3. Condição de incubação: escuro .....	67
4.2.6. Desenvolvimento de brotos .....	70
<b>4.3. Efeito do ácido naftaleno acético, ácido indolbutírico e ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4D) no processo de enraizamento de ápices de plântulas .....</b>	<b>72</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>6. APÊNDICE .....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>

## RESUMO

SILVA, Paula Cristina, MS., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Organogênese *in vitro* em explantes de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’**. Orientador: José Maria Moreira Dias. Conselheiros: Cláudio Horst Bruckner, Júlio César Lima Neves e Luiz Carlos Chamhun Salomão

A propagação dos *Citrus* pode se dar: através da cultura de células e tecido e através da propagação vegetativa clássica, com métodos de estaquia, mergulhia e enxertia, sendo este último o que apresenta maior interesse comercial. Dentre os hipobiotos atualmente mais utilizados, destaca-se a tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan), devido as suas características agronômicas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral, a pontualização de um eficiente protocolo orgaanogênico de células, tecido e órgãos, uma vez que o cultivo *in vitro* de células e tecidos constitui uma estratégia de extraordinária importância para solucionar problemas não apenas no âmbito da propagação, como também do melhoramento genético clássico e do melhoramento genético não convencional, notadamente das plantas lenhosas perenes, como são os citros. Sementes de tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan) obtidas de frutos de plantas de 16 anos de idade, foram utilizadas como explantes, visando a obtenção do maior número possível de plântulas axênicas, normais e vigorosas. Após 50 dias de incubação no escuro em meio MS (Murashige & Skogg, 1962) na ausência de vitaminas, foram avaliados o número de tubos contaminados; porcentagem de sementes germinadas; número de plântulas e raízes por semente; comprimento do epicótilo e das plântulas; e vigor destas. O melhor resultado foi obtido ao se utilizar as concentrações de HClO a 0,50% v/v por 30 minutos para a primeira desinfestação e a de 1,00% v/v por 5 minutos para a Segunda desinfestação. As plântulas, obtidas de acordo com o protocolo descrito acima, tiveram o epicótilo seccionado em cinco segmentos, os quais foram utilizados para avaliação da influência de BAP e ANA em distintas condições de incubação (luz, escuro e escuro/luz). Após 50 dias em incubação em meio MS, suplementado com três concentrações de ANA (0,00; 0,10 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup>) e quatro

de BAP (0,00; 0,50; 1,00 e 3,00 mg.L<sup>-1</sup>) e pelas combinações entre estas, foram avaliados no extremo distal e proximal, dos referidos explantes, o número de gemas, brotos e o tamanho dos calos formados. O processo organogênico ocorreu, tanto por organogênese direta (extremo distal), quanto por indireta (extremo proximal). Na organogênese direta, uma maior formação de gemas foi obtida quando BAP foi adicionado ao meio na concentração de 0,50 mg.L<sup>-1</sup>, sob incubação em escuro/luz; e a posterior brotação destas ocorreu de forma mais efetiva em meio com 1,60 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, sob incubação em luz. Para a organogênese indireta, a incubação dos explantes no escuro foi a mais efetiva em todas as etapas, entretanto, as necessidades requeridas, quanto à natureza do regulador de crescimento e da concentração destes, variaram. Para o processo calogênico foram necessárias combinações específicas entre ANA e BAP, para cada explante, enquanto, para a formação de gemas e brotos a adição de 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de BAP ao meio de cultivo promoveu de uma forma geral os melhores resultados. Visando a avaliação da influência de AIB, ANA e 2,4D no processo de enraizamento adventício *in vitro*, foram utilizados como explantes, ápices de plântulas axênicas (protocolo descrito anteriormente). Nesta etapa, o meio MS foi suplementado com 4 concentrações de AIB e de ANA (0,00; 0,50; 1,00 e 1,50 mg.L<sup>-1</sup>), e a combinação de AIB e ANA na concentração de 0,50 mg.L<sup>-1</sup>, para ambos reguladores de crescimento, sendo que para esta combinação também foram adicionadas duas diferentes concentrações de 2,4D (0,20 e 0,40 mg.L<sup>-1</sup>). Após 50 dias de incubação, foram avaliados: o número de ápices enraizados, o número de raízes por plântulas, o comprimento de raízes, ápices com formação de calos e o vigor das plântulas. A combinação de AIB e ANA a 0,50 mg.L<sup>-1</sup> para ambos, e ANA na concentração de 0,50 mg.L<sup>-1</sup>, foram os tratamentos que apresentaram melhores resultados.

## ABSTRACT

SILVA, Paula Cristina, MS., Universidade Federal de Viçosa, August 2001. Organogenesis *in vitro* in explants of epicotyl of the 'Cleópatra' mandarin. Adviser: José Maria Moreira Dias. Committee members: Cláudio Horst Bruckner, Júlio César Lima Neves and Luiz Carlos Chamhum Salomão.

The propagation of the *Citrus* can occur: by culture of cells and tissue and by the classic vegetative propagation, using methods of cutting, budding and grafting, the last method mentioned represents, commercially, the most interesting. Among the rootstock more utilized today. The mandarin tree "Cleópatra" (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan) is pointed out due to its agronomical features. Thus, this work had as a general objective, the pointing of an efficient organogenic protocol of cells, tissues and organs, once that the cultivation *in vitro* of cells and tissues constitutes a strategy of an extreme importance in solving problems, not only in a propagation aspect as well as in the classic and non-conventional genetic improvement, notably from the hardwood plants, as the *Citrus* are. Seeds from the "Cleópatra" tangerine tree (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan) obtained from the fruits of sixteen year-old plants, were utilized as explants, with the objective of obtaining the highest number possible of normal and vigorous axenic plantules. After fifty days of incubation in the dark in a MS mean (Murashige & Skoog, 1962) in the absence of vitamins, the number of contaminated tubes; percentage of germinated seeds; number of plantules and roots per seed; length of the epicotile and plantules and their strength. The best result was obtained while using the concentrations of HClO to 0.50%v/v during thirty minutes for the first disinfection and of 1,00%v/v during five minutes for the second disinfection. The plantules obtained according to the protocol described above had the epicotile sectioned in five segments, that were utilized for evaluating the influence of BAP and ANA in distinct incubation conditions (light, dark, and light/dark). After fifty days of incubation in a MS mean, supplemented with three concentrations of ANA (0,00; 0,10 and 1,00 mg.L<sup>-1</sup>) and four of BAP (0,00;0,50;1,00 and 3,00 mg.L<sup>-1</sup>) and by combinations between them, the number of buds, shoots, and the size of the formed callus were evaluated in the extreme apical and basal of the referred explants. The organogenic process occurred by direct

organogenesis (extreme apical) as well as indirect (extreme basal). In the direct organogenesis a higher formation of buds was obtained when BAP was added to the mean in the concentration of  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ , under incubation in the dark-light; and their posterior shootting occurred in a more effective form, with  $1,60 \text{ mg.L}^{-1}$  of BAP, under light incubation. For the indirect organogenesis, the incubation of the explants in the dark was the most effective in all stages, however, the required necessities varied, in relation to the nature of the growth regulator and their concentrations. For the callogenic process, specific combinations were necessary between ANA and BAP, to each of the explants, while that the formation of buds and soots, an addition of  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  of BAP to the mean of cultivation promoted in a general way the best results. Aiming the evaluation of the influence of AIB, ANA and 2,4D in the process of adventitious rooting *in vitro*, the apex of axenic plantules (previously described protocol) were used. In that stage the MS mean was supplemented with four concentrations of AIB and of ANA (0,00; 0,50; 1,00 and  $1,50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), and the combination of AIB and ANA in the concentration of  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ , for both growth regulator, and two different concentrations of 2,4D ( $0,20$  and  $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$ ) were also added. After fifty days of incubation, the number of rooted apexes, roots per plantules, root length, apexes with formation of callus and the plantule's vigour were evaluated. The combination of AIB and ANA to  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  for both, and ANA in the concentration of  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ , were the treatments that presented the best results.

# **1.INTRODUÇÃO**

As plantas cítricas compreendidas por laranjeiras, tangerineiras, limoeiros, limeiras, pomeleiros e toranjeiras têm um papel sócio-econômico mundial de elevada importância, uma vez que sua produção, supera a produção de outras fruteiras, já ultrapassando segundo dados recentes 100 milhões de toneladas (FAO, 2001). O Brasil apresenta-se como o maior produtor mundial de laranjas, com um total de 23 milhões de toneladas (FAO, 2001), sendo a maior parte desta produção destinada ao mercado externo, na forma de suco concentrado.

Devido às características edafo-climáticas brasileiras, os citros encontram-se disseminados por quase todo território nacional, com destaque para o estado de São Paulo que responde sozinho por, aproximadamente, 70 a 80% (GCONCI, 2001) da produção nacional, sendo esta alicerçada sobre uma forte estrutura de comercialização a nível nacional e internacional.

A propagação dos *Citrus* pode se dar: através da cultura de células e tecido, e através da propagação vegetativa clássica, com os métodos de estaquia, mergulhia e enxertia, sendo este último o que apresenta maior interesse comercial.

Dentre os hipobiotos atualmente mais utilizados, destaca-se a tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan), por apresentar características agrônomicas superiores para a Tristeza, o Declínio e a Exocortis e por apresentar compatibilidade com laranjeiras, pomeleiros e toranjeiras, podendo desta forma ser utilizada como porta-enxerto para um grande número de variedades comerciais de grande interesse econômico. A tangerineira 'Cleópatra' apresenta frutos com grande número de sementes altamente poliembriônicas, o que redundará em populações com até 90% de plantas de origem nucelar, possibilitando a obtenção de viveiros com plantas homogêneas (Loussert, 1992).

O cultivo *in vitro* de células e tecidos constitui uma estratégia de extraordinária importância para solucionar problemas não apenas no âmbito da propagação, como também do melhoramento genético clássico e da biotecnologia das plantas, notadamente das lenhosas perenes, como são os citros.

De acordo com Murashige (1974), o esquema padrão para o processo de propagação *in vitro* encontra-se dividido nos seguintes estádios:

- estágio 0, corresponde ao tratamento dado à planta matriz, de onde os explantes são obtidos, sendo este um estágio poucas vezes citado;
- estágio I, seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;
- estágio II, multiplicação dos explantes mediante subcultivos sucessivos em meio adequado à multiplicação;
- estágio III, transferência das brotações ou ápices caulinares produzidos para meio de enraizamento e subsequente transplantio das plantas obtidas para recipientes contendo uma mistura adequada de substrato ou para solo, visando a aclimação.

Com relação ao processo de desinfestação (estádio I), a maior dificuldade nesta etapa consiste em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado (Grattapaglia & Machado, 1998). O etanol e os compostos à base de cloro são as substâncias com ação germicida mais utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. A concentração das soluções desinfestantes, a combinação de princípios ativos e o tempo de exposição dos explantes às mesmas, varia de acordo com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado. Para a desinfestação de sementes de espécies cítricas, vários são os processos descritos (Sauton *et al.*, 1982; Pérez & Ochoa, 1997; Dias, 1998), entretanto, ocorre uma dificuldade de repetibilidade das metodologias, principalmente devido à grande variabilidade genética apresentada por estas espécies.

Na fase de multiplicação dos explantes (estádio II), o objetivo principal consiste em se obter uma taxa média de multiplicação satisfatória com o mínimo de variação entre explantes, visando desta forma, a obtenção de tecidos regenerados homogêneos e vigorosos, uma vez que esta etapa determina o sucesso da próxima fase do processo de propagação *in vitro*, o enraizamento. As variáveis que podem ser manipuladas nesta fase incluem a composição do meio de cultura utilizado, as condições ambientais de crescimento e os cuidados na manipulação do material durante as subculturas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Os meios de cultivo no processo de propagação *in vitro* em citros têm sido preparados na maioria dos trabalhos com os componentes inorgânicos de Murashige & Skoog (1962), utilizando como fonte de carbono a sacarose em concentrações que variam de 3 a 5% (p/v), e com importantes modificações quanto ao tipo e concentrações de vitaminas (Dias, 1998). Com relação aos hormônios adicionados ao meio, a importância de uma relação determinada entre auxinas/citoquininas tem sido descrita em citros tanto para o estabelecimento de calos (Chatuverdi & Mitra, 1974; Durán-Vila *et al.*, 1989), como para a organogênese (Grinblat, 1972; Edriss & Burger, 1984; Burger & Hackett, 1986; Durán-Vila *et al.*, 1989; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Dias, 1998).

Quanto ao estágio III, a fase de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas brotações ou ápices caulinares provenientes da multiplicação. Para as plantas cítricas, a maioria dos trabalhos de indução de enraizamento adiciona ao meio de cultivo o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB), em distintas concentrações (Gill *et al.*, 1994; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997).

Desta forma, a pontualização de um eficiente protocolo de morfogênese de células, tecidos e órgãos, depende do controle de diferentes fatores. E o estabelecimento deste protocolo para espécies de interesse como porta-enxertos cítricos, apresenta-se como requisito básico para que avanços sejam obtidos nos estudos destes.

## **2.REVISÃO DE LITERATURA**

## **2.1. Morfogênese *in vitro* de plantas cítricas**

As plantas cítricas podem ser obtidas *in vitro* através da embriogênese somática ou da organogênese

### **2.1.1. Embriogênese somática**

A embriogênese somática consiste na formação de embriões a partir de células que não são produtos da fusão de gametas (Tisserat *et al.*, 1979; Litz & Jarret, 1991), e apresenta-se como um processo de grande interesse na cultura de tecidos para muitas espécies e/ou variedades, pois permite a propagação de plantas elite em larga escala, além de ser uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião.

Na embriogênese somática *in vitro*, células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas, adquirem novas competências morfogênicas (Guerra *et al.*, 1999). Esta via de propagação vegetativa pode ocorrer, indiretamente, onde embriões somáticos se formam a partir de calos ou cultivos em suspensão, ou, diretamente, a partir de células dos tecidos-matrizes sem formação de estádios intermediários de calo. Entretanto, a indução embriogênica de uma célula somática pode ser afetada por diversos fatores, como: explante, composição do meio de cultivo, concentração osmótica, luz, temperatura, pH, entre outros.

A capacidade embriogênica apresentada pelas plantas cítricas possibilita a morfogênese de plantas inteiras e normais, partindo-se das mais variadas fontes de explante. Este tema foi revisado por Dias (1998), que menciona estudos referentes ao processo embriogênico para um grande número de espécies e variedades cítricas.

### **2.1.2. Organogênese**

Assim como a embriogênese somática, a organogênese constitui um processo morfológico através do qual se pode formar uma planta *in vitro*, sendo que, neste processo, ocorre a produção de brotações e raízes, sem formação prévia de embrião. A organogênese pode ser direta, sem o estágio intermediário de formação de calo, ou indireta (Dias, 1998). Uma desvantagem da organogênese indireta consiste na instabilidade genética apresentada pelo tecido caloso, o que pode resultar em plantas geneticamente diferentes.

Chlyah (1974), ao trabalhar com *Torenia* sp, constatou, na epiderme dos explantes, regiões de rápida divisão celular, as quais tiveram início a partir de algumas células que eventualmente estimularam a divisão de células circundantes. Segundo Thorpe (1983), a função

primária da mitose na organogênese consiste na formação de um número crítico de células em divisões ativas, as quais são capazes de responder a sinais de desenvolvimento. Essas regiões de células em divisão ou meristemóides apresentam células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, vacúolos pequenos e núcleo proeminente, sendo semelhantes a meristemas verdadeiros, e com conexões vasculares com o calo ou com o tecido adjacente. Após divisões contínuas dos meristemóides, ocorre a formação de pequenas protuberâncias, conferindo ao tecido uma aparência nodular. O processo de desenvolvimento dos órgãos ocorre de maneira similar ao observado em plantas intactas.

Com respeito aos citros, as plantas originadas de material nucelar expõem as características do período juvenil das plantas zigóticas, tanto *in vivo*, como *in vitro*, requerendo um longo período antes da floração e frutificação, além dos riscos de instabilidade genética. Estes obstáculos podem ser superados ou reduzidos ao empregar-se a via da organogênese, mediante sistemas que favoreçam tanto a multiplicação de brotos vegetativos a partir de gemas axilares, como a iniciação de gemas e brotos adventícios procedentes de explantes com uma morfogênese mínima de calo (Barlass & Skene, 1982, 1986; Edriss & Burger, 1984; Dias, 1998, 2000).

O Quadro 1 fornece informações de alguns dos principais trabalhos de organogênese em citros nos últimos anos. Os dados dos trabalhos apresentados neste Quadro nos revelam que o êxito do processo de organogênese está em função: do genótipo; da idade fisiológica, do estadio de desenvolvimento e do vigor do material de partida; do órgão de procedência do explante; da posição do órgão do qual se extrai o explante; da posição de cultivo; do meio de cultivo; da composição hormonal e das condições de incubação.

#### **2.1.2.1. Fatores que afetam o processo de organogênese.**

##### **Genótipo**

Em geral, todos os trabalhos que ensaiam diferentes genótipos (Quadro 1) mostram que a resposta organogênica depende deste fator, o que pode ser visualizado, ao se comparar distintos trabalhos (Kitto & Young, 1981; Barlass & Skene, 1982; Moore, 1986), onde se observa que enquanto para Laranja azeda (*Citrus aurantium*) a formação de brotos é difícil, para Citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) a resposta foi obtida com maior facilidade (Kitto & Young, 1981; Barlass & Skene, 1982). Além disso, tanto o alongamento de brotos (Moore, 1986; Durán-Vila *et al.*, 1989), como a capacidade de enraizamento destes (Durán-Vila *et al.*, 1989) dependem da espécie. Segundo Moore (1986), o êxito na obtenção e manutenção de linhas celulares, durante longo período de tempo, parece igualmente estar em função do genótipo.

### **Idade fisiológica**

Existem muitos trabalhos que utilizam unicamente explantes maduros de diferentes genótipos: *Citrus sinensis*, *Citrus limonia*, *Citrus reshni*, *Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis* (Barlass & Skene, 1982), *Citrus mitis* (Sim *et al.*, 1989) e *Citrus reticulata* e *Citrus limon* (Singh *et al.*, 1994). Entretanto, nos trabalhos que analisaram, ao mesmo tempo, explantes procedentes de plântulas *in vitro* e de plantas maduras (Bouزيد, 1975, Barlass & Skene, 1982, Sim *et al.*, 1989) ou bem de plântulas e de plantas juvenis cultivadas em casa de vegetação (Bowman, 1994), é possível observar que, assim como ocorre em outras espécies lenhosas, a capacidade organogênica de explantes juvenis é maior que a de explantes maduros ou com maior idade. Talvez esta seja a razão pela qual as plantas juvenis têm sido usadas como fonte de explante, na maior parte dos estudos realizados (Quadro 1). Além disso, ao se utilizar explantes procedentes de plântulas para determinar os requerimentos culturais de uma espécie, na produção de calos embriogênicos, estes resultados podem ser extrapolados para plantas adultas (Gill *et al.*, 1994).

Bowman (1994) relata que o uso de material juvenil, como fonte de explante, pode não ser prático e ter valor duvidoso para a propagação clonal de algumas espécies, devido ao elevado percentual de plântulas zigóticas. Entretanto, este mesmo autor, ao trabalhar com explantes de plântulas *in vitro* e de plantas juvenis, em casa de vegetação, constata que a primeira fonte de material é mais econômica e permite avaliar a efetividade de diferentes fatores implicados no processo de propagação.

### **Estadio de desenvolvimento e vigor do material de partida**

Segundo El-Morsy & Millet (1996) a capacidade morfogênica de certos explantes, obtidos a partir de diferentes posições em um ramo, é afetada pelo estágio de desenvolvimento deste ramo. Estes autores, ao considerar três estágios de desenvolvimento de ramos para extração de explantes de *Citrus aurantium*, ramos imediatamente antes de terminar o período de crescimento (estádio I), ramos em repouso (estádio II) e ramos imediatamente depois de recomeçar a nova fase de crescimento (estádio III), verificaram que o estágio de desenvolvimento do material de partida afeta a capacidade de morfogênese de brotos adventícios. Também Chaturvedi & Mitra (1974) verificaram que brotos com maior e menor vigor apresentavam diferenças quanto às exigências hormonais.

## Órgão de procedência do explante

Pode-se constatar, a partir dos trabalhos resumidos no Quadro 1, a variabilidade de tipos de explantes utilizados: segmentos nodais; segmentos internodais, ápices caulinares, segmentos de raízes, ápices de raízes, raízes inteiras, secções de folhas e de cotilédones, segmentos de nó cotiledonar, embriões nucelares e calos de distintas origens.

### 1) Explantes nodais e internodais

Os segmentos nodais e internodais têm sido as principais fontes de explantes para a obtenção *in vitro* de brotos múltiplos. Os segmentos nodais com suas gemas axilares pré-existent resultam em um explante adequado para obtenção de plantas. Barlass & Skene (1982) revelam que podem ocorrer variações nos meristemas, o que constitui um problema para o processo de propagação. Por outro lado, os segmentos internodais, podem formar meristemas “de novo”, mediante organogênese indireta a partir de cultivo de calo em resposta ao cultivo *in vitro* e constituem um sistema potencialmente útil para promover a variação somaclonal.

### 2) Explantes de ápices caulinares

Os explantes de ápices caulinares são muito utilizados para propagação, sendo Rangaswamy (1975) provavelmente o primeiro a empregar este tipo de explante, porém, obtinha um único ramo.

Poucos são os trabalhos com êxito em formar brotos múltiplos a partir destes explantes. Dentre estes, destacam-se os trabalhos de Kitto & Young (1981) e Barlass & Skene (1982) com Citrange Carrizo, Sim *et al.* (1989) com *Citrus mitis* e Singh *et al.* (1994) com *Citrus reticulata* cv. Khasi e *Citrus limon* cv Assam. Entretanto, é necessário destacar que este tipo de explante não forma brotos em *Citrus sinensis* cv Symon, *Citrus limonia* cv Rangpur, *Citrus reshni* e *Poncirus trifolilata* (Barlass & Skene, 1982).

### 3) Explantes de secções de folhas, de cotilédones e de hipocótilo

O emprego de explantes de secções de folhas e de cotilédones, em geral, tem sido utilizado para a obtenção de plantas via embriogênese somática (Sim *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1994; Goh *et al.*, 1995, Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997), sendo os níveis de respostas bastante variáveis, e, em geral, inferior à dos explantes de epicótilo (Gill *et al.*, 1994).

As respostas organogênicas de explantes de hipocótilo têm sido também variáveis, e, em alguns casos, proporcionam bons rendimentos (Matsumoto & Yamagushi, 1983; Harada &

Murai, 1996), enquanto em outros, os resultados têm sido insatisfatórios (Maggon & Singh, 1995).

#### 4) Explantes de raízes

Em termos comparativos, este tipo de explante tem sido pouco usado para a formação de brotos. A resposta organogênica tem variado de modo importante com a espécie, com o segmento considerado e com o meio de cultivo utilizado. Por exemplo, segmentos de raízes de Citrange Troyer (Edriss & Burger, 1984), *C. sinensis* cv. Pineapple (Durán-Vila *et al.*, 1989) e *C. aurantifolia* cv. Mexicana (Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997) mostraram uma marcada incapacidade para formar brotos. Entretanto, este mesmo tipo de explante, quando proveniente de *C. sinensis* cv Valência (Burger & Hackett, 1986); de *C. mitis* (Sim *et al.*, 1989), de *C. medica* cv. Etrog e *C. aurantifolia* cv Mexicana (Durán-Vila *et al.*, 1989) e de *C. aurantifolia* cv Kagzi (Bhat *et al.*, 1992) apresentou uma boa resposta. Por outro lado, ao serem utilizados segmentos de ápices radiculares (Edriss & Burger, 1984; Durán-Vila *et al.*, 1989) foram obtidas melhores respostas.

Bhat *et al.* (1992) assinalam que a frequência de formação de brotos e de plantas utilizando explante de raízes é baixa ou improvável, razão pela qual a utilização desta fonte de explante não parece ser uma estratégia adequada para obter altas taxas de propagação ou para conservação de germoplasma.

#### **Posição do órgão do qual se obtém o explante**

Em 1975, Bouzid descreveu que segmentos nodais extraídos da posição intermediária de ramos de plantas adultas regeneravam mais gemas, que quando estes explantes procediam da parte basal ou apical dos ramos. Burger & Hackett (1986), ao revisar o tema, verificaram que a posição do órgão na planta, do qual se obtém o explante é muito importante no processo organogênico. Este fator influencia não somente o número de estruturas regeneradas, mas também a velocidade de morfogênese (El-Morsy & Millet, 1996). Burger & Hackett (1986) verificaram que em *Citrus sinensis* cv. Valência existe um gradiente de morfogênese que diminui conforme aumenta a distância do nó cotiledonar, tanto em direção ao ápice do epicótilo, como em direção ao ápice radicular. Também Hiramatsu *et al.* (1987), constataram que segmentos de epicótilo próximos ao nó cotiledonar mostravam um potencial superior para morfogênese de estruturas adventícias. Um gradiente de morfogênese foi também verificado por Sim *et al.* (1989), ao estudarem a capacidade organogênica dos segmentos de epicótilo de *Citrus mitis*, constatando que dos três segmentos ensaiados, o basal foi o que precisou de mais tempo para regenerar, enquanto o apical foi o mais rápido. Goh *et al.* (1995), em estudos similares com

*Citrus grandis* verificaram que este gradiente não se estabelecia claramente no eixo do epicótilo, ainda que o segmento basal, comparado com o intermediário e o apical, apresentasse maior sensibilidade ao efeito inibidor de concentrações mais elevadas de BA.

Sim *et al.* (1989), observaram que secções basais de folhas apresentavam respostas organogênicas mais rápidas do que secções apicais das mesmas folhas, sendo o tempo de, respectivamente, 10 e 12 semanas, o necessário para a obtenção dos brotos.

