UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS E MINIENXERTIA EM CITROS

MARIA INÊS DE SOUZA MENDES

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO DE 2016

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS E MINIENXERTIA EM CITROS

MARIA INÊS DE SOUZA MENDES
Bacharel em Ciências Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - 2013

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: MARIA ANGÉLICA PEREIRA DE CARVALHO COSTA
COORIENTADOR: WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO
COORIENTADOR: ABELMON DA SILVA GESTEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS, BA, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

M538r

Mendes, Maria Inês de Souza.
Regeneração in vitro de porta-enxertos e minienxertia em citros / Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa._ Maria Inês de Souza Mendes._ Cruz das Almas, BA, 2016.
80f.; il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.
Coorientador: Walter dos Santos Soares Filho.

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

1.Citros – Cultivo. 2.Citros – Melhoramento genético. 3.Porta-enxertos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Gesteira, Abelmon da silva. III.Título.

CDD: 634.304

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

COMISSÃO ORGANIZADORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARIA INÊS DE SOUZA MENDES

Profª. Drª. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(orientadora)

Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida
Faculdade Maria Milza - FAMAM

Dr. Everton Hilo de Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em .....,
conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em .....

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, por me conceder o dom da vida e a permissão para realização deste trabalho, bem como de tudo em minha vida.

Aos meus pais, Tomazia e Benedito, maiores colaboradores na construção do meu eu, pela criação, amor, dedicação e incentivo sempre.

Aos meus queridos irmãos Roque, Cosme, Damiana, Inez, Fátima, Antônio, Benedito e Maria José, juntamente com seus cônjugues, e ao meu noivo Alex, pelo apoio, admiração e sempre me proporcionando grandes momentos.

Aos meus tios e primos, sempre presentes.

À minha orientadora Drª. Maria Angélica Costa, pela amizade, incentivo, dedicação e conhecimentos transmitidos, os quais me farão crescer profissionalmente.

A Dr. Antônio Souza por toda orientação, dedicação, amizade, cuidado e ensinamentos que pude dispor durante toda minha carreira acadêmica e guardarei sempre com muito carinho.

Aos co-orientadores Dr. Abelmon Gesteira e Dr. Walter Soares Filho pelas orientações e apoio, estando sempre a disposição.

À toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, especialmente Honorato, Elaine, Mariane, Jéssica, Manuela, Ubiraci, Eliane, Karen e Meire pelas colaborações, aprendizados e amizades.

Ao pessoal do campo pela atenção e disponibilidade em cooperar sempre com os trabalhos desenvolvidos em casa de vegetação.

A todos os amigos, em especial, Camila, Renata e Mariana pela amizade e torcida, sempre me incentivando a ir além.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura por ter possibilitado a realização dessa pesquisa.

À Capes pela base financeira através da bolsa concedida.

E a todos que de alguma forma cooperaram com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

RESUMO vii

ABSTRACT viii

INTRODUÇÃO GERAL.....01

Capítulo 1
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DOS PORTA-ENXERTOS DE CITROS LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051.....27

Capítulo 2
ADEQUAÇÃO DA TÉCNICA DE MINIENXERTIA EM CITROS.....51

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....71

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS E MINIENXERTIA EM CITROS

Autora: Maria Inês de Souza Mendes
Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Co-orientador: Walter dos Santos Soares Filho
Co-orientador: Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: O *Citrus* representa uma das fruteiras mais importantes do mundo, sendo que, 70 % da produção de laranja no Brasil é destinada para a fabricação de sucos. A qualidade do suco embora seja intrínseca a variedade, pode ser influenciada por fatores abióticos e pelo porta-enxerto utilizado. As variações entre as diferentes espécies de porta-enxertos e seus híbridos estão diretamente relacionadas às expansões ou limitações de áreas onde a cultura pode se desenvolver. Assim, a diversificação de porta-enxertos consiste, portanto, em uma importante ferramenta para melhorar a produtividade e qualidade da citricultura, atendendo às expectativas do produtor e do mercado consumidor. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo adequar os protocolos de estabelecimento e minienxertia em porta-enxertos produzidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. A regeneração dos porta-enxertos LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051 foi obtida por meio da organogênese direta a partir de segmentos apicais e nodais de 1 cm de altura, respectivamente, em meio de cultura WPM, com pH 6,0. A presença de 0,1 mg L^{-1} de ANA associada a concentração de 0,00008 mg L^{-1} de BAP foi eficiente na morfogênese *in vitro* do porta-enxerto HTR - 051. A minienxertia no porta-enxerto HTR - 069 apresentou as melhores respostas para sobrevivência das variedades copas laranjeira ‘Pera’, tangerina ‘Sunki Tropical’ e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’. O porta-enxerto citrandarin ‘Indio’ proporcionou um maior desenvolvimento da altura da copa e do diâmetro do enxerto.

Palavras-chave: *Citrus*, organogênese direta, melhoramento genético, morfogênese, propagação.

REGENERATION *IN VITRO* OF ROOTSTOCK AND MINIGRAFTING IN CITRUS

Authoress: Maria Inês de Sousa Mendes
Advisor: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Co-advisor: Walter dos Santos Soares Filho
Co-advisor: Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: The *Citrus* represents one of culture most important in fruits of world, being that, 70 % of orange production of Brazil is destined to manufacturing of juice. The juice quality, although intrinsic the range, may be influenced by abiotic factors and rootstock used. The variations between the different species of rootstock and their hybrids are directly related to expansions or limitations of areas where the culture can develop. Thus, the rootstock's diversification consists, therefore, an important tool to improve the productivity and quality of citriculture, meeting the expectations of the producer and the consumer market. By the way, this study aims to adapt the establishment of protocols and minigrafting in rootstock produced by the Genetic Improvement Program of Citrus of Embrapa Cassava and Fruits. The regeneration of rootstocks LCREEL x (LCR x TR) - 001 and HTR - 051 was obtainded by direct organogenesis from apical micropiles and nodal segments of 1 cm, respectively, in medium culture WPM, pH 6.0. The presence of 0.1 mg L^{-1} of ANA associated with concentration 0.00008 mg L^{-1} of BAP was effective in morphogenesis *in vitro* of HTR - 051 rootstock. The minigrafting of HTR - 069 rootstock showed the best results for survival of varieties canopies orange Pera, tangerine Sunki Tropical and lemon Cravo Santa Cruz. The rootstock citrandarin 'Indio' provided a larger development of heigh canopy and diameter of graft.

Keywords: *Citrus*, organogenesis, plant breeding, morphogenesis, propagation.

INTRODUÇÃO GERAL

Centro de origem e taxionomia dos citros

Originários de regiões do Sul e Sudeste da Ásia, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e do Leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (DONADIO et al., 2005), os citros são cultivados em diversos países com clima tropical ou subtropical (DUGO; DI GIACOMO, 2002).

Os citros são plantas eudicotiledôneas, pertencentes a familia Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae, sendo estreitamente relacionado aos demais gêneros de sua subtribo, a saber: *Severinia* Ten. ex Endl., *Pleiospermium* [(Engl.) Swingle]; *Burkillantus* (Swingle), *Limnocitrus* (Swingle) e *Hesperetusa* (Roem.), que são mais primitivos; *Citropsis* [(Engl.) Swingle e M. Kell.] e *Atalantia* (Corrêa), mais evoluídos do que os anteriores; *Ponciurus, Fortunella, Microcitrus, Eremocitrus e Clymenia,* constituindo esses últimos, juntamente com *Citrus*, o grupo dos citros verdadeiros, por produzirem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (SWINGLE, 1967; OTRIZ MARCIDE, 1985).

As principais espécies de plantas de interesse comercial mundial competem aos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, sendo *Citrus* o de importância mais relevante (WEILER et al., 2010).

Discordâncias ocorrem quanto ao sistema de classificação da subfamília Aurantioideae, especialmente em relação ao gênero *Citrus*, devido a elevada taxa de apomixia e compatibilidade sexual interespecífica e intergenérica, a alta frequência de mutações somáticas e ao longo período de cultivo e dispersão

(NICOLOSI et al., 2000), levando assim a diferentes sistemas taxonômicos com um número variável de espécies para o gênero.

Não há resultados conclusivos para determinar qual sistema de classificação é o mais preciso, embora estudos para analisar a filogenia e a origem genética de espécies de *Citrus* mediante marcadores moleculares tenham sido realizadas (NICOLOSI et al., 2000; PANG et al., 2003; CORAZZA-NUNES et al., 2005).

O sistema taxonômico de Swingle e Tanaka é o mais aceito. Swingle (1967) subdividiu o gênero *Citrus* em dois subgêneros: *Citrus* e *Papeda*, onde o *Citrus* é representado por dez espécies de frutos comestíveis e estames alados na base, e *Papeda* por seis espécies de frutos contendo vesículas com agregação de gotas de sabor não palatável, estames livres, presença de óleo acrídico nos frutos e inflorescência pequena. Tanaka (1977) propôs para o gênero a existência de 162 espécies, distribuídas nas seções papeda, limonellus, citrophorum, cephalocitrus e aurantium, do subgênero *Archicitrus*, e nas seções osmocitrus, acrumen e pseudofortunella, do subgênero *Metacitrus*.

Distribuição geográfica dos citros

A citricultura ocupa uma ampla área geográfica, situada entre os paralelos de 35° de latitude Norte e 35° de latitude Sul. No Mediterrâneo, devido às condições excepcionais de clima, a cultura é explorada em locais com até 42° de latitude Norte (CAMPOS, 1976).

O Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanmar são regiões mais antigas de cultivo dos citros, dispersando-se daí pelas Filipinas e numerosos grupos de ilhas do Pacífico (SPURLING, 1969).

Na Europa a dispersão da cultura foi influenciada pelos árabes e exércitos mulçumanos, sendo a cidra registrada como o primeiro fruto cítrico utilizado pela civilização europeia, 310 anos antes de Cristo. No século X foi introduzida a laranja azeda, havendo indicações de que os limões, as limas ácidas e as toranjas tenham se dispersado de modo semelhante, durante a primeira metade do século XII (SOOST; CAMERON, 1975). Após o domínio árabe, as Cruzadas, cujo início data do final do século XI, passaram a ter grande

influência sobre a expansão dos citros na Europa (WEBBER et al., 1967). Presume-se que a laranja doce tenha sido introduzida no continente europeu somente em princípios do século XV, por parte de genoveses, apesar de seus cultivos serem bastante antigos na China. As tangerinas, também extensivamente exploradas na China e no Japão desde épocas remotas, passaram a ser conhecidas na Europa (WEBBER et al.,1967; SOOST; CAMERON, 1975)

As introduções nas Américas foram realizadas por Cristovão Colombo, em sua segunda viagem ao Novo Mundo, no ano de 1493, quando trouxe para o Haiti sementes de laranjas, limões e cidras procedentes da Ilha de Gomera, pertencente ao grupo das Canárias. Introduções suplementares foram feitas nas Américas por portugueses e espanhóis, em inícios do século XVI (WEBBER et al., 1967; SOOST; CAMERON, 1975).

No Brasil, os registros mais antigos de cultivo dos citros datam de 1540, na Ilha de Cananéia, Estado de São Paulo, e de 1549, com a chegada de padres jesuítas a Salvador, Estado da Bahia (WEBBER et al., 1967; CAMPOS,1976).

Os citros são cultivados em todas as áreas tropicais e subtropicais favoráveis à cultura, no entanto, as principais áreas comerciais encontram-se em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20° N e 20° S (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996).

Importância econômica dos citros

A cultura dos citros possui um grande potencial econômico nacional e internacionalmente. A produção mundial de citros foi de mais de 131 milhões de toneladas, na safra 2012, tendo o Brasil participação como o segundo produtor mundial, com mais de 20 milhões de toneladas, ficando apenas atrás da China, com 31,7 milhões de toneladas, e ultrapassando os Estados Unidos da América, com 10,6 milhões de tonelada, o México, com 6,7 milhões de toneladas, e a Espanha, com 5,5 milhões de toneladas (FAO, 2014).

A laranja destacou-se dentre as frutas cítricas, com 51,79 % da produção mundial na safra de 2012. O Brasil possui a posição de maior produtor de

laranjas no mundo, seguido pelos EUA, China, Índia, México, Egito e Espanha. A produção brasileira é de mais de 18 milhões de toneladas, distribuídas nas regiões Sudeste (79 %), Nordeste (10,77 %), Sul (7,4 %), Norte (1,52 %) e Centro-Oeste (0,8 %). Na região Nordeste, o Estado da Bahia é o principal produtor, com mais de um milhão de toneladas, na safra 2012, (IBGE, 2014), o que corresponde a 53,46 % da produção da região.

Enquanto o Brasil e os Estados Unidos utilizam mais de 70 % das laranjas que produzem para a fabricação de sucos, México e China, em sua maioria, vendem as frutas para o consumo in natura, e, na Espanha, mais da metade das laranjas tem como destino a exportação (NEVES et al., 2010). O Brasil detém cerca de 60 % da produção de suco de laranja, sendo 80 % da produção brasileira da fruta destinada a produção de suco industrializado, e mantém a posição de maior participação no mercado (MAPA, 2015).

Apesar do Brasil ocupar posição de liderança na produção de laranja e as condições edafoclimáticas serem favoráveis à cultura, segundo a FAO (2014) a produtividade dos pomares brasileiros é ainda reduzida em comparação aos Estados Unidos. Essa baixa produtividade está conexa à falta de irrigação nas lavouras, à susceptibilidade das variedades utilizadas, às inúmeras pragas e doenças que, encontrando condições favoráveis ao seu desenvolvimento, são capazes de causar danos à produção e à qualidade das frutas cítricas, e ao limitado número de variedades copa e porta-enxerto (MACHADO et al., 2005).

