

USO DE MUTAGÊNESE "IN VITRO" NO MELHORAMENTO DE CITROS: I. SENSIBILIDADE A RAIOS GAMA DE EXPLANTES DO CULTIVAR PÊRA ⁽¹⁾

AUGUSTO TULMANN NETO ⁽²⁾, MARIANGELA CRISTOFANI ⁽³⁾,
BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES ⁽²⁾ e AKIHIKO ANDO ⁽²⁾

RESUMO

Para futuros trabalhos com indução de mutação "in vitro", determinou-se a sensibilidade de diferentes explantes do cultivar de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osbeck) a raios gama visando a escolha das doses a utilizar. Para isso, após a irradiação, avaliou-se o número de explantes responsivos, de embrióides e de brotações adventícias, a massa do calo e a formação de enraizamento. Resultados diferentes foram obtidos de acordo com o tecido empregado. Assim, para a irradiação de nucelos, recomenda-se o uso de doses entre 20 e 40 Gy; em calos embriogênicos, de 120 Gy e, para a irradiação de cotilédones de embriões nucelares, a dose situa-se ao redor de 40 Gy.

Termos de indexação: raios gama, *Citrus sinensis* Osbeck, nucelos, calos embriogênicos, gemas adventícias.

ABSTRACT

"IN VITRO" MUTAGENESIS IN CITRUS BREEDING: I. GAMMA RAYS SENSITIVITY OF CULTIVAR PÊRA EXPLANTS

In order to obtain basic data for future research in mutation breeding through "in vitro" technology in sweet orange cv. Pêra, gamma rays sensitivity of different types of explants was analyzed. After irradiation the following observations were carried out: response of explants, number of embryoids and adventitious buds, callus weight and rooting formation. Different results were obtained according the explant used. For irradiated nucellus, the dose was 20-40 Gy and for embryogenic callus 120 Gy is indicated. For irradiation of cotyledons originated from nucellar embryoids the use of 40 Gy of gamma rays was recommended.

Index terms: gamma rays, *Citrus sinensis* Osbeck, nucellus, embryogenic callus, adventitious buds.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 21 de fevereiro e aceito em 14 de julho de 1994. Parte de trabalho de dissertação do segundo autor, apresentado para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas no Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, Piracicaba (SP).

⁽²⁾ Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)/USP, Caixa Postal 96, 13400-970 Piracicaba (SP).

⁽³⁾ Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP).

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira detém a maior produção de laranja e exportação de suco cítrico concentrado no mundo (FAO, 1990). Apesar disso, os vários problemas existentes nos cultivares mais utilizados no Brasil (Moreira & Pio, 1992), tanto para copa como para porta-enxerto, indicam que o melhoramento de *Citrus* deve ser encarado como prioritário para que a citricultura possa manter essa posição de destaque.

Existem várias dificuldades associadas ao melhoramento genético de *Citrus*, tais como: poliembrionia, longo ciclo reprodutivo e juvenildade (Grosser & Gmitter, 1990) e, devido a elas, a maioria dos cultivares de importância mundial foi obtida a partir de mutações somáticas espontâneas (Soost & Cameron, 1975). Por essa razão, julga-se que o aumento da frequência de mutações mediante o uso de mutagênicos possa trazer resultados de interesse para os programas de melhoramento. Através da irradiação em borbulhas (Wang, 1991), alguns cultivares foram obtidos. Entretanto, o uso dessas estruturas multicelulares pode implicar o surgimento de indivíduos quiméricos, tornando o processo demorado devido à necessidade do isolamento do setor mutado. Como alternativa a esse procedimento, tem-se sugerido a mutagênese "in vitro".

O uso de certos tipos de explantes, como calos, suspensões celulares, protoplastos, pode levar à obtenção de mutantes sólidos (Spiegel-Roy & Kochba, 1975), havendo outras vantagens, a saber: possibilidade de uso mais eficiente de mutagênicos químicos e rápida seleção para mutantes recessivos (no caso de tratamento de haplóides).

O manejo "in vitro" de grandes populações em espaço reduzido facilita a seleção para uma série de características, especialmente para mutações dominantes, que, como se sabe, ocorrem em baixas frequências.