### **Colocação dos explantes no meio de cultivo**

Os dados do Quadro 1 assinalam que a quase totalidade dos explantes procedentes de hastes e raízes é colocada, verticalmente, no meio de cultivo, e que apenas Grinblat (1972); Durán-Vila *et al.* (1989, 1992); Bowman (1994); Maggon & Singh (1995); Pérez-Molphe-Balch & Uchoa-Alejo (1997) e Dias (1998) colocaram os explantes horizontalmente na superfície do meio de cultivo. Com respeito ao processo organogênico, o trabalho de Pérez-Molphe-Balch & Uchoa-Alejo (1997) compara a influência das colocações horizontal e vertical em dito processo, isolando outras condições. Estes autores verificaram que o emprego de segmentos de epicótilo inteiros e partidos, ambos com cortes longitudinais ou com feridas, aumentaram significativamente a morfogênese de gemas. Os explantes colocados horizontalmente no meio de cultivo produziram gemas em ambos extremos e nos pontos de feridas, aumentando, acentuadamente, o número de gemas formadas, para ambos genótipos *Citrus aurantifolia* cv. Mexicana e *Citrus reticulata* Blanco cv. Monica, com medias respectivas de  $7,8 \pm 0,8$  e  $5,1 \pm 0,4$  gemas por explante. Para estes autores, a melhor resposta foi obtida com os segmentos internodais partidos longitudinalmente e colocados com a face cortada em contato com o meio.

Entretanto, ainda que o cultivo horizontal proporcione o maior número de gemas por explante, a maior produção de brotos ocorreu em explantes com feridas no extremo apical e cultivados verticalmente com o extremo basal em contato com o meio de cultivo.

### **Meio de cultivo**

Os meios de cultivo usados para propagação *in vitro* dos citros têm sido preparados, na maioria dos trabalhos (Quadro 1), com os componentes inorgânicos de Murashige & Skoog (1962), seguidos, pelo emprego do meio de MS modificado por Murashige & Tucker, ou pelo meio de Chaturvedi & Mitra. Um número pequeno de trabalhos também empregou outras formulações, como as de White (1943) e Tuckey (1938), sendo importante ressaltar, que Button & Kochba (1977), ao revisar os trabalhos dirigidos a induzir embriogênese somática, verificaram que, em geral, para esta via de morfogênese, os explantes são cultivados no meio de Murashige & Tucker (1969).

Com respeito à fonte de carbono, apenas dois trabalhos usam a galactose (Cabasson *et al.* 1995; e Dias, 1998). Nos demais casos, tem sido utilizada a sacarose, em concentrações que variam de 3,0 a 6,0%, predominando as concentrações de 3 e 5%, que em alguns trabalhos têm favorecido a morfogênese (Grinblat, 1972; Chaturvedi & Mitra, 1974; Kitto & Young, 1981 e Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997).

É interessante verificar que, independentemente dos componentes inorgânicos utilizados, os meios apresentam importantes modificações quanto ao tipo e à concentração de vitaminas. Com respeito à concentração, têm sido observado, nos distintos trabalhos, variações de até 100 vezes para uma mesma vitamina (Quadro 1). O efeito benéfico de elevadas concentrações de vitaminas foi assinalado em *Citrus limon* por Murashige & Tucker (1969), em *Citrus sinensis* e *Citrus junos* por Kobayashi *et al.* (1984), em tangerina 'Kinnow' (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) por Gill *et al.* (1994) e em *Citrus aurantifolia* cv. Mexicana e *Citrus reticulata* cv. Monica por Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997). A inclusão de elevadas concentrações de vitaminas (10 vezes superiores as concentrações de MS) ao meio tem estimulado a indução de calo e a embriogênese somática (Gill *et al.*, 1994).

O extrato de malte, como substância complexa, tem sido usado em muitos trabalhos na concentração de 500mg.L<sup>-1</sup> para favorecer o processo de organogênese (Quadro 1). A influência deste aditivo no processo depende da espécie. Há autores que mencionam que sua adição é necessária (Tapati *et al.*, 1995), outros assinalam simplesmente que é benéfico (Chaturvedi & Mitra, 1974; Gill *et al.*, 1994) e outros indicam que não afeta o processo (Grinblat, 1972; Barlass & Skene, 1982).

Outros aditivos orgânicos utilizados no meio de cultivo são a adenina, em concentrações entre 40 e 80 mg.L<sup>-1</sup> (Kitto & Young, 1981; Starrantino & Caruso, 1987) e a caseína hidrolisada a 250 mg.L<sup>-1</sup> (Bowman, 1994). Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, (1997), empregaram o carvão ativado, porém não mencionam os efeitos deste composto.

A partir do Quadro 1, observa-se que para o processo de organogênese é fundamental a adição de citoquinina, sendo a benzilaminopurina (BAP) a citoquinina mais empregada e as concentrações variam entre 0,2 a 10,0 mg.L<sup>-1</sup>. Bouzid (1975) foi o primeiro a estudar o uso de outras citoquininas diferentes da benzilaminopurina. A adição de cinetina aos meios de cultivo tem resultado ineficaz para incrementar a morfogênese (Kitto & Young, 1981). Quanto às auxinas, sua adição em baixas concentrações (as melhores têm estado entre 0,1 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) aos meios de formação de brotos tem sido benéfica em alguns casos (Chaturvedi & Mitra, 1974; Burger & Hackett, 1986). Entretanto, dados quantitativos sobre sua influência ainda não foram reportados.

A importância da relação entre a concentração de auxina e citoquinina foi verificada desde o início dos trabalhos de morfogênese em cultivo *in vitro* (citação clássica de trabalhos). Em citros, a importância de uma relação determinada entre auxinas/citoquininas tem sido

descrita tanto para o estabelecimento de calos (Chatuverdi & Mitra, 1974; Durán-Vila *et al.*, 1989), como para a organogênese (Grinblat, 1972; Edriss & Burger, 1984; Burger & Hackett, 1986; Durán-Vila *et al.*, 1989). Para o processo de organogênese, verifica-se (Quadro 1) que a relação concentração de auxinas/concentração de citoquininas tem variado entre 1/1 até 1/100, com um predomínio das relações 1/2 até 1/10 favoráveis às citoquininas, ou seja, concentrações mais altas de citoquininas e mais baixas de auxinas têm favorecido ao processo organogênico.

Edriss & Burger (1984) verificaram que uma relação com baixas concentrações dos dois hormônios permite a morfogênese de um maior número de gemas e brotos sem a morfogênese de calo, enquanto Burger & Hackett (1986) verificaram que a combinação de baixa concentração ( $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de ANA com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BA no meio MT contribuiu para o estabelecimento do gradiente de formação em segmentos de epicótilo de citrange 'Troyer', tomados a distintas distâncias do nó cotiledonar, sendo que este gradiente não se estabeleceu, quando a relação foi de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA pela citada concentração de BAP.

Nos trabalhos citados no Quadro 1, é importante ressaltar o uso do ácido abscísico (ABA) no processo organogênico. Maggon & Singh (1995) assinalaram que o ABA nas concentrações de 0,1 ou  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  combinadas com uma concentração de BAP a  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  aumentaram a frequência de explantes que regeneram e a distribuição e desenvolvimento de broto, sem a formação de calo.

Referente ao papel das giberelinas ( $\text{GA}_3$ ) no processo organogênico, apenas Maggon & Singh (1995) e El-Morsy & Millet (1996) mencionam sua importância na brotação. Maggon & Singh observaram que a utilização de baixas concentrações ( $0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de giberelinas bloqueou o efeito inibidor promovido por elevadas concentrações do ácido abscísico no desenvolvimento de brotos de *Citrus sinensis* cv. Mousambi.

Outro aspecto importante é o do Tidiazuron (TDZ), que é um desfolhante químico com funções de citoquininas, usado por Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997), para o processo morfogênico em *Citrus aurantifolia* cv. Mexicana e *Citrus reticulata* cv. Monica. Esta substância inibiu a morfogênese de estruturas no extremo apical e a promoveu no extremo basal de segmentos de epicótilo. Onde não apenas os brotos regenerados eram deformados, como também não ocorreu o enraizamento dos mesmos.

### **Condições de incubação**

As condições de incubação têm uma grande influência nos processos de cultivo de calo e organogênese. Durán-Vila *et al.* (1992) revisaram o tema. A partir da revisão efetuada no presente trabalho (Quadro 1) observa-se que na maioria dos trabalhos foram ensaiadas condições definidas de temperatura, de irradiância e de fotoperíodo. Apenas no trabalho de Durán-Vila *et al.* (1992), a temperatura foi estudada. As condições lumínicas foram estudadas

em cinco dos trabalhos levantados (Kitto & Young, 1981; Otoni, 1988; Durán-Vila *et al.*, 1992; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Dias, 1998).

Durán-Vila *et al.* (1992) verificaram que a temperatura tem grande importância na variação da resposta dos explantes cultivados *in vitro* e, ainda que uma determinada temperatura possa ter uma aplicação de uso geral, a resposta pode ser otimizada com uma temperatura específica, para o tipo de explante ensaiado e a finalidade do cultivo.

Assim como a temperatura, também a irradiância influi sobre o cultivo *in vitro* de células e tecidos de citros. Os níveis de resposta, novamente, estão em função dos objetivos do trabalho e do tipo de explante. Durán-Vila *et al.* (1992) verificaram um aumento da indução de gemas e brotos em segmentos internodais no escuro, enquanto Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997) obtiveram uma menor morfogênese ao incubar os explantes procedentes de plântulas no escuro. Estes últimos autores ao ensaiarem a incubação em escuro/luz, isto é, a incubação constituída de duas etapas: a primeira metade do período de cultivo ocorrendo em condições de escuro absoluto; e a segunda, em condições de 16h de luz/8h de escuro, e ao compararem esta condição (escuro/luz) com a condição exclusiva de 16/8h luz/escuro, verificaram que a primeira melhorou a resposta organogênica. Estes autores citam, ainda o trabalho de Leblay *et al.* (1991) que verificaram uma resposta organogênica marcadamente superior, quando os segmentos de epicótilo de *Citrus aurantifolia* y *Citrus reticulata* foram previamente incubados no escuro.

Com relação ao fotoperíodo, o regime de 16 horas de luz por 8 horas de escuro foi utilizado na maioria dos trabalhos (Quadro 1), sendo Dias (1998), o único a estudar a influência do fotoperíodo no processo organogênico. Este autor obteve sob condição de dias longos (16/8 horas) uma maior morfogênese dos segmentos de epicótilo de plântulas de Citrange Troyer, do que sob condição de dias curtos (8/16 horas).

### **2.1.3. Viabilidade das brotações formadas.**

Para que os protocolos de organogênese de brotos em cultivo *in vitro* possam ser aplicados na propagação *in vitro* ou utilizados em conjunto com técnicas de biotecnologia para o melhoramento de citros é necessário que sejam capazes de enraizar estes brotos e que estes, em processo de aclimatação sobrevivam em elevada porcentagem de plantas no campo.

Para a indução do enraizamento, tem sido utilizada majoritariamente a adição ao meio de enraizamento do ácido naftaleno acético (ANA) e do ácido indol butírico (AIB), o qual tem sido adicionado sozinho ou em combinação com ANA (Quadro 2). É necessário destacar em alguns trabalhos de enraizamento, a presença de citoquininas como um fator que melhora os resultados (Bouzid, 1975, Raj Bhansali & Arya, 1979).

## 2.2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

Identificar um sistema de desinfestação de sementes de tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort ex. Tan), visando a obtenção de elevada taxa de germinação e a obtenção de plântulas axênicas, vigorosas, com arquitetura normal e suficientemente longas, para a extração de cinco segmentos de epicótilo;

Estudar a influência da 6-Benzilaminapurina (BAP) e do ácido naftaleno-acético (ANA) na formação de gemas e brotos em explantes de epicótilo no meio de cultivo;

Estudar a influência da luz durante o processo de organogênese e comparar os efeitos da incubação no escuro, em luz (fotoperíodo de 16/8h, luz/escuro) e em um regime de escuro/luz (25 dias no escuro, seguidos de 25 dias em fotoperíodo de 16/8 horas, luz/escuro);

Estudar a influência do ácido naftaleno-acético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4 D) no processo de enraizamento de ápices de plântulas germinadas *in vitro*.

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIETADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus madurensis</i> (calamodim)	Segmentos de epicótilo (partidos longitudinalmente)	MS (5%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác. nicot.: 0,5 Glicina: 2,0	Myo-inosit:100  Ext. malte. 500	BAP (10,00)+ ANA  (0,10)	Gemas- ápices (OI)	T: 27°C/21°C F: 16:8 I: 74 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Grinblat (1972)
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck  <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Calos subcultivados procedentes de folhas e segmentos de haste  Ápices proc. de cultivo <i>in vitro</i>	MS modificado (C/M) (5%)  Idem	T-HCl: 5,0 Piridox: 1,25 Ác. nicot.: 1,25 Ác. fólico: 0,1 Riboflav.: 0,1 Biotina: 0,10 Ác. ascórb.: 0,1 Idem	Myo inosit. 100  Idem	BAP (0,25) +ANA (0,10)  BAP (0,25)+ ANA (0,10)	Gemas- ápices (OI)  Gemas e ápices (OD)	T: 26°C F: 14:10 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Chaturvedi & Mitra. (1974)
<i>C. aurantium</i> (cv Sour) <i>Citrus lemon</i> (limão) <i>C. reticulata</i> (tangerina) <i>C. sinensis</i> (laranja doce)	Segmentos nodais (de plântulas e plantas adultas)  Segmentos internodais (de plântulas e plantas adultas)	MS (3%)  MS modif (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác. nicot.: 0,5  Idem	Myo-inosit:100  Idem	Cinetina (1,0) +ANA (1,0)  BAP (0,5) + AIB (1,0)	Gemas e brotos Axilares  Gem. e brot.(OI, OD)	T: 28±1°C  F: 16:8 I: 112µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Bouzid (1975)
<i>Citrus madurensis</i> (Calamodim)	Segmentos de haste de plântulas Ápices de plântulas	White (1943) (2%)  Tukey (1938) (0,5% glicose)  White (1943) (2%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,1 Ác. nicot.: 0,5 Glicina: 3,0  Idem  Idem	Ext. malte 50,0 o BAPbitone: 5,00  Idem  Água de coco (40% v/v)	-  -  Adenina (40,0) o	Gemas  Gemas  Alongamento de ápices	Não mencionado	Rangaswamy (1975)
<i>Citrus aurantium</i> <i>C. reshni</i> Hort.ex Tan. Citrange Troyer	Ápices de plântulas com 3 meses de idade	Knops + MS (3-4%)	T-HCl: 0,4 Piridox: 0,5 Ác. nicot.: 0,5	Myo-inosit:100 Adenina: 80	BAP (0,2; 1,0; 5,0; 6 Cinetina (0,2; 1,0; 5,0; 6 2iP (0,2; 1,0; 5,0; 6	Gemas e brotos (OD)	T: 29°C F: 16:8 I: 41 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Kitto & Young (1981)

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIETADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTORES
<i>C. sinensis</i> x <i>P.trifoliata</i> ( <i>Citrange Carrizo</i> )	Segmentos nodais e internodais e ápices de plântulas e plantas adultas)	MS (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác. nicot.: 0,5	Myo-inosit:100	BAP (2,0)	Gemas e ápices (OI)	T: 27/20°C F: 16:8 I: 50 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Barlass & Skene (1982)
<i>Citrus sinensis</i> (cv.Symon)	Idem	MS (1,5%)	Idem	Idem	BAP (0,50 ou 2,00)	Gemas e ápices (OI)		
<i>Poncirus trifoliata</i>	Seg._nodais e internodais de plântulas	MS (3%)	Idem	Idem	Idem	Gemas e ápices (OI)		
<i>Citrus reshni</i> (tangerina Cleópatra)	Seg. nodais e internodais de plântulas e plantas adultas	MS (3%)	Idem	Idem	Idem	Gemas e ápices (OI)		
<i>Citrus limonia</i> (cv.Rangpur)	Idem	½MS (1,5%)	Idem	Idem	Idem	Gemas e ápices (OI)		
<i>Poncirus trifoliata</i>	Embriões nucelares	MS modificado (C/M) (5%)	T-HCl 5,0 Piridox: 1,25 Ác nicot: 1,25 Ác.fólico: 0,1 Riboflav.: 0,1 Biotina: 0, 10 Ác.ascórb.:0,1	Myo-inosit:100	BAP (5,00)+ ANA (1,00)	Gemas	T: 26±1°C F: 14:10 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Matsumoto & Yamaguchi (1983)
<i>C. sinensis</i> x <i>P.trifoliata</i> ( <i>Citrange Troyer</i> )	Seg. de raízes de plântulas Segmentos de epicótilo Calos procedentes de epicótilo	MS (5%)	Piridox: 1,0 T-HCl: 0,2 Ác.nicot: 1,0	Myo-inosit:100	BAP (10,0) + ANA (1,00) BAP (0,50) + ANA (0,10) BAP (0,25) + ANA (0,10)	Gemas e ápices (OD) Gemas e ápices (OD) Gemas e ápices (OI)	T: 27°C F: 16:8 I: 72 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Edriss & Burger (1984)
<i>Citrus sinensis</i> (cv. Valencia)	Segmentos de epicótilos Seg. do nó cotiledonar Seg. e ápices de raízes	MS modificado (M/T) (5%)	Piridox: 10,0 T-HCl: 10,0 Ác.nicot: 5,0	Myo-inosit:100	BAP (2,0)  ANA (0,02; 0,2; 2,0)	Gemas e ápices (OD)	T: 25 a 28°C F: 16:8 I: 45 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Burger & Hackett (1986)
<i>Citrus aurantium</i> (cv.Sour)	Segmentos de epicótilo	MS modificado (M/T) (5%)	Piridox: 10,0 T-HCl: 10,0 Ác.nicot: 5,0	Myo-inosit:100	BAP (5,00) ANA (1,00)	Gemas e ápices (OD e OI)	T: 27°C F: 16:8 I: 76 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Moore (1986)
<i>C. sinensis</i> x <i>P trifoliata</i> ( <i>Citrange Carrizo</i> )	(plântulas com 8 semanas de idade, crescidas em 1:1 perlita-vermiculita em câmara de cultivo 28°C e fotoperíodo de 16:8)							
<i>Citrus reshni</i> (mandarina Cleópatra)								

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e/ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIETADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Poncirus trifoliata</i>	Segmentos de epicótilo Segmentos de raízes.	MS (5%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100	BAP (5,0; 10,0) + ANA (0,10)	Gemas e ápices (OD)	T: 28°C F: ? I: 56 μE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Hiramatsu et al. (1987)
<i>C. sinensis</i> x <i>P trifoliata</i> (Citrange Troyer) <i>C. sinensis</i> x <i>P trifoliata</i> (Citrange Carrizo) <i>Poncirus trifoliata</i> (cv. Flying Dragon)	Ápices de brotes axilares  (citrange:4 anos casa vegetaçã) (Poncirus enxerto gema)	MS (5%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,4 Ác.nicot: 0,5 Glicina: 2,0	Myo-inosit:100 Adenina: 40,00	BAP (0,5; 1,0)+ AIB (0,25; 0,50)	Gemas e ápices (OD)	T: 27°C F: 16/8 I: 19 μE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Starrantino & Caruso (1987)
<i>Citrus sinensis</i> cv. Pêra	Segmentos nodais de plântulas	MS (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác.nicot: 0,5 Glicina: 2,0	Myo-inosit:100	BAP (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	T: 27°C F: escuro durante 30 dias, seguido de fotoperíodo de: 16:8 I: 39,83 μE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Otoni (1988)
	Segmentos nodais de plântulas	Idem	Idem	Idem	2iP (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem	
	Segmentos nodais de plântulas	Idem	Idem	Idem	Zea (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem	
	Segmentos nodais de plântulas	Idem	Idem	Idem	Cin (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem	
	Segmentos nodais de plântulas	Idem	Idem	Idem	BAP (0,75)	Gemas e ramos (OD e OI)	T: 27°C F: escuro durante 2, 4, 6 ou 8 semanas, seguido de fotoperíodo de: 16:8. I: 39,83 μE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES	
<i>Citrus sinensis</i> cv. Pêra	Segmentos nodais de plântulas cortados longitudinalmente ou não	MS (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác.nicot: 0,5 Glicina: 2,0	Myo-inosit:100	BAP (0,75)	Gemas e ramos (OD e OI)	T: 27°C F: escuro durante 30 dias, seguido de fotoperíodo de: 16:8 I: 39,83 μE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>		
	Segmentos nodais de plântulas com diferentes tamanhos (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 cm)	Idem	Idem	Idem	BAP (0,75)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem		
	Ramos com diferentes tamanhos (6; 12; 18; 24; 30 cm), com segmentos nodais em diferentes posições (superior; mediana superior; central; mediana inferior; inferior)	Idem	Idem	Idem	Idem	BAP (0,75)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem	
	Segmentos nodais de plântulas	Idem	Idem	Idem	Idem	BAP (0,75) + ANA (0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem	
	Segmentos nodais de plântula	Idem	Idem	Idem	Idem	BAP (0,75) + GA <sub>3</sub> ( 0; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	Idem	Otoni (1988)
	Segmentos nodais de plântulas	Idem	Idem	Idem	Idem	BAP (0,75) + GA <sub>3</sub> ( 1,0) + ANA (0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0)	Gemas e ramos (OD e OI)	T: 27°C F: 16:8 I: 39,83 μE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINA S (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNIC OS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus sinensis</i> cv. Pera	Segmentos nodais de plântulas	MS (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác.nicot: 0,5 Glicina: 2,0	Myo- inosit:100	BAP (0,75) +ANA (0,4)	Gemas e ramos (OD e OI)	T: 27°C F: luz contínua I: 33,49 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 37,21µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 53,95µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 57,67µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 89,30µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 93,02µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 137,67µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 141,40µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 182,33µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ; 186,05µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Otoni (1988)
<i>Citrus sinensis</i> (cv.Pineapple)	Segmentos nodais de plântulas	MS (3%)	T-HCl: 0,2 Piridox: 1,0 Ác.nicot: 1,0	Myo- inosit:100	BAP (1,00)	Brotos axilares	T: 26±1°C F: 16:8 I: 40 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Durán-Vila et al. (1989)
<i>Citrus aurantifolia</i> (cv.Lima Mexicana)	Seg. internodais de plântulas.	Idem	Idem	Idem	BAP (1,00- 3,00)	Gemas e brotos (OI)		
<i>Citrus medica</i> (cídra Etrog)	Ápices e segmentos de raízes de plântulas.	Idem	Idem	Idem	Meio líquido sem hormônio (uso de papel ponte)	Plantas		
<i>Citrus mitis</i> ( <i>Citrus madurensis</i> )	3 segmentos de epicótilo (BAPsal, mediano e apical) (cultivo horizontal)	MS (2%)	Piridox: 0,50 T-HCl: 0,10 Ác.nicot: 0,5 Idem	Myo- inosit:100	BAP (0,50) + ANA (0,10)	Gemas e brotos (OI)	T: 27±1°C F: 16/8 I: 20 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> o 50 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> (para org. em raízes)	Sim et al. (1989)
	Cotilédone	Idem	Idem	Idem	BAP (1,0; 10,0)	Gemas e brotos (OI)		
	Seg. nodais e internod. de haste	Idem	Idem	Idem	BAP (0,50- 2,00)	Gemas e brotos (OI)		
	Folhas (diferentes secções)	½MS (2%)	Idem	Idem	BAP (2,00)	Gemas e brotos (OI)		
	Raízes	Idem	Idem	Idem	BAP (0,50)	Gemas e brotos (OI)		

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIETADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>C. aurantifolia</i> (Lima Kagzi)	Segmentos apicais de raízes mantidas em cultivo <i>in vitro</i> em meio líquido durante 3 anos	MS (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100	BAP (0,0; 0,20; 0,50; 1,00; 5,00; 10,00)  AIA (0,0, 0,20, 0,30)	Ápices (OD)	T: 25°C F: 16:8 I: 35 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Bhat <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus sinensis</i> (cv. Pineapple)	Segmentos internodais (partidos longitudinalmente)	MS (3%)	T-HCl: 0,2 Piridox: 1,0 Ác.nicot: 1,0	Myo-inosit:100	BAP (3,00)	Gemas e brotos (OI)	T: 15°C, 18°C; 21°C; 24°C; 27°C; 30°C F: 16:8 ou escuro I: 48 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>  T: 26±1°C I: 30; 48 e 60 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> e escuro;	Durán-Vila <i>et al.</i> (1992)
	Segmentos nodais	Idem	Idem	Idem	BAP (1,00)	Brotos axilares		
<i>Citrus spp</i> (cv.: Smooth Flat Seville) <i>P trifoliata</i> (L)Raf x <i>C.spp</i> (cv.: Yuma) ( <i>Citrus spp</i> significa espécie desconhecida)	Segmentos nodais de plantas cultivadas em casa de veget  Segmentos nodais de plântulas	MS modificado (M/T) (5%)	Piridox: 10,0 T-HCl: 10,0 Ác.nicot: 5,0	Myo-inosit:100 Ext. malte: 500 Caseína hidrol. (250)	BAP (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0) + ANA (0,1) Cin (0,1; 1,0; 5,0)+ ANA (0,1) 2iP (0,1; 1,0; 5,0)+ ANA (0,1)	Brotos axilares	T.: 27°C F.: luz contínua I: (nao mencionada)	Bowman (1994)
<i>C. nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i> (cv Kinnow) (tangerina)	Calo embriogênico de: Segmentos de epicótilo Seg. do nó cotiledonar Seg. de raízes de plântulas	MS (5%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100	Sem reguladores	OD e OI	T: 25±2°C F: 16:8 I: (não mencionam)	Gill <i>et al.</i> (1994)
		Idem	Idem	Idem	BAP (0,0; 2,0; 5,0)			
		Idem	Idem	Idem	BAP (0,5)+Cinetina (1,0)			
		Idem	Idem	Ext. malte: 500	BAP (0,5)+Cinetina (1,0)			
		Idem	Idem	Myo-inosit:100	BAP (1,0)+ANA (0,25)			
		Idem	Idem	Idem	BAP (1,0)+ANA (0,25)+2-4D (0,5)			
Idem	Idem	Idem	Myo-inosit:100 Ext. malte: 500	BAP (3,0)+ANA (0,50)				

