

ORGANOGENESE *in vitro* A PARTIR DE DIFERENTES REGIÕES DO EPICÓTILO DE *Citrus* sp.¹

EVANDRO HENRIQUE SCHINOR², LUIS GUSTAVO DE PAOLI³, FERNANDO ALVES DE AZEVEDO⁴*, FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO⁵, BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES⁶

RESUMO - O estabelecimento de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* é essencial para o uso de técnicas de transformação genética no melhoramento de citros. Visando à obtenção de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* para laranja-azedada (*Citrus aurantium*), laranjas 'Natal' e 'Pêra' (*C. sinensis*), limão 'Volkameriano' (*C. volkameriana*) e citrange 'Carrizo' (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*), avaliou-se a resposta morfogênica de diferentes regiões do epicótilo (basal, mediana e apical) em relação a distância do nó cotiledonar, na presença (1,0 mg/L⁻¹) ou ausência de 6-BAP, em meio de cultura MT. Após 60 dias, avaliaram-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de gemas adventícias por explante. A resposta morfogênica em função da região do epicótilo e da presença ou ausência da citocinina (6-BAP) foi influenciada pelo genótipo. A presença de 6-BAP no meio de cultura promoveu aumento na porcentagem de explantes responsivos para citrange 'Carrizo'. A suplementação do meio de cultura com a citocinina 6-BAP proporcionou aumento no número de brotos por explante para citrange 'Carrizo', laranja 'Natal' e limão 'Volkameriano'.

Termos para indexação: gema adventícia; cultura de tecidos; morfogênese.

Citrus sp. ORGANOGENESIS *in vitro* FROM DIFFERENT EPICOTYL'S REGIONS

ABSTRACT - The establishment of an *in vitro* plant regeneration protocol is essential for the use of genetic transformation techniques in *Citrus* breeding programs. Aiming to obtain an efficient protocol of *in vitro* regeneration for sour orange (*Citrus aurantium*), sweet oranges 'Natal' and 'Pêra' (*C. sinensis*), 'Volkamer' lemon (*C. volkameriana*) and 'Carrizo' citrange (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*), the morphogenetic response was evaluated for different epicotyl's regions (basal, medium and apical) regarding the distance from the cotyledonary node, in presence (1,0 mg/L⁻¹) or absence of 6-BAP in MT medium. After 60 days, the percentage of responsive explants and number of shoots per explants were evaluated. The morphogenetic response related to the epicotyl's region and the presence or absence of the cytokinin (6-BAP) were genotype influenced. The presence of 6-BAP in the culture medium showed a greater percentage of responsive explants for 'Carrizo' citrange. The addition of 6-BAP to the culture medium provided an increase in the number of shoots per explants for 'Carrizo' citrange, 'Natal' sweet orange and 'Volkamer' lemon.

Index terms: adventitious shoots; tissue culture; morphogenesis

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, com cerca de 20 milhões de toneladas anuais, com uma área colhida de aproximadamente 940 mil hectares (FAO, 2006). Apesar do impacto na economia brasileira, a citricultura mostra-se vulnerável devido, principalmente, à utilização de poucas combinações copa/porta-enxerto, o que vem ocasionando surtos de pragas e doenças ao longo dos anos. A ampliação da base genética atual dos citros torna-se necessária; entretanto, o melhoramento convencional pode apresentar poucos resultados significativos, atribuídos a barreiras naturais relacionadas à biologia reprodutiva do gênero (Gmitter Junior et al., 1992). Para contornar esses problemas, algumas técnicas, como a hibridação somática e a transformação genética vêm sendo incorporadas aos programas de melhoramento genético de citros (Almeida et al., 2002; Han et al., 2002). Porém, o uso destas técnicas depende da disponibilidade de um protocolo eficiente para regeneração de plantas *in vitro*.

O sucesso das vias de regeneração *in vitro* pode ser influenciado por vários fatores, como o genótipo, o tipo (segmento de epicótilo, segmento internodal, disco foliar), a idade e o tamanho dos explantes; os meios de cultura; as condições de cultivo; e os tipos e concentrações de reguladores vegetais, os quais se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (Thorpe, 1994; Moreira-Dias et al., 2001). Entre os reguladores vegetais, as citocininas promovem a divisão celular e estimulam a iniciação e o crescimento de gemas adventícias, sendo 6-benzilaminopurina (6-BAP) a citocinina mais utilizada para a indução de gemas adventícias

(Beyl, 2000).

