

# OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS IN VITRO DE TANGERINA ‘CLEÓPATRA’ (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.)<sup>1</sup>

ROSELY PEREIRA DA SILVA<sup>2</sup>, ELMA DOS SANTOS SOUZA<sup>3</sup>, FABIÓLA SANTANA REBOUÇAS<sup>3</sup>,  
WELITON ANTONIO BASTOS DE ALMEIDA<sup>4</sup>

**RESUMO** - O sucesso de técnicas biotecnológicas no melhoramento *in vitro* de citros está condicionado à existência prévia de uma metodologia eficiente de regeneração de plantas. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um sistema para regeneração de plantas *in vitro*, via organogênese de tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.). Experimentos avaliando concentrações de BAP (benzilaminopurina) e condições de cultivo, posição e polaridade do segmento de epicótilo, no meio de cultura, foram desenvolvidos para maximizar a regeneração. Para a indução das brotações, segmentos de epicótilo (1,0 cm de comprimento) foram cultivados em meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969). Após 45 dias, foram avaliados: percentual de explantes responsivos e n.º de gemas/ explante responsivo. Para enraizamento, foram utilizados os meios MT e MT/2, com ou sem ANA (ácido naftalenoacético) na concentração 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Após 60 dias, avaliou-se o percentual de brotos que emitiram raízes. A máxima proliferação de gemas foi obtida em condições de escuro, por 30 dias, utilizando-se da concentração 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Não houve efeito significativo da posição do explante na resposta organogenética. Os segmentos apicais e mediais mostraram-se mais eficientes que os basais. A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP com o cultivo em condições de escuro, por 30 dias, na fase de indução de brotações combinada com ausência de auxina no meio MT/2, na fase de indução de raízes, assegurou melhor índice de enraizamento dos brotos regenerados.

**Termos para indexação:** Cultivo *in vitro*, organogênese, tangerina, *Citrus*

## OPTIMIZATION OF PROTOCOLS FOR IN VITRO REGENERATION OF ‘CLEOPATRA’ (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) MANDARIN PLANTS

**ABSTRACT** - The success of biotechnology for *in vitro* citrus plant breeding programs depends on the availability of efficient methodologies for plant regeneration. The objective of this work was to establish a system for regeneration of *in vitro* plants, through organogenesis of ‘Cleopatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) mandarin plants. Experiments were performed to evaluate the concentration of BAP and culture conditions, position and polarity of the epicotyls segment in culture media to maximize the regeneration of plants. For bud induction, epicotyls segments (1.0 cm of length) were cultivated in MT media, and evaluated after 45 days for % of responsive explants, and number of responsive buds per explants. For rooting, MT and MT/2 media were tested, with and without NAA (1,0 mg L<sup>-1</sup>). After 60 days, the % of shoots that emitted roots was evaluated. The maximum shoot proliferation was obtained under dark for 30 days, with BAP at 2.0 mg L<sup>-1</sup>. No effect of explants position in organogenesis response was observed. The apical and medium segments were shown to be more responsive than the basal segments. BAP concentration of 1,0 mg L<sup>-1</sup>, under dark for 30 days, at shoot induction stage, combined with the lack of auxin in MT/2 media, at the rooting induction stage, assured greater rooting of the regenerated shoots.

**Index terms:** *in vitro* plant culture, organogenesis, mandarin, *Citrus*.

## INTRODUÇÃO

No contexto mundial, o Brasil mantém a posição de maior produtor de citros, com cerca de 18,8 milhões de toneladas produzidas (Rodrigues Neto & Lopes, 2003), bem como de maior exportador de suco cítrico concentrado e congelado (IBGE, 2004). Em 2003, o suco de laranja ocupou a segunda posição entre os produtos comercializados no mercado internacional (ABECITRUS, 2004). As exportações de suco concentrado congelado e sub-produtos geram para o País recursos da ordem de 1,3 a 1,5 bilhão de dólares por ano (Feichtenberger, 2003).

O Estado de São Paulo é o principal produtor nacional de citros, respondendo por cerca de 80% da produção nacional, ou seja, 13.496.620 t (331 milhões de caixas) (IBGE, 2004). A Bahia, embora ainda com contribuição pouco expressiva, ou seja, 5,2% da área total do País e 3,2% da produção, se classifica como segundo produtor nacional (Coelho et al., 2003), seguida por Sergipe, que apresenta números similares.