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus reticulata</i> (cv. Khasi)  <i>Citrus limon</i> (cv. Assam)	Ápices caulinares de plantas com 6 anos de idade	MS	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100	MB+ (BAP; KIN; ANA; AIB) Em diferentes concentrações. Não apresentam um desenho fatorial e não dão informação sobre vitaminas e açúcares: MS?		T: 25±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Singh <i>et al.</i> (1994)
<i>Citrus grandis</i> (cv. Thai) (pomelo)	3 seg. epicótil (BAPsal; med. veri) (cultivo horizontal) Seg. de raízes de plântulas Sec. de cotilédones (4x4 mm <sup>2</sup> ) Sec. de folhas (8x8 mm <sup>2</sup> ) Ápices caulinares de plântulas Seg. nodais de plântulas	MS (2%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100	ANA (5,00)  2-4D (0,50) +BAP (1,00)  BAP (0,50 a 5,00)	Calo  Cultivo de calo  Gemas e brotos (OI)	T: 27±1°C F: 16:8 I: 20 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Goh <i>et al.</i> (1995)
<i>Citrus sinensis</i> (cv: Mosambi)	Ápices de plântulas Segmentos nodais de plântula	MS modificado (C/M) (3%)	T-HCl 5,0 Piridox: 1,25 Ác.nicot: 1,25 Ác.fólico: 0,1 Riboflav.: 0,1 Biotina: 0,1 Ác.ascórb.:0,1	Myo inosit. 100 Ext. malte: 500	BAP (0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0) + ANA (0,0; 0,1; 0,2; 0,5)	Gemas e ápices (Organogênese direta)	T: 25±2°C F: 16:8 I: 30 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Tapati <i>et al.</i> (1995)
<i>Citrus deliciosa Ten</i>	Calo embriogênico procedente de óvulos	MT Sacarose (4,5%) Galactose (2,7%)	Piridox: 10,0 T-HCl: 10,0 Ác.nicot: 5,0	Myo-inosit:100 Ext. malta: 500		Embriões (OI)	T: 27°C F: 16:24 I: 27 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Cabasson <i>et al.</i> (1995)
<i>Citrus sinensis</i> cv. Mousambi	Segmentos de epicótilo Segmentos de hipocótilo  (cultivo horizontal)	MS (3%)  Idem  Idem	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5  Idem  Idem	Myo-inosit:100  Idem  Idem	BAP (0,5; 1; 2; 4; 8)  BAP (0; 2) + ABAP (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1)  BAP (0; 2)+ GA3 (0,04; 0,4)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±1°C F: 16:8 I: 100 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Maggon & Singh (1995)

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus aurantium</i>	Ápices de plântulas Brotos axilares procedentes de ditos ápices Segmentos nodais de ditos brotos axilares Brotos axilares dos segmentos nodais	MS (3%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100	Cinetina (0,5) + AIB (0,2) + GA <sub>3</sub> (0,5)	Brotos (OD)	T: 25±1°C F: 14:10 I: 30 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	El-Morsy & Millet (1996)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Segmentos de epicótilo	MS (3%)  Idem	Piridox: 0,50 T-HCl: 0,10 Ác.nicot: 1,00  Idem	Myo-inosit:100  Idem	BAP (10,00)  AIB (0,10: 1,00)	Gemas e brotos (OD)  Alongamento brotos	T: 26°C F: 16:8 I: 40 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Harada & Murai (1996)
<i>Citrus aurantifolia</i> (cv. <i>Lima Mexicana</i> )  <i>Citrus reticulata</i> Blanco (cv. <i>Monica</i> )	Secções de folhas de plântulas Seg. internodais de plântulas (Cultivo vertical)  Seg. de raízes de plântulas (Cultivo horizontal)  Seg. internodal de plântulas   Secções de folhas de plântulas Seg. internodais de plântulas (Cultivo vertical)  Seg. de raízes de plântulas (Cultivo horizontal)	MS (3%)  MS (3; 4; 5; 6%)  MS (5%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5  Idem  Idem	Myo-inosit:100 Ác. 2(Nmorfol. etanosulfônico. (500)  Idem  Idem	BAP(2,5; 5,0; 7,5)+ANA(1,0) Cinetina (10,0)+ ANA (1,0) TDZ (0,1;0,2)+ANA (1,0) BAP(2,5)TDZ(0,05)ANA(1)  BAP (7,5) + ANA (1,0)  BAP (7,5) + ANA (1,0)	Gemas e brotos (OI)  Gemas e brotos (OD)  Gemas e brotos (OI)	T: 25±2°C F: 16:8 I: 54 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>  Idem  T: 28°C e escuro por 21 dias, seguidos de 29 dias em condições de: T: 25±2°C F: 16:8 I: 54 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Pérez-Molphe- Balch & Ochoa- Alejo (1997)

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus aurantifolia</i> (cv. Lima Mexicana)  <i>Citrus reticulata</i> Blanco (cv. Monica)	Seg. internodais de plântulas  a) Seg. internodais (cult vertical com polaridade normal)  b) Seg. internodais (cultivo vert. com polaridade invertida)  c) Seg. internodais com vários cortes longitudinais (cultivo vert. com polaridade normal)  d) Seg. internodais (cultivo horizontal).  Seg. internodais partidos long. e cultivados com a face cortada em contacto com o meio meio  Seg. intern. com vários cortes long. e cultivado horizontalmente	MS (5%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100 Ác. 2(Nmorfol. etanosulfônico. (500)	BAP (7,5) + ANA (1,0)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 25±2°C F: 16:8 I: 54 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Pérez-Molphe- Balch & Ochoa- Alejo (1997)
<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. cv. Washington Navel x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical)  Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical e horizontal)	MS (3%)  Idem	T-HCl: 10 Piridox: 10 Ác.nicot: 5 Glicina: 2  Idem	Myo inosit. 100  Idem	ANA (0; 0,1; 1,0) + BAP (0; 0,5; 1,0; 5,0)  ANA (0; 0,1) +BAP (0; 1,0)	Gemas e brotos (OI e OD)  Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>  T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Dias (1998)

**QUADRO 1- Sumário de experiências em organogênese direta e /ou indireta realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. cv. Washington Navel x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical e horizontal)	MS (3%)	T-HCl: 10 Piridox: 10 Ác.nicot: 5 Glicina: 2	Myo inosit. 100	ANA (0,1) +BAP (1,0) + ABA (0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Dias (1998)
	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical e horizontal)	Idem	Idem	Idem	BAP (1,0) + ABA (0; 0,2; 1,0) + ANA (0; 0,1)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical)	Idem	Idem	Idem	ANA (0; 0,1) +BAP (1,0; 5,0)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±2°C F: 16:8 F:escuro F: 22 dias no escuro, seguidos de 23 dias em fotoperíodo de: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical)	Idem	Idem	Idem	ANA (0; 0,1) +BAP (0,5; 1,0; 5,0)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±2°C F: 16:8 ou F: 8:16 I: 37µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ou 74 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical com polaridade invertida)	Idem	Idem	Idem	ANA ( 0,1) +BAP (1,0)	Gemas e brotos (OI e OD)	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Segmentos de epicótilo de plântulas obtidas <i>in vitro</i> (cultivo vertical e horizontal)	MS Sacarose (3 e 6%) Galactose (1,8 e 3,6%)	Idem	Idem	Idem	ANA ( 0,1) +BAP (1,0)	Gemas e brotos (OI e OD)	

- OI - organogênese indireta ; OD- organogênese direta.

**QUADRO 2- Sumário de experiências em enraizamento realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>C. madurensis</i> (calamodim)	Segmentos de epicótilo (partidos longitudinalmente)	MS (5%)	Piridox: 0,50 T-HCl: 0,10 Ác. nicot.: 0,50	Myo-inosit:100  Ext. malte:500	ANA (0,0; 0,10 )		T: 27°C/21°C F: 16:8 I: 74 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Grinblat (1972)
<i>C. aurantium</i> : cv. Sour <i>Citrus lemon</i> : limão <i>C. reticulata</i> : mandarina <i>C. sinensis</i> : n laranja doce	Segmentos de haste (de plântulas e plantas adultas)	MS (3%)	Piridox: 0,50 T-HCl: 0,10 Ác. nicot.: 0,50	Myo-inosit:100	Cinetina (1,0)+ANA (1,0)		T: 28±1°C F: 16:8 I: 112µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Bouzid (1975)
<i>Citrus limetioides</i>	Segmentos de haste (de plântulas)	MS modificado (C/M) (2%)	T-HCl: 5,00 Piridox: 1,25 Ác nicot: 1,25 Ác.fólico: 0,10 Riboflav.: 0,10 Biotina: 0,10 Ác.ascórb.:0,10	Myo inosit:100	Cinetina (0,10) + ANA (1,02,50)		T: 27±2°C F: 16:8 I: 74 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Raj Bhansali & Arya (1979)
<i>Citrus aurantium</i> <i>C. resnyi</i> Hort.ex Tan. Citrange Troyer	Ápices procedentes de brotes axilares de plântulas	MS modificado (M/T) (3-4%)	T-HCl: 0,40 Piridox: 0,50 Ác.nicot: 0,50	Myo-inosit:100 Adenina: 80	AIA (0,0; 0,2; 1,0; 5,0) ou AIB (0,0; 0,2; 1,0; 5,0) ou ANA (0,0; 0,2; 1,0; 5,0)		T: 29°C F: 16:8 I: 41 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Kitto & Young (1981)
<i>C. sinensis</i> x <i>P trifoliata</i> ( <i>Citrange Troyer</i> )  <i>C. sinensis</i> x <i>P trifoliata</i> ( <i>Citrange Carrizo</i> )  <i>Poncirus trifoliata</i> (cv. Flying Dragon)	Seg. de ápices caulinares  Ápices de brotes axilares  (citrange:4 ano casa vegetação) ( <i>Poncirus enxerto gema</i> )	MS (5%)	Piridox: 0,50 T-HCl: 0,10 Ác.nicot: 1,00	Myo-inosit:100	ANA (1,0)		T: 27°C F: 16:8 I: 19 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Starrantino & Caruso (1987)
<i>Citrus sinensis</i> cv. <i>Pera</i>	Ramos axilares desenvolvidos <i>in vitro</i>	MS (3%)	Piridox: 0,5 T-HCl: 0,1 Ác.nicot: 0,5 Glicina: 2,0	Myo-inosit:100	ANA (1,0)		T: 27°C F: 16:8 I: 39,83 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Otoni (1988)

**QUADRO 2- Sumário de experiências em enraizamento realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTES E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus sinensis</i> (cv. Pineapple) <i>Citrus aurantifolia</i> (cv. Lima Mexicana) <i>Citrus medica</i> (cidra Etrog)	Ápices procedentes de segmentos nodais e internodais	MS (3%)  Idem	T-HCl: 0,20 Piridox: 1,00 Ác.nicot: 1,00  Idem	Myo-inosit:100  Idem	ANA (3,00)  Sem hormônios	Para indução  Para alongamento	T: 26±1°C F: 16:8 I: 40 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Durán-Vila <i>et al.</i> (1989)
<i>C. aurantifolia</i> (Lima Kagzi)	Segmentos apicais de raízes mantidas cultivo <i>in vitro</i> em meio líquido durante 3 anos. Segmentos nodais. adultos	MS (3%)	Piridox: 0,50 T-HCl: 0,10 Ác.nicot: 1,00	Myo-inosit:100	AIA (0,0, 0,20; 0,30)		T: 25°C F: 16:8 I: 35 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Bhat <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus sinensis</i> (cv. Pineapple)	Ápices de seg. internodais (partidos longitudinalmente) Brotos axilares	MS (3%)	T-HCl: 0,20 Piridox: 1,00 Ác.nicot: 1,00	Myo-inosit:100	ANA (10,00)	Para indução	T: 26±1°C F: 16:8 I: 48µmol. m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	Durán-Vila <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus grandis</i> (cv. Thai) (pomelo)	Ápices de seg. internodais Ápices de segmentos nodais raízes Ápices de folhas (procedentes de plântulas)	MS (2%)	T-HCl: 0,20 Piridox: 1,00 Ác.nicot: 1,00	Myo-inosit:100	AIB (0,50)		T: 27±1°C F: 16:8 I: 20 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Goh <i>et al.</i> (1994)
<i>Citrus spp</i> (cv.: Smooth Flat Seville) <i>P trifoliata</i> (L)Raf x <i>C.spp</i> (cv.: Yuma) (spp espécie desconhecida)	Ápices seg. nodais de plantas cultivadas em casa vegetação  Ápices seg. nodais de plântulas	MS modificado (M/T) (5%)	Piridox: 10,00 T-HCl: 10,00 Ác.nicot: 5,00	Myo-inosit:100 Ext. malte: 500 Caseína hidrol. (250)	ANA (0,0; 0,1; 0,2; 0,4)		T.: 27°C F.: luz contínua	Bowman (1994)
<i>Citrus reticulata</i> Blanco (cv. Kinnow) (Mandarina)	Embriões e brotos	½MS (5%)  Idem  MS (5%)  Idem	T-HCl: 0,10 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5  Idem  Idem  Idem	Myo-inosit:100  Idem  Idem  Idem	ANA (0,0; 2,0)  ANA (2,0) +AIB (1,0)  ANA (0,0; 2,0)  ANA (2,0)+AIB (1,0)		T: 25±2°C F: 16:8 I: (não mencionam)	Gill <i>et al.</i> (1994)
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. Cv: Femminello	Embriões e brotos	MS (5%)	T-HCl: 0,10 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100  Ext malte: 500	ANA (0,05)		T: 26±1°C F: 16:8 I: 100 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Carimi <i>et al.</i> (1994)

**QUADRO 2- Sumário de experiências em enraizamento realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIETADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTORES
<i>Citrus aurantium</i> L. cv: AA12; AA30 e AA31  <i>Citrus deliciosa</i> Tenore cv: Tardio de Ciaculi  <i>Citrus paradisi</i> Macf. cv: M Seedless  <i>Citrus sinensis</i> L. cv: Bonanza; Valencia; Brasiliano 92; Sanguinello	Embriões e brotos	MS (5%)	T-HCl: 0,1 Piridox: 0,5 Ác.nicot: 0,5	Myo-inosit:100 Ext.malte: 500	ANA (0,05)		T: 25±1°C F: 16:8 I: 100 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Carimi <i>et al.</i> (1995)
<i>Citrus sinensis</i> (cv: Mosambi)	Ápices de plântulas Segmentos nodais de plântula	½MS modific (½C/M) (3%)	T-HCl: 2,50 Piridox: 0,625 Ác.nicot: 0,625 Ác.fólico: 0,05 Riboflav.: 0,05 Biotina: 0,05 Ác.ascórb.:0,05	Myo inosit. 50	ANA (0,50; 1,00) ou AIB (0,50; 1,00) ou ANA (0,50) +AIB (0,50)		T: 25±2°C F: 16:8 I: 30 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Tapati <i>et al.</i> (1995)
<i>Citrus aurantium</i>	Ápices de plântulas Brotos axilares procedentes de ditos ápices Segmentos nodais de ditos brotos axilares Brotos axilares dos segmentos nodais	MS (3%)	T-HCl: 0,10 Piridox: 0,50 Ác.nicot: 0,50	Myo-inosit:100	ANA (2,00)		T: 25±1°C F: 14:10 I: 30 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	El-Morsy & Millet (1996)
<i>Citrus aurantiifolia</i> (cv. Lima Mexicana)  <i>Citrus reticulata</i> Blanco (cv. Monica)	Ápices do cultivo <i>in vitro</i>	½MS (2%)	T-HCl: 0,05 Piridox: 0,25 Ác.nicot: 0,25	Myo-inosit:50 Ác. 2(Nmorfol. etanosulfônico. (250) Carvão ativado (2%)	ANA (0,5; 1,0) ou AIB (0,5; 1,0)		T: 25±2°C F: 16:8 I: 54 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Pérez-Molphe- Balch & Ochoa- Alejo (1997)

QUADRO 2- Sumário de experiências em enraizamento realizadas com plantas cítricas.

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. cv. Washington Navel x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf	Brotos originados do extremo apical de segmentos de epicótilo	MS (3%)	T-HCl: 10 Piridox: 10 Ác.nicot: 5 Glicina: 2	Myo inosit. 100	-		T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ou T: 26±2°C F: escuro durante 35 dias, seguido de 30 dias em fotoperíodo de: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Dias (1998)
	Brotos originados do extremo apical de segmentos de epicótilo e ápices de plântulas germinadas <i>in vitro</i>	1/2 MS (3%)	Idem		ANA (1,0)		T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Brotos originados do extremo apical de segmentos de epicótilo	MS (3%)	Idem	Idem		-	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Ápices originados do extremo apical de segmentos de epicótilo cultivados em meio MS com ANA (0,1)	Idem	Idem	Idem		-	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Ápices originados do extremo apical de segmentos de epicótilo cultivados em meio MS com ANA (0,1) e BAP (1,0)	Idem	Idem	Idem		ANA (0; 0,5; 1,0); AIB (0; 1,0) ou ANA (0,5) + AIB (0,5)	T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ou T: 26±2°C F: escuro durante 30 dias, seguido de fotoperíodo de: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	

**QUADRO 2- Sumário de experiências em enraizamento realizadas com plantas cítricas.**

ESPÉCIES/ HÍBRIDOS/ VARIEDADES	FONTE E ORIGEM DO EXPLANTE	SAIS MINERAIS E (%) DE SACAROSE	VITAMINAS (mg.L <sup>-1</sup> )	ADITIVOS ORGÂNICOS (mg.L <sup>-1</sup> )	REGULADORES DE CRESCIMENTO (mg.L <sup>-1</sup> )	ESTRUTURAS E MODO DE REGENERAÇÃO	INCUBAÇÃO T: temperatura F: Fotoperíodo I: irradiância	AUTOR/ES
<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. cv. Washington Navel x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf	Ápices originados do extremo apical de segmentos de epicótilo cultivados em meio MS com ANA (0,1) e BAP (1,0)	MS (3%)	T-HCl: 10 Piridox: 10 Ác.nicot: 5 Glicina: 2	Myo inosit. 100	ANA (0; 1,0); AIB (0; 1,0) ou ANA (0,5) + AIB (0,5)		T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup> ou T: 26±2°C F: escuro durante 30 dias, seguido de fotoperíodo de: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	Dias (1998)
	Ápices originados do extremo apical de segmentos de epicótilo cultivados em meio MS com ANA (0,1) e BAP (1,0)	Idem	Idem	Idem	ANA (0) + AIB (0) ou ANA (0,5) + AIB (0,5)		T: 26±2°C F: 16:8 I: 56 µE. m <sup>-2</sup> . s <sup>-1</sup>	
	Ápices originados do extremo apical de segmentos de epicótilo cultivados em meio MS com diferentes concentrações de BAP (1,0; 5,0)	Idem	Idem	Idem	-		Idem	
	Ápices de plântulas germinadas <i>in vitro</i>	Idem	Idem	Idem	Idem	ANA (0) + AIB (0) ou ANA (0,5) + AIB (0,5)	Idem	

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Para realização deste trabalho, foram utilizadas sementes de tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan), as quais foram extraídas de árvores com dezesseis anos de idade, procedentes do Pomar do Fundão da Universidade Federal de Viçosa.

Após a extração das sementes, estas tiveram a mucilagem eliminada por imersão em solução de cal extinta por 15 minutos, seguida de três enxágües em água corrente. Após esta etapa, foram colocadas para secar à sombra, durante três dias, sendo posteriormente tratadas com o fungicida Captan® 50% PM, na quantidade necessária para formar uma fina camada ao redor de cada semente. Depois de tratadas, as sementes foram embaladas em sacos plásticos transparentes e encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Células e Tecidos do Setor de Fruticultura, onde foram armazenadas em geladeira a uma temperatura de 5-7°C, até o momento de sua utilização.

### **3.1. Obtenção de plântulas axênicas a partir de sementes.**

As sementes foram agrupadas em lotes e acondicionadas em saquinhos de gaze estéril, fechados com clipe de metal, para facilitar a manipulação.

Para a primeira desinfestação, os lotes, contendo em média 45 sementes, foram levados para a câmara de fluxo laminar. Nesta desinfestação foram testados: álcool etílico 70% v/v por 1 minuto; ácido hipocloroso 0,5% v/v por 30 minutos; ácido hipocloroso 1,0% por 30 minutos, sendo posteriormente enxaguados três vezes em água autoclavada, por 5, 10 e 10 minutos respectivamente.

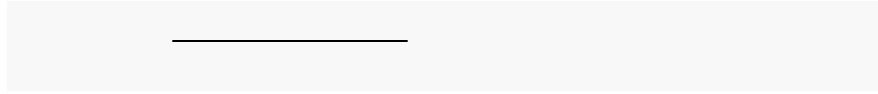
Após a primeira desinfestação, foi eliminado o tegumento externo das sementes, as quais foram novamente acondicionadas em saquinhos de gaze estéril, cada qual contendo em média 11 sementes.

Para a segunda desinfestação, foram testadas quatro diferentes concentrações de ácido hipocloroso (0.25, 0.50, 0.75 e 1.0%) e água autoclavada, em dois diferentes tempos, 5 e 10 minutos. Transcorrido o tempo de desinfestação, as sementes de cada tratamento foram enxaguadas, de novo, por três vezes em água autoclavada por 5, 10 e 10 minutos respectivamente.

Em todas as soluções desinfestantes foram acrescentadas 3 gotas de adesivo espalhante (Tween 20) para cada 100 ml de solução. Durante todo o tempo de desinfestação, o material imerso nas distintas soluções desinfestantes e também na água, foi agitado com auxílio de uma pinça, periodicamente, visando a completa exposição das sementes às soluções desinfestantes e a eliminação de bolhas de ar no interior do invólucro.

As soluções de ácido hipocloroso utilizadas foram preparadas a partir de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária Globo®) com aproximadamente 2,3% de CRT (cloro residual total) expresso em  $Cl_2$ , determinado pela técnica amido-iodo (Greenberg *et. al.*, 1992). As soluções de ácido hipocloroso tiveram o pH ajustado para pH 7,5 utilizando-se HCl (1N).

Desta forma, as soluções cloradas apresentaram: 0,00; 0,25; 0,50; 0,75 e 1% de ácido hipocloroso (HClO) expresso em  $Cl_2$ , pela seguinte fórmula :



As sementes assim preparadas foram então inoculadas, de modo a colocar uma por tubo de ensaio de 25 x 135 mm, contendo aproximadamente 10 mL de meio de germinação, constituído pela solução mineral de Murashige & Skoog (1962), com adição de sacarose (3% p/v) a ágar (0,8% p/v). O meio de germinação teve o pH ajustado em  $5,7 \pm 0,1$  com o uso de NaOH (0,1N), antes da adição do ágar, e sua esterelização foi realizada em autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Os tubos foram posteriormente fechados com tampa de polipropileno e as bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac<sup>®</sup>).

Objetivando a obtenção de plântulas estioladas, com o maior comprimento possível do epicótilo, a incubação foi realizada no escuro contínuo. Os tubos de ensaio foram colocados em grades metálicas desenhadas e confeccionados para esta finalidade e cobertos com papel alumínio para impedir a exposição à luz. As grades foram mantidas em câmara de cultivo em temperatura de  $27 \pm 2^\circ C$  e com umidade relativa de 60%. O tempo de incubação foi de 50 dias.

O experimento foi disposto, segundo um arranjo, em parcelas subdivididas, em um delineamento inteiramente casualizado, totalizando 27 tratamentos, cada um composto por nove repetições, sendo cada unidade experimental representada por um tubo de ensaio. As parcelas foram constituídas pelos tratamentos da primeira desinfestação e as subparcelas pelos tratamentos da Segunda desinfestação.

Para avaliação das características: número de tubos contaminados, porcentagem de sementes germinadas; número de plântulas por semente; comprimento de plântulas; comprimento do epicótilo e número de raízes por semente, foi realizada a análise de variância e ao ocorrer variação significativa foi feita a decomposição em contrastes (todos os contrastes testados encontram-se no Quadro 3). A característica vigor das plântulas foi avaliada segundo uma escala visual, na qual as plântulas com arquitetura reta e comprimento do epicótilo maior que 5,0 cm receberam nota 3; as com arquitetura reta e comprimento do epicótilo entre 4,5 e 5,0 cm receberam nota 2; e as com arquitetura curva e/ou comprimento do epicótilo menor que 4,5 cm, ou seja, as que não poderiam ser aproveitadas nos experimentos posteriores de organogênese e de enraizamento, receberam nota 1.

**QUADRO 3.** Contrastes testados para os parâmetros: contaminação; germinação; número de plântulas; comprimento de plântulas; comprimento do epicótilo e número de raízes. As concentrações estão expressas em % (v/v) e o tempo em minutos.

álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) 5'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) 5'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) 5'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) 10'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) 5'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) 5'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) 5'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) 5'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) 5'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) 5'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) 10'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs para HClO 0,25% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,25% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,75% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs HClO 1,0% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs HClO 1,0% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 1,0% (2° desinfestação) em 5' vs 10'
álcool etílico 70% (1° desinfestação) vs água (2° desinfestação)
HClO 0,5% (1° desinfestação) vs água (1° desinfestação)
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs água (2° desinfestação)
HClO (1° desinfestação) vs álcool etílico 70% (1° desinfestação)
HClO 1,0% (1° desinfestação) vs HClO 0,5% (1° desinfestação)

Todas as características mencionadas anteriormente foram avaliadas mediante um sistema de pontos adotado, no qual foram atribuídas notas para todos os tratamentos, onde os melhores receberam notas mais baixas, enquanto os que apresentaram resultados inferiores receberam notas maiores.