A organogênese *in vitro* de citros tem sido estudada a fim de otimizar os meios de cultura utilizados (Almeida et al., 2002, 2003; Bordón et al., 2000; Moreira-Dias et al., 2000, 2001; Moura et al., 2001; Silva et al., 2005a, 2005b), as condições de incubação (Bordón et al., 2000; Costa et al., 2004; García-Luis et al., 1999; Moreira-Dias et al., 2000, 2001) e o tipo de explante (Almeida et al., 2003; Ghorbel et al., 1998; Moura et al., 2001). Com relação ao explante, sabe-se que a organogênese de citros é influenciada pelo uso de explantes coletados de tecido jovem (Almeida et al., 2002; Bordón et al., 2000; Costa et al., 2004; García-Luis et al., 1999; Moreira-Dias et al., 2000, 2001; Silva et al., 2005a, 2005b) ou adulto (Almeida et al., 2003; Cervera et al., 1998), da região do epicótilo utilizada para coletar o explante (Costa et al., 2004; Moreira-Dias et al., 2001; Silva et al., 2005a, 2005b), da posição na incubação, vertical ou horizontal (Bordón et al., 2000; García-Luis et al., 1999; Moreira-Dias et al., 2000; Silva et al., 2005b), da polaridade (García-Luis et al., 1999) e do tipo de seccionamento (Moura et al., 2001; Silva et al., 2005a). Os resultados obtidos nestes estudos nem sempre são conclusivos, permitindo que sejam adaptados para outras cultivares.

Visando à obtenção de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* que auxiliaria na obtenção de plantas transgênicas de citros, avaliou-se a resposta organogênica de explantes coletados em diferentes regiões do epicótilo (basal, mediana e apical) em relação a distância do nó cotiledonar, de *Citrus aurantium*, *C. sinensis*, *C. volkameriana* e *Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*, na presença ou ausência da citocinina 6-benzilaminopurina.

¹ (Trabalho 77-2006). Recebido: 05-06-2006. Aceito para publicação: 06-10-2006.

² Doutorando em Fitotecnia, bolsista Capes, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP. E-mail: schinor@widesoft.com.br;

³ Mestrando em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, bolsista Capes, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. E-mail: lgpaoi@esalq.usp.br;

⁴ Doutorando em Fitotecnia, bolsista Capes, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP. E-mail: fernando@centrodecitricultura.br;

⁵ Professor Associado, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ/USP, C.P. 9, CEP 13418-900, Piracicaba - SP. E-mail: famourao@esalq.usp.br;

⁶ Professora Associada, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, CENA/USP, C.P. 96, CEP 13400-970 Piracicaba - SP. Autor correspondente: bmenes@cena.usp.br

* Endereço atual: Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" (IAC), Rodovia Anhanguera, KM 158, C.P. 4, CEP 13490-970, Cordeirópolis, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção dos explantes, sementes foram extraídas de frutos maduros das variedades laranja-azedada (*Citrus aurantium*), laranjas 'Natal' e 'Pêra' (*C. sinensis*), limão 'Volkameriano' (*C. volkameriana*) e citrange 'Carrizo' (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*), provenientes da coleção de cultivares de citros da ESALQ-USP, em Piracicaba-SP. As sementes foram lavadas para a retirada da mucilagem e secas em temperatura ambiente por 12 h. Em seguida, foram retirados seus tegumentos e realizou-se a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), durante 20 min, sob agitação. Após este período, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas, e germinadas *in vitro*, em tubos de ensaio (15 x 2,5 cm) contendo 15 mL do meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com sacarose (25 g.L⁻¹), solidificado com Phytigel™ (2 g.L⁻¹) e pH 5,8. A incubação foi realizada no escuro, por um período de 30 dias, à temperatura de 27 °C, para germinação e alongamento do epicótilo. As plântulas germinadas foram transferidas para fotoperíodo de 16 h, por 7-10 dias.