A citricultura encontra condições climáticas favoráveis em várias regiões do Brasil, porém mostra-se muito vulnerável devido à utilização quase única da combinação laranjeira ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertada em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* L. Osbeck). Esse é um dos fatores que fazem com que a citricultura apresente grande vulnerabilidade, o que tem ocasionado sucessivos surtos de pragas e doenças, através dos tempos, como, por exemplo, a ocorrência da Tristeza que, entre 1939 e 1949, matou 9 dos 11 milhões de laranjeiras

então existentes, ou a Clorose Variegada dos Citros, que afeta 38% das plantas das principais laranjas de São Paulo (Fernandes & Bassanezi, 2003), ou ainda a Morte Súbita dos Citros, doença detectada em pomares no sul do Triângulo Mineiro e norte de São Paulo (IBGE, 2004).

Portanto, é evidente a necessidade de encontrar alternativas para solucionar alguns problemas inerentes à cultura, dentre os quais o uso predominante do limoeiro ‘Cravo’ como porta-enxerto, cuja participação nos pomares pode variar de 70 a 100% e a obtenção de cultivares resistentes e/ou tolerantes a determinados patógenos (Almeida et al., 2002).

A tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) apresenta características agrônomicas superiores para tolerância à Tristeza, ao Declínio e à Exocorte (Silva et al., 2002), e, aparentemente, apresenta-se ainda como tolerante à Morte Súbita dos Citros (Vitória et al., 2002), e pode ser utilizada como porta-enxerto para um grande número de variedades comerciais de interesse econômico. Apesar dessas características, a mencionada espécie apresenta o inconveniente de que as copas nela enxertadas possuem um longo período vegetativo (Oliveira et al., 2001).

O comportamento genético e reprodutivo das plantas cítricas, influenciados por fatores como longo ciclo reprodutivo, apomixia e alto grau de heterozigosidade, dificultam a aplicação do melhoramento genético convencional. O desenvolvimento de técnicas biotecnológicas tem oferecido novas alternativas para o melhoramento dos citros. Dentre essas técnicas, a transformação genética vem se mostrando ter grande

<sup>1</sup> (Trabalho 046/2005). Recebido: 16/03/2005. Aceito para publicação: 17/11/2005.

<sup>2</sup> Mestre em Ciências Agrárias, rosely.silva@bol.com.br.

<sup>3</sup> Acadêmicas do curso de Engenharia Agrônoma, elmagrufba@yahoo.com.br, fably2000@yahoo.com.br.

<sup>4</sup> Doutor em Fitotecnia, Prof. da AGRUFBA, weliton@ufba.br. Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA. Tel. 75 36211220.

potencial, pois permite a introdução no genoma vegetal de genes de outras plantas ou outros organismos (Almeida et al., 2002), que modificam características de interesse agrônomo. Contudo, o estabelecimento de um sistema eficiente de regeneração de plantas *in vitro* constitui-se num pré-requisito fundamental para a aplicação da engenharia genética. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um sistema eficiente de regeneração de plantas *in vitro*, via organogênese, para tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.).

## MATERIALE MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Fitotecnia da Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia.

**Obtenção do explante:** as sementes de tangerina ‘Cleópatra’ foram extraídas de frutos maduros, retirados seus tegumentos e desinfestadas em solução comercial de hipoclorito de sódio e água (1:1) por 20 minutos, lavadas (três vezes) em água estéril e incubadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MT, acrescido de 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com ágar (0,8%) e mantidas a 27 ± 2°C, em ausência de luz por três semanas e duas semanas sob fotoperíodo de 16 horas. Após este período, os segmentos de epicótilo das plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como explantes.

### Indução de brotações adventícias

Foram conduzidos três experimentos para induzir formação de gemas adventícias em segmentos de epicótilo. Estes explantes foram cultivados em placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura MT acrescido de 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com ágar (0,8%) e suplementado com BAP, e incubados em câmara de crescimento a 27 ± 2°C.

**Experimento 1: Organogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo em função de concentrações de BAP e condições de cultivo:** segmentos de epicótilo com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram introduzidos horizontalmente no meio de cultura MT suplementado BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup>) e cultivados no escuro por 30 dias, seguidos de fotoperíodo de 16 horas e diretamente sob fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo vinte segmentos.

**Experimento 2: Efeito da posição de cultivo dos explantes na organogênese *in vitro*:** segmentos de epicótilo com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram introduzidos horizontal e verticalmente no meio de cultura MT na ausência e presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e incubados em fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo vinte segmentos.