Propagação dos citros

As plantas cítricas podem ser multiplicadas por sementes, alporquia, enxertia, estaquia (ANDRADE e MARTINS, 2003) ou por métodos de cultura de tecidos. A semeadura foi o método utilizado na propagação das primeiras espécies cítricas introduzidas no Brasil. A facilidade deste método norteou a disseminação dos citros durante a colonização do Brasil, no século XVI. A propagação por sementes, na citricultura mundial, predominou até a metade do século XIX, quando problemas relacionados ao ataque de *Phytophthora* sp., na Ilha dos Açores (Portugal), determinaram o uso de porta-enxertos tolerantes a esses fungos (CARLOS et al., 1997).

Além de problemas relacionados às doenças, a multiplicação por semeadura apresenta várias desvantagens, como: o inicio de produção tardio dos pés-francos, implicando em um maior espaço de tempo para que se tenha o retorno econômico do capital investido na implantação do pomar; a produção dos frutos pode ser menor e aperiódica; e as plantas apresentam muitos espinhos e crescem bastante, dificultando a colheita e os tratos culturais (CUNHA SOBRINHO et al., 2013a). A multiplicação por sementes ainda nem sempre é viável, porque existem cultivares que não as têm, são aspérmicas, enquanto outras são monoembriônicas, resultando em descendência muito variável, obtida por cruzamentos ou autofecundação naturais, não reproduzindo, portanto, a planta-mãe (CUNHA SOBRINHO et al., 2013b).

Na Espanha, os agricultores perceberam que as plantas provenientes de sementes tardavam muito a entrar em produção e tinham muitos espinhos, que poderiam lesionar as frutas, e passaram a adotar a enxertia a partir da segunda metade do século XIX (CARLOS et al., 1997).

Entre outros métodos de propagação, a alporquia consiste na formação de uma planta forçando-se um ramo, que continua unido à planta-mãe, a emitir raízes mediante seu contato com o solo. Já no processo da estaquia provoca-se a formação de raízes adventícias em qualquer parte do vegetal, quando então é separada da planta original e colocada em um meio apropriado ao enraizamento. No entanto, esses dois métodos, embora produzam fielmente as plantas originais e induzam frutificação precoce, apresentam como desvantagens a suscetibilidade da planta à podridão-do-pé e das raízes (CUNHA SOBRINHO et al., 2013a).

As técnicas de enxertia resumem-se a três – garfagem, encostia e borbulha – das quais apenas a última é usada comercialmente na citricultura de todo o mundo. Nesse processo, faz-se a soldadura de um pedaço de casca com uma gema da variedade que se quer multiplicar em um porta-enxerto já enraizado (CUNHA SOBRINHO et al., 2013a).

Na busca pela uniformidade e produtividade, os pomares comerciais de citros são formados por mudas obtidas por enxertia, mas isso tornou os cultivos vulneráveis a enfermidades típicas de plantas enxertadas, como exocorte,

xiloporose e declínio dos citros (CASTRO; KERSTEN, 1996), havendo dessa forma a necessidade da diversificação dos porta-enxertos utilizados.

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

Porta enxertos de citros

No Brasil, no início do século XIX, utilizava-se a laranjeira doce [*Citrus sinenses* (L.) Osb] 'Caipira' como principal porta-enxerto que, por suscetibilidade à seca e à gomose, levou ao uso da laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium* L.), que passou, então, a ser o principal porta-enxerto. A intolerância deste porta-enxerto ao vírus da tristeza praticamente dizimou a citricultura brasileira na década de 1940 (CUNHA SOBRINHO et al., 2013b).

Após a década de 1960, o limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osb.) passou a liderar a preferência dos citricultores e em alguns anos foi empregado em 99 % das mudas produzidas (SCHÄFER et al., 2001), com exceção dos estados de Sergipe, onde o limoeiro 'Cravo' dividiu com o 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) a sustentação dos pomares citrícolas, com predominância do primeiro, e do Rio Grande do Sul, onde prevalece o emprego do trifoliata [*Ponciurus trifoliata* (L.) Raf.]. No Estado de São Paulo o uso do limoeiro 'Cravo' nos pomares passou de 76,6 % em 1961 para 99,1 % em 1970. Uma das causas desse crescimento foi o uso de borbulhas de matrizes nucelares, livres de exocorte e xiloporose, às quais o 'Cravo' é suscetível (CUNHA SOBRINHO et al., 2013b).

Com o surgimento do 'declínio dos citros' na década de 1970, ao qual o limoeiro 'Cravo' é vulnerável, optou-se pelo uso de outros porta-enxertos tolerantes a essa anomalia, como a tangerineira 'Cleópatra' (C. reshni Hort. ex Tanaka) e o limoeiro 'Volkameriano' (C.volkameriana V. Ten. & Pasq.).

No Brasil, entre 1984 e 1988, a tangerineira ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort. ex Tan.) teve seu uso aumentado (24 % das mudas produzidas) e em escala menor, a tangerineira ‘Sunki’ (*C. sunki* Hort ex Tan.), o limoeiro ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Ten. et Pasq.), o *P. trifoliata* e seus híbridos (CARLOS et al., 1997).

Nos pomares paulistas, além do limoeiro ‘Cravo’, tangerineira ‘Cleópatra’, citrumeleiro ‘Swingle’, tangerineira ‘Sunki’, limoeiro ‘Volkameriano’, e do trifoliata, têm sido empregados outros porta-enxertos, como os citranges (*C. sinenses* x *P*. trifoliata) ‘Troyer’ e ‘Carrizo’, a ‘Caipira’ e outras laranjeiras doces, o tangelo ‘Orlando’ (*C*. *paradisi* Macf. x *C*. *tangerina* hort. ex Tanaka), o limoeiro ‘Rugoso’, a laranjeira ‘Azeda’ ‘Gou tou Chen’, esses totalizando menos de 4 % das mudas (AMARO; BAPTISTELLA, 2008; POMPEU JUNIOR, 2005; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2008). Assim, mesmo considerando a prevalência do limoeiro ‘Cravo’ com 65 % de uso no período, observa-se, paulatinamente, uma diversificação de porta-enxertos nos viveiros paulistas em relação a anos passados (AMARO; BAPTISTELLA, 2008).

No Rio Grande do Sul o *P. trifoliata* é o porta-enxerto mais utilizado, alcançando até 97,5 3% das mudas produzidas em 1998 (SCHÄFER; DORNELLES, 2000). O interesse pelo uso do *P*. *trifoliata* e de seus híbridos deve-se à características como redução do porte da planta, permitindo maior densidade de plantio, produção de frutos de boa qualidade e melhor tolerância à podridão do pé e das raízes (CUNHA SOBRINHO et al., 2013a).

Resultados obtidos na Bahia com híbridos de trifoliata gerados pela United States Date and *Citrus* Station, Indio, Califórnia, pertencente ao United States Department of Agricultura (USDA), relacionadas à produtividade e ao vigor de plantas de laranjeira ‘Pêra’ demonstraram a possibilidade de sua inclusão em programas de diversificação de porta-enxertos em áreas de condições ambientais semelhantes às dos locais das avaliação, destacando-se os híbridos tangerineira ‘Sunki x *P. trifoliata* seleção ‘English’ (63/256 e 63/264) e Sunki x *P. trifoliata* seleção ‘Swingle’ (63/314) (PASSOS et al., 2005). Esses citrandarins foram recomendados como porta-enxertos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, com denominações de ‘Indio’; ‘Riverside’ e ‘San Diego’ (PASSOS et al., 2011a, 2011b, 2011c).

Por volta de 1999, com o surgimento da morte-súbita-dos-citros em pomares dos Estados de Minas Gerais e São Paulo, avaliou-se uma nova tentativa para diversificação de porta-enxertos, frente à vulnerabilidade do limoeiro ‘Cravo’ a essa doença (CUNHA SOBRINHO et al., 2013b). Assim, não constatando sintomas em plantas enxertadas em outros porta-enxertos, a utilização do limoeiro ‘Cravo’, que chegou a alcançar 82 %, baixou para 45 %, ocupando o segundo lugar nas preferências o citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata*), seguido pelas tangerineiras ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’, tolerantes a morte súbita dos citros nesses Estados (AMARO; BAPTISTELLA, 2008; POMPEU JUNIOR, 2005).

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil é utilizado de maneira abusiva o limoeiro ‘Cravo’ como porta-enxerto de todas as variedades cultivadas, em todos os tipos de solo e clima, com exceção do Estado de Sergipe (CUNHA SOBRINHO et al., 2013b). Na Bahia, em ensaio com laranjeira ‘Hamlin’ (*C. sinenses*), diversas seleções de limoeiro ‘Rugoso’ superaram o limoeiro ‘Cravo’ em produção, destacando-se a seleção ‘Volkameriano’ que é uma boa alternativa para a enxertia da limeira ácida ‘Tahiti’ por sua tolerância à exocorte (CUNHA SOBRINHO et al.,1986).

Poliembrionia em citros

A poliembrionia institui um dos principais obstáculos à criação de novas variedades cítricas pelos programas de melhoramento genético. Fenômeno corriqueiro a muitas espécies cítricas, a poliembrionia é caracterizada pela presença de mais de um embrião em uma mesma semente. A maioria desses embriões é de origem nucelar (apogâmicos), e o embrião zigótico, quando presente, geralmente único (SOARES FILHO et al., 2002).

Na propagação dos citros, outros aspectos são também relevantes para a seleção de porta-enxertos, principalmente a poliembrionia das sementes (SOARES FILHO et al., 2003). O vigor, uma das características de interesse na busca de diversificação no uso do porta-enxerto, tem sido associado ao número de embriões por semente. Um menor número de embriões por semente favorece o aumento do tamanho e a taxa de germinação do embrião

zigótico (SOARES FILHO et al., 2000). Isso se deve ao fato de que os embriões nucelares apresentam maior capacidade de desenvolvimento do que os zigóticos seja pela competição entre os vários embriões nucelares ou pela superação e germinação do embrião zigótico, geralmente de baixo vigor (RAMOS et al.; 2006). Passos et al. (2006) afirmam que quanto mais elevada a taxa de poliembrionia nas sementes, maiores são as chances do porta-enxerto, quando propagado, resultar em plântulas de origem nucelar, semelhantes à cultivar-mãe, garantindo assim a mesma constituição genética e favorecendo a homogeneidade dos pomares.

Em programa de melhoramento genético de citros para a obtenção de híbridos em cruzamentos envolvendo parentais femininos poliembriônicos, particularmente nas situações em que a porcentagem de poliembrionia é elevada (>70 %) é recomendada a excisão dos embriões das sementes resultantes das hibridações realizadas, seguida do seu cultivo *in vitro*, de forma a garantir a germinação e o desenvolvimento da maioria das plântulas, separando, posteriormente, os indivíduos híbridos dos nucelares (SOARES FILHO et al., 2002).

Alguns estudos realizados têm apresentado várias técnicas de identificação do embrião sexual (zigótico), como o uso de marcadores isoenzimáticos e RAPD (MEDEIROS et al., 2000; ANDRADE-RODRÍGUEZ et al., 2005). Assim, é possível selecionar indivíduos com características genéticas de interesse.

Melhoramento genético de citros no Brasil

Grande parte dos programas de melhoramento de citros se basearam em métodos convencionais, tais como, seleção clonal, mediante a ocorrência de mutações somáticas espontâneas em gemas e ramos, induções de mutações e hibridação sexual (MOREIRA; PIO, 1991).

A seleção clonal baseia-se em eleger “novas variedades” de um cultivar que mantém suas características primárias, mas com maiores produtividades, maturação mais precoce ou tardia, fruto de melhor qualidade ou outras particularidades de interesse (GROSSER et al., 1992). Como exemplos da

seleção clonal de mutantes naturais, os mais importantes foram aqueles que deram origem a variedades comerciais de laranjeiras como ‘Natal’, ‘Bahia’, ‘Baianinha’, ‘Westin’, ‘Piralima’, ‘Lima Verde’, ‘Folha Murcha’, dentre outras (DONADIO et al., 1995).

Dentre os vários programas de melhoramento, a seleção de clones nucelares resultou em maiores ganhos econômicos para a citricultura comercial (SALIBE et al., 1984).

Quanto à indução de mutações, trabalhos foram conduzidos visando redução do número de sementes e resistência ao cancro cítrico (TULMANN NETO et al., 1990), porém não alcançaram sucesso.

Os trabalhos de hibridação sexual tiveram início por Donadio e Teófilo Sobrinho (1975), produzindo híbridos de laranja doce, os quais não apresentaram valor comercial. Em 1974, foram produzidos híbridos entre tangerina ‘Satsuma' (*C. unshiu* Marc.) e diversos parentais masculinos (DONADIO et al., 1992).

Na década de 1980, Donadio lança nova variedade de tangerina, a ‘Jaboti’, obtida do cruzamento entre tangerina ‘Satsuma’ x Mexerica-do-Rio (*C. deliciosa* Ten.), a qual se mostrou muito promissora ao mercado por apresentar frutos de tamanho médio, com poucas sementes e serem fáceis de descascar (MOREIRA; PIO, 1991).