### **3.2. Efeito da adição de 6-benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na organogênese, em explantes de epicótilo cultivados verticalmente e incubados em três condições de luz**

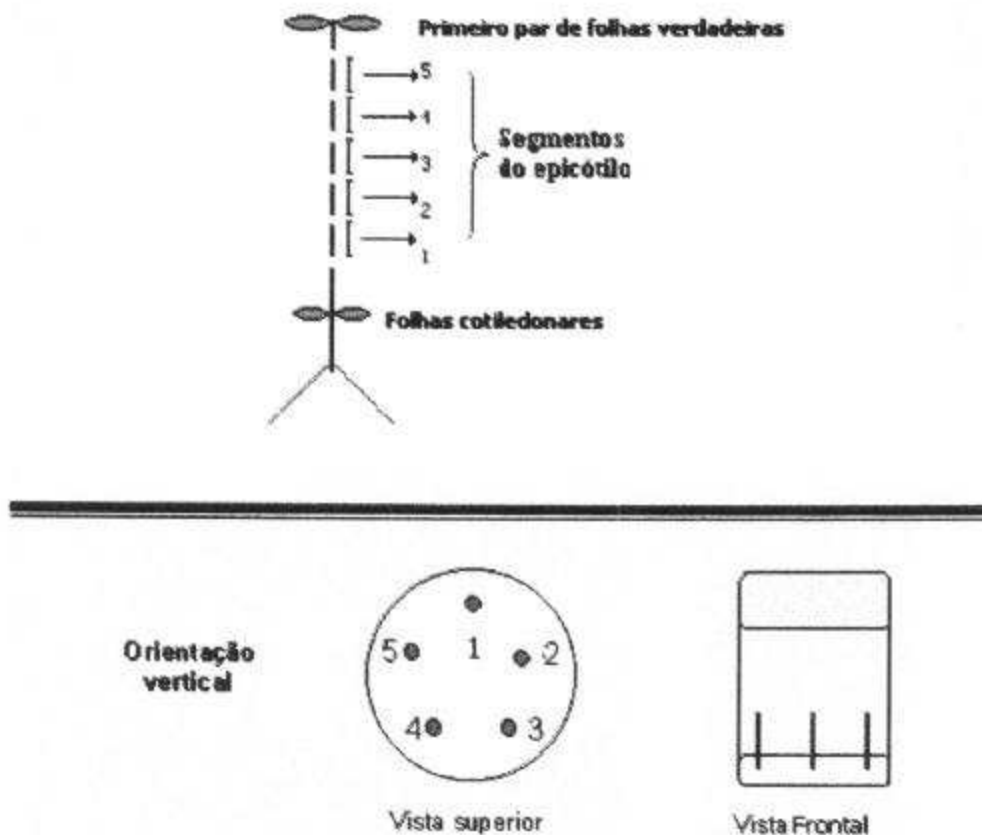
A partir do melhor protocolo estabelecido no experimento inicial, as sementes foram colocadas para germinar em meio de germinação, nas condições de incubação citadas anteriormente.

Para assegurar a uniformidade genética do material vegetal, foram escolhidas as plântulas que apresentaram vigor médio e epicótilo com 5 ou mais centímetros de comprimento.

A partir do epicótilo, porção da haste entre o par de folhas cotiledonares e o primeiro par de folhas verdadeiras, foram obtidos cinco segmentos de 8 a 10 mm de comprimento. Para se especificar a posição do explante no epicótilo, nas distintas experiências, se seguiu a numeração desde 1 até 5, sendo o primeiro o mais próximo ao nó cotiledonar e o último, o mais próximo do ápice (Figura 1).

Os explantes de epicótilo foram colocados em posição vertical, em frascos de vidro com capacidade volumétrica de 320 mL, diâmetro externo de 6,8 cm e interno de 6,5 cm, com cerca de 2 a 3 mm do extremo proximal inserido no meio de cultivo, o qual foi constituído pelos sais nutrientes de MS, com adição de ácido nicotínico ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), glicina ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), piridoxina clorídrica ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tiamina clorídrica ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sacarose (3% p/v) e ágar (0,8% p/v). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  com o uso de NaOH (0,1N), antes da adição do ágar, e sua esterelização foi realizada em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos.

Após a esterelização do meio e sob condição de câmara de fluxo laminar, o meio de cultivo foi esfriado o suficiente para não interferir na atividade dos reguladores de crescimento, porém permanecendo fluído para ser distribuído nos frascos de cultivo, quando, então, foram adicionados os reguladores de crescimento previamente esterelizados por filtração. O meio, então, foi agitado por aproximadamente 2 minutos, para que ocorresse uma homogeneização dos reguladores de crescimento, sendo posteriormente, distribuídos em frascos de cultivo previamente esterelizados em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos.



**FIGURA 1.** Esquema do modo de obtenção e orientação dos segmentos de epicótilo de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan), no meio de cultivo.

Visando a avaliação da influência de três níveis do ácido naftaleno acético (0; 0,10 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e de quatro níveis de 6-benzilaminopurina (0; 0,50; 1,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>) no processo de organogênese, estes foram adicionados ao meio seguindo um desenho fatorial completo.

Na etapa posterior à inoculação dos explantes, os frascos de cultivo foram hermeticamente fechados com tampa de polipropileno e as bordas foram protegidas com filme de PVC (Rolopac<sup>®</sup>), sendo então, levados para câmara de cultivo, onde foram colocados afastados por aproximadamente 5 cm uns dos outros, sendo incubados durante 50 dias a 27 ± 2°C e com umidade relativa de 60%, em três distintas condições de luz:

- Fotoperíodo de 16 /8 horas (luz/escuro), com uma irradiância de 60 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, proporcionada por tubos fluorescentes OSRAM<sup>®</sup> 40W., luz do dia. Esta condição será chamada de luz.
- Metade do período de cultivo no escuro contínuo (25 dias), e a outra metade do período de incubação em condição de luz (fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas de escuro e de 60 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

$^2.s^{-1}$ , proporcionada por tubos fluorescentes OSRAM® 40W., luz do dia.). Esta condição será chamada de escuro/luz.

c) Escuro contínuo. Esta condição será chamada de escuro.

Foram analisados, nos extremos distais e proximais dos explantes os números de gemas, brotos e tamanho dos calos, com auxílio de uma lupa e papel milimetrado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, seguindo um arranjo em parcelas subdivididas, onde os níveis de ANA e BAP constituíram as parcelas e os explantes as sub-parcelas. Cada tratamento foi composto por sete repetições, e cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo cinco explantes.

A formação de gemas, brotos e tamanho de calos em ambos extremos, exceto calos distais, foram submetidos à análise de variância para as três condições de incubação ensaiadas (luz, escuro/luz e escuro). Para a análise de: gemas e brotos distais e gemas e calos proximais, independente da interação tripla (concentrações de ANA x concentrações de BAP x posição do explante), Ter sido ou não significativa, foi realizado o desdobramento dos graus de liberdade correspondentes para Ana e BAP, respectivamente nos efeitos lineares e quadráticos para ANA, e nos efeitos lineares, quadráticos e cúbicos para BAP e no efeito linear de ANA x efeito linear do BAP, para cada uma das condições de incubação ensaiadas, de modo a estudar os efeitos das concentrações de ANA e BAP e das combinações entre estes reguladores de crescimento para cada explante dentro de cada condição de incubação, o que foi realizado mediante superfície de resposta.

Para a avaliação dos brotos proximais e calos distais foram realizadas análises descritivas.

### **3.3. Efeito do ácido naftaleno-acético, ácido indolbutírico e ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4D) no processo de enraizamento de ápices de plântulas.**

Os ápices utilizados no processo de enraizamento foram obtidos de plântulas germinadas *in vitro* (metodologia do experimento inicial), com comprimento de 2 a 3 cm.

Os ápices foram acondicionados verticalmente, um em cada tubo de ensaio, contendo em média 10 mL de meio de cultivo, com aproximadamente 2 a 3 mm do extremo basal inserido no meio.

O meio de cultivo foi constituído pelos sais nutrientes de MS, com adição de ácido nicotínico ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), glicina ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), piridoxina clorídrica ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tiamina clorídrica ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sacarose (3% p/v) e ágar (0,8% p/v). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  com o uso de NaOH (0,1N), antes da adição do ágar, e sua esterelização foi realizada em autoclave a

121°C, durante 20 minutos. A adição de reguladores de crescimento ao meio foi realizada como descrito no item 3.2. Entretanto, para este experimento foram utilizadas quatro concentrações de AIB e de ANA (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>), a combinação de AIB e ANA na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, e a esta combinação também foram adicionadas duas diferentes concentrações de 2,4D (0,2 e 0,4 mg.L<sup>-1</sup>).

Após a introdução dos explantes nos tubos de ensaio, estes foram hermeticamente fechados com tampa de polipropileno transparente e as bordas protegidas com filme de PVC (Rolopac<sup>®</sup>), sendo então colocados em grades metálicas e levados para a sala de cultivo, onde foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas de escuro e irradiância de 60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, proporcionada por tubos fluorescentes OSRAM<sup>®</sup> 40W., luz do dia. A temperatura da câmara de cultivo foi mantida em 27± 2°C, e a umidade relativa em 60%.

Após um período de 50 dias, foram avaliados o número de ápices enraizados, o número de raízes por plântulas, o comprimento de raízes, os ápices com formação de calos e o vigor das plântulas. Para a análise do comprimento das raízes foi utilizada uma régua milimetrada e para o vigor, estabeleceu-se uma escala visual, na qual os ápices que se apresentavam verdes, com desenvolvimento uniforme e raízes com comprimento maior que 3,0 cm receberam nota 3; os que se apresentavam verdes e/ou com pequenas áreas amarelas nas folhas, mas com desenvolvimento uniforme e raízes com comprimento entre 2,0 e 3,0 cm receberam nota 2; e os que se apresentavam verdes e/ou com amarelecimento maior que 50% e raízes com comprimento menor que 2,0 cm receberam nota 1.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram dispostos segundo arranjo em matriz baconiana. Cada tratamento foi composto por dez repetições, sendo cada unidade experimental composta por um ápice. Todos os parâmetros foram avaliados segundo uma análise descritiva.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1. Obtenção de plântulas axênicas a partir de sementes

A partir da análise de variância, verifica-se que as características avaliadas: número de tubos contaminados, porcentagem de sementes germinadas, número de plântulas por semente, comprimento de plântulas e de epicótilo; e número de raízes por plântula foram afetadas pela primeira desinfestação, enquanto apenas o número de tubos contaminados apresentou resultado significativo para a segunda desinfestação (Quadro 4).

O efeito da interação entre a primeira e segunda desinfestação, foi significativo para o número de tubos contaminados e porcentagem de sementes germinadas. Ao se decompor esta interação em contrastes, verifica-se que os tratamentos submetidos a álcool etílico 70% v/v, na primeira desinfestação, com independência da solução desinfestante (incluindo água) utilizada na segunda desinfestação e do tempo no qual esta foi realizada, apresentaram resultados inferiores aos demais tratamentos (Quadro 5).

Com relação a primeira desinfestação, observa-se a partir do Quadro 6, que o ácido hipocloroso na concentração de 0,5% v/v apresentou melhores resultados para todas as características analisadas. Ainda neste Quadro, ao se comparar a eficiência das soluções desinfestantes, constata-se que o ácido hipocloroso, nas distintas concentrações, demonstrou maior poder germicida que o álcool etílico a 70%, e uma possível não toxicidade aos processo de germinação e desenvolvimento de plântulas, nesta etapa do processo de desinfestação.

Ao se analisar o efeito da segunda desinfestação sobre o número de tubos contaminados (Quadro 7), verifica-se que o tempo de imersão das sementes na solução desinfestante influenciou, de modo marcante, esta característica, pois independentemente da concentração do ácido hipocloroso utilizada, o menor número de tubos contaminados foi obtido na maioria dos tratamentos, quando esta desinfestação foi realizada no tempo de 10 minutos, constituindo exceção os tratamentos onde a primeira desinfestação foi feita com ácido hipocloroso a 0,5 e 1,0% e a segunda desinfestação com ácido hipocloroso a 0,75 e 0,25%, respectivamente.

O sistema de pontuação adotado permitiu uma análise mais pontual do experimento, e a partir do Quadro 8, verifica-se que o tratamento utilizando ácido hipocloroso a 0,5% por trinta minutos na primeira desinfestação, e a 1,0% por cinco minutos na Segunda desinfestação foi o tratamento que apresentou, de uma forma geral, resultados mais adequados aos objetivos deste experimento.

Na Figura 2 pode-se observar, detalhadamente, exemplos de plântulas normais e vigorosas de tangerineira 'Cleópatra', obtidas após 50 dias de incubação no escuro.

A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com o de outros autores torna-se difícil, uma vez que a maioria dos trabalhos utilizam soluções comerciais de hipoclorito de sódio e não especificam a exata concentração de ácido hipocloroso utilizada no processo de desinfestação.

**QUADRO 4.** Resumo da análise de variância do processo de desinfestação de sementes de tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan).

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados médios					
		Contaminação	Germinação	Num. de plânt	Comp. das plânt	Comp. epicót.	Num. raízes
1 <sup>o</sup> desinf	2	6.69548*	4.49792*	6.17695*	126.54280*	100.23954*	9.51029*
Erro A	24	0.04938 <sup>ns</sup>	0.16564 <sup>ns</sup>	0.39197 <sup>ns</sup>	12.51457 <sup>ns</sup>	10.09189 <sup>ns</sup>	0.28498 <sup>ns</sup>
2 <sup>o</sup> desinf	8	0.99794*	0.14918 <sup>ns</sup>	0.40535 <sup>ns</sup>	6.46958 <sup>ns</sup>	3.99028 <sup>ns</sup>	0.41769 <sup>ns</sup>
1 <sup>o</sup> desinf x 2 <sup>o</sup> desinf	16	0.63066*	0.39609*	0.37140 <sup>ns</sup>	8.40720 <sup>ns</sup>	6.06644 <sup>ns</sup>	0.55195 <sup>ns</sup>
Erro B	192	0.06790 <sup>ns</sup>	0.19342 <sup>ns</sup>	0.46721 <sup>ns</sup>	9.05480 <sup>ns</sup>	7.22038 <sup>ns</sup>	0.52341 <sup>ns</sup>

\* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F; <sup>ns</sup> Não Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

**QUADRO 5.** Resumo da análise de variância, seguindo o modelo de decomposição em contrastes do processo de desinfestação de sementes de tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan).

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios	
		Contaminação	Germinação
5 <sup>o</sup> vs 10 <sup>o</sup> para HClO 0,25% (2 <sup>o</sup> desinfestação) em etanol 70% (1 <sup>o</sup> desinfestação)	1	3,55555*	0,50000 <sup>ns</sup>
5 <sup>o</sup> vs 10 <sup>o</sup> para HClO 0,50% (2 <sup>o</sup> desinfestação) em etanol 70% (1 <sup>o</sup> desinfestação)	1	2,00000*	0,22222 <sup>ns</sup>
5 <sup>o</sup> vs 10 <sup>o</sup> para HClO 0,75% (2 <sup>o</sup> desinfestação) em etanol 70% (1 <sup>o</sup> desinfestação)	1	4,50000*	2,00000*
5 <sup>o</sup> vs 10 <sup>o</sup> para HClO 1,00% (2 <sup>o</sup> desinfestação) em etanol 70% (1 <sup>o</sup> desinfestação)	1	4,50000*	0,50000 <sup>ns</sup>
Água vs HClO (2 <sup>o</sup> desinfestação) em etanol 70% (1 <sup>o</sup> desinfestação)	1	1,78395*	0,15432 <sup>ns</sup>

\* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F; <sup>ns</sup> Não Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

**QUADRO 6** Médias referentes a primeira desinfestação de sementes de tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan), para todos os parâmetros avaliados.

Soluções desinfestantes (v/v)	Contaminação	Germinação	Num. de plânt	Comp. das plânt	Comp. epicót	Num. raízes
Alcool etílico 70%	0,580	0,346	0,358	1,668	1,443	0,358
HClO 0,50%	0,049	0,790	0,901	4,112	3,615	1,037
HClO 1,00%	0,123	0,704	0,716	3,343	2,948	0,778

**QUADRO 7.** Médias referentes a nove repetições para cada tratamento.

1º desinfest	2º desinfest	Trat	Tempo	Contam	Germ	Nº de pls	Comp de pls	Comp de epic	Vigor	Nº de raízes
Álcool 70%	Água	1		1,00	0,22	0,33	1,31	1,53	0,30	0,33
Álcool 70%	HCIO 0,25%	2	5'	1,00	0,22	0,22	0,61	0,53	0,70	0,22
Álcool 70%	HCIO 0,25%	3	10'	0,11	0,56	0,67	3,11	2,47	1,00	0,67
Álcool 70%	HCIO 0,50%	4	5'	0,89	0,22	0,78	0,78	0,72	0,40	0,22
Álcool 70%	HCIO 0,50%	5	10'	0,22	0,44	0,44	2,28	1,96	0,80	0,33
Álcool 70%	HCIO 0,75%	5	5'	1,00	0,11	0,11	0,72	0,67	0,10	0,11
Álcool 70%	HCIO 0,75%	7	10'	0,00	0,78	0,67	3,43	2,78	2,00	0,78
Álcool 70%	HCIO 1,00%	8	5'	1,00	0,11	0,11	0,83	0,72	0,10	0,11
Álcool 70%	HCIO 1,00%	9	10'	0,00	0,44	0,56	1,93	1,64	1,00	0,44
HCIO 0,50%	Água	10		0,11	1,00	1,00	4,45	3,86	2,00	1,11
HCIO 0,50%	HCIO 0,25%	11	5'	0,22	0,67	0,78	4,57	3,97	1,00	1,00
HCIO 0,50%	HCIO 0,25%	12	10'	0,00	0,78	1,00	4,02	3,49	1,00	1,56
HCIO 0,50%	HCIO 0,50%	13	5'	0,00	0,78	0,78	3,14	2,74	2,00	1,11
HCIO 0,50%	HCIO 0,50%	14	10'	0,00	0,89	1,00	4,01	3,47	2,00	1,00
HCIO 0,50%	HCIO 0,75%	15	5'	0,00	0,89	0,89	5,06	4,61	1,00	1,00
HCIO 0,50%	HCIO 0,75%	16	10'	0,11	0,44	0,44	3,06	2,74	0,40	0,44
HCIO 0,50%	HCIO 1,00%	17	5'	0,00	1,00	1,33	5,37	4,78	2,00	1,33
HCIO 0,50%	HCIO 1,00%	18	10'	0,00	0,67	0,89	3,31	2,84	1,00	0,78
HCIO 1,0%	Água	19		0,33	0,67	0,78	2,84	2,56	2,00	0,67
HCIO 1,0%	HCIO 0,25%	20	5'	0,00	0,89	0,56	2,49	2,30	2,00	1,00
HCIO 1,0%	HCIO 0,25%	21	10'	0,11	0,89	0,78	3,34	2,86	2,00	0,89
HCIO 1,0%	HCIO 0,50%	22	5'	0,11	0,44	0,67	2,56	2,33	1,00	0,67
HCIO 1,0%	HCIO 0,50%	23	10'	0,11	0,78	0,67	3,79	3,17	1,00	0,67
HCIO 1,0%	HCIO 0,75%	24	5'	0,11	0,78	0,60	2,33	2,09	2,00	0,78
HCIO 1,0%	HCIO 0,75%	25	10'	0,00	0,56	0,67	3,60	3,26	0,60	0,67
HCIO 1,0%	HCIO 1,00%	26	5'	0,11	0,67	0,89	4,56	3,93	1,00	0,78
HCIO 1,0%	HCIO 1,00%	27	10'	0,00	0,67	0,89	4,58	4,04	1,00	0,89

**QUADRO 8** Notas dos tratamentos, segundo o sistema de pontuação adotado

1º desinfest	2º desinfest	Trat	Tempo	Contam	Germ	Nº.de pls	Comp de pls	Comp de epic	Vigor	Nº de raízes	Total
HCIO 0,50%	HCIO 1,00%	17	5'	1	1	1	1	1	2	2	9
HCIO 0,50%	HCIO 0,75%	15	5'	1	2	3	2	2	1	4	15
HCIO 1,0%	HCIO 1,00%	27	10'	1	4	3	3	3	1	5	20
HCIO 0,50%	Água	10	5'	2	1	2	6	6	2	3	22
HCIO 0,50%	HCIO 0,25%	12	10'	1	3	2	7	7	1	1	22
HCIO 0,50%	HCIO 0,25%	11	5'	3	4	4	4	4	1	4	24
HCIO 1,0%	HCIO 1,00%	26	5'	2	4	3	5	5	1	6	26
HCIO 0,50%	HCIO 0,50%	14	10'	1	2	2	8	8	2	4	27
HCIO 1,0%	HCIO 0,50%	23	10'	2	3	5	9	9	1	7	36
HCIO 1,0%	HCIO 0,75%	25	10'	1	5	5	10	10	0,6	7	38,6
Álcool 70%	HCIO 0,75%	7	10'	1	3	5	11	11	2	6	39
HCIO 1,0%	HCIO 0,25%	21	10'	2	2	4	12	12	2	5	39
HCIO 0,50%	HCIO 0,50%	13	5'	1	3	4	14	14	2	3	41
HCIO 0,50%	HCIO 1,00%	18	10'	1	4	3	13	13	1	6	41
Álcool 70%	HCIO 0,25%	3	10'	2	5	5	15	15	1	7	50
HCIO 1,0%	HCIO 0,25%	20	5'	1	2	7	19	19	2	4	54
HCIO 1,0%	Água	19	5'	4	4	4	17	17	2	7	55
HCIO 0,50%	HCIO 0,75%	16	10'	2	6	8	16	16	0,4	8	56,4
HCIO 1,0%	HCIO 0,50%	22	5'	2	6	5	18	18	1	7	57
HCIO 1,0%	HCIO 0,75%	24	5'	2	3	6	20	20	2	6	59
Álcool 70%	HCIO 1,00%	9	10'	1	6	7	22	22	1	8	67
Álcool 70%	HCIO 0,50%	5	10'	3	6	8	21	21	0,8	9	68,8
Álcool 70%	HCIO 0,50%	4	5'	5	7	4	25	25	0,4	10	76,4
Álcool 70%	Água	1		6	7	9	23	23	0,3	9	77,3
Álcool 70%	HCIO 1,00%	8	5'	6	8	11	24	24	0,1	11	84,1
Álcool 70%	HCIO 0,25%	2	5'	6	7	10	27	27	0,7	10	87,7
Álcool 70%	HCIO 0,75%	5	5'	6	8	11	26	26	0,1	11	88,1

\* Sistema de pontuação. Maior pontuação, significa pior comportamento do tratamento.



**FIGURA 2.**

Exemplos de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' após 50 dias de cultivo.

As soluções comerciais de hipoclorito de sódio apresentam em sua composição aproximadamente 2,0 a 2,5% de cloro residual total, o que representa a concentração de ácido hipocloroso, cloro e cloramina presentes na solução, portanto não indicam a concentração real do agente germicida (ácido hipocloroso) presente. Exemplificam este fato os trabalhos realizados por Sauton *et al* (1982) que, após a remoção dos tegumentos, desinfestaram as sementes de *Poncirus trifoliata*, citrange 'Troyer', limão 'Eureka' e laranja 'Trovia' em solução de hipoclorito de sódio 10% v/v por dez minutos, seguidos de quatro enxágües em água estéril; e por Peña *et al* (1994), os quais, após a remoção dos tegumentos, desinfestaram as sementes de citrange 'Carrizo', por dez minutos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% v/v, seguido de três enxágües em água estéril. Fica, assim, demonstrado o quanto é importante a quantificação do ácido hipocloroso, no estabelecimento de um protocolo de desinfestação para que este apresente repetibilidade e para que se possa averiguar a ocorrência de efeitos tóxicos das soluções desinfestantes utilizadas sobre o material desinfestado.

Um outro importante ponto no processo de desinfestação de sementes, diz respeito à remoção dos tegumentos destas, como pode ser observado nos trabalhos acima citados (Sauton *et al.*, 1982; Peña *et al.*, 1994) e no realizado por Dias (1998), que, ao trabalhar com citrange 'Troyer', realizou a desinfestação de sementes deste híbrido, tratando, inicialmente estas estruturas com uma solução de hipoclorito de sódio a 30% v/v por 30 minutos, seguido de três enxágües, para, em seguida, remover os dois tegumentos, o externo (testa) e o interno (tégma), seguido de nova imersão em solução de hipoclorito de sódio a 10% v/v, no tempo de quinze minutos e três enxágües posteriores em água estéril. De acordo com Soares *et al* (1995), a remoção dos tegumentos das sementes visa uma germinação mais rápida e uniforme destas estruturas propagativas e a obtenção de plântulas com arquitetura reta, assim como maior comprimento da parte aérea. Dias (1998), menciona em seu trabalho, que a retirada apenas do tegumento externo (testa) não assegurava as referidas vantagens, além de apresentar um maior número de tubos contaminados. Entretanto, para a espécie estudada neste trabalho, a remoção total dos tegumentos não foi possível, devido à fragilidade apresentada por estas sementes, implicando na ruptura e separação dos componentes internos destas e culminando na não germinação.