Pelas razões expostas, a mutagênese "in vitro" já vem sendo aplicada no melhoramento de *Citrus*, como em Israel (Kochba & Spiegel-Roy, 1982), Japão (Matsumoto, 1984), Itália (Spina et al., 1991), China (Wan et al., 1991) etc. Esses trabalhos re-

velam que existem etapas que devem ser cumpridas antes que se iniciem programas de seleção utilizando-se tal método. Uma das etapas de importância refere-se a estudos nos quais, de acordo com as condições em que os explantes a utilizar foram extraídos, com o meio empregado, cultivar, tipo e idade do explante, pode variar a dose a ser recomendada para trabalhos com indução de mutação. Nas pesquisas de Pasqual (1985) e Goldman (1988), realizadas no Brasil com cultura de tecidos em *Citrus*, deu-se bastante destaque aos aspectos de metodologia para a obtenção de meios de cultura e condições apropriadas para a regeneração de plantas a partir de diferentes explantes.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a sensibilidade à radiação gama de nucelos, calos embriogênicos e gemas adventícias obtidas pela cultura de nucelos "in vitro" e de cotilédones de embriões nucelares, visando a futuros trabalhos com indução de mutações "in vitro" em *Citrus sinensis* cv. Pêra.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos gerais

Em todos os experimentos, empregou-se o clone de laranja Pêra premunizado, por ser o mais importante, atualmente, da citricultura paulista e um dos preferidos pela indústria devido à qualidade do seu suco (Teófilo Sobrinho, 1991).

Os nucelos foram extraídos de frutos imaturos colhidos aproximadamente doze semanas após a antese. A assepsia das sementes foi realizada em solução composta de uma parte de água sanitária comercial (hipoclorito de sódio 2%) e três partes de água destilada, durante dez minutos, sendo, em seguida, em condições assépticas, lavadas com água destilada estéril por três vezes. Com auxílio de pinça e bisturi, e sob o estereomicroscópio, as sementes foram cortadas longitudinalmente em duas partes, extraíndo-se o tecido nucelar de cada uma delas e retirando-se os embriões que eventualmente já estivessem em formação.

Os meios de cultivo constituíram-se, basicamente, dos sais minerais e vitaminas do meio MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com reguladores de crescimento e outras substâncias, de acordo com cada experimento. Os meios, solidificados com 8 g/L de ágar, com o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, foram autoclavados a 121°C por 15 minutos a 1,5 atm. O cultivo dos explantes de cada experimento foi realizado sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob intensidade luminosa de 3.000 lux. O delineamento experimental utilizado em todos os ensaios foi o inteiramente casualizado. Para efeito de análise estatística, os dados relativos à massa e à contagem foram transformados em $[\bar{x} + 0,5]^{1/2}$.

A irradiação dos diferentes materiais foi realizada com raios gama da fonte ^{60}Co do CENA-USP.

2.2 Procedimentos específicos

- Radiossensibilidade dos tecidos nucelares

Nesse experimento, os nucelos foram extraídos de acordo com o descrito nos procedimentos gerais. O meio de cultura foi o básico MT suplementado com 0,14 mol/L de sacarose e 500 mg/L de EM (extrato de malte).

Os nucelos, inoculados em tubo de ensaio, foram irradiados com as seguintes doses de radiação gama: 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 e 160 Gy a uma taxa de dose de 970 Gy/h, sendo efetuadas 28 repetições para cada tratamento.

As avaliações realizaram-se após oito semanas de cultivo, fazendo-se a contagem do número de nucelos que apresentaram embriões e do seu número de embriões.

- Radiossensibilidade dos calos nucelares

Calos provenientes de nucelos cultivados em meio MT, suplementado com 0,14 mol/L de sacarose, 500 mg/L de EM e $2,79 \times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ de BAP (benzil-aminopurina), e subcultivados a intervalos de quatro semanas, foram irradiados com as doses de 0; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 Gy de raios gama, com taxa de dose de 970 Gy/h, cada qual com cinco repetições.

Após o tratamento mutagênico com radiação gama, sob condições assépticas, os calos irradiados com a mesma dose foram agrupados em uma placa de Petri, de onde foram retiradas porções de 25 mg de calos e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MT, adicionado de 0,14 mol/L de lactose e 500 mg/L de EM. Realizaram-se dez repetições para cada tratamento, isto é, dez tubos de ensaio contendo 25 mg de calo. Quarenta dias após o tratamento mutagênico, realizou-se a avaliação, pesando-se os calos e fazendo-se a contagem do número de embriões por calo.