**Experimento 3: Efeito da polaridade na resposta organogenética dos segmentos de epicótilo:** o epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* foi dividido em três partes (basal, medial e apical), sendo estas seccionadas em segmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, cultivados separadamente em meio MT, na ausência e presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e incubados em condições de fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo vinte segmentos.

Após 45 dias, em todos os experimentos, foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas por explante responsivo. As brotações obtidas (gemas desenvolvidas, apresentando em torno de 1,0 cm) foram transferidas para meio MT acrescido de 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com fitagel (0,2%) e suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, para promover o alongamento das mesmas, onde permaneceram por 60 dias, quando, então, foram submetidas à indução de enraizamento.

### Indução do Enraizamento das brotações

Para induzir formação de raízes, as brotações regeneradas com 0,0; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, do experimento 1, foram transferidas para

frascos contendo 20 mL dos seguintes meios de cultura: MT + 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, MT + 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, metade dos sais de MT (MT/2) + 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, metade dos sais de MT (MT/2) + 0,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA. As brotações foram cultivadas em câmara de crescimento a 27 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, durante 60 dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo quatro brotos. Foi avaliado o percentual de brotos que emitiram raízes.

Posteriormente, as plantas passaram pelo processo de aclimatização, onde se utilizaram copos plásticos descartáveis contendo terra vegetal autoclavada e cobertos com sacos plásticos para manter a umidade. Esses sacos foram mantidos por 30 dias, onde, a cada dia, se fazia a irrigação, deixando a planta sem cobertura plástica por meia hora e aumentando-se gradativamente esse tempo até a remoção total da cobertura plástica.

### Análises estatísticas

As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância. Para as variáveis que apresentaram diferença significativa para concentração (acima de três doses), foi feita a análise de regressão. A comparação dos demais resultados foi feita pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR – Sistema de análises de variância para dados balanceados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1: Organogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo em função de concentrações de BAP e condições de cultivo

Houve efeito da interação BAP x condições de cultivo para as variáveis avaliadas. Para o percentual de explantes responsivos, a maior média (96%) foi obtida na ausência de BAP (0,0 mg L<sup>-1</sup>) em condições de fotoperíodo de 16 h, onde se verificou também que o adição de BAP reduziu significativamente os valores dessa variável (Figura 1A). Resultados semelhantes foram obtidos por Moura et al. (2001) na indução da organogênese *in vitro*, em laranja ‘Pêra’, que observaram 95; 85 e 65% de explantes responsivos na presença de 0,0; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente. No cultivo em condições de escuro por 30 dias, a adição do BAP foi fundamental para obtenção de melhor resposta, de modo que a concentração ótima estimada foi 2,0 mg L<sup>-1</sup>, a partir da qual houve redução do percentual de explante responsivo. Quanto ao número de gemas por explante responsivo (Figura 1B), a concentração 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, em condições de escuro por 30 dias, foi a que proporcionou melhor resultado (3,7 gemas/ explante responsivo). Duran-Vila et al. (1992) também observaram que a incubação de explantes de laranja ‘Pineapple’ no escuro aumentou a regeneração de gemas e brotações e a conseqüente conversão em plantas; contudo, esses autores utilizaram segmentos internodais como explantes, cultivados em meio MS com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. A análise conjunta dos resultados permitiu constatar que a concentração 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, combinada com o cultivo em condições de escuro por 30 dias, mostrou-se mais eficiente na indução de gemas adventícias, proporcionando 303 brotos, partindo de 100 explantes iniciais. Esses resultados foram diferentes dos obtidos por Bordón et al. (2000), quando estudaram a organogênese em segmentos de epicótilo de diferentes porta-enxertos de citros e obtiveram apenas 14% de explantes responsivos com 1,4 brotação por explante responsivo na extremidade apical dos explantes de tangerina ‘Cleópatra’. Vale ressaltar que esses autores cultivaram os explantes verticalmente, em meio MS, suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e obtiveram para citrange ‘Troyer’, nessas mesmas condições, 100% de explantes responsivos com 5,4 brotações por explante responsivo na extremidade apical e 0,4 brotação na extremidade basal.