Em 1990, foi iniciado um programa de hibridação sexual no Instituto Agronômico de Campinas, resultando na obtenção de híbridos intergenéricos entre tangerina ‘Sunki’ x *Severinia buxifolia* (BORDIGNON et al., 1990). Recentemente, híbridos entre *C. limonia* Osb. cv. ‘Cravo’ x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e limão ‘Volkameriano’ x limão ‘Cravo’ foram relatados por Medeiros et al. (2000) e Vilarinhos et al. (2000), respectivamente.

Nesses programas, o resgate e a cultura *in vitro* de embriões zigóticos têm sido utilizados para aumentar a frequência de híbridos identificados, principalmente quando o genitor feminino é altamente poliembriônico (SOARES FILHO et al., 1997).

O melhoramento pela adaptação de plantas pouco tolerantes à tristeza, por preimunização com vírus atenuados, e pelo emprego da termoterapia, para obtenção de gemas livres de vírus, tem sido feito para algumas variedades

(MOREIRA; PIO, 1991). Como exemplo, pode-se mencionar a obtenção de clones preimunizados de laranja ‘Pêra’, viabilizando, portanto, o uso comercial da mais importante variedade cítrica do País, enfatizando-se, inclusive, a relação econômica que resultou (MULLER; COSTA, 1991; MULLER et al., 1999). Possivelmente, após os clones nucelares, este foi um grande avanço para citricultura brasileira.

O Brasil possui na Embrapa Mandioca e Fruticultura e no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” dois dos principais bancos ativos de germoplasma (BAG) de citros existentes no mundo (OLIVEIRA, 2006). Esses centros de pesquisas há vários anos trabalham no melhoramento de citros a partir da incorporação de novas técnicas biotecnológicas, com o objetivo de produzir novas variedades para ganho genético da cultura.

O BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas, BA, conta com 626 acessos, compreendendo diversas espécies e cultivares do gênero *Citrus*, além de genótipos de gêneros afins, tais como *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severinia* (OLIVEIRA, 2006).

A maioria das espécies cítricas cultivadas são originadas de mutações espontâneas, tendo o melhoramento genético pouco contribuído para a criação de novas cultivares. Sendo assim, o germoplasma vegetal de citros é indispensável para a geração de novas cultivares (SOUZA et al., 2011). Nesse contexto, o BAG-Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura tem tido papel fundamental nos trabalhos de diversificação de cultivares copa e porta-enxerto e, nos de hibridação, fornecendo os parentais necessários à obtenção de variedades dentro do programa de melhoramento genético institucional (SOARES FILHO et al., 2003).

Os trabalhos com hibridações na Embrapa Mandioca e Fruticultura tiveram início no ano de 1998, utilizando da variabilidade genética disponível em seu BAG para obter novas variedades adaptadas aos trópicos (SOARES FILHO, 1998).

As variedades empregadas nos trabalhos de hibridação compreendem espécies e híbridos interespecíficos de *Citrus*, bem como gêneros afins e híbridos intergenéricos. Como critério de escolha dos parentais a serem hibridados procura-se, em princípio, aqueles possuidores de comprovado valor

agronômico e/ou adaptativo a condições ambientais adversas, como tolerância à seca e ao alumínio, e resistência/tolerância à doenças (SOARES FILHO, 1998).

Como objetivo de seleção de genótipos, particularmente porta-enxertos, tolerantes à seca e ao alumínio, além de adaptados a altas densidades populacionais, Soares Filho (1998) relata como ações de pesquisas desenvolvidas no Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura são: hibridações, embriogênese *in vitro*, identificação de embriões a partir de caracteres morfológicos, escurecimento enzimático, análises de isoenzimas, segmentos polimórficos de DNA e bandeamento cromossômico, hibridação somática por meio de fusão de protoplastos, seleção de híbridos tolerantes à seca e ao alumínio, seleção precoce de genótipos resistentes/tolerantes à gomose de *Phytophthora*, seleção de híbridos de citros resistentes/tolerantes ao vírus da “tristeza” e indução de florescimento de seedlings em fase juvenil.

A Embrapa tem colocado à disposição dos citricultores diversas variedades de laranja e porta-enxertos visando a modernização e diversificação da citricultura. Todas estas variedades vêm sendo introduzidas em áreas comerciais, particularmente de pequenos citricultores, mediante a constituição de lotes básicos, implantados até o momento nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. O programa de melhoramento genético de citros vem ainda estudando, em parceria com citricultores, em nível nacional, os seguintes porta-enxertos híbridos: trifoliados HTR - 051 e HTR - 069, TSKC x (LCR x TR)-059, TSKC x CTSW-033, TSKC x CTSW-041 e TSKC x CTTR-002, dentre outros (PASSOS, 2012)

Sobretudo, ainda são grandes os desafios, tanto no aspecto da organização da produção quanto no que concerne às ameaças, principalmente de natureza fitopatológica, que vêm provocando prejuízos imensuráveis à economia nacional (ALMEIDA; PASSOS, 2011).

Obtenção de triploides em citros

Os *Citrus* são geralmente diploides, porém é possível encontrar também monoploides, triploides, tetraploides, pentaploides e octoploides. As alterações na ploidia podem ter procedência sexual ou somática e ocorrer por meio de processos naturais (mutações de gema e embriogênese nucelar) ou artificiais (uso de colchicina na cultura de tecidos). Também é possível manipular a ploidia a partir da hibridação interespecífica (MACHADO et al., 2005).

Os triploides híbridos em citros podem ser obtidos a partir de cruzamentos de parentais diploides (2x) com tetraploides (4x) (ESEN e SOOST, 1973) e diploides (2x) X diploides (2x) (ESEN; SOOST, 1971), sendo a frequência natural de obtenção de triploides muito baixa (próxima de 5 %) neste último caso, variando em cargo do genótipo materno. A obtenção de uma planta triploide na progênie resultante do cruzamento de duas plantas tetraploides (4x) é descrita por Esen et al. (1978). No entanto, um dos problemas para o uso intenso de cruzamentos envolvendo plantas tetraploides é o baixo número de cultivares disponíveis. A maioria das cultivares de citros tetraploides foi obtida espontaneamente em populações de plântulas cultivadas para outros fins (SOOST; CAMERON, 1975). Porém, a frequência de poliploidização natural nestas populações é geralmente baixa, variando entre 0,2 % e 3 % (BARRET; HUTCHISON, 1978).

Uma outra estratégia para a produção de frutos cítricos sem sementes é a utilização de variedades triploides (3x=27), como é o caso a lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan.), possivelmente originada de hibridação natural (LUCHETTI et al., 2003).

Swingle, polinizando a *Fortunella* ‘Hindsii’, um "kumquat" tetraploide que é bastante produtivo e nativo nas montanhas do Sudeste da China, com um "limequat" diploide [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing], X *Fortunella* ‘Margarita’) obteve o primeiro triploide artificial em *Citrus* (LONGLEY, 1925). Ultimamente, novas variedades-copa vêm sendo obtidas a partir de cruzamentos envolvendo triploides (3n), produtores de frutos sem sementes e alto valor agregado como frutas de mesa (cascas de fácil remoção e com coloração vermelho-alaranjada intenso, polpa laranja intenso, brix elevado associado a acidez equilibrada),

com destaque para o programa de melhoramento genético desenvolvido pelo Instituto Valenciano de Investigações Agrarias (Ivia), com ações que tiveram início na segunda metade da década de 1990 (NAVARRO et al., 2005).

Melhoramento de porta-enxerto de citros

No que tange à pesquisa para melhoramento de porta-enxertos, os programas dão destaque a problemas relacionados aos aspectos fitossanitários e vários são os trabalhos desenvolvidos neste sentido. Os programas de melhoramento de cultivares porta-enxerto dão ênfase à tolerância ou resistência a doenças como gomose de *Phtphthora*, Citrus Tristeza Vírus (CTV), declínio e nematídes, a fatores abióticos tais como baixa temperatura, salinidade, estresse hídrico e encharcamento, além de características horticulturais como vigor e tamanho da copa, qualidade dos frutos e produtividade (MOURÃO FILHO, 1996). Um bom porta-enxerto deve também ser de fácil propagação, compatível com a cultivar copa sobre ele enxertado e conferir vigor reduzido às plantas para facilitar o planejamento e condução dos pomares adensados (POMPEU JÚNIOR, 1991).

Desde então, com esse intuito, milhares de híbridos vêm sendo gerados em cruzamentos envolvendo diversas espécies de limoeiros, laranjeiras doces e azedas (*C. aurantium* L.), diversas espécies de tangerineiras, *P. trifoliata* e híbridos desta espécie, principalmente. Avaliações preliminares têm compreendido indivíduos sob a forma de seedlings, sendo aqueles selecionados como promissores, com a finalidade de uso como porta-enxertos, posteriormente estudados em combinações com diversas variedades copa de interesse comercial, compondo experimentos em diferentes ecossistemas, em nível nacional (SOARES FILHO et al., 2013).

Melhoramento utilizando-se técnicas biotecnológicas

A cultura de tecidos em citros iniciou com os trabalhos de Ranga Sway (1958) que, consagrando a capacidade natural de proliferação das células de tecidos nucelares, os estabeleceu *in vitro*, com a finalidade de obter plântulas

livres de vírus. Posteriormente, foram obtidos embrioides, *in vitro*, de diversas variedades poliembriônicas (KOCHBA; SAFRAN, 1972; MOREIRA et al., 2010; GUERRA et al., 2012) e monoembriônicas (RANGAN et al., 1968; BITTERS et al., 1970; DEIDDA, 1973; JUAREZ et al., 1976; NAVARRO; JUAREZ, 1977).

Apesar do grande impacto da cultura de nucelos, esta técnica foi substituída pela microenxertia, quando aplicada à limpeza clonal, pois além de recuperar plantas livres de vírus mantém suas características adultas, indispensáveis no ponto de vista comercial (NAVARRO, 1984).

As técnicas de cultura de tecidos, além de promover a limpeza clonal, são úteis como uma ferramenta em programas de melhoramento genético na obtenção de híbridos somáticos por fusão de protoplastos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; PAVAN et al, 2007; SORIANO et al., 2012) e de plantas transgênicas (MENDES et al, 2009; CARDOSO et al., 2010).

A regeneração *in vitro* de citros via organogênese direta é feita na maioria dos trabalhos utilizando gemas nodais. Vários estudos vêm analisando a combinação dos reguladores vegetais ANA e BAP em protocolos de micropropagação da espécie com o intuito de obter explantes mais responsivos (SILVA et al., 2005, RATHORE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010). A morfogenese *in vitro* a partir de segmentos intermodais é também utilizada em alguns estudos em citros. Almeida et al. (2002) obteve índices de regeneração e enraizamento de até 85,4 % e 94,6 %, respectivamente para a as variedades 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' e limão 'Cravo', utilizando segmentos internoidais. Fazendo uso do mesmo tipo de explante Oliveira et al. (2008) obteve uma eficiente regeneração para as laranjeiras doces 'Pêra', 'Valência' e 'Bahia' e o limoeiro 'Cravo'.

Outra rota morfogenética que pode ser aplicada a cultura de citros é a embriogênese, que na maioria dos processos envolve inicialmente a formação de calo. Ricci et al. (2002) teve respostas positivas na regeneraão de embriões somáticos das tangerineiras ‘Ponkan’ ‘Cravo’ e ‘Kinnow’, e das laranjeiras ‘Itaboraí’ e ‘Valência’. Savita et al. (2015) alcançou até 98,85 % de germinação de embriões somáticos obtidos na variedade de *Citrus jambhiri* Lush. (Rugoso).

Apesar da existência de vários estudos acerca da regeneração *in vitro* de citros, não há um protocolo determinado para todos os genótipos. Dessa

forma, faz-se necessário ainda o estudo de fatores que possam influenciar nesse processo, como as condições de cultivo *in vitro*, no que se refere as concentrações de sais do meio de cultura e o pH, que irão estar influenciando na disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento da planta e combinações ideais dos reguladores vegetais para que haja um balanço hormonal que resulte na regeneração completa do vegetal.

Os híbridos (HTR - 051; HTR - 069; LRF x (LCR x TR) - 005 e LCREEL x (LCR x TR) - 001, estão em fase final de avaliação em campo e já têm-se destacado em ensaios desenvolvido pelo programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, conduzidos no norte do estado de São Paulo, em combinação com copas de laranjeira 'Valência' [*C. sinensis* (L.) Osb.]. Esses porta-enxertos caracterizam-se pela redução que determina o porte da mencionada cultivar-copa, associada à alta eficiência de produção de frutos e à alta qualidade destes (teores elevados de sólidos solúveis); (OLIVEIRA et al., 2014).

Os citrandarins 'Indio' e 'Riverside' são porta-enxertos de porte médio, com taxa de poliembrionia de aproximadamente 99 %, e são oriundos da Estação Experimental de Indio, Califórnia, pertencente ao United States Department of Agriculture (USDA), introduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura por intermédio do Instituto de Pesquisa do Centro Sul - IPEACS. São híbridos do cruzamento entre a tangerineira 'Sunki' *Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., obtidos pelo Dr. Joe Randolph Furr. Avaliados em áreas experimentais e em quadras, na Embrapa Mandioca e Fruticultura e em pomares particulares, os citrandarins 'Riverside' e 'Indio' têm mostrado excelentes comportamentos quando enxertados com laranjeiras doces, tangerineiras, limeiras ácidas e pomeleiros. Possuem elevado vigor e uniformidade, elevada produção em sequeiro, mesmo com Pera, resistência à gomose e ausência de declínio (PASSOS et al., 2011a, 2011b).