- Radiossensibilidade em cotilédones de embriões nucelares

Embriões nucelares, no estágio cotiledonar expandido (três a quatro semanas de idade), obtidos *in vitro*, foram irradiados com raios gama nas doses seguintes: 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 e 90 Gy, a uma taxa de dose de 970 Gy. Após a irradiação, as folhas cotiledonares foram extraídas e divididas longitudinalmente em duas partes iguais, sendo quatro delas inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MT suplementado com 0,08 mol/L de sacarose, $1,39 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$ de BAP e $4,94 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$ de NAA (ácido naftalenoacético). O cultivo se deu inicialmente no escuro, por quinze dias, e, posteriormente, sob as mesmas condições de luminosidade descritas.

Foram realizadas dez repetições para cada tratamento. A avaliação efetuou-se 90 dias após o início do cultivo, obtendo-se o número de explantes que apresentaram brotações adventícias e o número de brotações adventícias por esse tipo de explante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Radiossensibilidade dos tecidos nucelares

O efeito da radiação gama sobre a formação de embriões, a partir de nucelos, é apresentado no quadro 1. Realizaram-se as avaliações após oito semanas de cultivo e, as inspeções, semanalmente, na cultura, permitindo observar que a radiação aumentou a fase "lag" dos nucelos quanto à formação de embriões. Na testemunha, iniciou-se a formação de embriões após a terceira e a quarta

semanas de cultivo, enquanto nos nucelos irradiados essas estruturas começaram a se formar a partir da sexta semana de cultivo. Após oito semanas, não se observou diferença no número de nucelos que formaram embriões quando irradiados com doses de 20 a 80 Gy, sendo formado praticamente o mesmo número de embriões por nucelo. As doses acima de 100 Gy foram letais para o tecido nucelar, não havendo, portanto, formação de embriões nesses tratamentos.

Esse efeito também foi observado no trabalho de Kochba & Spiegel-Roy (1977), pois, segundo esses autores, os nucelos são muito sensíveis à irradiação. Entretanto, verificaram que as doses de 5 e 10 Gy promoveram um estímulo na embriogênese nesse tecido, discordando, contudo, das observações de Pasqual (1985), no cv. Valência, utilizando as mesmas doses.

No presente trabalho, os nucelos foram irradiados juntamente com o meio de cultura, onde foram mantidos durante o período de cultivo, baseando-se no trabalho de Pasqual (1985), que não verificou efeito prejudicial da radiação com esse procedimento, comparativamente aos resultados obtidos

com a irradiação de nucelos isolados. Essa prática também facilita o processo de tratamento mutagênico.

Para esse estudo, foram utilizados frutos com doze semanas de idade, baseando-se na literatura existente, pois Starrantino & Russo (1976/1977) utilizaram frutos com 100-200 dias de idade (14 a 28 semanas) para extração dos nucelos, enquanto Pasqual (1985) e Goldman (1988) trabalharam com frutos mais imaturos (cerca de doze semanas) nos clones de laranja Valência e Pêra respectivamente. A grande dificuldade que se apresenta para trabalhar com frutos ainda mais imaturos é a extração dos nucelos sem danificá-los. Utilizando-se, porém, o método de extração descrito neste trabalho, acredita-se que seja possível o uso de frutos mais jovens.

Nas sementes extraídas dos frutos, observou-se a existência no estágio globular de embriões (em média três/semente), os quais foram retirados dos nucelos para garantir que novos embriões se formariam somente após o tratamento mutagênico.