A concentração ótima estimada em alguns trabalhos de organogênese tem sido variada dentre outros fatores com a espécie, cultivar e explante utilizado e, conhecendo essa concentração, tem-se verificado que doses superiores promovem redução na resposta organogenética. Esse fato, constatado no presente trabalho, foi

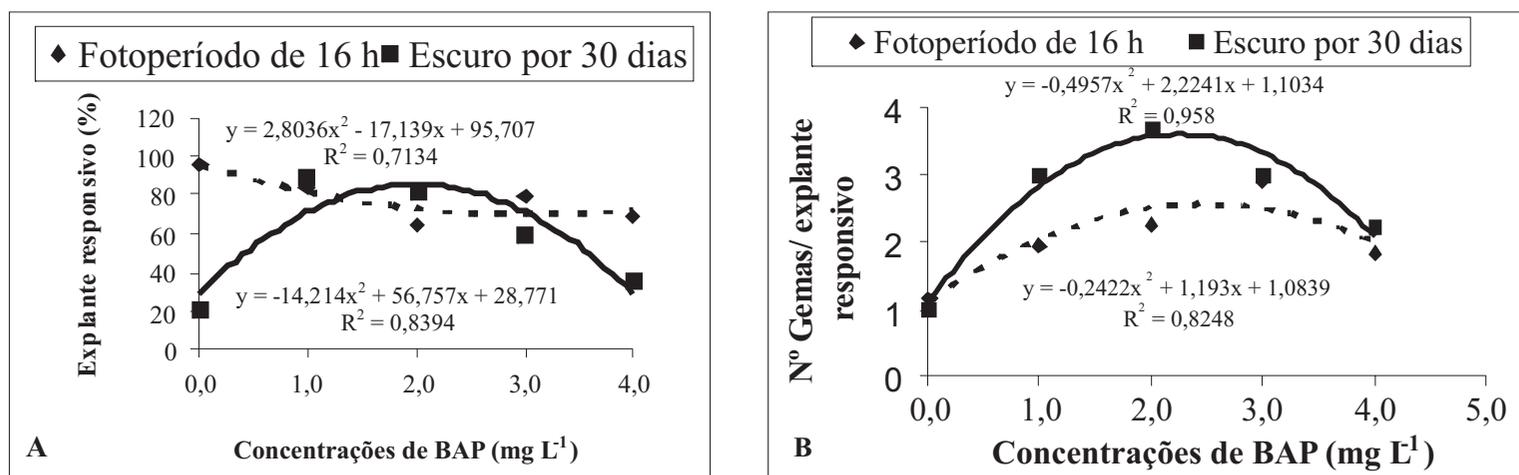


FIGURA 1 - Indução de organogênese em explantes de tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) em função de condições de cultivo e concentrações de BAP. A) Percentual de explante responsivo. B) Número de gemas por explante responsivo.

observado também por Pasqual & Ando (1989) no cultivo *in vitro* de gemas axilares de plântulas de *Poncirus trifoliata*, Moura et al. (2001) e Almeida et al. (2002) estudando organogênese *in vitro* em *C. sinensis* L. Osbeck e *C. limonia* L. Osbeck. Possivelmente, elevados níveis exógenos de BAP, interagindo com o nível endógeno de citocinina, tenham dificultado a desdiferenciação, bem como a determinação celular, influenciando negativamente na proliferação de gemas adventícias.

**Experimento 2: Efeito da posição de cultivo dos explantes na organogênese *in vitro***

A Figura 2 apresenta o efeito isolado do BAP sobre o percentual de explantes responsivos e o número de gemas por explante responsivo. Observou-se que a adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> dessa citocinina ao meio de cultura MT reduziu em 28,5% o percentual de explantes responsivos, entretanto aumentou significativamente (157%) o número de gemas por explante responsivo. A análise conjunta dos dados permite afirmar que o adicionamento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi fundamental para maximizar a resposta organogenética, independentemente de os explantes terem sido cultivados horizontal ou verticalmente. O BAP tem se destacado entre as citocininas pela sua eficiência em multiplicação e indução de gemas adventícias em várias espécies (Grattapaglia & Machado, 1998), e isso tem se constatado em diversos trabalhos (Perez-molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Moura et al., 2001).

No que se refere à posição em que o explante foi introduzido no meio de cultura, as análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa neste experimento. É possível que esta resposta seja devida ao potencial genético desta espécie, pois Garcia-Luis et al. (1999), estudando a morfogênese em segmentos de epicótilo de citrange

‘Troyer’, verificaram maior número de gemas formadas em ambas as extremidades dos segmentos quando estes explantes foram cultivados horizontalmente, comparando-se com aqueles cultivados verticalmente.