A facilidade de obtenção de plantas por meio de sementes torna este o método mais utilizado na propagação de porta-enxertos de citros (OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, a micropropagação ou propagação *in vitro* de porta-enxertos constitui um método a ser estudado para produção em larga escala de porta-enxertos com a mesma constituição genética da planta mãe.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo adequar os protocolos de estabelecimento *in vitro* e minienxertia em porta-enxertos produzidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. O.; PASSOS, A. O. **Citricultura brasileira**: em busca de novos rumos desafios e oportunidades na região Nordeste. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 160 p.

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.

AMARO, A. A.; BAPTISTELLA, S. S. L. **Viveiros de citros**: uma visão econômica. Fundecitrus, 2008. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/artigo_viveiros.pdf>. Acesso em: 14 out. 2015.

ANDRADE, R. A. de; MARTINS, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 25, n. 1, p. 134-136, 2003.

ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.; VILLEGAS-MONTER, Á.; GUTIÉRREZ-ESPINOSA, M. A.; CARRILLO-CASTAÑEDA, G.; GARCÍA-VELÁZQUEZ, A. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. **Agrociência**, Chapingo, v. 39, p. 371-383, 2005.

BARRET, H. C.; HUTCHISON, D. J. Spontaneous tetraploidy in apomitic seedlings of *Citrus*. **Economic Botany**, New York, v. 32, p. 27-45, 1978.

BITTERS, W. P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. Investigations on established virus-free citrus plants through tissue culture. **California Citrus Nurserymen's Society**, Califórnia, v. 9, p. 27-30, 1970.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H. P.; BALLVÉ, R. M. L. Melhoramento genético de citros no Instituto Agronômico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, p.167-176, 1990.

CAMPOS, J. S. **Cultura dos citros**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1976. 100 p.

CARDOSO, S. C.; MENDES, J. M. B.; CAMARGO, R. L. B.; CHRISTIANO, R. S. C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M. L. C.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Transgenic sweet orange (*Citrus* sinensis L. Osbeck) expressing the attacin A gene for resistance to Xanthomonas citri subsp. citri. **Plant Molecular Biology Reporter**, Cordeirópolis, v. 28, p. 185-192, 2010.

CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. **Porta-enxertos para a citricultura paulista**. Jaboticabal: Funep, 1997. 47 p. (Funep. Boletim citrícola, 1).

CASTRO, A. M.; KERSTEN, E. Influência do anelamento e estiolamento de ramos na propagação da laranjeira Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) através de estacas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 2/3, p. 199-203, 1996.

CORAZZA-NUNES, M. J.; NOVELLI, V. M.; NUNES, W. M. C.; MOREIRA, A. L. O. R.; CARVALHO, S. A. de; MACHADO, M. A. Uma revisão da taxonomia e filogenia, com as contribuições da sistemática molecular. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, n. 2, p. 359-374, 2005.

CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. Cultivares porta-enxerto. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. **Cultura dos citros**. Brasília-DF: Embrapa, 2013a. v. 1, p. 322-345.

CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. Diversificação de porta-enxertos na citricultura do Nordeste. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGROPECUÁRIA INOVADORA PARA O NORDESTE, 1986, Fortaleza. **Anais**... p. 228-234.

CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; GIRARDI, E. A. Propagação. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. **Cultura dos citros**. Brasília-DF: Embrapa, 2013b. v. 1, p. 322-345.

DEIDDA, D. Embrioni nucellari di clementine ottenuti *in vitro*. **Revista della Ortoflora-Frutticoltura Italiana**, v. 54, p. 291-296, 1973.

DONADIO, L. C.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: Fundação Cargill, 1995. 228 p.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico:e Fundag, 2005. p. 1-18.

DONADIO, L. C.; PIFFER, W. J.; STUCHI, E. S. Estudo de espaçamentos para laranjeira 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertada sobre a tangerina 'Cleopatra'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 3, p. 125-129, 1992.

DONADIO, L. C.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Estudo comparativo de híbridos e nucelares de laranjeira Baianinha. **Científica**, v. 3, n. 1, p. 107-114, 1975.

DUGO, G.; DI GIACOMO, A. ***Citrus*, The genus *Citrus***. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. London and New York, v. 26, p. 1-15, 2002.
ESEN, A.; SOOST, R. K.; GERACI, G. Seed set, size, and development after 4x X 2x and 4x X 4x crosses in *Citrus*. **Euphytica**, Califórnia, v. 27, p. 283-294, 1978.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in *Citrus*. **The Journal of Heredity**, UK, v. 64, p. 147-154, 1973.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. **The Journal of Heredity**, UK, v. 62, p. 329–333, 1971.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 18 mar. 2014.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 25, p. 147-151, 1990.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; SESTO, F.; DENG, X. X.; CHANDLER, J. L. Six new somatic *Citrus* hybrids and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Flórida, v. 117, p. 169-173, 1992.

GUERRA, D.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. V. D. de; WEILER, R. L. Caracterização morfológica, determinação do número de

embriões e taxa de poliembrionia em três porta-enxertos híbridos de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 196-201, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola 2012**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 18 fev. 2014.

JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; GUARDIOLA, J. L. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle *in vitro*. **Fruits**, França, v. 31, n. 12, p. 751-762, 1976.

KOCHBA, J.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta**, Heidelberg, v. 106, p. 273-345, 1972.

LONGLEY, A. E. Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. **Journal National of the Academy of Science**, Washington, v. 15, p. 347-351, 1925.

LUCHETTI, M. A.; MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O. Aspectos gerais e distribuição de cultivo. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O. (Ed.). **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agronômico, 2003. p. 1-12.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 223-277.

MAPA. Citrus. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus. Acesso em: 20 dez. 2015.

MEDEIROS, M. R.; MANN, R. S.; VICHIATO, M.; PASQUAL, M. Uso de marcadores isoenzimáticos na identificação de poliembriões do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 409-416, 2000.

MENDES, J. M. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S. B.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 109-115, 2009.

MOURÃO FILHO, F. A. A. Produção de híbridos somáticos em citros. **Laranja**. Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 179-197, 1996.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.

MOREIRA, R. A.; RAMOS, J. D.; CRUZ, M. C. M. Caracterização de frutos e poliembrionia em sementes de 'Flying Dragon' e de híbridos de porta-enxerto de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 486-492, 2010.

MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 2, p. 735 -762.

MÜLLER, G. W.; TARGON, M. L. N.; MACHADO, M. A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado 'Pêra IAC' na citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 1, p. 399-408, 1999.

NAVARRO, L. Citrus tissue culture. In: FAO. Micropropagation of selected root crops, palms, citrus and ornamental species. **Plant Production and Protection Paper**, Roma, n. 59, p. 113-154, 1984.

NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J. A.; OLIVARES-FUSTER, O.; CUENCA, J.; JULVE, J. M. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarino en España. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 36-41, 2005.

NAVARRO, L.; JUAREZ, J. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free citrus plants. **Acta Horticulticulturae**, n. 78, p. 425-435, 1977.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 137 p.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin v. 100, p. 1155-1166, 2000.

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M. G. C.; SILVA, C. V.; OTONI, W. C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from

mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.

OLIVEIRA, R. P. **Biotecnologia em citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 36 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 160).

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. S; PASSOS, O. S.; SCIVITTARO, K. B.; ROCHA, P. S. G. Porta-enxertos para citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. (Documentos, 226).

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. dos S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

OTRIZ MARCIDE, J. M. Nomenclatura botânica de los cítricos. **Levante Agrícola**, Valência, n. 71, p. 259-260, 1985.

PANG, X. M.; HU, C. G.; DENG, X. X. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers. **Acta Genetica Sinica**, China, v. 30, n. 1, p. 81-87, 2003.

PASSOS, O. S. 50 anos de P&D em citros no Nordeste Brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: SBF, 2012. 1 CD-ROM.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. **Citrandarin `Índio´**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011a. 1 folder.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. **Citrandarin `Riverside´**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011b. 1 folder.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. **Citrandarin `San Diegoa´**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011c. 1 folder.

PASSOS, O. S.; SOUZA, C. A. F.; SOARES FILHO, W. S.; PEIXOUTO, L. S. **Alternativas de porta-enxerto de citros no Nordeste do Brasil**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 1 folder.

PASSOS, O. S.; PEIXOUTO, L. S.; SANTOS, L. C.; CALDAS R. C.; SOARES FILHO, W. S. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 410-413, 2006.

PAVAN, A.; CALIXTO, M. C.; CARDOSO, S. C.; MENDES, B. M. J.; BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, J. R. S.; CARVALHO, C. R.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Evaluation of Hamlin sweet orange *Montenegrina mandarin* somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* cv. citri and *Xylella fastidiosa*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 3, v. 113, p. 278-285, 2007

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 61-104.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Laranjeiras e seus porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 29, n. 1-2, p.35-50, 2008.

RAMOS, J. D.; ARAÚJO NETO, S. E.; CASTRO, N. E. A.; MARTINS, P. C. C.; CORREIA, M. G. Poliembrionia e caracterização de frutos de citrumelo 'Swingle' e de *Poncirus trifoliata*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 88-91, 2006.

RANGA SWANY, N. S. Culture of nucelar tissue of *Citrus in vitro*. **Experientia**, v. 14, n. 3, p. 111-112, 1958.

RANGAN, T. S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. **HortScience**, Califórnia, v. 3, n. 4, p. 226-227, 1968.

RATHORE, J. S.; RATHORE, M. S.; SINGH, M.; SINGH, M. M.; SHEKHSWAT, N. S. Micropropagation of mature tree of citrus lime. **Indian Journal of Biotechnology**, Índia, v. 6, p. 239-244, 2006.

RICCI, A. P.; MOURÂO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE, S. M. D. S. Somatic embryogenesis in *Citrus* sinensis, C. reticulata and C. nobilis x C. deliciousa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 41-46, 2002.

SALIBE, A. A.; MOREIRA, C. S. Production, selection and comercial use of citrus nucelar clones in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Italia, v. 1, p. 91-96, 1984.

SAVITA; PATI, P. K.; VIRK, G. S.; NAGPAL, A. An Efficient Somatic Embryogenesis Protocol for Citrus jambhiri and Assessment of Clonal Fidelity of Plantlets Using RAPD Markers. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 34, n. 2. p. 309 -319, 2015.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCHÄFER, G., DORNELLES, A. L. C. Produção de mudas cítricas no Rio Grande do Sul - diagnóstico da região produtora. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 587-592, 2000.

SILVA, R.; 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, 2005.

SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. P.; SOUZA, A. S. Melhoramento genético In: CUNHA SOBRINHO. A. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S; PASSOS, O. S,; SOARES FILHO, W. S. (Ed). **Cultura dos Citros**. Brasília: Embrapa, 2013. V. 1, p, 233-292.

SOARES FILHO, W. S.; MEDRADO, A. C. M.; CUNHA, M. A. P.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S. Freqüência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes versus cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 7, p. 981-988, 2002.

SOARES FILHO, W. S.; MOREIRA, C. S.; CUNHA, M. A. P.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S. Poliembrionia e freqüência de híbridos em *Citrus* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 4, p. 857-864, 2000.

SOARES FILHO, W. S. Variabilidade genética e melhoramento dos citros. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,1998. Disponível em: http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/citros.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SOARES FILHO, W. S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CRUZ, J. L.; SOUZA, L. D.; CASTRO NETO, M. T.; GUERRA FILHO, M. S.; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**: obtenção de híbridos. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 37 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 106).

SOARES FILHO, W. S.; VILARINHOS, A. D.; CUNHA SOBRINHO, A. P. C.; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. S.; CRUZ, J. L.; CASTRO NETO, M. T.; GUERRA FILHO, M. S.; CUNHA, M. A. P.; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E.; OLIVEIRA, R. P. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa-CNPMF**: obtenção de híbridos. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1997. 17 p. (Embrapa-CNPMF. Documentos, 74).

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. *Citrus*. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SOOST, R. K.; ROOSE, M. L. *Citrus*. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**: tree and tropical fruits. New york: John Wiley, 1996. v. 1, p. 257-323.

SORIANO, L.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; CAMARGO, L. E. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; LATADO, R. R.; PACHECO, C. A.; AZEVEDO, F. A.; MENDES, B. M. J. Regeneration and characterization of somatic hybrids combining sweet orange and mandarin/mandarin hybrid cultivars for citrus scion improvement. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 111, p. 385-392, 2012.

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

SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES-FILHO, V. S.; CARDOSO, M. G. S.; CARMO, R. S..; CARVALHO, M. J. S.; SANTOS, E. B. **Estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 7 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 103).

SPURLING, M. B. *Citrus* in the Pacific area. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 93-101.

SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.

TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. **Study in Citrologia**, Osaka, v. 14, p. 1-6, 1977.

TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; MENDES, B. M. J. Indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: Embrapa-CNPH, 1990. p. 341-378.

VILARINHOS, A. D.; VIANA, C. H. P.; SOARES FILHO, W. S.; NICKEL, O.; OLIVEIRA, R. P. Marcadores RAPD na avaliação da diversidade genética e na identificação de híbridos interespecíficos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 14-19, 2000.

WEBBER, H. J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v. 1, p. 1-39.

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E. C.; SCHWARZ, S. F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1523-1529, 2010.

CAPÍTULO 1

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DOS HÍBRIDOS DE CITROS LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051.[1]

[1]Artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Brasileira de Fruticultura.