Verificou-se que o aumento das doses de radiação causou uma redução na porcentagem de enraizamento e um aumento na de anormalidades

Quadro 1. Efeito da radiação gama na formação de embriões em nucelos. Avaliação realizada 8 semanas após o tratamento mutagênico

Doses	Número de embriões em 28 nucelos	Nucelos com embriões	Número médio de embriões/nucelo inoculado
Gy			
0	8	28,6	0,52 a
20	2	7,1	0,21 ab
40	2	7,1	0,15 ab
60	2	7,1	0,07 ab
80	2	7,1	0,07 ab
100	0	0,0	0,00 b
120	0	0,0	0,00 b
140	0	0,0	0,00 b
160	0	0,0	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

(Quadro 2), observando-se cotilédones múltiplos, fundidos e fasciados. As doses acima de 40 Gy causaram grande redução no número de embriões obtidos, no seu enraizamento, alta porcentagem de anormalidades e baixo número de plântulas normais. Por essas razões, doses de 20 a 40 Gy seriam indicadas para o tratamento mutagênico. Se doses acima dessas fossem adotadas, haveria necessidade de aumentar o número de nucelos a tratar, para se obter um número adequado de plantas normais para serem observadas.

Pasqual (1985) recomenda a dose de 10-20 Gy para indução de mutações no cv. Valência, aplicada a nucelos recém-inoculados ou até uma semana depois. Starrantino & Russo (1976/1977) irradiaram frutos com as doses de 20 e 40 Gy, verificando que a porcentagem de nucelos com embriões foi praticamente igual à testemunha, sendo de 27,5% dos nucelos cultivados. Provavelmente, a irradiação dos frutos na pesquisa dos últimos autores tenha causado menos dano aos nucelos que a irradiação direta dos explantes, como no primeiro trabalho.

3.2 Radiossensibilidade dos calos nucelares

Neste experimento, usaram-se calos obtidos a partir de nucelos cultivados em meio MT suplementado com BAP ($2,79 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$). Tais calos,

quando mantidos nesse meio de cultivo, proliferam e não formam embriões, conservando, assim, uma composição celular de aspecto uniforme. Naqueles mantidos em meio MT sem fitorreguladores, diferenciam-se embriões, tornando-se o calo um tecido com composição bastante heterogênea, onde, além das células, existem pró-embriões e embriões em vários estádios de desenvolvimento, diminuindo a probabilidade de obtenção de mutantes sólidos, após tratamento com agentes mutagênicos.

Depois do tratamento com diferentes doses de raios gama, os calos foram inoculados em meio MT contendo 0,14 mol/L de lactose e 500 mg/L de EM. Os embriões no estágio globular foram transferidos para o mesmo meio de cultivo, modificando-se apenas a fonte de carbono (sacarose). Os embriões que se desenvolveram até o estágio cotiledonar foram inoculados em meio fresco, contendo a mesma constituição do meio anterior, para germinação e regeneração de plantas.

O quadro 3 mostra o efeito de diferentes doses de radiação gama no crescimento dos calos e na diferenciação de embriões, 40 dias após o tratamento mutagênico. Observa-se que a massa média dos calos diminuiu com o aumento da dose de radiação. Na de 180 Gy, os calos apresentavam um aspecto necrosado e não formaram nenhum embrião

Quadro 2. Desenvolvimento de embriões, individualizados, oriundos de nucelos submetidos a diferentes doses de radiação gama. Avaliação realizada 60 dias após a inoculação dos embriões no estágio globular

Doses Gy	Número de embriões obtidos	Raízes	Anormalidades		Plântulas normais
			%		
0	34	58,8	76,5		23,5
20	12	41,7	83,3		16,7
40	13	38,5	34,6		15,4
60	4	0,0	100,0		0,0
80	7	18,6	85,7		14,3
100	0	28,6	85,7		0,0
120	0	0,0	0,0		0,0
140	0	0,0	0,0		0,0
160	0	0,0	0,0		0,0

de, enquanto na de 150 Gy diminuiu drasticamente o número de embriões por calo. Obteve-se maior número de embriões por calo quando se utilizou a dose de 30 Gy, embora até a de 120 Gy não houvesse diferença estatística significativa em relação à testemunha.

Quadro 3. Efeito de diferentes doses de radiação gama no crescimento de calos e na diferenciação de embriões a partir destes. Avaliação 40 dias após o início do cultivo

Doses	Massa média/calos	Número médio de embriões/calos
Gy	mg	
0	239,39 a	936,0 a
30	207,47 a	2.551,4 a
60	151,40 b	2.280,6 a
90	103,93 c	1.984,8 a
120	84,27 cd	1.002,3 a
150	44,34 de	22,1 b
180	38,71 e	0,0 c

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey - 5%.