**Experimento 3: Efeito da polaridade na resposta organogenética dos segmentos de epicótilo**

Os segmentos apicais e mediais, 82,5 e 61,4% de explantes responsivos, respectivamente, foram mais eficientes na resposta organogenética que os basais (23,6%). É provável que, por estarem próximos do meristema apical, zona de intensa divisão celular, tenham sido influenciados positivamente na referida resposta, em virtude de o balanço endógeno auxina x citocinina ter sido mais favorável. Segmentos de epicótilo classificados em distal, medial e proximal, em relação ao nó cotiledonar, foram estudados por Goh et al. (1995), que observaram formação de brotações em 84% dos segmentos distais, em meio MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e em 83% dos segmentos medial e proximal quando cultivados na ausência de BAP. Bordón et al. (2000) também verificaram efeito significativo da polaridade de segmentos de epicótilo de citrange ‘Troyer’, onde os segmentos apicais tiveram melhor resposta.

Com relação ao número de gemas por explante responsivo (Tabela 1), verificou-se que a presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP favoreceu a indução de gemas adventícias em segmentos mediais e apicais, contudo exerceu efeito antagônico sobre os segmentos basais. A polaridade dos explantes tem sido objeto de estudo em diversos trabalhos, e alguns casos têm demonstrado efeito significativo na resposta morfogenética *in vitro* (Moreira-Dias et al., 2000).

As brotações alongaram satisfatoriamente em meio MT com GA3. Esse fato foi verificado também por outros autores trabalhando com citros (Moura et al., 2001).

TABELA 1 - Número de gemas/ explante responsivo de tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) em função da polaridade do segmento de epicótilo e da presença de BAP.

Concentração de BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	Polaridade do segmento		
	Basal	Medial	Apical
0,0	1,77a A	1,36b A	1,87b A
1,0	0,97b B	2,86a A	2,70a A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem significativamente (Tukey 0,05).

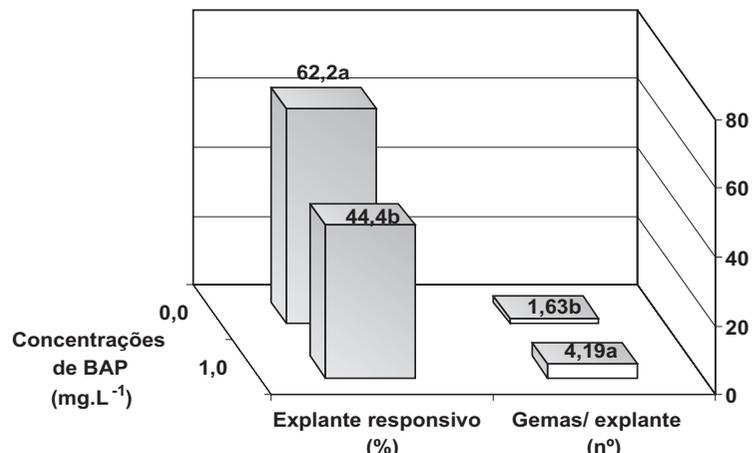


FIGURA 2 - Percentual de explantes responsivos e número de gemas por explante de tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. Ex Tan.) em função da ausência e presença de BAP. Barras com médias seguidas da mesma letra, em cada variável, não diferem entre si (Tukey 0,05).

**Enraizamento de brotações**

Quanto à indução da formação de raízes (Tabela 2), houve efeito da interação BAP x meios para induzir enraizamento. O maior percentual de brotos enraizados (85%) foi verificado no meio constituído por metade dos sais de MT sem a adição de auxina, combinado com a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na fase de indução de brotações, diferindo-se dos demais. O efeito do BAP foi observado em todos os tratamentos utilizados, de modo que a presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP

**TABELA 2** - Enraizamento de brotos de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.) em função de concentrações de BAP e diferentes meios de cultura para induzir formação de raízes.

Concentração de BAP na indução de brotações (mg.L <sup>-1</sup> )	Meios para a indução do enraizamento			
	MT sem regulador vegetal	MT + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de ANA	MT/2 sem regulador vegetal	MT/2 + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de ANA
0,0	10,0a B	8,3a B	68,8ab A	75,0a A
1,0	15,0a B	8,3a B	85,0a A	37,5ab B
2,0	0a B	6,3a AB	40,0b A	16,7b AB

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem significativamente (Tukey 0,05).

favoreceu o enraizamento; já a concentração 2,0 mg L<sup>-1</sup> dessa citocinina exerceu influência negativa nessa variável. Esse fato também foi verificado por Almeida et al. (2002), que obtiveram maiores percentuais de enraizamento para 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' quando os brotos foram regenerados com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e constataram que concentrações acima de 1,5 mg L<sup>-1</sup> influenciaram negativamente na formação de raízes, ratificando que há um efeito residual dessa citocinina na fase de enraizamento das brotações.