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DOS HÍBRIDOS DE CITROS LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051

Autora: Maria Inês de Souza Mendes
Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Co-orientador: Walter dos Santos Soares Filho
Co-orientador: Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: As técnicas de cultura de tecidos consistem em ferramentas alternativas de grande importância para a propagação de porta-enxertos, superando as limitações causadas pelos sistemas convencionais de propagação. O objetivo deste trabalho foi estabelecer condições *in vitro* para a regeneração dos porta-enxertos de citros LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051. Para tanto, foram desenvolvidos dois experimentos. No primeiro, segmentos apicais com 1 cm de comprimento foram incubados em meio de cultura WPM nas suas variações de 1/2 e 1/3 da formulação basal, e pH foi ajustado para 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. No segundo experimento, foram analisados segmentos nodais de 1,0 cm de comprimento em meio de cultura WPM sem e suplementado com ANA nas doses de 0,02 mg L^{-1}; 0,04 mg L^{-1}; 0,06 mg L^{-1}; 0,08 mg L^{-1} e 0,1 mg L^{-1}, e BAP nas concentrações de 0,00001 mg L^{-1}; 0,00002 mg L^{-1}; 0,00004 mg L^{-1}; 0,00006 mg L^{-1} e 0,00008 mg L^{-1}. A regeneração dos porta-enxertos LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051 foi obtida por meio da organogênese direta a partir de segmentos apicais e nodais de 1 cm de comprimento, respectivamente, em meio de cultura WPM. O pH 6,0 foi aquele que proporcionou a melhor resposta morfogênética *in vitro* para o porta-enxertos LCREEL x (LCR x TR) - 001. A presença de 0,1 mg L^{-1} de ANA associada a concentração de 0,00008 mg L^{-1} de BAP foi eficiente na morfogênese *in vitro* do porta-enxerto HTR - 051.

Palavras-chave: *Citrus*, organogênese, melhoramento genético, morfogenese.

IN VITRO ESTABLISHMENT OF ROOTSTOCK LCREEL x (LCR x TR) - 001 AND HTR - 051

Authoress: Maria Inês de Sousa Mendes
Advisor: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Co-advisor: Walter dos Santos Soares Filho
Co-advisor: Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: The tissue culture techniques consist in alternatives tool of great importance for the propagation of rootstocks, overcoming the limitations caused by conventional systems of propagation. The aim of this study was establish *in vitro* conditions to regeneration of citrus rootstocks LCREEL x (LCR x TR) - 001and HTR - 051. Therefore, two experiments was developed. In the first, apical segments of 1 cm were incubated in WPM medium variations in 1/2 and 1/3 of basal concentration and pH was adjusted to 4.5; 5.0; 5.5; 6.0 e 6.5. In the second experiment, nodal segments of 1 cm were analyzed in WPM medium culture without and with ANA doses of 0.02 mg L^{-1}; 0.04 mg L^{-1}; 0.06 mg L^{-1}; 0.08 mg L^{-1} and 0.1 mg L^{-1}, and BAP at concentrations of 0.00001 mg L^{-1}; 0.00002 mg L^{-1}; 0.00004 mg L^{-1}; 0.00006 mg L^{-1} and 0.00008 mg L^{-1}. The regenerations of rootstocks LCREEL x (LCR x TR) - 001 and HTR - 051 was obtained by direct organogenesis from apical and nodal segments of 1 cm, respectively, in WPM medium. The pH 6.0 showed the best morphogenetic answer *in vitro* to LCREEL x (LCR x TR) - 001 rootstock. The presence of 0.1 mg L^{-1} of ANA associated with BAP concentration of 0.00008 mg L^{-1} was efficient in the *in vitro* morphogenesis of HTR - 051 rootstock.

Keywords: *Citrus*, organogenesis, genetic breeding, morphogenesis.

INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* abrange um grande grupo de plantas produtoras de frutos, destacando-se, entre elas, as laranjeiras doces [*C. sinenses* (L.) Osbeck], as tangerineiras [a exemplo da 'Ponkam' (*C. reticulata* Branco), a 'Dancy' (*C. tangerina* hort. Ex Tanaka) e a 'Mexeriqueira' (*C. deliciosa* Ten)], os limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] e as limeiras doces (*C. limettioides* Tanaka e *C. limetta* Risso) e ácidas [como a 'Tahiti' (*C. latifolia* Tan)]. No Brasil, cerca de 70 % da produção de laranja é destinada para a fabricação de sucos e o País detém cerca de 50 % da produção mundial de suco, com 85 % de participação no mercado mundial (NEVES et al., 2010).

A qualidade do suco, embora seja intrínseca à variedade, pode ser influenciado pelo clima, solo, adubação, tratos culturais, tratamentos fitossanitários e porta-enxerto utilizado (SCHÄFER; DORNELLES, 2000). O tipo de porta-enxerto influencia na produção, no tamanho e no peso dos frutos, no conteúdo de suco, no teor de sólidos solúveis totais (Brix), na acidez, na cor do suco e no conteúdo de sais minerais, vitamina C e ácidos graxos (WUTSCHER,1988; CASTLE, 1995), bem como na arquitetura da copa e na tolerância a fatores bióticos e abióticos (SHARMA et al., 2009).

As variações entre as diferentes espécies de porta-enxertos e seus híbridos estão diretamente relacionadas às expansões ou limitações de áreas onde a cultura pode se desenvolver, pois os porta-enxertos diferem em relação à adaptabilidade aos diferentes tipos de solos e, à suscetibilidade às diferentes pragas e doenças. Assim, a diversificação de porta-enxertos consiste, portanto, em uma importante ferramenta para melhorar a produtividade e qualidade da citricultura, atendendo às expectativas do produtor e do mercado consumidor. No entanto, a pouca diversificação desses, aliadas à dispersão de doenças, põe em risco a atual citricultura, tornando-se uma preocupação para os programas de melhoramento genético, que poderá contribuir para a seleção de materiais adaptados e tolerantes, principalmente à doenças (SCHÄFER et al. 2001).

Os porta-enxertos LCREEL x (LCR x TR) - 001, hibrido resultante de cruzamento ente limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* osb.) e híbrido de diferentes

acessos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., e HTR - 051, resultante de cruzamento entre *P. trifoliata*, oriundos do programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, vêm apresentando alta eficiência de produção e qualidade de frutos, com teores elevados de sólidos solúveis totais, bem como redução no tamanho da muda (OLIVEIRA et al., 2014), características estas que os credenciam a serem utilizados nos pomares cítricos, principalmente para produção de suco.

Normalmente, a produção de porta-enxertos de citros se dá a partir de sementes, o que pode comprometer a fidelidade genética e a uniformidade do pomar, uma vez que os embriões zigóticos não preservam as características do porta-enxerto de interesse. Segundo Sharma et al. (2009), na germinação das sementes ocorre a produção de 1 % a 40 % de plântulas zigóticas. Outro aspecto a ser considerado é que alguns porta-enxertos potencial não produzem sementes ou as produzem em pequena quantidade e não apresentam sazonalidade ou, ainda, as sementes apresentam baixa porcentagem de germinção, como é o caso dos porta-enxertos LCREEL x (LCR x TR) - 001, e HTR - 051. Alem disso, a demanda por grande quantidade de material de plantio, aliada à alta qualidade fitossanitária, vem sendo cada vez mais demandada e exigida pelos produtores.

A obtenção de porta-enxertos via propagação vegetativa é uma prática que poderá possibilitar, além da redução do prazo na formação da muda, a utilização de variedades que produzam poucas sementes e baixa taxa de germinação, além de variedades monoembriônicas, com características desejáveis, que refletirão na uniformidade do pomar. Além disso, a produção de porta-enxertos pelo sistema tradicional é sazonal, enquanto que a utilização da propagação assexuada pode ser realizada, teoricamente, em qualquer época do ano (ZAFARRI et al., 1993)

Nesse sentido, a técnica da micropropagação consiste em uma ferramenta alternativa de grande importância para a multiplicação de porta-enxertos, superando, assim, as limitações causadas pela propagação por sementes.

O sucesso da morfogênese *in vitro* depende de vários fatores, como o meio de cultura utilizado, o tipo e a concentração de reguladores vegetais, as

condições de incubação (BORDÓN et al, 2000; MOREIRA-DIAS et al., 2000, MARQUES et al., 2001; MOLINA et al., 2007; KHAN et al., 2009), o pH do meio (PASQUAL et al., 2002; YAACOB et al., 2014), o tipo de explante (GARCÍA-LUIS et al., 2006; CURTIS; MIRKOV, 2012; TALLON et al., 2012, ESMAEILNIA; DEHESTANI, 2015), e a grande influência do genótipo (BORDÓN et al, 2000; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi estabelecer condições *in vitro* para a regeneração dos hibridos LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram selecionados os híbridos LCREEL x (LCR x TR) - 001 (resultado de cruzamento ente limoeiro 'Cravo' e híbrido de *P. trifoliata)* e HTR - 051 (híbrido de *P. trifoliata*).

Sementes dos porta-enxertos LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051, retiradas de frutos coletados no campo experimental de citros, foram desinfestadas, imergindo-as em etanol 70% por cinco minutos e em solução de hipoclorito de sódio 0,5 %, mais duas gotas de Tween® por 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada altoclavada. Logo em seguida, as sementes foram estabelecidas no meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) e incubadas sob temperatura de 27 ± 1°C, densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo de 16 horas. Após 120 dias da germinação, quando as plântulas alcançaram altura aproximada de 10 cm a 12 cm, foram utilizadas como fonte de explante para a realização dos experimentos.

Experimento I: **Efeito do pH e concentração do meio WPM na regeneração *in vitro* de brotações adventícias do híbrido LCREEL x (LCR x TR) - 001.**

Segmentos apicais do caule com 1 cm de comprimento foram incubadas em tubos de ensaio (14 cm de altura e 2,3 cm de diâmetro) contendo 10 mL do meio de cultura WPM a sua composição normal e a 1/2 e 1/3 da formulação

basal, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com 2 g L^{-1} de Phytagel® e pH ajustado para 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 antes da autoclavagem.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 x 5 (três formulações do meio WPM e cinco pH's), com 15 repetições. Cada parcela experimental foi constituída por um tubo de ensaio contendo um segmento apical. Decorridos 120 dias da instalação do experimento, foram realizadas as avaliações, observando-se as seguintes variáveis: número de folhas vivas; número de folhas senescentes; altura da parte aérea (cm), número de segmentos nodais com 1 cm de comprimento, contendo ao menos uma gema; número de raízes; comprimento da maior raiz (cm); peso fresco da parte aérea e de raízes (mg); e peso seco da parte aérea e de raízes (mg). Para a determinação do peso seco, o material vegetal foi colocado em estufa de circulação de ar forçada à temperatura de 60º C, até atingir peso constante.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância pelo software SISVAR, versão 5.5 (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os valores do número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de segmentos e número de raízes foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

Experimento II: Efeito das doses de ANA e BAP na regeneração *in vitro* do híbrido de citros HTR - 051.

Segmentos nodais de 1 cm de comprimento foram incubadas em tubos ensaio (14 cm de altura e 2,3 cm de diâmetro) contendo 10 mL do meio de cultura WPM, suplementado com 30 g. L^{-1} de sacarose, ácido naftalenoacetico (ANA) nas doses de 0,02 mg L^{-1}; 0,04 mg L^{-1}; 0,06 mg L^{-1}; 0,08 mg L^{-1} e 0,1 mg L^{-1}, benzilaminopurina (BAP) nas doses de 0,00001 mg L^{-1}; 0,00002 mg L^{-1}; 0,00004 mg L^{-1}; 0,00006 mg L^{-1} e 0,00008 mg L^{-1}, em todas as combinações possíveis, solidificado com 2 g L^{-1} de Phytagel® e pH ajustado para 5,7-5,8.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 6 x 6 (seis concentrações de ANA e seis concentrações de BAP), com

10 repetições. Cada parcela experimental foi constituída por um tubo de ensaio contendo um segmento nodal.

Decorridos 120 dias da instalação do experimento foram realizadas as avaliações, observando-se as seguintes variáveis: número de folhas vivas; número de folhas senescentes; altura da parte aérea (cm); número de segmentos nodais com 1 cm de comprimento, contendo ao menos uma gema; número de raízes; comprimento da maior raiz (cm); peso fresco da parte aérea e raízes (mg); peso seco da parte aérea e de raízes (mg). Para a determinação do peso seco o material vegetal foi colocado em estufa de circulação de ar forçado a temperatura de 60º C, até atingir peso constante.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância pelo software SISVAR, versão 5.5 (FERREIRA, 2011). As médias das concentrações de ANA e BAP foram ajustadas para modelos de regressão polinomial. Os valores de contagem número de folhas vivas, número de folhas senescentes, número de segmentos nodais e número de raízes foram transformados em $\sqrt{x + 0{,}5}$, visando o atendimento das pressuposições da análise de variância

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: **Efeito do pH e concentração do meio WPM na regeneração *in vitro* de brotações adventícias do híbrido LCREEL x (LCR x TR) - 001.**

Os segmentos apicais do híbrido LCREEL x (LCR x TR) – 001 foram 100% responsivos às condições experimentais *in vitro*. Conforme pode ser observado na Tabela 1, dentre os fatores estudados verificou-se efeito significativo ($p<0{,}01$) das variações na composição do meio de cultura, para todas as variáveis analisadas. Já as alterações de pH influenciaram de forma positiva apenas quanto ao número de segmentos nodais e os pesos fresco e seco de raízes. Observou-se interação significativa entre meio de cultura e pH para as variáveis número de folhas vivas e os pesos fresco e seco da parte aérea.