Esses dados estão de acordo com Kochba & Spiegel-Roy (1973), os quais notaram um aumento no número de embriões por calo a partir de radiações com as doses de 40 até 200 Gy, sendo o efeito máximo conseguido com 160 Gy, com uma intensidade de 850 Gy/h.

Skoog, citado por Spiegel-Roy & Kochba (1973), mostrou que os raios X inativam auxinas. A diminuição da massa dos calos irradiados, bem como o aumento do número de embriões, tem sido associada à inativação das auxinas endógenas.

Kochba & Spiegel-Roy (1977) irradiaram calos com diferentes doses até 300 Gy, inoculando-os posteriormente em meio contendo diferentes concentrações de IAA, observando que certas concentrações aumentaram a proliferação de embriões, nas doses mais altas de radiação. Segundo esses autores, a irradiação, com as mais altas doses, pode ter reduzido a auxina a um nível subótimo, e a adição de IAA estaria promovendo a embriogênese, em tais condições.

Os embriões obtidos no presente estudo foram transferidos para meio básico de cultivo MT, no estágio globular (1-2 mm de diâmetro). Realizaram-se avaliações e determinou-se a porcentagem de embriões que se desenvolveram até o estágio cotiledonar, de embriões que germinaram formando raízes e plantas normais e embriões e plantas anormais. Os resultados encontram-se nos quadros 4 e 5.

Na testemunha, foi obtido maior número de embriões, que se desenvolveram até o estágio cotiledonar. Possivelmente, no presente trabalho, a irradiação tenha causado uma redução no nível de IAA, ocasionando uma redução na capacidade de desenvolvimento desses embriões. Kochba & Spiegel-Roy (1977) verificaram que a adição de IAA aos calos irradiados promoveu melhor desenvolvimento dos embriões em plantas.

A quantificação de plantas normais que conseguiram enraizar nos tratamentos com irradiação foi menor quando comparada com a testemunha - Quadro 6. Anormalidades são freqüentemente observadas nos embriões obtidos de cultura de núcelos e calos, sem tratamento mutagênico, revelam Gmitter & Moore (1986). Segundo esses autores, o número de embriões com capacidade de desenvolver plantas adultas normais pode variar de acordo com o clone estudado; para o de laranja-doce Hamlin (*C. sinensis*), 35% dos embriões obtidos se desenvolveram até estádios mais avançados e, destes, 48% germinaram.

No presente estudo, observou-se, na testemunha, 37,97% de embriões no estágio de cotilédone expandido, os quais se desenvolveram em plântulas. Alguns embriões formaram raízes, mas não houve desenvolvimento da parte aérea. Anormalidades, como cotilédones múltiplos, fundidos e fasciados, foram encontradas em todas as doses de radiação estudadas. Alguns embriões desenvolveram parte aérea anormal com epicótilo fasciado ou gemas apicais múltiplas.

Nas doses de 30 a 150 Gy, as porcentagens de plantas anormais encontradas foram bastante semelhantes (Quadro 5).

Kochba et al. (1982), utilizando doses de 80, 120 e 160 Gy a uma taxa de 800 Gy/h, verificaram que elas aceleraram o processo de seleção em calos embriogênicos do cv. Shamouti para salinidade. A dose de 120 Gy produziu o melhor resultado, quando se utilizou 0,17mol/L de NaCl no meio de cultura.

No presente estudo - Quadro 3 - a dose de 120 Gy produziu um número médio de embriões (1.002,30), não diferindo estatisticamente do valor obtido na testemunha. A dose de 150 Gy produziu uma redução drástica no número médio de embriões formados por calo (22,11). Isso deve ser considerado, pois uma dose que cause tal redução não

é conveniente; muitas mutações induzidas nas células dos calos podem ser perdidas, se tais células não tiverem capacidade de formar embriões. Assim, a dose de 120 Gy pode ser recomendada para a indução de mutações em calos embriogênicos.

3.3 Radiossensibilidade em cotilédones de embriões nucelares

O quadro 6 apresenta o número de explantes responsivos e o número médio de brotações por explante responsivo em cotilédones de embriões nucelares expostos a diferentes doses de radiação gama.