Para verificar a resposta morfogênica, segmentos de epicótilo foram seccionados transversalmente e divididos em três diferentes regiões, em função da distância do nó cotiledonar: basal, mediana e apical (Figura 1). Os explantes com 0,8-1,0 cm de comprimento, foram cultivados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura MT, na presença de 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP ou na ausência do regulador. A incubação foi realizada no escuro, por 20 dias, e, em seguida, transferiu-se para fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 27 °C. Após 40 dias, avaliaram-se o número de explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias (explantes responsivos), e o número de gemas adventícias por explante. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema de parcela subdividida 3x2 (região x regulador), com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri, contendo quinze segmentos de epicótilo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização de protocolos de organogênese *in vitro* tem sido estudada para diferentes cultivares de citros com a variação de fatores físicos, químicos e do material vegetal. A suplementação do meio de cultura com citocinina, principalmente 6-benzilaminopurina, é considerada essencial para o desenvolvimento da organogênese *in vitro*, em diferentes espécies (Beyl, 2000; Moreira-Dias et al., 2001; Silva et al., 2005b). Para o caso específico de citros, a organogênese *in vitro* tem sido obtida cultivando-se segmentos de epicótilo ou segmentos internodais em meios de cultura suplementados com 6-BAP (Almeida et al., 2002, 2003; Moura et al., 2001; Silva et al., 2005a, 2005b) ou com a combinação 6-BAP + ANA (Almeida et al., 2003; Bordón et al., 2000; Moreira-Dias et al., 2000, 2001).

A análise dos dados apresentados na Tabela 1 indica que o maior número de explantes responsivos foi obtido com a utilização de explantes coletados da região basal do epicótilo para as cultivares laranja 'Natal', citrange 'Carrizo' e laranja-azedada, com 96; 83 e 68,7% de explantes com pelo menos uma gema adventícia regenerada, respectivamente. Para o limão 'Volkameriano', 77,3% de explantes coletados da região apical do epicótilo responderam à organogênese, diferindo da região basal com 56,7% de explantes que regeneraram gemas adventícias. Para a laranja 'Pêra', não foi possível detectar diferenças quanto ao número de explantes responsivos entre as três regiões do epicótilo avaliadas.

A suplementação do meio de cultura com 6-BAP mostrou-se essencial para citrange 'Carrizo', constatando que 1,0 mg.L⁻¹ do regulador proporcionou um aumento de 40,7 para 93,3% no número de explantes responsivos, independentemente da região do epicótilo avaliada. Para o limão 'Volkameriano', não foi possível detectar

diferenças com relação à utilização ou não da citocinina. Para laranja-azedada e laranjas 'Natal' e 'Pêra', a porcentagem de explantes responsivos foi maior quando os explantes foram incubados em meio de cultura basal não-suplementado com regulador vegetal, 77,3; 92 e 77,2%, respectivamente. Embora o uso dos reguladores vegetais estimule a organogênese, nem sempre a suplementação do meio de cultura pode ser considerada essencial. Almeida et al. (2002) também não detectaram diferenças na suplementação do meio de cultura com concentrações variando entre 0 e 2,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP para laranjas 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' e para limão 'Cravo'.

De forma geral, não houve influência da região do epicótilo no número de gemas adventícias desenvolvidas por explante. Apenas para citrange 'Carrizo' ocorreu o desenvolvimento de um maior número de gemas adventícias nos explantes coletados da região basal do epicótilo regenerando 2,5 gemas/explante, diferindo das demais regiões. A suplementação do meio de cultura com 6-BAP favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias, tendo-se obtido um maior número de gemas por explante para citrange 'Carrizo' (3,2), limão 'Volkameriano' (1,5) e laranja 'Natal' (1,4) (Tabela 2). Esse efeito significativo do uso de reguladores vegetais na organogênese *in vitro* de citros parece estar mais relacionado ao número de gemas adventícias desenvolvidas por explante do que com a porcentagem de explantes responsivos, conforme constatado por Silva et al. (2005b). Para laranja-azedada e laranja 'Pêra' não foi possível detectar diferenças em relação à adição ou não do 6-BAP no meio de cultura.

Houve interação da presença de 6-BAP x regiões do epicótilo para laranja 'Natal', sendo que, na presença do regulador vegetal, o maior número de explantes responsivos foi obtido com explantes coletados da região basal do epicótilo com 93,3% contra 50,7 e 65,3% para as regiões apical e mediana, respectivamente. Para citrange 'Carrizo', a região basal diferiu das demais apenas na ausência do regulador com 66% contra 20 e 36% para as regiões apical e mediana, respectivamente; entretanto, o 6-BAP parece ser fundamental para a regeneração dessa variedade. Quanto ao número de gemas