A baixa taxa de poliembrionia encontrada para as sementes de tangerineira 'Cleópatra' neste trabalho (1,33 no melhor tratamento), contrasta com a descrita por Loussert (1992), o qual descreve as sementes desta espécie como altamente poliembrionicas. Este fato pode ser explicado com base no trabalho de Ramos *et. al.* (1991), segundo os quais, mesmo em condições otimizadas de temperatura e umidade, uma semente pode não expressar totalmente sua verdadeira taxa de poliembrionia, isto é, o número de embriões nela contido. Para os referidos autores, este fato ocorre principalmente em espécies com elevado grau de poliembrionia, em razão do pequeno tamanho ou inadequada localização na semente dos

embriões, os quais não germinam ou são logo dominados por outros embriões. Ramos *et al.* (1991), mencionam, ainda, que o tratamento com hipoclorito de sódio pode reduzir a sobrevivência de embriões, o que diminui a taxa de germinação. No entanto, este dado não pode ser comprovado neste estudo, pois quando foi utilizado álcool etílico a 70% como solução desinfestante houve um elevado grau de contaminação, impossibilitando avaliações deste aspecto

## **4. 2. Influência da adição de 6-benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na organogênese em explantes de epicótilo cultivados verticalmente e incubados em três condições de luz.**

A indução de organogênese a partir de explantes cultivados *in vitro* pode ocorrer por duas vias diferentes. Em algumas ocasiões, ocorre uma regeneração direta de gemas a partir do explante, sem prévia formação de calo (organogênese direta). Em outros casos, a diferenciação de estruturas organogênicas vem precedida pela formação e proliferação de um calo, a partir do qual se diferenciam nódulos meristemáticos, os quais darão origem às gemas (organogênese indireta).

Nos estudos de organogênese *in vitro* de espécies cítricas, a partir de explantes de caule, tem se observado uma regeneração de brotos tanto mediante a organogênese direta (Rangasway, 1974; Grinblat, 1974; Edriss & Burger, 1984; Moore, 1986; Durán-Vila *et al.*, 1992; Goh *et al.*, 1995; Maggon & Singh, 1995; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Dias, 1998; Dias *et al.*, 2000), quanto mediante a organogênese indireta (Raj Bhansali y Arya, 1978; Barlass & skene, 1982; Moore, 1986; Maggon & Singh, 1995; Dias, 1998; Dias *et al.*, 2000). O que determina um ou outro padrão de organogênese está relacionado com o genótipo (Moore, 1986) e com a natureza dos reguladores de crescimento adicionados ao meio organogênico (Maggon & Singh, 1995; Dias, 1998; Dias *et al.*, 2000), porém não existem trabalhos que estudem detalhadamente o processo, nem que determinem a origem das estruturas.

No presente estudo, foram observados ambos processos de organogênese em explantes de epicótilo cultivados *in vitro* e foram caracterizadas as condições que determinam este processo. A organogênese direta se apresentou no extremo distal dos explantes, quando estes foram incubados em posição vertical, independente da condição de incubação analisada e da composição do meio de cultivo.

A **organogênese direta** é um processo que ocorre em duas fases, as quais compreendem a formação de gemas e a brotação das mesmas. Estas gemas parecem ter sua origem histológica em um meristema já presente no explante original, o câmbio vascular (Dias, 1998).

### **4. 2. 1. Formação de gemas**

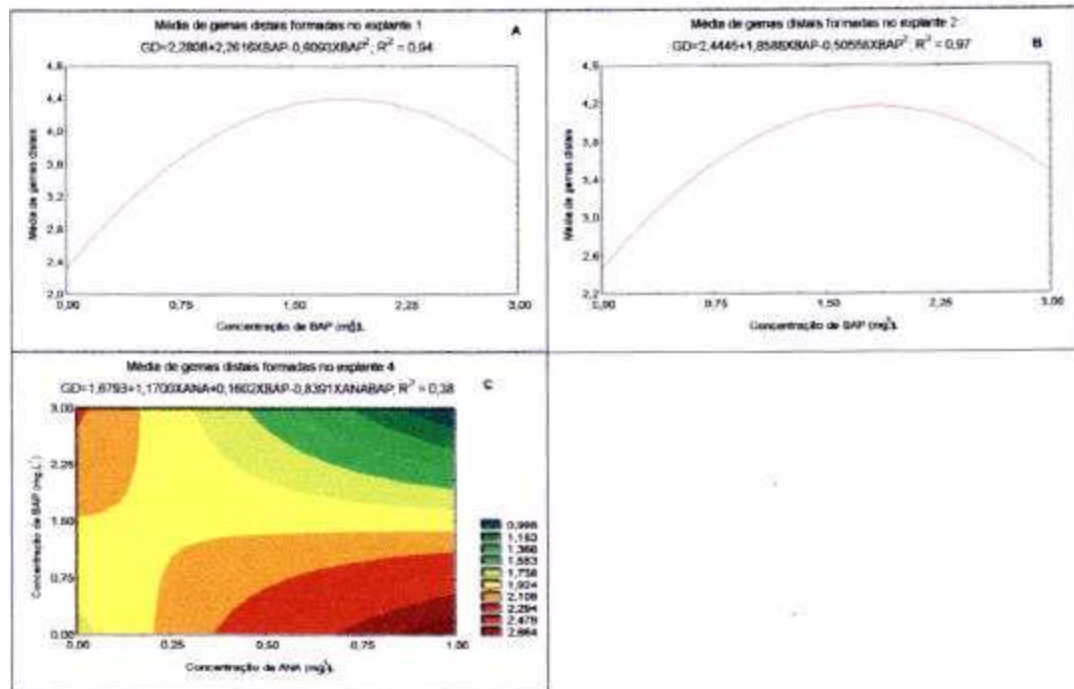
#### **4. 2. 1. 1. Condição de incubação: luz**

Para a incubação dos explantes sob condição luz, percebe-se através da Figura 3.A e B, uma marcada influência das concentrações de BAP sob a formação de gemas nos explantes 1 e 2, respectivamente, ou seja, explantes obtidos de segmentos mais próximos ao nó cotiledonar. Para os referidos explantes, o efeito deste regulador de crescimento se mostrou mais efetivo na concentração de 1,80 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que todas as concentrações testadas de BAP apresentaram

resultados superiores aos obtidos na ausência desta citocinina; e para estes explantes a presença de ANA não foi efetiva.

Com relação ao explante 4 (Figura 3.C), tanto ANA, quanto BAP apresentaram efeitos positivos na formação de gemas. A partir desta Figura, constata-se que a medida que a concentração de ANA foi aumentada, também houve aumento no número de gemas distais formadas, sendo o melhor resultado obtido na concentração de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> desta auxina. Comportamento similar também pode ser observado com relação a adição de BAP ao meio de cultivo, entretanto, apesar da concentração mais alta testada desta citocinina (3,00 mg.L<sup>-1</sup>) apresentar um maior número de gemas formadas que as demais concentrações, este resultado foi inferior ao obtido ao se adicionar ANA na concentração de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> ao meio. A interação entre ANA e BAP teve efeito negativo sob a formação de gemas distais para o referido explante.

Os explantes 3 e 5 não apresentaram resposta quanto à formação de gemas nas diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento testadas neste experimento ( $\hat{GD} = \bar{GD} = 2,67$ , para o explante 3 e  $\hat{GD} = \bar{GD} = 2,59$ , para o explante 5).



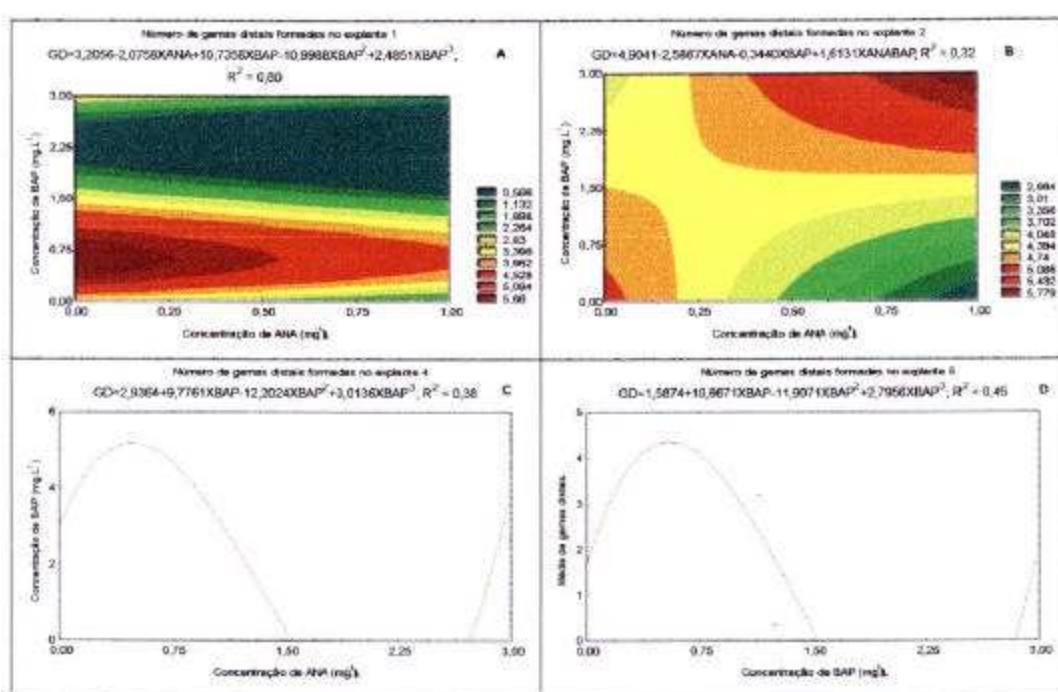
**FIGURA 3.** Média de gemas formadas no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em luz.

#### 4. 2. 1. 2. Condição de incubação: escuro/luz

Nesta condição de incubação, os explantes 1, 4 e 5 tiveram suas respostas afetadas positivamente pela adição de BAP ao meio de cultivo, nas concentrações de 0,60 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 1 (Figura 4.A) e de 0,50 mg.L<sup>-1</sup> para os explantes 4 e 5 (Figura 4.C e D, respectivamente), sendo estas as concentrações que apresentaram o maior número de gemas formadas, para ditos explantes. A concentração mais elevada de BAP (3,00 mg.L<sup>-1</sup>) ensaiada neste estudo, apresentou resultados inferiores ou iguais, aos obtidos no meio de cultivo com ausência de reguladores de crescimento, podendo este fato ser atribuído a um possível efeito negativo deste regulador de crescimento sob a formação de gemas nesta concentração.

Para o explante 2, a ação isolada tanto de ANA, quanto de BAP, afetou negativamente o processo de formação de gemas. No entanto, a combinação destes reguladores de crescimento nas concentrações mais altas ensaiadas para ambos (1,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 3,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP), apresentou efeito positivo sob o número de gemas formadas neste explante. Porém, os resultados obtidos para esta combinação foram próximos aos obtidos quando no meio de cultivo estes reguladores não se encontravam presentes (Figura 4.B).

O explante 3 não apresentou resposta ao se adicionar ANA e/ou BAP ao meio de cultivo para as concentrações testadas ( $\hat{GD} = \bar{GD} = 3,53$ ).



**FIGURA 4.** Média de gemas formadas no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro/luz.

#### 4. 2. 1. 3. Condição de incubação: escuro

A influência da presença de BAP na formação de gemas para os explantes 1 e 3 sob condição escuro foi marcante, sendo a concentração mais eficiente desta citocinina a de 2,03 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 1 (Figura 5.A) e de 0,65 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 3 (Figura 5.C).

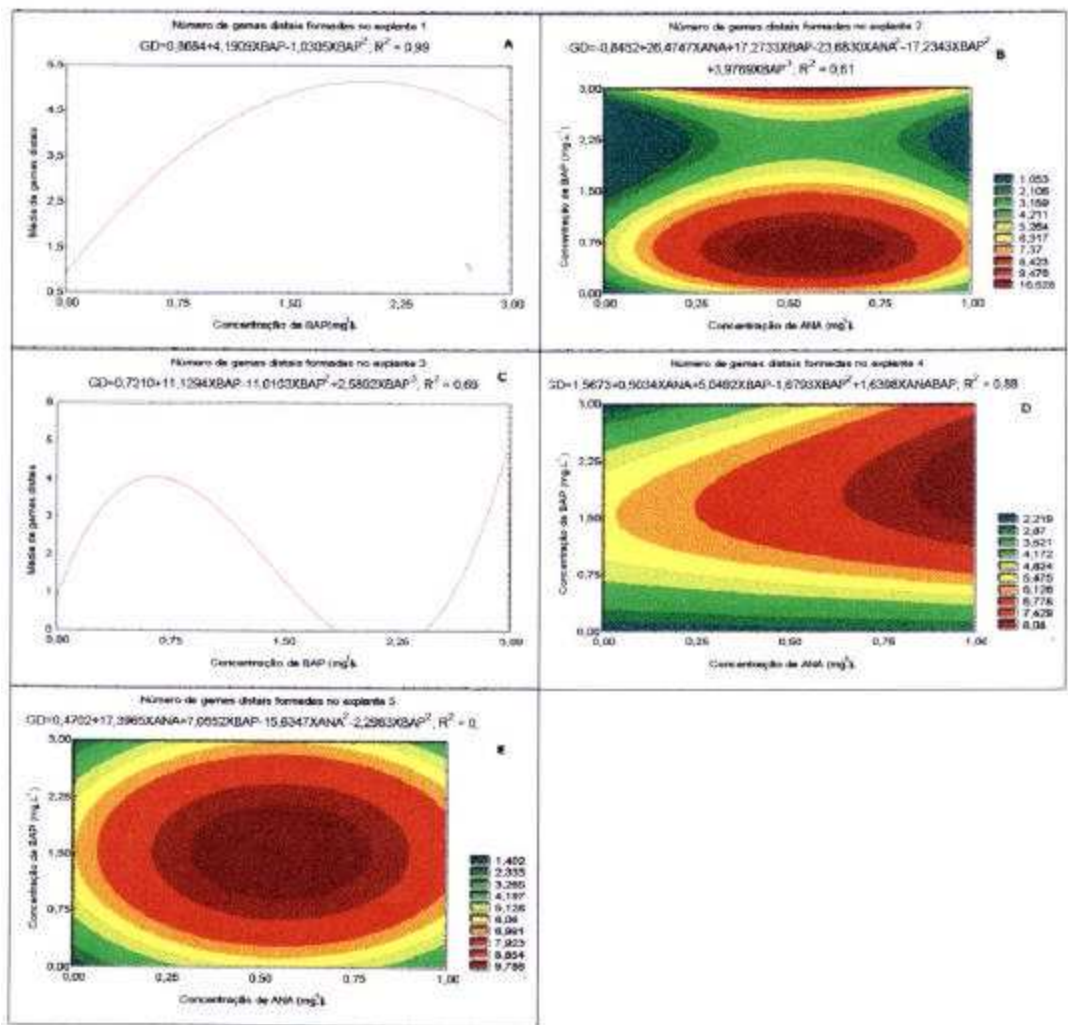
A formação de gemas nos explantes 2, 4 e 5 (Figura 5.B, D e E, respectivamente) foi influenciada pela presença de ANA, assim como pela presença da combinação ANA e BAP.

Com relação ao explante 2, constata-se uma maior formação de gemas quando no meio de cultivo encontra-se presente apenas ANA na concentração de 0,56 mg.L<sup>-1</sup> ou em combinação com BAP em concentrações elevadas como 3,00 mg.L<sup>-1</sup> ou mais baixas, como aproximadamente 0,75 mg.L<sup>-1</sup>. A adição de ANA a 0,56 mg.L<sup>-1</sup> ao meio de cultivo em combinação com BAP em concentrações que variam entre 0,75 a 2,25 mg.L<sup>-1</sup> também foi responsável por uma maior formação de gemas distais no explante 5.

Para o explante 4, uma maior formação de gemas foi obtida ao se utilizar ANA a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> em combinação com concentrações de BAP entre 1,00 e 2,50 mg.L<sup>-1</sup>.

A formação de gemas no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ ocorreu, sem a necessidade de adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo, sendo ligeiramente aumentada pela adição destes ao meio, em concentrações que variaram não apenas com a condição de incubação, mas também de acordo com a posição de onde o explante foi extraído do epicótilo.

A partir dos resultados obtidos, pode-se assinalar que sob a condição de escuro/luz (condição mais efetiva), a adição de BAP na concentração de 0,50 mg.L<sup>-1</sup> promoveu, de uma forma geral, os melhores resultados. Para os explantes incubados em condição de escuro/luz e de escuro a presença de BAP na concentração de 3,00 mg.L<sup>-1</sup>, pareceu promover um efeito negativo sobre a formação de gemas, uma vez que esta, não só apenas reduziu o número destas estruturas formadas, como também as melhores respostas foram obtidas em concentrações mais baixas desta citocinina. Maggon & Singh (1995), também detectaram um efeito deletério de altas concentrações de BAP sob a formação de gemas em segmentos de epicótilo de *Citrus sinensis* L. Osbeck. De acordo com estes autores, a adição de BAP na concentração de 2,00 mg.L<sup>-1</sup> ao meio MS, foi a que promoveu maior frequência de resposta dos explantes e maior número de gemas formadas.



**FIGURA 5.** Média de gemas formadas no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro.

#### 4. 2. 2. Desenvolvimento de brotos

##### 4. 2. 2. 1. Condição de incubação: luz

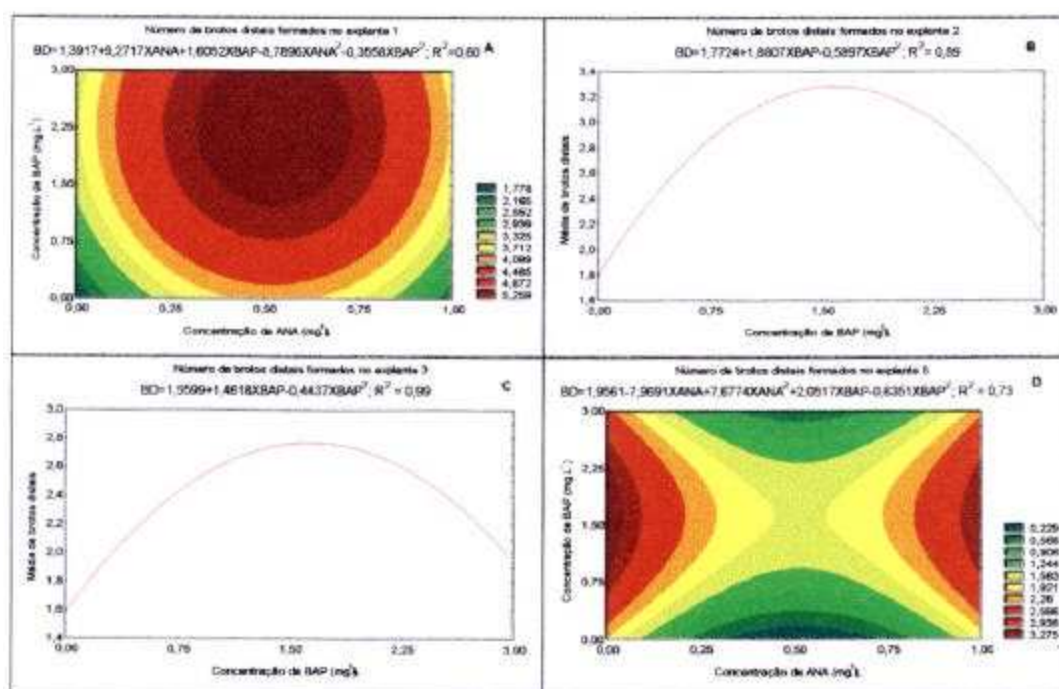
Para o explante 1 a ação isolada tanto de ANA a 0,50 mg.L<sup>-1</sup>, quanto de BAP a 2,26 mg.L<sup>-1</sup> apresentou uma maior formação de brotos que a ausência destes reguladores de crescimento no meio de cultivo, entretanto, constata-se a partir da Figura 6.A, que a ação combinada destes reguladores nas concentrações acima citadas, apresenta a resposta mais positiva para este processo.

A adição de BAP ao meio de cultivo foi mais efetiva no processo de brotação no extremo distal, para os explantes 2 (Figura 6.B) e 3 (Figura 6.C) que a adição de ANA. Para

ambos explantes, a concentração desta citocinina a 1,59 mg.L<sup>-1</sup> e a 1,65 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, foram as que promoveram maior formação de brotos.

A ação isolada de BAP também foi a responsável pelo maior número de brotos formados no explante 5, sendo a concentração de 1,60 mg.L<sup>-1</sup>, a mais eficiente. Pode-se constatar na Figura 6.D, que para o referido explante a combinação de ANA a 1,00 mg.L<sup>-1</sup> (concentração mais alta testada para esta auxina, no presente estudo) com concentrações de BAP entre 0,75 e 2,25 mg.L<sup>-1</sup>, apresentou a formação de um grande número de brotos distais, entretanto, os valores obtidos são inferiores aos obtidos pela ação de BAP na melhor concentração.

A presença de ANA e BAP, assim como de suas combinações no meio de cultivo não estimularam a brotação no explante 4 ( $\hat{BD} = \bar{BD} = 1,61$ ).

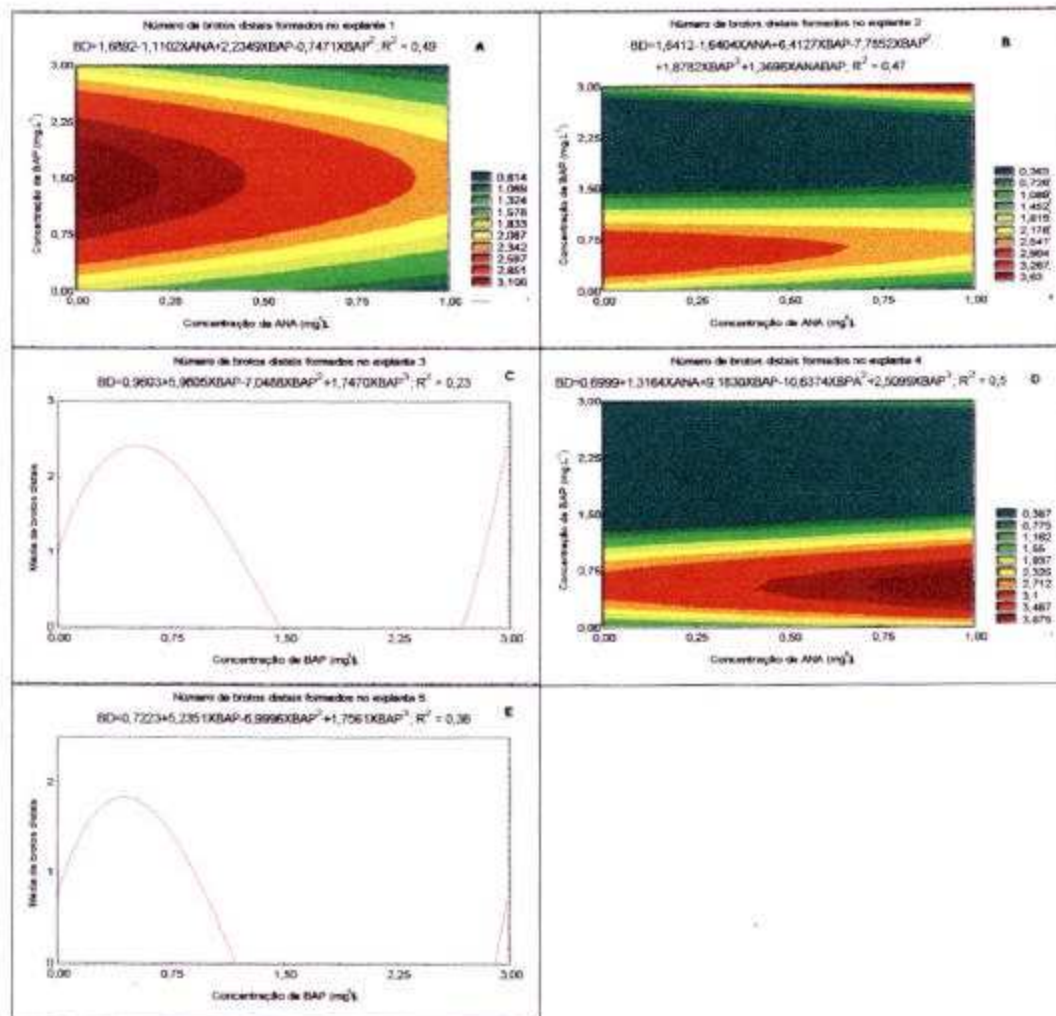


**FIGURA 6.** Média de brotos formados no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em luz.

#### 4. 2. 2. 2. Condição de incubação: escuro/luz

Os explantes incubados na condição escuro/luz também foram marcadamente influenciados pela presença de BAP (Figura 7). A adição isolada de ANA ao meio de cultivo promoveu um efeito inibidor no desenvolvimento de brotos nos explantes 1 (Figura 7.A) e 2 (Figura 7.B), e não foi efetiva para os explantes 3 (Figura 7.C) e 5 (Figura 7.E), apenas, o

explante 4 (Figura 7.D) foi beneficiado pela ação isolada desta auxina. Para este explante concentrações de ANA acima de 0,75 mg.L<sup>-1</sup> foram responsáveis por uma maior formação de brotos, quando comparada a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo; e, com relação a adição de BAP ao meio de cultivo, este teve efeito positivo, quando adicionado em baixas concentrações, sendo a melhor concentração desta citocinina a de 0,53 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, o melhor resultado para o referido explante foi obtido ao se utilizar ANA a 1,00 mg.L<sup>-1</sup> + BAP a 0,53 mg.L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 7.** Média de brotos formados no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro/luz.

Para o explante 1 (Figura 7.A), a concentração de BAP que promoveu a maior formação de brotos foi a de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, para o explante 2 (Figura 7.B) a de 0,70 mg.L<sup>-1</sup>, para o explante 3 (Figura 7.C) a de 0,48 mg.L<sup>-1</sup> e para o explante 5 (Figura 7.E) a de 0,37 mg.L<sup>-1</sup>.