Quadro 4. Desenvolvimento de embriões, individualizados, oriundos de calos submetidos a diferentes doses de radiação. Avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos embriões no estágio globular

Doses Gy	Número de embriões transferidos (1-2 mm ϕ)	Estádio globular		Estádio cotiledonar
		%		
0	164	51,8		48,2
30	194	84,6		15,5
60	226	63,4		34,6
90	269	73,2		26,8
120	337	78,3		21,7
150	198	81,3		18,7
180	0	0,0		0,0

Quadro 5. Germinação de embriões desenvolvidos, oriundos de calos submetidos a diferentes doses de radiação gama. Avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos embriões no estágio cotiledonar

Doses Gy	Número de embriões transferidos no estágio cotiledonar	Raízes	Anormalidades		Plântulas normais
			%		
0	79	55,7	62,0		38,0
30	30	13,3	76,6		23,3
60	78	21,5	75,5		24,5
90	72	17,9	81,4		17,9
120	73	32,9	72,5		27,4
150	37	40,1	72,9		27,0
180	0	0,0	0,0		0,0

Quadro 6. Efeito de diferentes doses de radiação gama na formação de brotações adventícias em cotilédones de embriões nucelares. Avaliação 90 dias após o tratamento mutagênico

Doses	Número de repetições	Número de explantes responsivos	Número de brotações/ /explante responsivo
Gy			
0	5	2,52 a	23,90 a
10	5	2,38 a	16,47 ab
20	5	2,12 ab	15,39 ab
30	5	1,74 abc	15,31 ab
40	5	1,74 abc	12,50 abc
50	5	0,47 bc	1,55 bc
60	5	0,34 c	0,57 c
70	5	0,34 c	0,47 c
80	5	0,16 c	0,47 c
90	5	0,16 c	0,28 c

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Observa-se uma tendência à redução no número de explantes responsivos e no de brotações por explante responsivo, com o aumento da dose de radiação. Para doses acima de 40 Gy, os efeitos foram muito drásticos, podendo-se, portanto, recomendar, para o cultivar Pêra, doses ao redor de 40 Gy na indução de mutações a partir de gemas adventícias, obtidas em cotilédones de embriões nucelares. Deve-se levar em conta que doses menores (20 a 30 Gy) poderão produzir maior número de plantas normais, do que maiores (40 a 50 Gy), como se discutiu.

O interesse nas brotações adventícias como um meio de produzir mutantes sólidos, isto é, não quiméricos, em partes irradiadas de uma planta, começou com experimentos em *Saintpaulia*. Segundo Broertjes & Van Harten (1988), a explicação para o aparecimento de altas porcentagens de plantas não quiméricas, a partir daquele explante, seria de que a nova brotação teria origem unicelular. No presente trabalho não se determinou se as brotações tiveram origem unicelular ou multicelular. Entretanto, existem várias formas de evitar a formação de quimeras, mesmo nas situações em que as gemas se formam a partir de mais de uma célula (Broertjes & Van Harten, 1988).

Venverloo et al. (1983) argumentam que, mesmo se a área de uma gema adventícia for formada por

células descendentes de mais de uma célula epidérmica, o resultado final pode ser comparável à situação com uma única célula. Isso porque, se o ápice é um sistema dinâmico, muitas células do domo apical podem deixá-lo e se incorporar às folhas e aos ramos. Então, o ápice, por si só, pode, finalmente, consistir indiretamente de células descendentes de uma única célula epidérmica, podendo, dessa forma, dar origem a um mutante sólido após tratamento mutagênico.

4. CONCLUSÕES

1. Com base na redução do número de embriões obtidos, na redução do seu enraizamento e no número de anomalias dos embriões após a irradiação de nucelos com doses crescentes de raios gama, recomendam-se doses entre 20 e 40 Gy para indução de mutações quando se usar esse tipo de explante para o cultivar Pêra.

2. O estudo da radiosensibilidade de calos embriogênicos do cultivar Pêra, feito mediante avaliação da massa média do calo, número de embriões produzidos por calo, desenvolvimento dos embriões e seu enraizamento e plantas normais obtidas, indicou que a dose de 120 Gy deve ser a recomendada para indução de mutação.