Em se tratando do efeito isolado, o meio de cultura WPM na sua concentração basal de sais favoreceu as maiores médias para a regeneração do híbrido LCREEL x (LCR x TR) – 001 no que tange a todas as variáveis estudadas. A redução na concentração dos sais deste meio influenciou de forma negativa no desenvolvimento das plantas (Figura 1), sendo que, para variável número de folhas senescentes esse efeito negativo ficou evidente com um aumento na quantidade de folhas envelhecidas no tratamento com 1/3 da concentração basal do WPM. O número de raízes foi a única variável que não sofreu influência da variação do meio de cultura da metade para um terço da concentração basal de sais (Tabela 1). Glimaldi et al. (2008) afirmam que para a maioria das culturas *in vitro*, baixas concentrações de sais tendem a induzir o enraizamento e que diluições dos sais minerais, entre 50 % e 75 %, em relação ao meio básico, têm possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas.

Silva et al. (2005) constataram que o maior percentual de brotos enraizados (85 %) de tangerina 'Cleópatra' ocorreu no meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) constituído por metade dos sais sem a adição de auxina. O emprego do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com os sais reduzido à metade tem possibilitado a obtenção de resultados satisfatórios na indução de raízes adventícias *in vitro* para os portas-enxerto limoeiro rugoso, tangerineira 'Cleópatra' e Pectinifera (SHAMA et al., 2009), cultivares de limão (SAMARINA et al., 2010) e citrange 'Carrizo' (MANVIR et al., 2015). Porém, resultado distinto foi observado nesse estudo, no qual a concentração basal do WPM favoreceu um maior número de raízes (1,11).

Meios básicos como o WPM e o de White (WHITE, 1943), por serem menos concentrados, podem ser igualmente favoráveis ao processo da rizogênese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ROCHA et al., 2007). Possivelmente essa foi à razão pela qual a variável número de raízes tenha sido favorecida na concentração basal do meio de cultura utilizado neste estudo.

Tabela 1. Análise de variância e médias de variáveis de crescimento do híbrido LCREEL x (LCR x TR) - 001 submetido a diferentes pH's e concentrações do meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980).

Valor F	NFV	NFS	APA	NSN	NRA	CMR	PFA	PSA	PFR	PSR
Meio	17,87**	0,26**	197,86**	11,10**	0,38**	858,70**	52318,99**	1866,31**	9709,80**	444,75**
pH	0,94^{ns}	0,12^{ns}	5,85^{ns}	0,53*	0,01^{ns}	33,20^{ns}	736,52^{ns}	36,23^{ns}	1596,43**	38,39**
Meio x pH	1,05*	0,07^{ns}	4,24^{ns}	0,32^{ns}	0,03^{ns}	35,41^{ns}	1026,22*	56,31**	353,33^{ns}	11,03^{ns}
CV (%)	22,46	33,09	42,59	22,30	16,06	55,48	44,82	42,10	67,29	57,73
					Meio					
1/1 WPM	13,23 a	0,13 a	5,91 a	5,68 a	1,11 a	11,91 a	77,28 a	15,50 a	38,01 a	7,76 a
1/2 WPM	10,23 b	0,11 a	3,70 b	3,45 b	0,92 b	8,31 b	39,72 b	7,98 b	24,13 b	4,48 b
1/3 WPM	7,43 c	0,35 b	2,74 c	2,59 c	0,80 b	5,14 c	26,33 c	6,06 c	15,46 c	3,00 c
					Ph					
4,5	10,00 a	0,27 a	4,35 a	4,33 ab	0,93 a	8,66 a	45,29 a	9,18 a	25,33 b	4,85 b
5,0	10,00 a	0,35 a	3,93 a	3,65 ab	0,93 a	7,54 a	45,53 a	9,68 a	21,40 b	4,58 b
5,5	9,73 a	0,18 a	3,97 a	3,73 ab	0,93 a	8,27 a	47,38 a	10,12 a	22,93 b	4,76 b
6,0	11,93 a	0,02 a	4,62 a	4,49 a	1,00 a	9,80 a	54,87 a	11,24 a	36,22 a	6,71 a
6,5	9,71 a	0,15 a	3,72 a	3,33 b	0,91 a	7,99 a	45,82 a	8,99 a	23,44 b	4,49 b

NFV = número de folhas vivas; NFS = número de folhas senescentes; APA = altura da parte aérea (cm); NSN = número de segmentos nodais; NRA = número de raízes; CMR = comprimento da maior raiz (cm); PFA = peso fresco da parte aérea (mg); PSA = peso seco da parte aérea (mg); PFR = peso fresco de raiízes (mg); PSR = peso seco de raízes (mg). ns = não significativo; * (P<0,05), ** (P<0,01). Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

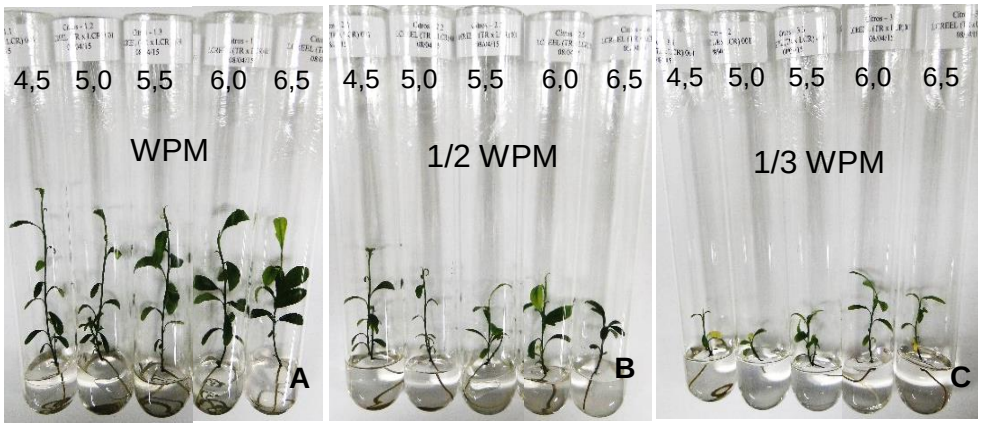

Figura 1. Plantas cítricas do porta-enxerto LCREEL x (LCR x TR) - 001 após 120 dias, oriundas do cultivo de cultivo *in vitro* de segmentos apicais com 1 cm de comprimento, em diferentes concentrações do meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) e valores de pH.

O meio WPM na sua concentração basal de sais foi preponderante para o desenvolvimento do porta-enxerto LCREEL x (LCR x TR) - 001, resultado similar aos alcançados por Santos et al. (2012). Esses autores afirmam que a redução das concentrações de sais no meio básico de cultivo acarreta um crescimento lento, o que pode estar relacionado a uma diminuição no metabolismo das plantas devido a uma menor disponibilidade de nutrientes nos meios com a redução de sais.

Quanto ao efeito da variação do pH, verificou-se que apenas o valor 6,0 influenciu de forma significativa, haja vista que neste pH os pesos fresco e seco de raízes alcançaram as maiores médias, de 36,22 mg e 6,71 mg, respectivamente. A variável número de segmentos nodais foi pouco influenciada pela variação do pH, dado que a maior média (4,49) foi obtida no pH 6,0, porém, não se verificou diferença estatística entre esta média e as obtidas nos pH's 4,5; 5,0 e 5,5 e nem desses para o pH 6,5, no qual se obteve a menor média (3,33) (Tabela 1).

Analisando o efeito da interação concentrações de sais do meio de cultura WPM e diferentes pH's, observou-se que na concentração basal não houve diferenças estatísticas nos diferentes pH's para as variáveis número de folhas vivas e peso fresco da parte aérea. O peso seco da parte aérea foi levemente influenciado pela variação no pH, sendo as maiores médias

alcançadas nos pH's 5,5 e 6,0, as quais não diferiram estatisticamente das médias obtidas nos pH's 5,0 e 6,5, que por sua vez, também não diferiram do pH 4,5 (Tabela 2).

Para o meio WPM com metade da concentração de sais no pH 6,0 foram alcançadas médias superiores, não revelando diferenças estatísticas das obtidas nos pH's 4,5; 5,0 e 6,5 para número de folhas vivas e nos pH's 4,5; 5,0 e 5,5 para peso seco da parte aérea. Neste meio, a variável peso fresco da parte aérea não foi influenciada pela variação do pH (Tabela 2).

Com relação ao efeito da variação do pH dentro do meio de cultura com um terço da concentração de sais da sua formulação basal, verifica-se que as variáveis pesos fresco e seco da parte aérea não foram influenciadas pelo pH. Para o número de folhas vivas a maior média foi obtida no pH 6,0 (9,37) e a menor no pH' 5,0 (5,47), apresentando os demais pH's médias estatísticas que não diferem destas. (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de variáveis de desenvolvimento de plantas do híbrido LCREEL x (LCR x TR) - 001, após 120 dias de cultivo de cultivo *in vitro* de segmentos apicais com 1 cm de comprimento, cultivados em diferentes composições do meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) e valores de pH.

WPM	Ph				
	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
	Número de folhas vivas				
1	13,87 aA	12,60 aA	14,00 aA	13,20 aA	12,47 Aa
1/2	9,00 bAB	12,20 aAB	7,67 bB	12,87 aA	9,40 abAB
1/3	7,13 bAB	5,47 bB	7,53 bAB	9,73 aA	7,27 Bab
	Peso fresco da parte aérea (mg)				
1	64,93 aA	72,73 aA	86,20 aA	81,07 aA	81,47 aA
1/2	48,67 aA	39,27 bA	30,00 bA	50,93 bA	29,73 bA
1/3	22,27 bA	24,60 bA	25,93 bA	32,60 bA	26,27 bA
	Peso seco da parte aérea (mg)				
1	12,34 aB	14,74 aAB	18,19 aA	16,53 aA	15,68 aAB
½	10,05 aAB	7,83 bABC	5,97 bAB	10,31 bA	5,72 Bc
1/3	5,16 bA	6,47 bA	6,21 bA	6,89 bA	5,57 Ba

Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente entre si a 1 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

De uma maneira geral independentemente da formulação do meio de cultura, o pH 6,0 foi aquele que proporcionou a melhor resposta morfogênética *in vitro*, pH este que se encontra dentro da faixa entre 5,0 e 6,5, a qual é definida por Canhoto (2010), como a faixa que proporciona melhor aproveitamento de nutrientes pelo explante para a maioria das culturas. Nessa faixa, todos os íons estão em solução e facilmente disponíveis para as células, além do que é um valor de pH próximo daquele que em condições naturais se encontra nas células vegetais. Este pH também se encontra próximo ao pH de 5,7 a 5,8, usualmente utilizado nos trabalhos de cultura de tecidos em espécies de citros como *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (KHAN et al., 2009), *Citrus sinensis* cv. Hamlin (CURTIS; MIRCOV, 2012), *clementina* Hort. Ex Tan (LOMBARDO et al., 2011), *Citrus macrophylla* e *C. aurantium* (TALLON et al., 2012); *Citrus tangerina* (NWE et al., 2014) e *Citrus assamensis* (YAACOB et al., 2014).

A disponibilidade de vários elementos no meio, a exemplo das fontes de nitrogênio, diminui com valores de pH abaixo de 5 (CAPONETTI; TRIGIANO, 2011). Valores de pH acima de 7,0 e abaixo de 4,5 geralmente resultam na inibição do crescimento e desenvolvimento vegetal (CHAWLA, 2009).

O número de segmentos nodais ou de brotos é uma característica de grande importância quando se objetiva a micropropagação. Neste estudo, foi possível a obtenção de uma média satisfatória de segmentos nodais (5,68) no meio WPM em sua concentração basal, mesmo quando comparado ao número de brotos, obtidos em outros estudos. Esmaeilnia e Dehestan (2015) obtiveram uma média de 1,2 brotos cultivando *in vitro* seguimentos apicais de *Citrus sinensis* L. Osbeck., também em meio WPM. Oliveira et al. (2010), obtiveram a mesma média de brotos no cultivo *in vitro* de laranjeiras 'Pêra', 'Valência' e 'Bahia' em meio WPM.

Experimento II: Efeito das doses de ANA e BAP na regeneração *in vitro* do híbrido HTR - 051 a partir de segmentos nodais.

Na Tabela 3, pode-se observar na análise de variância efeito significativo ($P<0,01$ e $P<0,05$) da forma isolada do ANA e do BAP para as variáveis número de raízes, comprimento da maior raiz, e pesos fresco e seco da parte

aérea e de raízes. Para a interação entre esses reguladores vegetais, verificou-se efeito significativo para número de folhas vivas e para as variáveis mencionadas anteriormente, com exceção do número de raízes, o qual foi influenciado por ANA e BAP apenas como fatores isolados.

Os meios de cultura suplementados com os reguladores vegetais favoreceram a morfogênese *in vitro* do híbrido HTR – 051, apresentando 99,4 % de explantes responsivos (Figura 2).

Tabela 3. Análise de variância e médias de variáveis de crescimento do híbrido HTR - 051 submetido a diferentes doses de ANA e BAP em meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980).