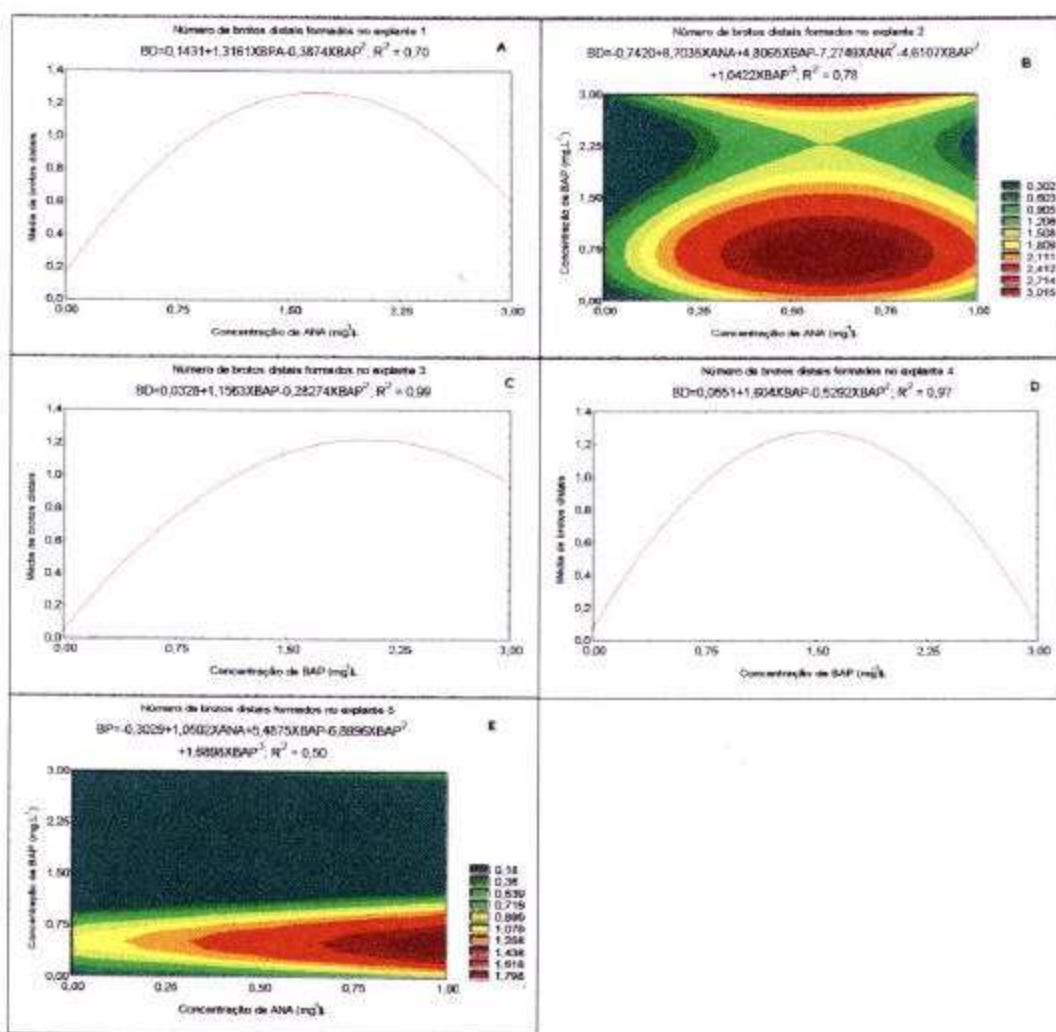
#### **4. 2. 2. 3. Condição de incubação: escuro**

A adição de BAP ao meio de cultivo foi determinante no processo de formação de brotos no extremo distal dos explantes incubados sob condição de escuro. Entretanto, as concentrações requeridas para que ocorresse a maior formação foi variável, 1,7 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 1 (Figura 8.A); 2,05 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 3 (Figura 8.C); e 1,55 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 4 (Figura 8.D).

Para os explantes 2 e 5 as concentrações necessárias de BAP para obtenção das melhores respostas foram mais baixas, quando comparadas com as dos demais explantes (0,68 e 0,48 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente), entretanto, estas só foram, efetivas na presença de ANA. Para o explante 2 (Figura 8.B), a melhor resposta foi obtida na combinação de ANA a 0,60 mg.L<sup>-1</sup> e BAP a 0,68 mg.L<sup>-1</sup> e para o explante 5 (Figura 8.E) na combinação de ANA a 1,00 mg.L<sup>-1</sup> e BAP a 0,48 mg.L<sup>-1</sup>.

A brotação foi altamente favorecida pela presença de BAP nas diferentes condições de incubação ensaiadas, sendo este fato mais pronunciado para a condição luz. Os explantes incubados sob as condições luz e escuro/luz, apresentaram uma redução nas concentrações requeridas desta citocinina a medida que estes se distanciavam do ápice das plântulas. Para este processo a concentração ótima de BAP no meio de cultivo foi de aproximadamente 1,60 mg.L<sup>-1</sup>, para a maioria dos explantes, quando estes foram incubados na condição de luz. Os resultados obtidos neste trabalho contrastam com os apresentados por Kitto & Young (1981), os quais ao utilizarem ápices de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' como explantes, objetivando a formação de brotos obtiveram uma maior proliferação ao adicionarem ao meio de cultivo BAP na concentração de 5,00 mg.L<sup>-1</sup>. As prováveis causas das divergências entre os resultados, podem ser atribuídas as condições de incubação e ao local de procedência dos explantes.

O comportamento obtido para morfogênese e brotação do extremo distal de explantes de epicótilo de tangerineira 'Cleópatra' neste estudo é similar ao assinalado para os citranges 'Troyer' e 'Carrizo' (Barlass & Skene, 1982; Moore, 1986; Dias, 1998), ainda que variem as concentrações ótimas e a porcentagem de regeneração. No entanto, discordam dos resultados apresentados por Edriss & Burger (1984), no que diz respeito ao desenvolvimento de brotos em meios sem reguladores de crescimento. Estes autores, ao trabalharem com citrange 'Troyer', não obtiveram desenvolvimento de brotos sob esta condição. Entretanto no presente



**FIGURA 8.** Média de brotos formados no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro.

presente estudo, os explantes incubados em luz e escuro/luz apresentaram brotações mesmo na ausência de reguladores de crescimento.

O processo de organogênese direta foi marcadamente influenciado pelas condições de iluminação, Durante o período de incubação dos explantes. A formação das gemas foi mais efetiva sob condição de escuro/luz, enquanto a brotação foi superior sob condição de luz, sendo esta última altamente reduzida quando a incubação dos explantes ocorreu no escuro (Figura 9).

Os trabalhos realizados com *Citrus aurantifolia* (Raj Bhansali & Rya, 1978; Pérez-Molphe-Bach & Ochoa-Alejo, 1997), *Citrus reticulata* (Pérez-Molphe-Bach & Ochoa-Alejo, 1997) e com citrange ‘Troyer’ (Dias, 1998), lograram também maior organogênese em

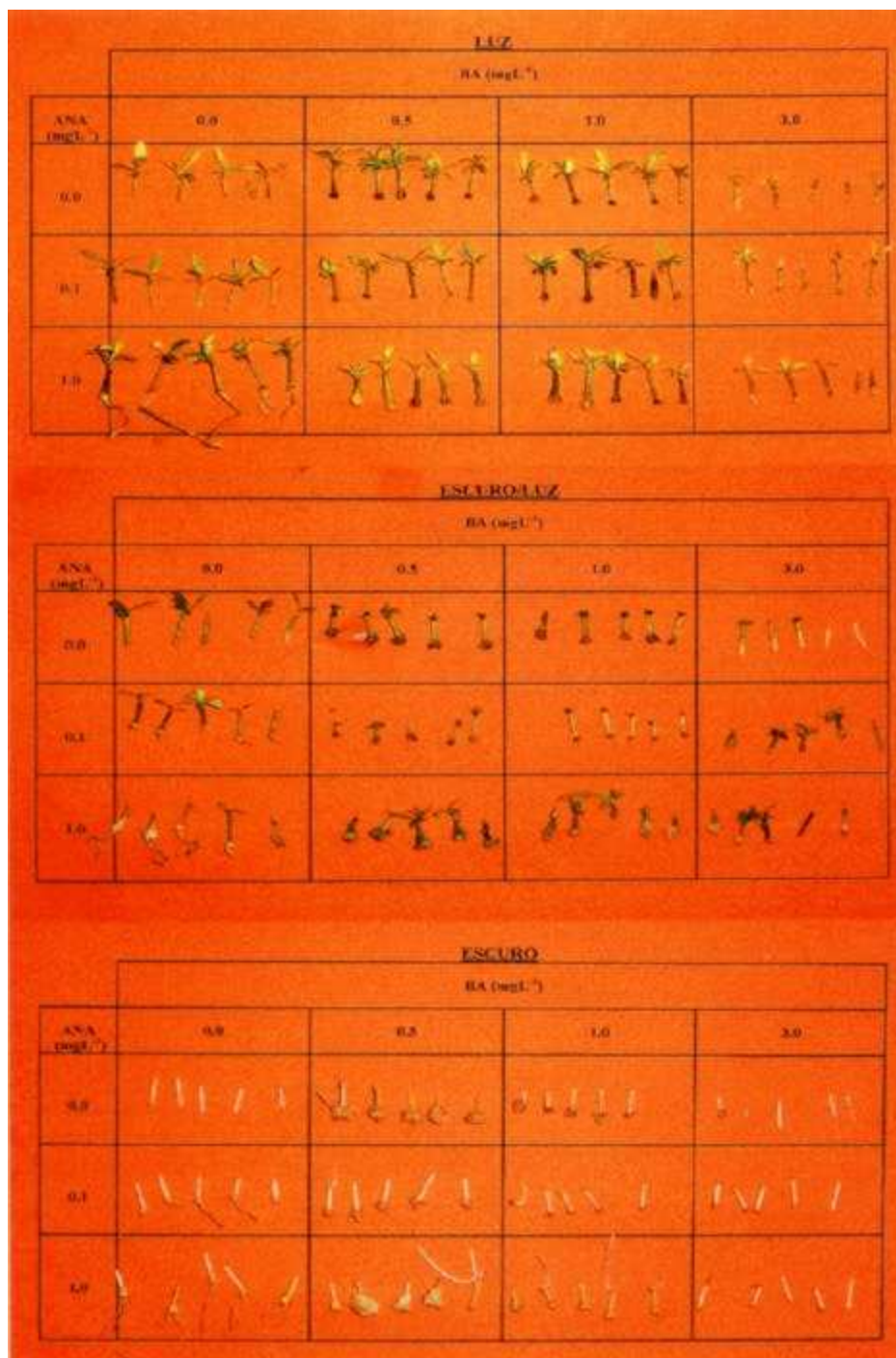
explantes incubados em luz, do que em explantes mantidos no escuro. Entretanto, diferem do trabalho realizado por Durán-Vila *et al.* (1989), os quais obtiveram para *Citrus sinensis* uma maior formação de gemas a partir de segmentos caulinares incubados no escuro. O que demonstra a variabilidade de respostas promovidas por distintas espécies cítricas referentes ao efeito da luz no processo organogênico, fato este comprovado por Bórdon (1997), ao trabalhar com diferentes espécies cítricas.

Nas condições deste experimento, não foi possível alcançar com clareza um gradiente para formação de gemas e de brotos. Entretanto, este fato pode ser visualizado de uma maneira sutil, nos explantes incubados sob condição de escuro/luz na presença de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em combinação com 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (gradiente de formação de gemas, Quadro 9) e nos explantes incubados sob condição de luz na presença de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em combinação com 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (gradiente de formação de gemas, Quadro 10). Em ambos gradientes, pode-se verificar, uma redução do número de estruturas formadas à medida que o segmento utilizado como explante se distanciava do nó cotiledonar.

Talvez, estudos posteriores empregando um maior número de repetições, objetivando um maior refinamento para as condições morfogênicas *in vitro*, possam evidenciar de modo mais claro este gradiente.

O gradiente existente para a capacidade organogênica foi investigado pela primeira vez no trabalho de Burger & Hackett (1986) em *Citrus sinensis*, sendo constatado tanto para explantes de epicótilo como para explantes de raiz, sempre que o meio permitiu uma eficiente organogênese. Trabalhos com *Poncirus trifoliata* (Hiramatsu *et al.*, 1987) e *Citrus mitis* (Sim *et al.*, 1989) também indicam a existência deste gradiente. Um trabalho posterior em *Citrus grandis* (Goh *et al.*, 1995) relata que o extremo proximal do epicótilo é mais sensível à inibição por concentrações elevadas de BAP sobre a regeneração de epicótilo. Burger & Hackett (1986) postularam que a organogênese é estimulada por substâncias promotoras presentes nos cotilédones, as quais seriam responsáveis pelo aumento do potencial morfogênico dos segmentos mais próximos a esses cotilédones.

Dias (1998), também constatou a presença deste gradiente organogênico em explantes de epicótilo de citrange 'Troyer', ao ensaiar distintas concentrações de ANA e BAP em diferentes condições de luz. De acordo com este autor, existem duas possíveis causas para a formação deste gradiente, a primeira, diz respeito ao transporte de alguma substância (de natureza diferente a dos reguladores de crescimento testados), desde os cotilédones até o ápice. E a segunda, seria uma causa do tipo epigenético, onde as células dos segmentos mais próximos ao ápice seriam menos capazes de responder aos estímulos que iniciam o processo de organogênese.



**FIGURA 9.** Processo organogênico em explantes de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob distintas condições lumínicas.

**QUADRO 9.** Médias referentes a sete repetições, para o número de gemas formadas no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’, nas distintas condições ensaiadas.

	ANA/BAP (mg L <sup>-1</sup> )	LUZ				ESCURO/LUZ				ESCURO			
		0,0	0,5	1,0	3,0	0,0	0,5	1,0	3,0	0,0	0,5	1,0	3,0
Explante 1	0,0	1,67	3,14	3,43	2,57	4,00	6,33	4,00	2,57	2,17	0,00	4,57	3,00
Explante 2	0,0	1,33	3,86	4,00	3,00	4,17	7,00	5,00	2,71	1,83	2,86	1,00	3,86
Explante 3	0,0	2,33	2,71	3,14	2,14	3,00	5,00	4,43	3,29	1,67	3,00	2,86	3,00
Explante 4	0,0	2,00	1,29	3,14	2,43	4,00	5,83	4,00	2,29	2,67	2,86	4,29	0,00
Explante 5	0,0	3,17	2,00	4,00	2,71	3,33	4,00	2,57	0,00	2,50	3,57	2,43	1,57
Explante 1	0,1	3,00	2,57	4,57	3,43	3,00	6,29	5,43	4,28	0,00	4,00	2,71	4,33
Explante 2	0,1	2,33	3,00	3,29	4,29	3,71	5,14	2,71	5,29	0,00	5,14	5,71	7,50
Explante 3	0,1	2,50	2,00	3,00	2,86	3,43	2,71	2,86	5,00	0,00	4,00	6,75	7,33
Explante 4	0,1	1,67	1,86	0,71	1,71	3,14	4,29	2,14	5,71	1,33	4,29	5,00	3,33
Explante 5	0,1	2,67	1,71	2,29	3,14	1,43	4,71	2,00	12,00	1,50	4,29	7,29	3,33
Explante 1	1,0	2,50	3,29	4,29	4,71	0,00	3,50	4,57	1,43	0,00	3,00	5,14	5,14
Explante 2	1,0	3,50	3,29	3,86	3,14	1,33	2,17	6,29	5,29	0,00	9,14	8,00	3,57
Explante 3	1,0	2,33	2,14	3,57	3,29	2,33	4,17	2,43	3,71	0,00	4,57	3,57	4,42
Explante 4	1,0	2,50	3,29	1,86	0,86	1,67	5,33	4,43	3,43	1,30	5,14	8,00	6,57
Explante 5	1,0	1,50	2,86	2,57	2,43	0,00	4,17	4,86	2,29	0,00	5,57	9,43	1,29

**QUADRO 10.** Médias referentes a sete repetições, para o número de brotos formados no extremo distal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’, nas distintas condições ensaiadas.

	ANA/BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	LUZ				ESCURO/LUZ				ESCURO			
		0,00	0,50	1,00	3,00	0,00	0,50	1,00	3,00	0,00	0,50	1,00	3,00
Explante 1	0,0	2,00	2,57	2,43	2,14	1,83	3,67	2,57	0,00	0,00	0,00	1,14	0,00
Explante 2	0,0	1,50	2,57	2,86	2,57	1,83	4,17	2,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Explante 3	0,0	1,67	3,00	2,57	1,57	1,00	2,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Explante 4	0,0	1,17	1,71	3,00	0,57	1,50	3,67	1,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Explante 5	0,0	1,83	2,43	4,00	2,29	1,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Explante 1	0,1	2,50	1,86	4,00	4,14	1,43	2,57	2,00	3,29	0,00	1,71	1,00	1,00
Explante 2	0,1	2,00	2,00	3,43	1,86	1,29	2,86	0,00	3,71	0,00	0,00	1,86	1,33
Explante 3	0,1	1,50	2,00	2,57	1,86	1,71	0,00	1,57	4,43	0,00	0,00	1,29	1,17
Explante 4	0,1	1,67	1,86	0,57	1,00	1,71	1,29	0,00	1,29	0,00	0,00	1,43	0,00
Explante 5	0,1	1,67	1,57	2,29	2,14	1,00	1,43	0,00	1,86	0,00	0,00	0,00	0,00
Explante 1	1,0	1,50	2,00	3,57	4,00	0,00	1,83	2,86	0,00	0,00	1,29	1,29	0,00
Explante 2	1,0	2,17	2,29	3,43	1,86	0,00	1,33	3,14	3,57	0,00	2,71	1,86	1,86
Explante 3	1,0	1,50	1,57	2,57	2,43	0,00	3,83	2,29	3,29	0,00	1,29	0,00	1,71
Explante 4	1,0	2,17	2,43	2,43	0,71	0,00	5,33	4,43	1,00	0,00	2,43	0,00	0,00
Explante 5	1,0	1,67	2,71	3,29	1,71	0,00	1,50	1,71	0,00	0,00	3,57	0,00	0,00

### **4. 2. 3. Formação de calos**

Não ocorreu formação de calos no extremo distal dos explantes, para nenhuma das condições ensaiadas neste estudo.

A **organogênese indireta** compreende três etapas sucessivas: formação de calo. Formação de gemas e brotações destas.

### **4. 2. 4. Formação de calos**

#### **4. 2. 4. 1. Condição de incubação:luz**

A ação isolada, tanto de ANA quanto de BAP, promoveu nos explantes 1, 3, 4 e 5 calos de maior tamanho no extremo proximal que a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo (Figura 10.A, C, D e E, respectivamente). Com relação ao explante 2 (Figura 10.B), este comportamento foi observado apenas para a presença de ANA, mesmo assim para concentrações de ANA próximas a 1,00 mg.L<sup>-1</sup>. A adição de BAP em concentrações próximas a 0,25 mg.L<sup>-1</sup> promoveu um menor que a ausência de reguladores de crescimento. Para o explante 2, o calo de maior tamanho foi obtido ao se utilizar a combinação entre ANA e BAP nas concentrações de 1,00 e 0,67 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para o explante 1 (Figura 10.A), percebe-se que as melhores respostas foram obtidas quando houve uma combinação entre ANA e BAP, nas concentrações entre 0,25 e 0,75 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 2,25 e 3,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

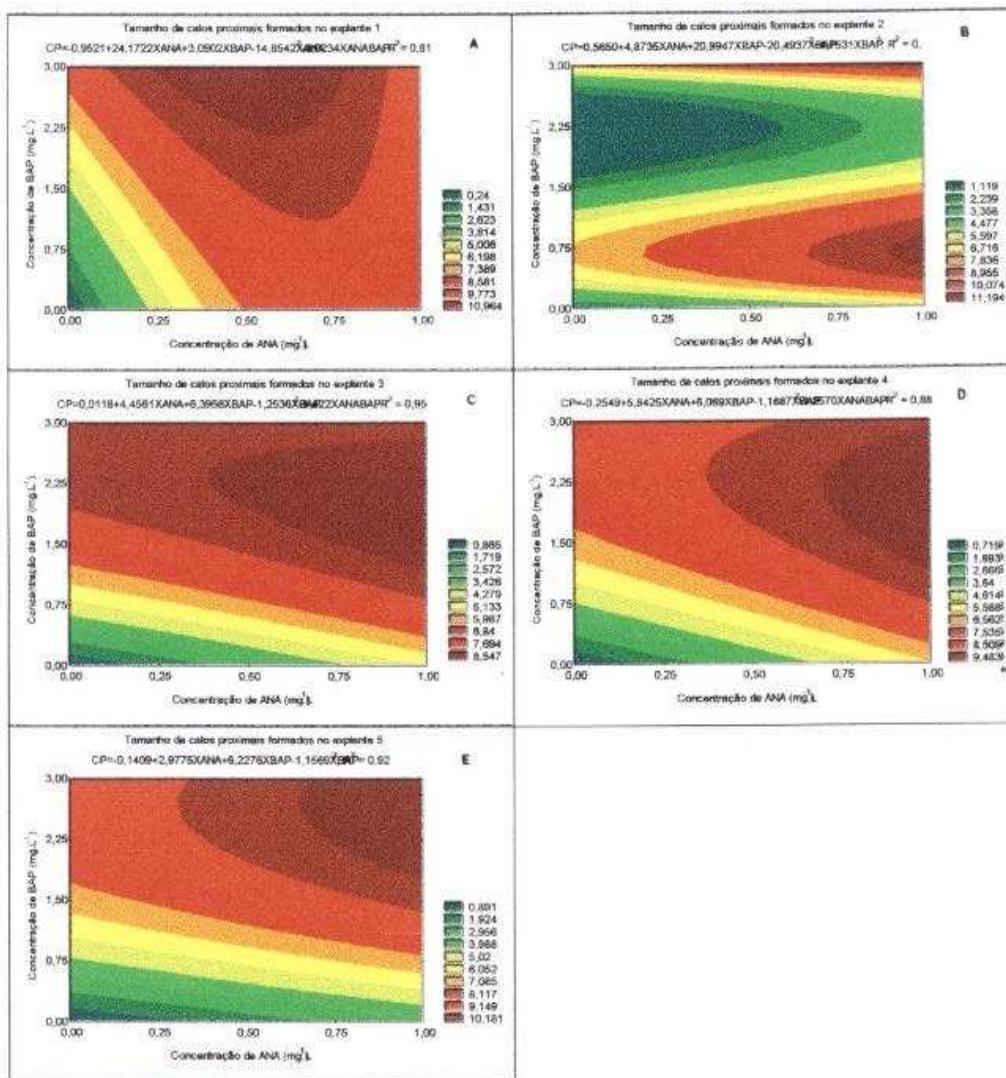
Os explantes 3, 4 e 5 apresentaram respostas similares, sendo os maiores calos obtidos ao se utilizar a combinação de ANA a 1,00 mg.L<sup>-1</sup> e BAP em concentrações entre 1,00 e 2,25 mg.L<sup>-1</sup> para os explantes 3 e 4 (Figura 10.C e D, respectivamente), e entre 2,70 e 3,00 mg.L<sup>-1</sup> para o explante 5 (Figura 10.E).

#### **4. 2. 4. 2. Condição de incubação: escuro/luz**

A adição de apenas BAP ao meio de cultivo, para todos os explantes, promoveu respostas iguais ou inferiores às obtidas na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo, entretanto seu efeito combinado ao do ANA induziu a formação de calos (Figura 11).

Para o explante 1 (Figura 11.A), embora a combinação entre os reguladores de crescimento tenha sido eficiente, a resposta obtida foi similar a encontrada quando apenas ANA foi adicionado ao meio na concentração de 0,62 mg.L<sup>-1</sup>.

Com relação aos demais explantes, a combinação de aproximadamente 0,70 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1,50 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, foi a que resultou na formação de calos de maior tamanho (Figura 11.B, C, D e E).



**FIGURA 10.** Média para tamanho (mm<sup>2</sup>) de calo formado no extremo proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em luz.

#### 4. 2. 4. 3. Condição de incubação: escuro

O tamanho de calo para todos os explantes incubados sob esta condição foi afetado pela adição de ANA e/ou BAP ao meio de cultivo (Figura 12). Similar a condição de incubação escuro/luz, a adição de apenas BAP ao meio de cultivo promoveu respostas iguais ou inferiores às obtidas na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo, entretanto seu efeito combinado ao do ANA induziu a formação de calos.

No explante 1 (Figura 12.A), a formação do maior calo ocorreu ao se adicionar ao meio de cultivo 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 0,51 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Para os explantes 2, 3 e 5 também a combinação entre ANA e BAP foi a responsável pela formação de calos de maior tamanho, entretanto, as concentrações requeridas

dos reguladores de crescimento foram distintas, sendo para o explante 2, ANA a  $0,74 \text{ mg.L}^{-1}$  + BAP a  $0,74 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 12.B); para o explante 3, ANA a  $0,63 \text{ mg.L}^{-1}$  + BAP a  $1,40 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 12.C); e para o explante 5, ANA a  $0,70 \text{ mg.L}^{-1}$ + BAP a  $0,56 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 12.E).