A utilização de ANA em concentrações variando de 0,5 a 5 mg L<sup>-1</sup> foi fundamental para enraizar brotos de laranja 'Pineapple', com índices de 85% (Duran-Vila et al., 1989); de lima ácida 'Galego', com 70% (Perez-Molhepe-Balch & Ochoa, 1997); citrange 'Troyer', com 86% (Moreira-Dias et al., 2000); limão 'Cravo', com 80% (Moura et al., 2001); entretanto, no presente trabalho, a presença de ANA só foi favorável à formação de raízes em meio de cultura com 50% dos sais de MT e em brotos regenerados sem BAP, com índice de 75% de enraizamento. Todas as plantas enraizadas foram aclimatizadas e adaptaram-se às condições de casa de vegetação.

### CONCLUSÕES

1. O cultivo dos explantes em condições de escuro por 30 dias, utilizando-se da concentração 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, induziu a máxima proliferação de gemas adventícias *in vitro*.
2. Independentemente de os explantes terem sido cultivados horizontal ou verticalmente, a presença de BAP foi fundamental para promover melhor resposta organogênica.
3. Os segmentos apicais e mediais mostraram-se mais eficientes na indução da organogênese *in vitro* que os basais.
4. A utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na fase de indução de brotações, combinada com ausência de ANA em meio com metade dos sais de MT na fase de enraizamento, assegurou a máxima regeneração de plantas *in vitro*, com índices de 85% de brotos enraizados, bem como plantas aclimatizadas.
5. Recomenda-se como sistema de regeneração *in vitro*, a partir de segmentos de epicótilo de tangerina 'Cleópatra', na fase de indução de brotações, a utilização de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, cultivando-se as partes apicais ou mediais dos segmentos em condições de escuro por 30 dias e, na fase de enraizamento, o meio de cultura MT com metade dos sais.

### REFERÊNCIAS

ABECITRUS. **Novo mapeamento do sistema agroindustrial cítrica** (Informativo, 30 set. 2004). Disponível em : <www.abecitrus.com.br/informa.html>. Acesso: em 18 nov. 2004.

ALMEIDA, W. A. B. de et al. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, p.35-40, 2002.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, London, v.86, p.159-166, 2000.

COELHO, Y. da S. et al. **Comercialização dos Citrus no Estado da Bahia**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.24. (Documento, 108).

DURAN-VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of three citrus species. **Plant Cell Tissue and Organ**

**Culture**, Dordrecht, v. 16, p.123-133, 1989.

DURAN-VILA, N. et al. Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.): effect of temperature and photosynthetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 11-18, 1992.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, supl., p.76-86, 2003..

FERNANDES, N. G.; BASSANEZI, R. B. Morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, supl., p.66-72, 2003.

GARCIA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; GUARDIOLA, J. L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, London, v.84, p.715-723, 1999.

GOH, C. J. et al. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pummelo tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.43, p.301-303, 1995.

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

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola, maio 2004**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 21 nov. 2004.

MOREIRA-DIAS, J. M. et al. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotilyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and their response to light. **Annals of Botany**, London, v.85, p.103-110, 2000.

MOURA, T. L. de M. et al. Organogênese *in vitro* de Citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, ago., 2001.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.R.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. p.1155-1169.

OLIVEIRA, R. P. de et al. Calogênese em óvulos de espécies e variedades de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.220-224, 2001.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação de 'Trifoliata' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p. 217-220, 1989.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Maandarim by direct organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n.5, p.931-934, 1997.

RODRIGUES NETO, J.; LOPES, S. A. Manejo integrado de doenças bacterianas dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, supl., p.72-75, 2003.

SILVA, P. C. et al. Protocolo para Desinfestação de Semenets de Tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort ex Tan.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. ICD-ROM.

VITÓRIA, D. P.; DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S. Efeito de doses de nitrogênio e potássio sobre a produção de mudas de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) sobre porta-enxerto tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. ICD-ROM.