Valor F	NFV	NFS	APA	NSN	NR	CMR	PFPA	PSPA	PFR	PSR
ANA	1,23 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,90 ^{ns}	0,14 ^{ns}	2,71**	43,20**	2019,47**	160,91**	4423,51**	252,21**
BAP	0,57^{ns}	0,00 ^{ns}	1,48 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,26**	43,27**	1506,46*	81,87*	483,44**	31,48**
ANA x BAP	0,99*	0,17 ^{ns}	1,18 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,11^{ns}	18,12**	1124,80**	67,85**	231,67*	12,41**
CV (%)	37,05	14,00	46,04	18,70	20,33	79,47	60,32	56,97	62,05	54,82

NFV = número de folhas vivas; NFS = número de folhas senescentes; APA = altura da parte aérea (cm); NSN = número de segmentos nodais; NR = número de raíze; CMR = comprimento da maior raiz (cm); PFPA = peso fresco da parte aérea (mg); PSPA = peso seco da parte aérea (mg); PFR = peso fresco de raízes (mg); PSR = peso seco de raízes (mg).
**significativo (P<0,01). *significativo (P<0,05), ns não significativo (P<0,05).

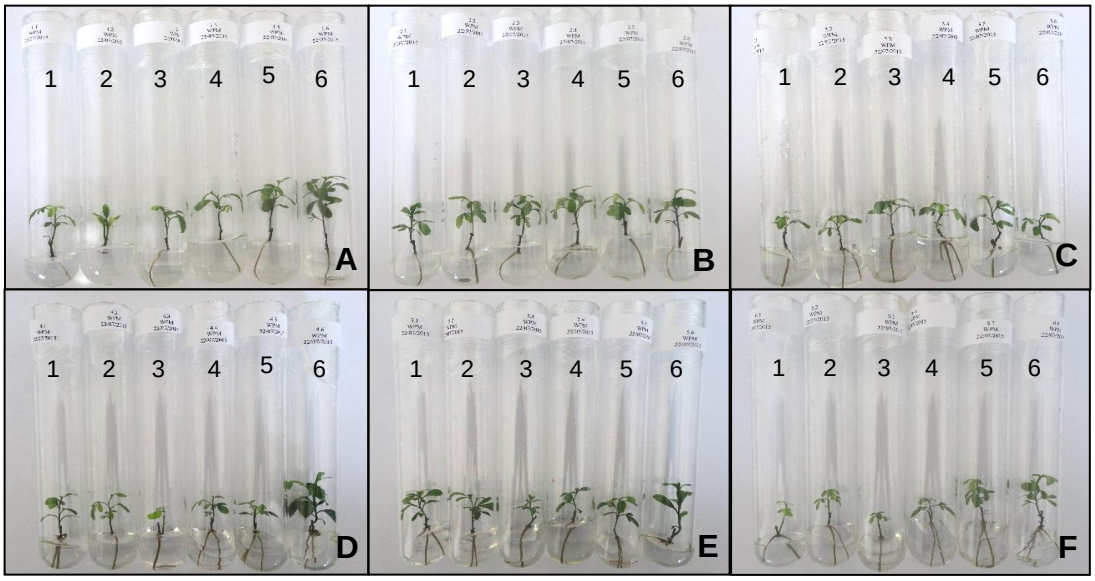

Figura 2. Plantas do porta-enxerto HTR - 051, após 120 dias de cultivo *in vitro* de segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento, em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado com diferentes concentrações de ANA e BAP. (A) 0,0 mg L^{-1} de ANA, (B) 0,02 mg L^{-1} de ANA, (C) 0,04 mg L^{-1} de ANA, (D) 0,06 mg L^{-1} de ANA (E) 0,08 mg L^{-1} de ANA (F) 0,1 mg L^{-1} de ANA e BAP nas doses de 0,0 mg L^{-1} (1); 0,00001 mg L^{-1} (2); 0,00002 mg L^{-1} (3); 0,00004 mg L^{-1} (4); 0,00006 mg L^{-1} (5) e 0,00008 mg L^{-1} (6).

Na tabela 4 são apresentados os modelos de equações polinomial. Foi realizado o ajuste de modelos de 1º e 2º graus, com coeficientes de determinação (R^2) variando de 51,07 % para número de folhas vivas a 94,10 % para peso seco de raízes, ambos os coeficientes observados na interação de ANA dentro da dose 0,0 mg L^{-1} de BAP (Tabela 4). Coeficientes de determinação similares (56,84% a 94,94%) foram encontrados por Peixoto et al. (2011) na conservação *in vitro* de maracujazeiro, e são considerados aceitáveis na cultura de tecidos.

Tabela 4. Equações de regressão, coeficientes de determinação, dose ótima e valores estimados do número de folhas vivas, número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), comprimento da maior raiz (cm), peso fresco da parte aérea (mg), peso seco da parte aérea (mg), peso fresco de raízes (mg) e peso seco de raízes (mg) do híbrido HTR 051 em função de doses de ANA e BAP.

Interações	Doses (mg L^{-1})	Equação	R2 (%)	Dose ótima	Valor estimado
Número de folhas vivas					
ANA (BAP)	0	ŷ * = -21,857x + 5,7095	51,07	0	3,52
BAP (ANA)	0,1	ŷ * = 31789x + 3,154	77,76	0,00008	5,7
Número de raízes					
ANA		ŷ ** = 14,303x + 0,7575	92,56	0,1	2,19
BAP		ŷ ^{ns}	-	0	1,47 [1]
Comprimento da maior raiz (cm)					
BAP (ANA)	0,1	ŷ ** = 51968x + 2,5428	62,72	0,00008	6,7
Peso fresco da parte aérea (mg)					
ANA (BAP)	0	ŷ **= -294,03x + 57,051	64,31	0	27,65
BAP (ANA)	0,1	ŷ **= 332789x + 22,657	85,22	0,00008	49,28
Peso seco da parte aérea (mg)					
ANA (BAP)	0	ŷ ** = -84,871x + 14,665	64,5	0	6,18
BAP (ANA)	0,1	ŷ ** = 75789x + 5,544	84,01	0,00008	11,61
Peso fresco de raízes (mg)					
ANA (BAP)	0	ŷ ** = 173,4x + 7,9067	64,59	0,1	25,2
ANA (BAP)	0,00001	ŷ ** = 258,99x + 6,3857	79,44	0,1	32,28
ANA (BAP)	0,00002	ŷ ** = 167,96x + 5,4638	86,92	0,1	22,26
ANA (BAP)	0,00004	ŷ ** = 173,4x + 7,9067	64,59	0,1	25,25
ANA (BAP)	0,00006	ŷ ** = 221,63x + 7,9719	90,77	0,1	30,13
ANA (BAP)	0,00008	ŷ ** = 336,47x + 4,6348	81,68	0,1	38,28
BAP (ANA)	0,1	ŷ ** =y = 8E+09x2 - 444482x + 28,823	93,85	0,00008	28,5
Peso seco de raízes (mg)					
ANA (BAP)	0	ŷ ** = 51,714x + 2,4743	94,10	0,01	7,65
ANA (BAP)	0,00001	ŷ ** = 56,314x + 1,8243	84,57	0,01	7,46
ANA (BAP)	0,00002	ŷ ** = 40,957x + 1,5205	79,82	0,01	5,62
ANA (BAP)	0,00004	ŷ ** = -717,86x2 + 106,73x + 1,3857	64,94	0,07	5,35
ANA (BAP)	0,00006	ŷ ** = 55,6x + 2,2233	91,79	0,01	7,78
ANA (BAP)	0,00008	ŷ ** = 80,3x + 1,5233	81,48	0,01	9,55

** e * significativo a 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F da ANAVA. ^{ns} não significativo a 5 % de probabilidade. [1]valor baseado na média dos valores observados.

De acordo com os valores estimados obtidos a partir das equações, as maiores médias para número de folhas vivas (5,7), comprimento da maior raiz (6,7 cm), pesos fresco (49,28 mg) e seco da parte aérea (11,61 mg) e pesos fresco (38,28 mg) e seco (9,55 mg) de raízes foram obtidos em interações envolvendo doses ótimas de 0,1 mg L^{-1} de ANA e 0, 00008 de BAP mg L^{-1} (Tabela 4).

Um maior número de raízes (2,19) foi observado na dose de 0,1 mg L^{-1} de ANA. Apesar de apresentar influência para esta variável de forma isolada, não foi possível o ajuste de uma equação com significância para o hormônio vegetal BAP (Tabela 4).

A importância dos reguladores vegetais na morfogenese *in vitro* de citros tem sido documentada por diversos autores. Oliveira et al. (2010) obtiveram eficientes resultados na regeneração *in vitro* usando meio MS suplementado com 0,5 mg L^{-1} de BAP + 0,25 mg L^{-1} de ANA para limoeiro 'Cravo'; 1,0 mg L^{-1} de BAP + 0,25 mg L^{-1} de ANA para *Citrus sinensis* cv 'Valência' e 'Bahia' e 1,0 mg L^{-1} de BAP + 0,5 mg L^{-1} de ANA para cv 'Pêra'. Samarina et al. (2010) encontraram ótimos resultados na regeneração de cultivares de limão com 0,1 mg L^{-1} de ANA e 1,0 mg L^{-1} de BAP. Marques et al. (2011) obtiveram uma eficiente regeneração de *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian utilizando meio suplementado com 0,1 mg L^{-1} ANA em combinação com 1,0 mg L^{-1} a 3 mg L^{-1} de BAP.

No caso de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing., *Citrus sinensis* (L.) Osb. e *Citrus jambhiri* (Lusk.) a combinação de 1,0 mg L^{-1} de BAP; 0,50 mg L^{-1} de cinetina e 0,50 mg L^{-1} de ANA promoveu uma maior proliferação de brotações adventícias (RATTANPAL et al., 2011). Para *Citrus clemetina* Hort. Ex Tan. a adição de BAP ao meio de cultura foi essencial para a formação de brotações adventícias (LOMBARDO et al., 2011). Yaacob et al. (2014) alcançaram ótimos resltados na morfogênese de Ginger Lime (*Citrus assamensis* R. M. Dutta & Bhattacharya) quando utilizaram o meio MS suplementado com 1,5 mg.L^{-1} de ANA e 2,0 mg L^{-1} de BAP.

Efeitos positivos do ANA isolado ou em combinação com outra auxina foi essencial para o enraizamento de brotações adventícias de *Citrus limonia*

Osb., *Citrus sinensis* e *Citrus jambhiri* (ALMEIDA et al., 2002; SAINI et al., 2010; SINGH; KAUR, 2011).

Comparando as concentrações utilizadas no estudo com outros trabalhos envolvendo a regeneração *in vitro* de citros, pode-se constatar que o segmento nodal do porta enxerto HTR - 051 responde bem à presença de baixas concentrações de reguladores vegetais no meio nutritivo, aspecto este de extrema importância quando se deseja a clonagem de genótipos elite em larga escala, de forma a evitar o surgimento de variação somaclonal e reduzir os custos de produção com o emprego de menores quantidades de fitohormônios.

CONCLUSÕES

A regeneração dos híbridos LCREEL x (LCR x TR) - 001 e HTR - 051 pode ser obtida por meio da organogênese direta a partir de segmentos apicais e nodais de 1 cm de comprimento, respectivamente, em meio de cultura WPM.

O pH 6,0 foi aquele que proporcionou a melhor resposta morfogênética *in* vitro para o híbrido LCREEL x (LCR x TR) - 001.

A presença de 0,1 mg L^{-1} de ANA associada a concentração de 0,00008 mg L^{-1} de BAP foi eficiente na morfogênese *in vitro* do híbrido HTR - 051.

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*. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, n. 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.

CANHOTO J. M. **Biotecnologia Vegetal**: da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Coimbra: Universidade de Coimbra, 2010. p. 43-71.

CAPONETTI, J. D.; TRIGIANO, R. N. Nutrition of cell and organ cultures. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed). **Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 27-32.

CASTLE, W. S. Rootstock as a fruit quality factor in citrus and decidous tree crops. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 23, p. 383-394, 1995.

CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. 3 ed. Enfield: Science Publishers, 2009.

CURTIS, I. S., MIRKOV, T. E. Influence of surfactants on growth and regeneration from mature internodal stem segments of sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 108, p. 345-352, 2012.

ESMAEILNIA, E.; DEHESTANI, A. *In vitro* plant regeneration from mature tissues of Thomson navel sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.). **Biharean Biologist**, Oradea, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GARCÍA-LUIS, A.; MOLINA, R. V.; VARONA, V.; CASTELLÓ, S.; GUARDIOLA, J. L. The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer citrange. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, p. 137–144, 2006.

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

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. S. W.; GUIDOLIN, A. F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008

KHAN, E. U.; FU, X. Z.; WANG, J.; FAN, Q. J.; HUANG, X. S.; ZHANG, G. N.; SHI, J.; LIU, J. H. Regeneration and characterization of plants derived from leaf

in vitro culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 70–76, 2009.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, 1980.

LOMBARDO, G.; ALESSANDRO, R.; SCIALABBA, A.; SCIANDRA, M.; De PASQUALE, F. Direct organogenesis from cotyledons in cultivars of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. **American Journal of Plant Sciences**, n. 2, p. 237–244, 2011.

MANVIR, K.; DHALIWAL H. S.; ANIRUDH, T.; GURUPKAR, S.; MANVEEN, K. *In vitro* plantlet formation in *Carrizo citrange*: A promising citrus rootstock. **Journal of Horticulture**, Ludhiana, v. 72, p. 1-6, 2015.

MARQUES, N. T.; NOLASCO, G. B.; LEITÃO, J. P. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 2, 176-182, 2011.

MOLINA, R. V.; CASTELLO, S.; GARCIA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J. L. Light cytokinin interactions in shoot formation in epicotyl cuttings of *Troyer citrange* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, p. 131–140, 2007.

MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings if *Troyer citrange* differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, London, v. 85, p. 103–110, 2000.

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

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings**… Riverside: University of California, 1969. v. 3, p.1155-1169.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 137 p.