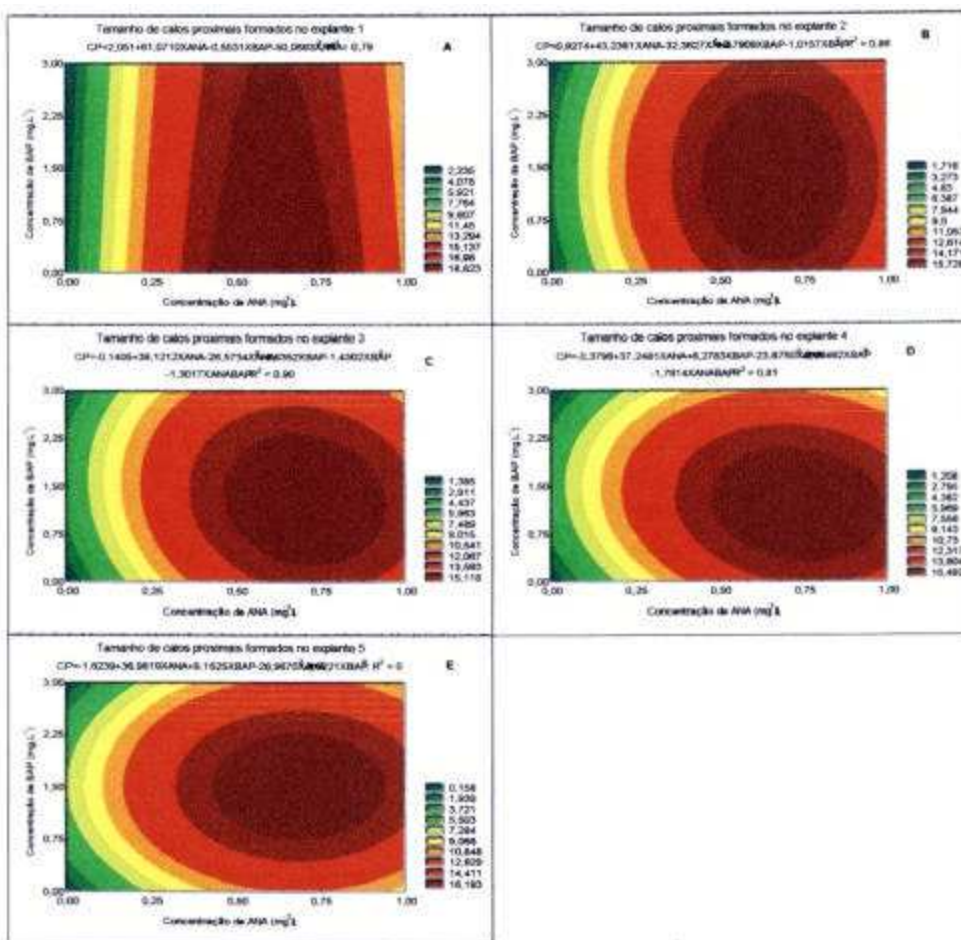


FIGURA 11. Média para tamanho ( $\text{mm}^2$ ) de calo formado no extremo proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro/luz.



a incubação ocorreu no escuro. A incubação em escuro/luz apresentou valores intermediários. Para estas duas condições de incubação é interessante verificar, que na ausência de auxinas, a formação do calo foi induzida apenas quando se usou uma concentração específica ótima de BAP (1,00 mg.L<sup>-1</sup>). Já na condição de luz, o tamanho do calo aumentou com o aumento da concentração desta citocinina.

Em nenhum dos tratamentos ensaiados (Quadro 11), nas diferentes condições de incubação (luz, escuro/luz e escuro), se estabeleceu claramente um gradiente para a formação de calo do primeiro ao quinto segmento de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’.

Para se precisar a origem do calo são necessários estudos histológicos. Grinblat (1972) ao realizar estes estudos, em explantes partidos horizontalmente de *Calamodium* (*Citrus madurensis*), descreve o calo como uma extensão de camadas do córtex, o que discorda do estudo realizado por Dias (1998). Segundo este autor, em estudos realizados com citrange ‘Troyer’, o calo origina-se a partir da divisão de células parenquimáticas da medula do explante, quando este é incubado horizontalmente no meio de cultivo, e a divisão de células da medula e do córtex do explante, quando este é incubado verticalmente.

Neste estudo se demonstra que a formação do calo depende tanto da presença de BAP no meio de cultivo, quanto da presença de ANA. A observação sobre a exigência de BAP coincide com o observado em citrange ‘Troyer’ (Barlass & Skene, 1982; Dias, 1998); citrange ‘Carrizo’ (Moore, 1986); *Citrus reticulata* (Gill *et al.*, 1995) e *Citrus sinensis* (Maggon & Singh, 1995). Já com relação ao requerimento de ANA, este também é detectado em trabalhos realizados com diferentes espécies cítricas como tangerineira ‘Cleópatra’ e *Citrus aurantium* L. (Moore, 1986) e tangerineira ‘Comuna’(Gill *et al.*, 1995). O efeito da auxina depende criticamente, nos estudos destes autores, do nível de citocininas, não sendo imprescindível, em alguns casos.

O estímulo do desenvolvimento do calo em incubação no escuro tem se manifestado em diversas espécies cítricas (Raj-Bhansali & Rya, 1987; Durán-Vila *et al.*, 1989, 1992) e é prática geral para se conseguir tecido desorganizado destinado ao cultivo em suspensão.

#### **4. 2. 5. Formação de gemas**

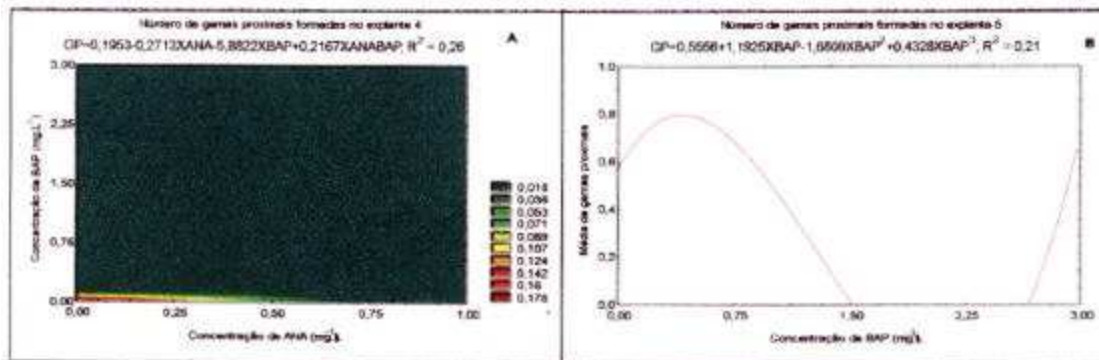
##### **4. 2. 5. 1. Condição de incubação: luz**

Os explantes incubados sob condição luz não apresentaram respostas positivas à presença de ANA e apenas o explante 5 (o mais distante do nó cotiledonar) apresentou resposta positiva à presença de BAP, sendo a concentração de 0,42mg.L<sup>-1</sup> desta citocinina a mais efetiva no processo de formação de gemas (Figura 13.B).

**QUADRO 11.** Médias referentes a sete repetições, para o tamanho (mm<sup>2</sup>) de calos formados no extremo proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’, nas distintas condições ensaiadas.

	ANA/BAP (mg L <sup>-1</sup> )	LUZ				ESCURO/LUZ				ESCURO			
		0,0	0,5	1,0	3,0	0,0	0,5	1,0	3,0	0,0	0,5	1,0	3,0
Explante 1	0,0	0,00	1,71	7,29	8,71	0,00	0,00	3,43	2,29	0,00	0,00	8,29	3,71
Explante 2	0,0	0,00	2,43	4,71	6,57	0,00	0,00	5,14	0,00	0,00	0,00	6,57	0,00
Explante 3	0,0	0,00	2,14	4,71	7,43	0,00	0,00	4,86	1,29	0,00	0,00	6,57	0,00
Explante 4	0,0	0,00	1,14	4,00	8,86	0,00	0,00	4,71	0,00	0,00	0,00	5,71	0,00
Explante 5	0,0	0,00	0,86	4,29	8,86	0,00	0,00	3,71	0,00	0,00	0,00	5,29	0,00
Explante 1	0,1	0,00	5,57	8,71	11,14	11,14	6,00	5,71	5,29	8,33	7,71	7,14	5,33
Explante 2	0,1	0,00	5,71	6,57	7,86	7,14	6,43	5,00	3,29	7,17	6,86	5,29	4,67
Explante 3	0,1	0,00	4,29	6,43	8,29	5,57	6,14	3,86	4,57	5,67	7,29	5,00	4,00
Explante 4	0,1	0,00	5,29	4,86	5,86	6,43	5,14	4,29	2,86	6,17	8,43	4,00	4,17
Explante 5	0,1	0,00	4,00	5,71	8,86	5,57	4,86	4,00	3,00	6,17	7,86	4,00	4,33
Explante 1	1,0	8,67	11,43	11,43	9,86	9,83	17,50	12,71	9,71	17,83	37,57	13,00	9,71
Explante 2	1,0	3,67	13,43	8,14	9,86	9,67	16,67	11,57	11,43	11,50	26,57	13,00	6,00
Explante 3	1,0	4,50	7,43	7,00	8,29	10,17	16,17	15,00	9,14	6,17	18,86	9,86	6,29
Explante 4	1,0	4,67	9,14	8,57	9,43	8,17	20,17	15,71	7,00	8,33	18,56	14,71	5,14
Explante 5	1,0	2,33	7,71	7,29	10,00	2,17	17,17	18,00	6,43	8,17	23,14	13,00	5,86

Os explantes 1, 2 e 3 não apresentaram resposta a nenhum dos dois reguladores de crescimento, nas concentrações testadas e nem à interação entre estes ( $\hat{GP} = G\bar{P} = 0,10$ , para o explante 1;  $\hat{GP} = G\bar{P} = 0,06$ , para o explante 2 e  $\hat{GP} = G\bar{P} = 0,01$ , para o explante 3) e para o explante 4 (Figura 13.A), a ausência de reguladores no meio de cultivo proporcionou a maior formação de gemas.

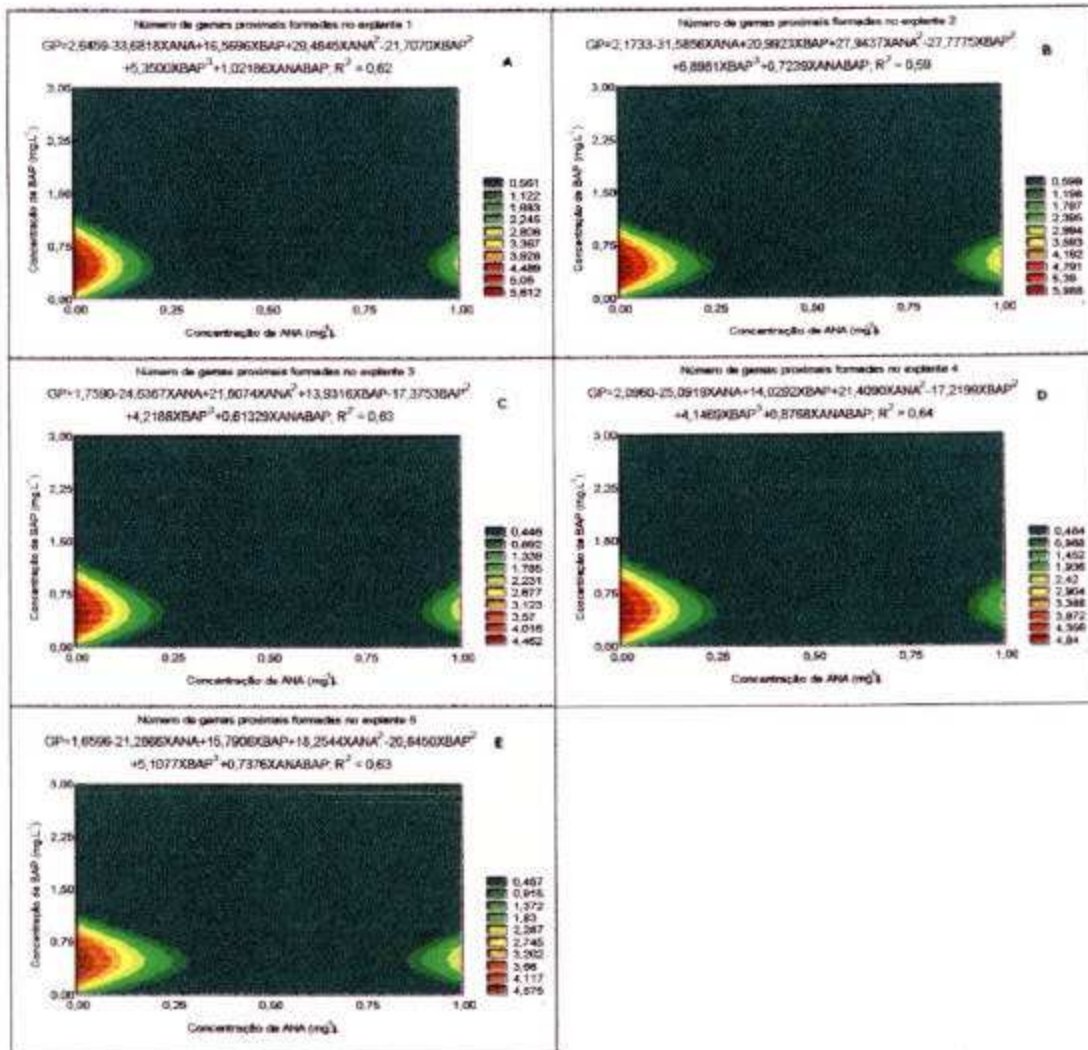


**FIGURA 13.** Média de gemas formadas no extremo proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleápatra’ sob incubação em luz.

#### 4.2.5.2. Condição de incubação: escuro/luz

Para a condição de incubação escuro/luz, os explantes apresentaram respostas similares (Figura 14). A ação isolada de ANA promoveu respostas inferiores as obtidas na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo.

Apesar das combinações entre ANA a  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$  e BAP em concentrações baixas (entre  $0,25$  e  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ , aproximadamente), propiciarem maior formação de gemas que a ausência de reguladores de crescimento, estes valores são inferiores aos obtidos pela ação isolada de BAP nas concentrações que promoveram os melhores resultados. De uma forma geral todos os explantes apresentaram maior formação de gemas quando utilizou-se BAP em concentrações próximas a  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo  $0,46 \text{ mg.L}^{-1}$  para os explantes 1 e 5 (Figura 14.A e E, respectivamente);  $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$  para o explante 2 (Figura 14.B);  $0,49 \text{ mg.L}^{-1}$  para o explante 3 (Figura 14.C); e  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  para o explante 4 (Figura 14.D).

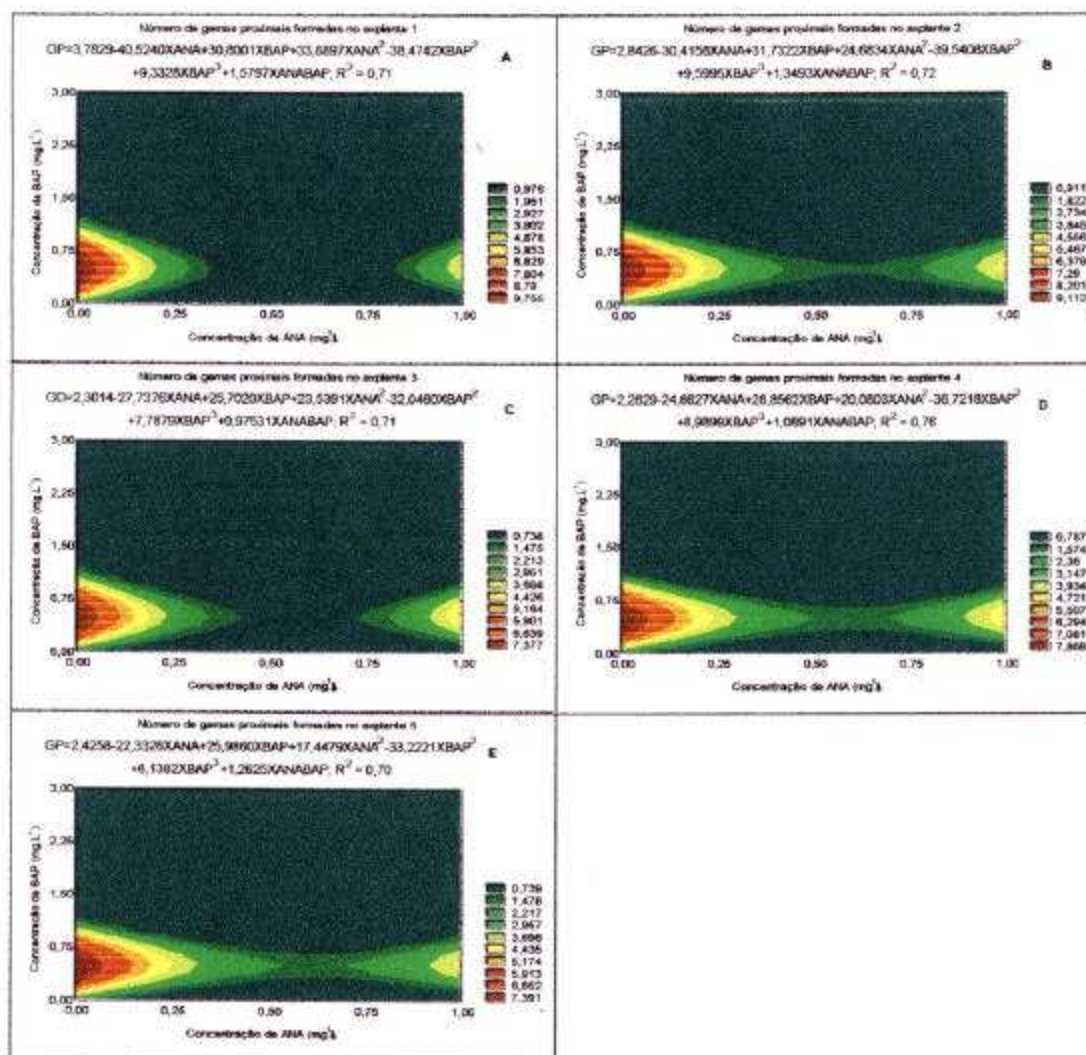


**FIGURA 14.** Média de gemas formadas no extremo proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro/luz.

#### 4. 2. 5. 3. Condição de incubação: escuro

Os cinco explantes incubados sob a condição de escuro (Figura 15) apresentaram resultados semelhantes, os quais coincidem, em grande parte, com os resultados apresentados para a condição de escuro/luz (Figura 14). Novamente a adição de ANA promoveu respostas inferiores as obtidas na ausência de reguladores de crescimento.

Para todos os explantes um maior número de gemas foi obtido ao se adicionar 0,49 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 15). A combinação entre ANA e BAP apesar de apresentar resposta positiva em alguns casos (ANA a 1,00 mg.L<sup>-1</sup> e BAP a aproximadamente 0,50 mg.L<sup>-1</sup>), sempre promoveu resultado inferior a melhor concentração de BAP.



**FIGURA 15.** Média de gemas formadas no extremo proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’ sob incubação em escuro.

Pode se visualizar, a partir do Quadro 12, que os explantes incubados sob condição de luz não formaram gemas na presença de ANA e/ou BAP, nas concentrações ensaiadas neste estudo, o que sugere um possível efeito inibidor destes reguladores de crescimento nesta condição de incubação.

No quadro 12, também pode ser verificado que dentre as condições de incubação testadas, a mais eficiente na formação de gemas proximais foi a condição escuro, sendo esta apenas um pouco superior à condição escuro/luz.

**QUADRO 12.** Médias referentes a sete repetições, para o número de gemas formadas no extremo

proximal de segmentos de epicótilo de tangerineira ‘Cleópatra’, nas distintas condições ensaiadas.

	ANA/BAP (mg L <sup>-1</sup> )	LUZ				ESCURO/LUZ				ESCURO			
		0,0	0,5	1,0	3,0	0,0	0,5	1,0	3,0	0,0	0,5	1,0	3,0
Explante 1	0,0	0,33	0,57	0,00	0,00	0,66	10,26	2,23	0,00	1,00	16,14	4,43	0,29
Explante 2	0,0	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	11,33	1,00	0,14	0,00	14,86	4,33	0,00
Explante 3	0,0	0,16	0,16	0,00	0,00	0,00	8,00	2,67	0,00	0,00	10,50	2,50	0,17
Explante 4	0,0	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	8,33	2,83	0,00	0,00	11,17	3,33	0,00
Explante 5	0,0	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	8,17	1,50	0,00	0,00	11,83	3,00	0,33
Explante 1	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,57	2,14	0,00	0,00	5,57	2,14	0,00
Explante 2	0,1	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	1,14	0,14	0,00	0,00	5,67	2,17	0,00
Explante 3	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,17	0,00	0,00	4,67	0,83	0,00
Explante 4	0,1	0,00	0,00	0,33	0,00	14,00	2,00	0,50	0,17	0,33	5,50	0,42	0,00
Explante 5	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67	0,17	0,17	0,00	0,33	1,14	0,00
Explante 1	1,0	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,50	0,00	0,42	0,00	1,00	1,14	0,29
Explante 2	1,0	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,17	0,00	0,00	0,17	1,17	1,16	0,00
Explante 3	1,0	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	1,50	1,67	0,17
Explante 4	1,0	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,67	0,33	0,00	1,50	0,67	0,00
Explante 5	1,0	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,50	0,00	0,50	0,00	0,33	0,67	0,33

A formação de gemas no extremo proximal dos explantes incubados sob condição escuro/luz, ocorreu quando ao meio de cultivo foi adicionado BAP nas concentrações de 0,50 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> e quando estas concentrações foram combinadas a 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Para os explantes incubados no escuro, a formação de gemas ocorreu ao se adicionar BAP nas concentrações de 0,50 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> e quando estas concentrações foram combinadas a 0,10 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, sendo que o maior número de gemas proximais foi obtido na concentração de 0,50 mg.L<sup>-1</sup>.

Não foi possível constatar com nitidez a formação de um gradiente organogênico em nenhum dos tratamentos ensaiados nas diferentes condições de incubação (luz, escuro/luz e escuro).

#### **4. 2. 6. Desenvolvimento de botos**

No Quadro 13, estão apresentadas as médias para os cinco explantes, referentes a todos os tratamentos, para a característica brotos formados no extremo proximal, nas diferentes condições de incubação ensaiadas (luz, escuro/luz e escuro).

Em praticamente todos os tratamentos e condições de incubação ensaiadas neste estudo, não ocorreu brotação no extremo proximal. Apenas quando os explantes foram incubados no escuro, nos tratamentos constituídos pela concentração de 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e na combinação desta concentração com 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, houve formação de brotos neste extremo, para todos os explantes. É importante verificar ainda, que para estes dois meios de cultivo, não se estabeleceu um gradiente do primeiro ao quinto segmento de epicótilo, com relação à capacidade de formação de brotos.

No presente estudo a formação de gemas e brotos no extremo proximal foi estritamente dependente da presença de BAP no meio organogênico, concordando em parte com o descrito por Dias (1998), o qual assinala não só a necessidade da presença de BAP no meio de cultivo, como também de baixas concentrações de ANA (0,10 mg.L<sup>-1</sup>).

Um efeito inibidor de concentrações elevadas de BAP sobre a regeneração de gemas e brotos, e sobre o vigor dos brotos formados têm sido verificado em diferentes trabalhos com distintas espécies cítricas (Moore, 1986; Sim *et al.*, 1989; Goh *et al.*, 1995), o qual também foi constatado neste trabalho, uma vez que concentrações de BAP superiores a 0,50 mg.L<sup>-1</sup> promoveram respostas iguais ou inferiores a ausência de reguladores no meio de cultivo.

Apesar das necessidades requeridas, quanto à natureza do regulador de crescimento e da concentração destes, variarem em cada etapa da organogênese indireta, a incubação dos explantes sob condição escuro foi a mais eficiente para todas as etapas (Quadro 11, página 65; Quadro 12, página 69; Quadro 13, página 71).



#### 4. 3. Efeito do ácido naftaleno-acético, ácido indolbutírico e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) no processo de enraizamento de ápices de plântulas

A partir do Quadro 14, pode-se observar que a presença de auxinas favoreceu o processo de enraizamento para a maioria das condições ensaiadas. A menor resposta para este processo foi verificada, quando se combinou concentrações de ANA, AIB e 2,4D, respectivamente, 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 0,4 mg.L<sup>-1</sup>. De acordo Gaspar *et al.* (1996), as auxinas exercem forte influência sobre os processos de expansão do crescimento celular, acidificação da parede celular, iniciação da divisão celular e organização dos meristemas, originando tecidos não organizados (calos) ou órgãos definidos (geralmente raízes) e promovendo a diferenciação celular. Haissig (1973), reporta que as auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam, consistentemente, a formação de primórdios radiculares, pelo menos em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento.

A concentração de ANA a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e a combinação de ANA e AIB na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, para ambas auxinas, constituem os protocolos mais utilizados para a obtenção de enraizamento em diferentes explantes. Alguns autores como Kitto & Young (1981) e Bhat *et al.* (1992), também citam a adição de AIA ao meio de cultivo em diferentes concentrações como sendo eficiente no processo de enraizamento, entretanto, na literatura pesquisada não foi encontrada nenhuma referência à utilização de 2,4D com este objetivo.

Percebe-se, também, a partir da revisão de literatura, que para muitos casos ocorre uma inconsistência em relação aos resultados ao se trabalhar com uma mesma espécie em diferentes laboratórios. Por exemplo, Singh *et al.*, (1994) indicam a necessidade de uma combinação muito específica de reguladores de crescimento, a qual inclui BAP, ANA e AIB para se obter o enraizamento em *Citrus reticulata*, enquanto Pérez-Molph-Bach & Ochoa-Alejo (1997), conseguem obter enraizamento de ápices desta espécie em concentrações de ANA ou AIB a 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>.