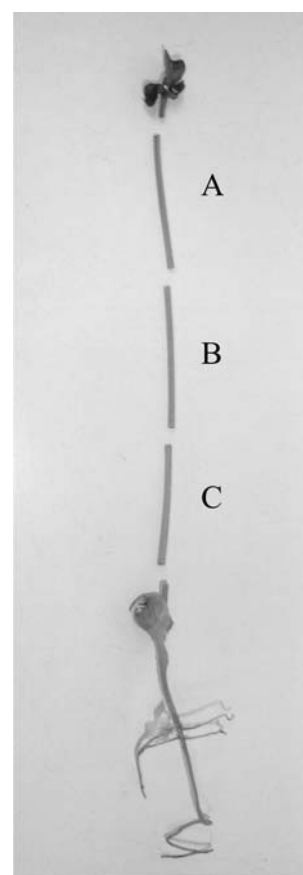


FIGURA 1 - Plântula de citros germinada *in vitro*, mostrando o seccionamento das regiões apical (A), mediana (B) e basal (C) do epicótilo, utilizadas como explantes.

TABELA 1 - Número de explantes com gemas adventícias (%) em diferentes regiões do epicótilo de cinco variedades de citros.

Variedade	6-BAP (mg.L ⁻¹)	Região do epicótilo			
		Apical	Mediana	Basal	Média
Azeda	0	10,4* (69,3) ns	11,6 (77,3)	12,8 (85,3)	11,6 (77,3) A
	1,0	3,0 (20,0) ns	6,8 (45,3)	7,8 (52,0)	5,9 (39,1) B
	Média	6,7 (44,7) b	9,2 (61,3) ab	10,3 (68,7) a	
Volkameriano	0	12,2 (81,3) ns	9,6 (64,0)	8,6 (57,3)	10,1 (67,6) A
	1,0	11,0 (73,3) ns	11,8 (78,7)	8,4 (56,0)	10,4 (69,3) A
	Média	11,6 (77,3) a	10,7 (71,3) ab	8,5 (56,7) b	
Natal	0	13,6 (90,7) a A	13,0 (86,7) a A	14,8 (98,7) a A	13,8 (92,0) A
	1,0	7,6 (50,7) b B	9,8 (65,3) b B	14,0 (93,3) a A	10,5 (69,8) B
	Média	10,6 (70,7) b	11,4 (76,0) b	14,4 (96,0) a	
Carrizo	0	2,0 (20,0) b B	3,6 (36,0) b B	6,6 (66,0) a B	4,1 (40,7) B
	1,0	8,6 (86,0) a A	9,4 (94,0) a A	10 (100,0) a A	9,3 (93,3) A
	Média	5,3 (53,0) b	6,5 (65,0) b	8,3 (83,0) a	
Pêra	0	8,6 (71,7) ns	9,4 (78,3)	9,8 (81,7)	9,3 (77,2) A
	1,0	4,6 (38,3) ns	5,2 (43,8)	6,4 (53,3)	5,4 (45,1) B
	Média	6,6 (55,0) a	7,3 (61,0) a	8,1 (67,5) a	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5%.

* Médias de cinco repetições com quinze explantes por repetição.

TABELA 2 - Número total de gemas adventícias/total de explantes responsivos (média/explante), de diferentes regiões do epicótilo, de cinco variedades de citros (média de cinco repetições).

Variedade	6-BAP (mg.L ⁻¹)	Região do epicótilo			
		Apical	Mediana	Basal	Média
Azeda	0	65/52 (1,3) ns	77/58 (1,3)	81/64 (1,2)	223/174 (1,3) A
	1,0	23/15 (1,4) ns	50/34 (1,5)	49/39 (1,3)	122/88 (1,4) A
	Média	88/67 (1,4) a	127/92 (1,4) a	130/103 (1,3) a	
Volkameriano	0	75/61 (1,2) ns	54/48 (1,1)	46/43 (1,1)	175/152 (1,1) B
	1,0	75/55 (1,4) ns	96/59 (1,6)	71/42 (1,6)	242/156 (1,5) A
	Média	150/116 (1,3) a	150/107 (1,4) a	117/85 (1,3) a	
Natal	0	74/68 (1,1) NS	79/65 (1,2)	88/74 (1,2)	241/207 (1,2) B
	1,0	50/38 (1,3) NS	71/49 (1,4)	105/70 (1,5)	226/157 (1,4) A
	Média	124/106 (1,2) a	150/114 (1,3) a	193/144 (1,3) a	
Carrizo	0	10/10 (1,0) a B	18/18 (1,0) a B	34/33 (1,0) a B	62/61 (1,0) B
	1,0	112/43 (2,6) b A	140/47 (3,0) b A	199/50 (4,0) a	451/140 (3,2) A
	Média	122/53 (1,8) b	158/65 (2,0) b	233/83 (2,5) a	
Pêra	0	56/43 (1,3) ab A	61/49 (1,2) b A	78/49 (1,6) a A	195/141 (1,4) A
	1,0	34/23 (1,3) a A	35/26 (1,3) a A	40/32 (1,2) a B	102/76 (1,3) A
	Média	90/66 (1,3) a	96/75 (1,3) a	118/81 (1,4) a	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5%.