3. Através do número de explantes responsivos e de brotações adventícias obtidas por explante responsivo, determinou-se que a dose de raios gama em cotilédones de embriões nucleares, para trabalhos de indução de mutação, situa-se ao redor de 40 Gy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROERTJES, C. & VAN HARTEN, A.M. Citrus. In: BROERTJES, C. & VAN HARTEN, A.M., eds. *Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops*. Amsterdam, Elsevier, 1988. p.279-285.
- FAO QUARTELY BULLETIN OF STATISTICS. Rome, FAO, v.3, n.2, 1990.
- GMITTER, F.G. & MOORE, G.A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic callo of *Citrus*: embryo production germination and plant survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 6:139-147, 1986.
- GOLDMAN, M.H.S. *Cultura de tecidos nucleares, isolamento e radiosensibilidade de protoplastos de Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pêra*. Piracicaba, 1988. 127p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - ESALQ-USP, 1988.
- GROSSER, J.W. & GMITTER, J.F. *Wide-hybridization of Citrus via protoplast fusion: progress, strategies, and limitations*. Gainesville Agricultural Experimental Station, 1990. p.31-41. (Journal Series, M-0034)
- KOCHBA, J.; BEN-HAYYIN, G.; SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S. & NEUMANN, H. Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *C. aurantium*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 106:111-118, 1982.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange as affected by auxin and by tissue age. *Environmental and Experimental Botany*, Oxford, 17:151-159, 1977.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Progress in selection for sodium chloride, 2,4-D Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and Streptomycin tolerance in *Citrus sinensis* ovular callus lines. In: INDUCED MUTATIONS IN VEGETATIVELY PROPAGATED PLANTS, Vienna, 1982. *Proceedings*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1982. p.77-89.
- MATSUMOTO, K. Increased variation of NaCl-tolerance in adventitious embryoids of trifoliolate orange using an *in vitro* technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7(1):73-81, 1984.
- MOREIRA, C. & PIO, R.M. Melhoramento dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. & POMPEU JUNIOR, J., eds. *Citricultura Brasileira*. Campinas, Fundação Cargill, 1992. p.116-152.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. *Proceedings*. Riverside, University of California, 1969. v.3, p.115-166.
- PASQUAL, M. *Regeneração de plantas in vitro e radiosensibilidade de tecidos nucleares de citros*. Piracicaba, 1985. 106p. Tese (Doutorado em Agronomia) - ESALQ-USP, 1985.
- SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J. & MOORE, J.N., eds. *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Production of solid mutants in *Citrus* using new approaches and techniques. In: IMPROVEMENTS OF VEGETATIVELY PROPAGATED PLANTS THROUGH INDUCED MUTATIONS, Vienna, 1975. *Proceedings*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1975. p.113-127.
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. *Radiation Botany*, Oxford, 13:97-103, 1973.
- SPINA, P.; MANNINO, P.; REFORGIATO RECUPERO, G. & STARRANTINO, A. Use of mutagenesis at the Istituto Sperimentale per l'Agricoltura, Acireali. In: PLANT MUTATION BREEDING FOR CROP IMPROVEMENT, Vienna, 1991. *Proceedings*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1991. p.257-259.
- STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Coltura *in vitro* di nucelle isolate da frutticini de limone irragiati. Tentative per ottenere semenzali resistenti al mal secco. *Annali Istituto Sperimentale per l'Agricoltura*, Acireali, 9/10:209-221, 1976/1977.

- TEOFILO SOBRINHO, J. Variedades de copas e porta-enxertos para os citros. In: MENTEN, J.O.M.; DOURADO NETO, D. & TORRADO, P.V., eds. *Curso Intensivo de Citricultura*. Piracicaba, CERES/ESALQ, 1991. p.25-36.
- VENVERLOO, C.J.; KOSTER, J. & LIBBENGA, K.R. The formation of adventitious organs. IV. The ontogeny of shoots and leaves from epidermis cells of *Nautilocalyx lynchii*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, **109**:55-67, 1983.
- WAN, S.Y.; DENG, Z.A.; DENG, X.X. & YE, X.R. Advances made *in vitro* mutation breeding in *Citrus*. In: PLANT MUTATION BREEDING FOR CROP IMPROVEMENT, Vienna, 1991. *Proceedings*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1991. p.263-269.
- WANG, L.Q. Induced mutation for crop improvement in China. In: PLANT MUTATION BREEDING FOR CROP IMPROVEMENT, Vienna, 1991. *Proceedings*. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1991. p.9-32.