No presente estudo, a adição de ANA ao meio basal, apresentou um efeito positivo na formação de raízes e de calos para todas as concentrações ensaiadas. A concentração mais elevada desta auxina (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) foi a responsável pelo maior número de ápices enraizados e maior número de raízes por plântulas, quando comparada com as concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, percebe-se uma relação inversa entre o número de raízes formadas e o comprimento médio destas. Para a concentração de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> desta auxina, o comprimento médio de raízes foi igual a 1,58 cm, o que não é satisfatório, uma vez que o comprimento mínimo das raízes deve ser, segundo Li (1997) e Dias (1998) de no mínimo 2,5 a 3,0 cm para que a posterior aclimação das plântulas ocorra de forma satisfatória. Nas concentrações mais baixas ensaiadas desta auxina (0,5 e 1,0 mg.L), o comprimento médio das raízes satisfaz às exigências, quanto à posterior aclimação das

**QUADRO 14.** Influência do meio de regeneração no enraizamento de ápices de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' regeneradas n vitro. Médias referentes a dez repetições.

Meio basal + Auxinas (mg L <sup>-1</sup> )			Proporção de ápices enraizados	Número médio de raízes por plântula	Comprimento médio de raízes (cm)	Proporção de ápices com caílos	Vigor médio das plântulas
ANA	AIB	2,4D					
0,00	0,50	0,00	4/10 (40%)	1,00	2,30	0/10 (0%)	2,20
0,00	1,00	0,00	6/10 (60%)	1,17	4,48	0/10 (0%)	1,80
0,00	1,50	0,00	10/10 (100%)	1,25	2,69	0/10 (0%)	1,30
0,50	0,00	0,00	9/10 (90%)	3,33	3,06	9/10 (90%)	2,00
1,00	0,00	0,00	8/10 (80%)	6,87	2,50	8/10 (80%)	2,00
1,50	0,00	0,00	10/10 (100%)	7,10	1,58	10/10 (100%)	2,00
0,50	0,50	0,00	10/10 (100%)	3,40	3,00	10/10 (100%)	2,00
0,50	0,50	0,20	8/10 (80%)	4,12	0,35	10/10 (100%)	2,00
0,50	0,50	0,40	1/10 (10%)	3,00	0,2	10/10 (100%)	2,00
0,00	0,00	0,00	2/10 (20%)	1,00	4,5	0/10 (0%)	1,70

plântulas e, apesar do número de ápices enraizados e raízes formadas por plântulas serem menores que os obtidos para a concentração mais elevada, as plântulas apresentaram-se vigorosas, o que faz com que estas concentrações sejam mais indicadas para o enraizamento. No entanto, o uso da concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , apresenta-se mais vantajoso não só pela redução de custos, mas também porque esta apresentou valores médios superiores para ápices enraizados e para o comprimento médio de raízes, quando comparada à concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . O aumento da concentração utilizada de ANA interagiu de forma positiva na formação de calos, ou seja, a medida que a concentração aumentou, também ocorreu aumento da formação destes. A desvantagem da formação de calo no processo de enraizamento será discutida posteriormente.

Como ocorrido com ANA, a adição de AIB ao meio basal, induziu maior resposta ao processo de enraizamento de ápices. A presença no meio de regeneração de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  desta auxina proporcionou maior média para ápices enraizados e para número médio de raízes por plântula, embora o comprimento médio de raízes (2,69 cm) tenha sido inferior ao produzido pela concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  deste regulador de crescimento (4,48 cm). Apesar do número de ápices enraizados e do número de raízes por plântulas aumentar à medida que a concentração desta auxina aumentou, o vigor das plântulas reagiu de forma inversamente proporcional, e ao contrário de todos os demais tratamentos ensaiados neste trabalho, nos meios de cultivo, onde se adicionou exclusivamente AIB não houve formação de calo na base dos explantes.

Com relação à combinação de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB, esta apresentou resultados superiores para o número de ápices enraizados, número médio de raízes por plântula, comprimento médio de raízes e ápices com formação de calos quando comparada à ação isolada de AIB para esta mesma concentração. Entretanto, no que se refere ao vigor das plântulas, a superioridade desta combinação não foi observada, sendo o resultado apresentado (2,0) ligeiramente inferior ao apresentado pela ação isolada de AIB (2,2). Comparando-se os resultados obtidos para a combinação ANA + AIB ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , para ambos), ao efeito isolado de ANA a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , também se pode perceber, em geral, uma resposta ligeiramente superior da combinação dessas auxinas com relação ao número de ápices enraizados, número médio de raízes por plântula, e ápices com formação de calos, enquanto o vigor apresentado pelas plântulas para ambos os tratamentos foi semelhante, indicando que o efeito isolado de ANA a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  também satisfaz às necessidades exigidas para que ocorra enraizamento satisfatório dos ápices de plântulas estioladas de tangerineira 'Cleópatra' formadas *in vitro*.

Os resultados obtidos neste trabalho concordam em parte com os apresentados por Dias (1998), para o enraizamento de ápices regenerados *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo de citrange 'Troyer'. Segundo este autor, a adição ao meio de cultivo (MS) da combinação de ANA e AIB, na concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  para ambas auxinas ou de ANA na concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  promoveu enraizamento satisfatório. Starrantino & Caruso (1987) também obtiveram uma formação satisfatória de raízes ao adicionarem ao meio basal (MS) a concentração de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$

de ANA, ao estudarem o processo de enraizamento em brotações formadas a partir de segmentos nodais de hastes de plantas crescidas *in vitro* de diferentes porta-enxertos cítricos (citrange 'Troyer' e 'Carrizo', 'Flying Dragon' e um mutante ananicante de citrange 'Troyer').

No presente estudo, com a adição de 2,4D à combinação ANA + AIB ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , para ambas auxinas) pode-se verificar que a presença de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4D aumentou o nível de resposta para número médio de raízes por plântula, passando de 3,40 para 4,12. Entretanto, para número de ápices enraizados e comprimento de raízes por plântulas, a presença de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4D inibiu o processo. A inibição para os citados parâmetros foi claramente superior, ao incorporar  $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$  desta auxina ao meio já combinando de AIB e ANA a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Isto demonstra, portanto, que o 2,4D, nas condições ensaiadas, apresentou efeito negativo sob processo de enraizamento de ápices.

A formação de um calo compacto e achatado na base dos ápices dependeu diretamente da presença e do tipo de auxina adicionada ao meio de cultivo. A presença de ANA no meio de cultivo interagiu positivamente na formação de calos, sugerindo, desta forma, uma possível organogênese indireta no processo de formação das raízes, o que poderia constituir uma desvantagem ao processo de enraizamento, pois nas plântulas que apresentavam calos pode ser observado um amarelecimento em algumas folhas, o que pode, talvez, ser explicado, devido a uma deficiência nutricional, motivada pela possível organogênese indireta, através da qual, os primórdios radiculares se formavam a partir do calo, não estando desta forma, o sistema vascular da raiz conectado diretamente ao sistema vascular do ápice o que pode ter causado uma absorção apenas passiva de nutrientes.

A presença de 2,4D também influenciou a formação de calos. Os ápices que se encontravam em meios de cultivo onde este regulador de crescimento estava presente, foram os primeiros a apresentar esta estrutura e também foram os que mais demoraram a apresentar raízes, as quais só começaram a ser visualizadas após vinte dias de incubação, contrastando com os demais tratamentos ensaiados, onde as raízes puderam ser visualizadas em média dez dias após a incubação dos ápices. Este estímulo à formação de calos promovido pelo 2,4D, concorda com a descrição feita para esta auxina por Assis & Teixeira (1998), os quais a descrevem como uma potente indutora do enraizamento para certas espécies, apresentando, entretanto, como desvantagem o fato de inibir o desenvolvimento das partes aéreas e estimular a formação de calos.

Também é importante ressaltar, que nos meios de cultivo onde foram adicionados ANA e 2,4D, as raízes formadas apresentaram uma espessura mais grossa que as formadas nos meios onde os reguladores de crescimento estavam ausentes ou nos meios onde foi adicionado apenas AIB.

## **5.CONCLUSÕES**

- O melhor protocolo para a obtenção de maior número de plântulas axênicas, normais e vigorosas foi estabelecido, quando se desinfestou sementes intactas (primeira desinfestação) por trinta minutos em solução de ácido hipocloroso 0,5% v/v, seguido da retirada do tegumento externo das sementes (testa), quando, então, estas foram submetidas à Segunda desinfestação, que consistiu na imersão das sementes em ácido hipocloroso a 1,0% por cinco minutos.
- O processo de morfogênese no segmento de epicótilo ocorreu tanto por um processo de organogênese direta, mediante a diferenciação de gemas a partir de um meristema pré-existente (câmbio vascular), como por um processo de organogênese indireta, mediante a formação de nódulos meristemáticos.
- No extremo apical dos explantes, o qual não encontra-se em contato com o meio de cultivo, formaram-se gemas a partir do câmbio por um processo de organogênese direta, e no extremo proximal dos explantes, ocorreu a formação de um calo organogênico, a partir do qual se formaram nódulos meristemáticos que deram origem a gemas e brotos (organogênese indireta).
- Na organogênese direta, a diferenciação de gemas não necessitou do aporte de reguladores de crescimento, entretanto, esta foi significativamente aumentada ao se adicionar BAP ao meio organogênico ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) na condição de incubação escuro/luz, a qual foi a mais efetiva para este processo, o que proporcionou a obtenção de 25,75 gemas distais por plântula. Para o processo de brotação, as melhores respostas foram obtidas ao se adicionar ao meio de cultivo  $1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, quando os explantes encontravam-se sob incubação em luz, totalizando aproximadamente 9,45 brotos distais por plântula.
- Para a organogênese indireta, a incubação dos explantes no escuro foi a mais efetiva em todas as etapas, entretanto, as necessidades requeridas, quanto à natureza do regulador de crescimento e da concentração destes, variaram. Para o processo calogênico foram necessárias combinações específicas entre ANA e BAP, para cada explante, enquanto, para a formação de gemas e brotos a adição de  $0,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP ao meio de cultivo promoveu de uma forma geral os melhores resultados, sendo desta forma possível a obtenção de aproximadamente 40,65 gemas proximais a partir de uma plântula.

- Para a obtenção de enraizamento de ápices de plântulas estioladas de tangerineira 'Cleópatra' formadas *in vitro*, a adição ao meio basal, tanto da combinação de AIB e ANA a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , quanto de apenas ANA na concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , podem ser recomendadas, devido ao efeito positivo proporcionado por estas a este processo.

## **6.APÊNDICE**

**Apêndice 1.** Análise de variância para a formação de gemas no extremo distal dos segmentos de epicótilo de tangerineira 'Cleópatra'.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		luz	Escuro/Luz	Escuro
ANA	2	2,6595 <sup>ns</sup>	21,3071 <sup>ns</sup>	107,7452 <sup>**</sup>
BA	3	13,1519 <sup>ns</sup>	82,7746 <sup>*</sup>	276,3968 <sup>**</sup>
ANA x BA	6	3,8944 <sup>ns</sup>	48,6627 <sup>*</sup>	62,3040 <sup>**</sup>
Erro A	216	6,5611	21,2270	16,6825
Posição do explante	4	24,771 <sup>**</sup>	26,6155 <sup>*</sup>	18,5595 <sup>ns</sup>
Rep x posição do expl	30	3,9190	11,3532	6,1103
ANA x posição do expl	8	3,4303 <sup>ns</sup>	7,9440 <sup>ns</sup>	11,2095 <sup>ns</sup>
BA x posição do expl	12	3,0603 <sup>ns</sup>	7,5456 <sup>ns</sup>	24,7659 <sup>**</sup>
ANA x BA x posição do expl	24	3,5859 <sup>ns</sup>	7,2361 <sup>ns</sup>	13,7801 <sup>*</sup>
Erro B	258	3,0942	9,3518	22,3279

\*\* , \* , <sup>ns</sup> efeitos significativos a 1% e 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente.

**Apêndice 2.** Análise de variância para o desenvolvimento de brotos no extremo distal dos segmentos de epicótilo de tangerineira 'Cleópatra'.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		luz	Escuro/Luz	Escuro
ANA	2	1,03095 <sup>ns</sup>	1,9595 <sup>ns</sup>	26,0024 <sup>**</sup>
BA	3	21,8190 <sup>*</sup>	48,4468 <sup>**</sup>	21,4500 <sup>**</sup>
ANA x BA	6	2,1643 <sup>ns</sup>	47,6611 <sup>**</sup>	8,3071 <sup>*</sup>
Erro A	216	6,2286	6,7040	3,7206
Posição do explante	4	14,6274 <sup>**</sup>	14,2345 <sup>*</sup>	2,9250 <sup>ns</sup>
Rep x posição do expl	30	2,7706	5,3008	1,8778
ANA x posição do expl	8	2,7809 <sup>*</sup>	9,7452 <sup>*</sup>	1,7018 <sup>ns</sup>
BA x posição do expl	12	3,9480 <sup>**</sup>	6,3377 <sup>ns</sup>	2,0313 <sup>ns</sup>
ANA x BA x posição do expl	24	2,3706 <sup>ns</sup>	4,7008 <sup>ns</sup>	2,2962 <sup>ns</sup>
Erro B	258	1,8289	4,9070	1,4887

\*\* , \* , <sup>ns</sup> efeitos significativos a 1% e 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente.

**Apêndice 3.** Análise de variância para o tamanho ( $\text{mm}^2$ ) de calos formados no extremo proximal dos segmentos de epicótilo de tangerineira 'Cleópatra'.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		luz	Escuro/Luz	Escuro
ANA	2	740,6167**	4237,6167**	5047,0309**
BA	3	925,9833**	322,1397**	938,5492**
ANA x BA	6	81,8452*	324,4230**	845,6659**
Erro A	216	27,4825	17,9500	80,9143
EXPL	4	62,9131**	26,9726*	217,2381**
Rep x posição do expl	30	12,1476	7,5611	44,1404
ANA x EXPL	8	12,5184 <sup>ns</sup>	10,2923 <sup>ns</sup>	82,7809*
BA x EXPL	12	13,4099 <sup>ns</sup>	21,4869**	14,6682 <sup>ns</sup>
ANA x BA x EXPL	24	8,2748 <sup>ns</sup>	20,0232**	39,0944 <sup>ns</sup>
Erro B	258	8,2103	8,5013	36,0895

\*\* , \* , <sup>ns</sup> efeitos significativos a 1% e 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente.

**Apêndice 4.** Análise de variância para a formação de gemas no extremo proximal dos segmentos de epicótilo de tangerineira 'Cleópatra'.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		luz	Escuro/Luz	Escuro
ANA	2	0,2452 <sup>ns</sup>	293,2738**	524,5190**
BA	3	0,9039*	318,5714**	1031,6659**
ANA x BA	6	0,3278 <sup>ns</sup>	174,7881**	306,6182**
Erro A	216	0,2865	4,1023	13,9563
Posição do explante	4	0,0639 <sup>ns</sup>	0,9226 <sup>ns</sup>	8,3238 <sup>ns</sup>
Rep x posição do expl	30	0,3643	1,9190	6,3024
ANA x posição do expl	8	0,1202 <sup>ns</sup>	1,7619 <sup>ns</sup>	4,8309 <sup>ns</sup>
BA x posição do expl	12	0,0647 <sup>ns</sup>	2,6686*	2,7889 <sup>ns</sup>
ANA x BA x posição do expl	24	0,3575 <sup>ns</sup>	1,9984 <sup>ns</sup>	2,3722 <sup>ns</sup>
Erro B	258	0,2841	1,2909	3,4952

\*\* , \* , <sup>ns</sup> efeitos significativos a 1% e 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente.

**Apêndice 5.** Análise de variância para o desenvolvimento de brotos no extremo proximal dos segmentos de epicótilo de tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan).

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		luz	Escuro/Luz	Escuro
ANA	2	0,2309 <sup>ns</sup>	0,3024 <sup>†</sup>	13,5881 <sup>**</sup>
BA	3	0,2444 <sup>ns</sup>	0,2563 <sup>†</sup>	36,4095 <sup>**</sup>
ANA x BA	6	0,1516 <sup>ns</sup>	0,0992 <sup>ns</sup>	11,6262 <sup>**</sup>
Erro A	216	0,1032	0,0857	1,1921
EXPL	4	0,0559 <sup>ns</sup>	0,1512 <sup>ns</sup>	0,9960 <sup>ns</sup>
Rep x posição do expl	30	0,1159	0,1040	0,7833
ANA x EXPL	8	0,0792 <sup>ns</sup>	0,0673 <sup>ns</sup>	0,3827 <sup>ns</sup>
BA x EXPL	12	0,0798 <sup>ns</sup>	0,1591 <sup>†</sup>	0,5147 <sup>ns</sup>
ANA x BA x EXPL	24	0,1149 <sup>ns</sup>	0,1181 <sup>*</sup>	0,3772 <sup>ns</sup>
Erro B	258	0,1238	0,0736	0,5674

\*\*; \*; <sup>ns</sup> efeitos significativos a 1% e 5% de probabilidade e não significativo pelo teste F, respectivamente

## **7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L** Enraizamento de Plantas Lenhosas. In Torres, A.C.; Caldas, I.S.; Buso, J.A., (Ed). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998, v.1, p 261-296.
- BARLASS, M. & SKENE, K.G.M** *Citrus* (Citrus species). P: 207-219. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v. 1. p. 207-219.
- BHAT, S. R.; CHITRALEKHA, P.; CHANDEL, K.P.S** Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v 29. p. 19-25. 1992.
- BÓRDON, F.Y.** Estudio de regeneración *in vitro* en diferentes especies de cítricos. Efectos hormonales. Valência: E. T. S. I. Agrónomos, 1997.
- BOUZID, S.** Quelques traits du comportement de boutures de *Citrus* en culture *in vitro*. **C. R. Acad. Sci. Ser. D**, v. 280, p. 1689-1692, 1975.
- BOWMAN, D.D.** Micropropagation of 'Smooth Flat Seville' and 'Yuma' citrus rootstocks. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v. 107, p. 15-18, 1994.
- BURGER, D. W.; HACKETT, W.P.** Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of *Citrus*. **Plant Science**, v. 43. p. 229- 232. 1986.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.** Tissue culture in the Citrus Industry. In: REINERT J. , BAJAJ, Y.P.S. (Ed). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. New York: Springer- Verlag, 1977. p. 72-92.
- CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; COTE, F.X.; FERRIERE, N.M.; DAMBIER, D.** Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, v. 93. p. 464- 470. 1995.
- CARIMI, F.; DE PASQUALE, F.; CRESCIMANNO, F. G.** Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37. p. 209-211, 1994.

- CARIMI, F.; DE PASQUALE, F.; CRESCIMANNO, F. G.** Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. **Plant Science.**, v. 105. p. 81-86, 1995.
- CHATUVERDI, H.C.; MITRA, G.C.** Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. **HortScience.**, v. 9, n. 2. p. 118-120, 1974.
- CHLYA, H.** Inter-tissue correlations in organ fragments: Organogenic capacity of tissues excised from stem segments of *Torenia fournieri* Lind. Cultured separately in vitro. **Plant Physiology.**, v. 54. p. 341-348. 1974.
- DIAS, J. M. M** Organogenesis "*in vitro*" en segmentos de epicotilo de citrange troyer. València: Departamento de Biología Vegetal, 1998. 317p. (Tesis Doctoral)- Universidad Politécnica de Valencia. 1998.
- DIAS, J. M. M.; MOLINA, R.V.; BÓRDON, Y.; GUARDIOLA, J.L; GÁRCIA-LUIS, A.** Direct and indirect organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirement and in their response to light. **Annals of Botany.** , v. 85, p. 103-110, 2000.
- 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.
- DURÁN-VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L.** Morphogenesis and tissue culture of three *Citrus* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.**, v. 16. p. 123-133. 1989.
- EDRISS, M. H.; BURGER, D. W.** *In vitro* propagation of Troyer Citrange from epicotyl segments. **Scientia Horticulturae.**, v. 23. p. 159-162. 1984.
- EL-MORSY, A. A.; MILLET, B** Rhythmic growth and optimization of micropropagation: the effect of excision time and position of axillary buds on *in vitro* culture of *Citrus aurantium* L. **Annals of Botany.**, v. 78. p. 197-202. 1996.
- FAO.** <http://apps.fao.org> 2001.

**GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A.** Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.**, v. 32. p. 272-289. 1996.

**GCONCI.** <http://gconci.com.br>.2001.

**GILL, M.Y.S.; SINGH, Z.; DHILLON, B. S.; GOSAL, S. S.** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Scientia Horticulturae.**, v. 63, p. 167-174, 1995.

**GILL, M.Y.S.; SINGH, Z.; DHILLON, B. S.; GOSAL, S. S.** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedlings explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenora). **Jornal of Horticultural Science.**, v. 69, n. 2. p. 231-236. 1994.

**GOH, C. J.; SIM, G.E.; MORALES, C.L.; LOH, C.S.** Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.**, v. 43, p. 301-303, 1995.

**GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A** In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1. p. 183-260.

**GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D.** **Standard methods for the examination of water and wastewater.** (Ed). Apha, 1992.18ª edição, p. 4-38.

**GRINBLAT, U** Differentiation of *Citrus* stem *in vitro*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 97, n. 5. p. 599- 603. 1972.

**GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B.** Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. ed. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1999. v. 2. p.533-568.

**HAISSIG, B.E.** Influences of auxin synergist on adventitious root primordium initiation and developente. **New Zealand Journal of Forestry Science.**, v. 4 (2), p. 311-323, 1973.

- HARADA, H. & MURAI, Y.** Clonal propagation of *Poncirus trifoliata* through culture of shoot primordia. **Journal of Horticultural Science.**, v. 71, n. 6. p. 887-892. 1996.
- HIRAMATSU, J.; ENOMOTO, S.; OYAMA, K.** Plant regeneration from epicotyl and root segments of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). **Plant tissue Culture Letters.**, v. 4, p. 79-81, 1987.
- KITTO, S. L.; YOUNG, M. J.** *In vitro* propagation of Carrizo citrange. **HortScience.**, v. 16, n. 3. p. 305-306. 1981.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M.** Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osbeck) and uniformity of regenerated plants. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station of Japan.**, v. 5, p. 43-54, 1984.
- LI, X.** **Cultivo *in vitro* de especies afines a los cítricos**, Valencia-España, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Universidad Politécnica de Valencia, 1997, 167p. (Tese de Doutorado). Universidad Politécnica de Valencia, 1997.
- LITZ, R. E.; JARRET, R. L.** Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos: embriogenesis somática y organogenesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed). **Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.** Cali: CIAT- Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991, p. 143-172.
- LOUSSERT, R.** **Los Agrios.** Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1992. 319p.
- MAGGON, R.; SINGH, B. D.** Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae.**, v. 63. p. 123- 128, 1995.
- MATSUMOTO, K.; YAMAGUCHI, H.** Induction of adventitious buds and globular embryoids on seedlings of trifoliata orange (*Poncirus trifoliata*). **Japanese Journal of Breeding.**, v. 33, n. 2, p. 123- 129, 1983.
- MOORE, G. A.** *In vitro* propagation of *Citrus* rootstocks. **Hortscience.**, v. 21(2), p. 300-301, 1986.

- MURASHIGE, M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum** ., v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. **Botanical Bulletin Academy Sinica**., v. 18, p. 1-24, 1977.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. **Proceedings First International Citrus Symposium**. University of California, Riverside, 3. p. 1155- 1161, 1969.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**., v. 25, p. 135-166, 1974.
- OTONI, W. C. Estudos de propagação "in vitro" de Citrus sinensis (L.) Osb. cv. Pêra, a partir da cultura de segmentos nodais juvenis. Viçosa: Departamento de Fitotecnia, 1988. 108p. (Tese de Mestrado )- Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- 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**. 1994. (en prensa).
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by organogénesis direct. **HortScience**., v. 32, n. 5, p. 931-934, 1997.
- RAJ BHANSALI, R.; RYA, H. C.. Organogenesis in *Citrus limettioides* (Sweet lime) callus culture. **Phytomorfology**., v. 29, p. 97-100, 1979.
- RAMOS, J. D.; CARVALHO, S. A.; PASQUAL, M. Efeito da extração do tegumento na expressão poliembrionica de sementes de dois pota-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, n. 1, p.161-166, 1991.
- RANGASWAMY, N. S Morphogenesis in explants of *Citrus microcarpa* Bunge grow *in vitro*. **Indian Journal Exp. Biol**, v. 13, p. 213-215, 1975.
- SAUTON, A.; MOURAS, A.; LUTZ, A. Plant regeneration from citrus root meristems. **Journal of Horticultural Science** ., v. 57, n. 2, p. 227–231, 1982.

- SIM, G. E.; GOH, C. J.; SOH, C. S** Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. **Plant Science.**, v. 59, p. 203-210, 1989.
- SINGH, S.; RAY, S. B.; DEKA, P. C.** *In vitro* propagation of *Ictrus reticulata* Blanco and *Citrus limon* Burm. F. **Hortscience.**, v. 29 (3), p. 214-216, 1994.
- SOARES, W. S. S.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; SOBRINHO, A. P. C.; ARAÚJO, E. F.** Influência dos tegumentos externo e interno na germinação de sementes de citros: implicações na sobrevivência de "seedlings" híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 17, n. 1, p.91-101, 1995.
- STARRANTINO, A.; CARUSO, A.** Experiences on the *in vitro* propagation of some citrus rootstocks. **Acta Horticulturae.**, v. 212, p. 471-78, 1987.
- TAPATI, D.A.S.; MITRA, G.C.; CHATTERJEE, A.** Micropropagation of *Citrus sinensis* var. Mousambi- An important scion. **Phytomorphology.**, v. 45, n. 1-2, p. 57-64, 1995.
- THORPE, T. A** The current status of plant tissue culture. In: BHOJWAM, S. S. (Ed). **Plant tissue culture: applications and limitations** Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1990, p. 1-33.
- TUCKEY, H. B.** Growth patterns of plants developed from immature embryos in artificial culture. **Botanical Gazette.**, v. 99, p. 630-655, 1938.
- WHITE, P. R.** Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth.**, v. 7, p. 53, 1943.