adventícias regeneradas por explante, verificou-se uma interação 6-BAP x regiões do epicótilo para citrange 'Carrizo', em que a incubação dos explantes provenientes da região basal do epicótilo em meio de cultura suplementado com 6-BAP proporcionou a regeneração de 4,0 gemas/explante, diferindo das regiões apical e mediana, com 2,6 e 3,0 gemas regeneradas por explante. Para laranja 'Pêra', a incubação dos explantes provenientes da região basal do epicótilo em meio de cultura sem a adição de 6-BAP, proporcionou a regeneração de 1,6 gemas/explante, diferindo apenas da região mediana, com 1,2 gemas/explante.

Estas variações nos resultados com relação ao uso ou não de citocinina devem estar relacionadas à concentração interna de auxinas e citocininas no tecido dos explantes e podem variar em função da região do epicótilo onde o explante foi coletado. Moreira-Dias et al. (2001) relataram que independentemente do meio de cultura e das condições de incubação, a organogênese diminui em função da distância do nó cotiledonar, ou seja, quanto mais distante do nó cotiledonar, menor a frequência de desenvolvimento de gemas adventícias. Resultados semelhantes também foram verificados neste trabalho para laranja 'Natal', citrange 'Carrizo' e laranja-azedra, em

que a região basal do epicótilo respondeu melhor à organogênese. Porém, alguns trabalhos indicaram quanto mais distante do nó cotiledonar o explante for coletado, maior a frequência de desenvolvimento de gemas adventícias (Costa et al., 2004; Silva et al., 2005a, 2005b), conforme demonstrado para limão 'Volkameriano' neste trabalho.

Os resultados obtidos no presente estudo e relatos na literatura indicam que os diferentes padrões de resposta organogênica ao longo do eixo de epicótilo de citros podem ser atribuídos a fatores relacionados ao material vegetal, como o genótipo e a idade do explante; à composição do meio de cultura, como concentrações e tipos de reguladores vegetais; e às condições de incubação, como orientação do explante e regime de luminosidade, conforme demonstrado por Costa et al. (2004).

CONCLUSÕES

1) A organogênese *in vitro* em citros é influenciada pelo genótipo, independentemente da região do epicótilo que o explante é coletado e da presença ou ausência da citocinina (6-BAP).

2) A presença de 6-BAP no meio de cultura promoveu aumento na porcentagem de explantes responsivos para citrange 'Carrizo'.

3) A suplementação do meio de cultura com 6-BAP proporcionou aumento no número de brotos por explante para citrange 'Carrizo', laranja 'Natal' e limão 'Volkameriano'.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.35-40, 2002.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerick, v.164, p.203-211, 2003.
- BEYL, C.A. Getting started with tissue culture. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap.3, p.21-38.
- BORDÓN Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-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.
- CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, London, v.7, p.51-59, 1998.
- COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G.; MOSQUIMA, P.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, p.63-74, 2004.
- FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 15 maio 2006.
- GARCÍA-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.
- GHORBEL, R.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.73, n.3, p.323-327, 1998.
- GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. chap.14, p.335-369.
- HAN, S.H.; KANG, S.K.; AN, H.J.; KIM, H.Y. Effect of embryogenic callus conditions on plant regeneration in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal of Plant Biotechnology**, Bristol, v.4, p.29-32, 2002.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, London, v.85, p.103-110, 2000.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.87, p.275-290, 2001.
- MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. 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, 2001.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside. **Proceeding...** Riverside: University of California, 1969. p.1155-1169.
- SILVA, R.P.; COSTA, M.A.P.C; SOUZA, A.S.; ALMEIDA, W.A.B. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.12, p.1.153-1.159, 2005a.
- SILVA, R.P.; SOUZA, E.S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.484-487, 2005b.
- THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.) **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. chap.2, p.17-36.