NWE, Y. Y.; MYINT, K. T.; MOCHIZUKI, Y.; VAZIRZANJANI, M.; OKAYASU, K.; SUZUKI, S.; OGIWARA, I. *In vitro* regeneration through direct shoot

organogenesis in Honey Orange (*Citrus* tangerina). **The Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology**, Fuchu, v. 31, n. 4, p. 341-344, 2014.

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M. G. C.; SILVA, C. V. da; OTONI, W. C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, p. 199-202, 2002.

PEIXOTO, A. P. B.; FARIA, G. M.; MORAIS, A. R.de. Modelos de regressão com platô na estimativa do tamanho de parcelas em experimento de conservação in vitro de maracujazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1907-1913, 2011.

RATTANPAL, H. S.; KAUR, G.; GUPTA, M. *In vitro* plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) by direct organogenesis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 63, p.13724–13728, 2011.

ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Árvore**, Viçosa, v. 31, n.1, p. 43-50, 2007.

RODRÍGUEZ, A.; CERVERA, M.; PERIS, E.; PENÃ, L. The same treatment for transgenic shoot regeneration elicits the opposite effect in mature explants from two closely related sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) genotypes. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, p. 97-106, 2008.

SAINI, H. K.; GILL, M. S.; GILL, M.I.S. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). **Indian Journal of Biotechnology,** ÍIndia, n. 9, p. 419:423, 2010.

SAMARINA, L. S.; KOLOMIETS, T. M.; BARANOVA, E. N.; ARUTYUNOVA, E. S. Regeneration and micropropagation of lemon cultivars *in vitro* from nodal

explants. **Russian Agricultural Sciences**, Moscow, v. 36, n. 6, p. 417-420, 2010.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENEZES, M. M. L. A. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 963-970, 2012.

SCHÄFER G.; DORNELLES, A. L. C. Produção de mudas cítricas no Rio Grande do Sul - Diagnóstico da região produtora. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 587-592, 2000.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SHARMA, S.; PRAKASH, A.; TELE, A. *In vitro* propagation of citrus rootstocks. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj-Napoca**, Haryana, v. 37, n. 1, p. 84-88, 2009.

SILVA, R. P.; SOUZA, E. S.; REBOUCAS, 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, 2005.

SINGH, B.; KAUR, A. Comparison of agar and gum karaya as gelling agent for *in vitro* regeneration of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) plantlets from nodal explants. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 297–303, 2011.

TALLON, C. I.; PORRAS, I.; PEREZ-TORNERO, O. High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. ***In Vitro*** **Cellular and Developmental Biology – Plant**, cidade, v. 49, p. 145-155, 2012.

ZAFARRI, G. R.; KOLLER, O. L.; STUKER, H. Efeito do ácido 2,4 diclorofenoxiacético e do ácido indolbutírico sobre o enraizamento de estacas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 15, n. 2, p. 39-44, 1993.

WHITE, P. R., Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v. 30, p. 33-36, 1943.

WUTSCHER, H. K. Rootstoks effects on fruit quality. In: FERGUSON, J. J.; WARDOWSKI, W. F. (Ed.). **Factors affecting fruit quality**. Lake Alfred: University of Florida, 1988. p. 24-34.

YAACOB, J. S.; MAHMAD, N.; TAHA, R. M.; MOHAMED, N.; YUSSOF, A. I. M.; SALEH, A. Optimization of culture conditions (sucrose, pH, and photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*). **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 262710, p. 1-9, 2014.

CAPÍTULO 2

ADEQUAÇÃO DA TÉCNICA DE MINIENXERTIA EM CITROS[2]

[2]Artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Brasileira de Fruticultura.

ADEQUAÇÃO DA TÉCNICA DE MINIENXERTIA EM CITROS

Autora: Maria Inês de Souza Mendes
Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Co-orientador: Walter dos Santos Soares Filho
Co-orientador: Antônio da Silva Souza

RESUMO: Avaliou-se a técnica da minienxertia das variedades cítricas laranjeira Pera, tangerineiras Sunki Tropical e Clementina e limoeiro Cravo Santa Cruz enxeradas sobre os porta-enxertos citrandarins 'Indio' e 'Riverside', HTR - 069 e LRF x (LCR x TR) - 005. O primeiro experimento constou da minienxertia de segmentos apicais de 1 cm e 2 cm de altura da tangerineira 'Clementina' nos porta-enxertos citrandarin 'Indio' e citrandarin 'Riverside'. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 2 (dois tamanhos de segmentos apicais e dois porta-enxertos), com 20 repetições, sendo cada parcela composta por um porta-enxerto e um segmento apical. No segundo experimento estudou-se a combinação de segmentos apicais de 1,5 cm de altura das variedades laranjeira Pera, tangerineira Sunki Tropical e limoeiro Cravo Santa Cruz sobre os porta-enxertos citrandarin 'Indio', HTR - 069 e LRF x (LCR x TR) - 005. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 (três variedades copas e três variedades porta-enxertos), com 15 repetições. As avaliações foram realizadas aos 120 dias de instalação dos experimentos em casa de vegetação. A utilização de segmentos com 1,5 cm de altura facilita o pegamento da minienxertia em relação à ápices de menor tamanho. O porta-enxerto HTR - 069 apresentou as melhores respostas para sobrevivência das variedades copas laranjeira 'Pera', tangerineira 'Sunki Tropical' e limoeiro 'Cravo Santa Cruz'. O porta-enxerto citrandarin 'Indio' proporcionou um maior desenvolvimento da altura da copa e do diâmetro do enxerto.

Palavras-chave: *Citrus*, cultura de tecidos, propagação, enxertia.

ADJUSTMENT OF MINIGRAFTING TECHNIQUE IN CITRUS

Authoress: Maria Inês de Sousa Mendes
Advisor: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Co-advisor: Walter dos Santos Soares Filho
Co-advisor: Antônio da Silva Souza

ABSTRACT: The technique of minigrafting was evaluated in citrus varieties Pera orange, Sunki Tropical and Clementina mandarins and Cravo Santa Cruz lemon over rootstocks citrandarins ‘Indio’ e ‘Riverside’, HTR - 069 and LRF x (LCR x TR) - 005. The first experiment consisted of minigrafting of apical minicuttings of 1 cm and 2 cm of mandarin ‘Clementine’ in the rootstocks citrandarin ‘Indio’ and citrandarin ‘Riverside’. The design was completely randomized in a factorial 2 x 2 (two minicuttings sizes and two rootstocks), with 20 repetitions, each portion consists of a rootstock and one minicuttings. The evalutions were performed at 120 days of experiment setup in greenhouse. The second experiment studied the combination of apical minicuttings 1.5 cm of varieties Pera orange, Sunki Tropical mandarin and Cravo Santa Cruz lemon over rootstocks citrandarin ‘Indio’, HTR - 069 and LRF x (LCR x TR) - 005. The design was completely randomized in a factorial 3 x 3 (three varieties of grafts and three rootstocks), with 15 repetitions. The evalutions were performed at 120 days of experiments setup in greenhouse. The use of 1,5 cm segments facilitates the establishment of minigrafting relative to smaller apexes. The rootstock HTR - 069 showed the Best results for survival of canopies ‘Pera’ Orange, ‘Sunki Tropical’ mandarin and ‘Cravo Santa Cruz’ lemon. The rootstock citrandarin ‘Indio’ provided further development of canopy height and diameter of graft.

Keywords: *Citrus*, tissue culture, propagation

INTRODUÇÃO

Os citros são propagados comercialmente, por enxertia, pois o porta-enxerto tem a capacidade de proporcionar várias características favoráveis à copa cítrica, quanto à qualidade do fruto, resistência e tolerância a adversidades climáticas e fitopatológicas (ANDRADE; MARTINS, 2003), além de possibilitar a propagação de genótipos que não produzem sementes ou são triploides.

Os triploides podem ocorrer espontaneamente em cruzamentos diploides, do cultivo de endosperma *in vitro* e de cruzamentos interploides recíprocos entre plantas diploides e tetraploides (MACHADO et al., 2005). Em geral, existe uma tendência dos frutos triploides serem partenocárpicos. Por isso, são de grande interesse em programas de melhoramento genético de citros de mesa, em que se deseja obter cultivares sem produção de sementes (OLIVEIRA et al., 2014).

A enxertia é um método de multiplicação que consiste em justapor tecidos de duas plantas, provocando sua soldadura com a finalidade de formar um novo e único indivíduo. Uma das plantas, o porta-enxerto, oferece o sistema radicular e a parte basal do tronco, enquanto a outra planta forma a parte aérea, a qual é desenvolvida a partir de um fragmento (garfo, borbulha) e é geneticamente idêntica à planta mãe. Há, porém, influências do porta-enxerto sobre a copa, desta sobre o porta-enxerto e de fatores como o clima, o solo, as pragas e o manejo do pomar sobre a combinação copa-porta-enxerto (CUNHA SOBRINHO et al., 2013).

Além da enxertia convencional utilizada para propagação comercial no gênero *Citrus*, foi também desenvolvida a técnica da microenxertia de ápices meristemáticos. Esta técnica consiste em enxertar ápices caulinares em porta-enxertos micropropagados, cultivados *in vitro*. Navarro et al. (1975) desenvolveram essa técnica para a obtenção de plantas isentas de doenças sistêmicas transmissíveis normalmente pela enxertia convencional.

Uma variação desta técnica, a minienxertia, vem sendo utilizada em algumas espécies como seringueira (LEMOS FILHO et al., 1994), erva-mate

(WENDLING; HOFFMANN, 2005) e maracujazeiro (ALEXANDRE et al., 2013), como uma nova estratégia para a propagação vegetativa.

A técnica baseia-se em um sistema de multiplicação, no qual um segmento apical, oriundo do cultivo *in vitro*, é enxertada por garfagem sobre um porta-enxerto oriundo de semeadura em casa de vegetação. A grande vantagem deste método é que, além de promover a propagação clonal em larga escala de mudas com alta qualidade fitossanitária, quando comparado a enxertia possibilita maior taxa de pegamento, cicatrização, facilidade na execução da garfagem e formação das mudas em menor espaço de tempo (WENDLING; HOFFMANN, 2005).

Diversos fatores podem influenciar no sucesso da microenxertia, como o tamanho do enxerto, as condições culturais e as cultivares (SANABAM et al., 2015).

Vários trabalhos estudam a técnica da microenxertia para eliminação de vírus em espécies cítricas (SINGH et al., 2008; OHTA et al., 2011; CHAE et al., 2013; SANABAM et al., 2015), porém não é encontrada na literatura trabalhos que avaliem a aplicação do método da minienxertia para as espécies cítricas.

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento vegetativo e a sobrevivência das cultivares copas de citros laranjeira ‘Pera’, tangerineiras ‘Sunki Tropical’ e ‘Clementina’ e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’ sobre os porta-enxertos citrandarin ‘Indio’, citrandarin ‘Riverside’, HTR - 069 e LRF x (LCR x TR) - 005 por meio da minienxertia.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos e em casa de vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram selecionados como porta-enxertos os citrandarins ‘Indio’ e ‘Riverside’, híbridos de tangerineira ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] com *Ponciurus trifoliata* (L.) haf. ‘English’, o HTR - 069 (híbrido de *P. trifoliata)* e o LRF x (LCR x TR) - 005 (limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ [*P. trifoliata* x limoeiro 'Cravo' (*C*. *limonia* Osbeck)], e como fonte de segmentos nodais as variedades laranjeira ‘Pera’, tangerineiras ‘Sunki Tropical’ e ‘Clementin’a e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’.

Obtenção dos porta-enxertos

Os porta-enxertos foram obtidos por semeadura em tubetes plásticos de 120 cm^3, contendo aproximadamente 100 g do substrato comercial Vivatto®, em casa de vegetação. Quando as plantas alcançaram em média 8 cm de altura, em torno de 4 meses foi realizado o transplante dos porta-enxerto para sacos plásticos de 20 cm x 25 cm x 0,20 cm, contendo 1 kg do substrato Vivatto®, para uma melhor nutrição e desenvolvimento das plantas. Ao atingirem diâmetro do caule de aproximadamente 2 mm os porta-enxertos foram utilizados para a realização da minienxertia.

Obtenção dos segmentos apicais

Para obtenção dos segmentos apicais retirou-se a testa das sementes, que foram então desinfestadas em etanol 70 % por 5 minutos e em solução de hipoclorito de sódio 0,5 %, duas gotas de Tween®, por 20 minutos, seguida de três lavagens em água destilada altoclavada. Após desinfestadas, as sementes foram distribuídas em tubos de ensaio (14 cm de altura e 2,3 cm de diâmetro) contendo 10 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com 2 g L^{-1} de Phytagel® e pH ajustado para 5,7 a 5,8.

Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de 30 µmol m^{-2} s^{-1} e fotoperíodo de 16 horas.

Após 120 dias, quando as plântulas atingiram uma altura em torno de 6 cm, foram seccionadas, retirando-se os segmentos apicais para realização da minienxertia, em dois experimentos distintos.

Minienxertia

Os porta-enxertos com altura entre 50 cm e 60 cm e diâmetro de aproximadamente 2 mm sofreram uma decapitação na região apical, foram desfolhados, deixando-se apenas as três folhas superiores. Foi realizada uma

fenda longitudinal no caule com aproximadamente 0,5 cm de profundidade. Na sequência, foi realizada a minienxertia sob condição *in vivo*, efetuando-se dois cortes em forma de cunha na base do segmento apical, a qual foi inserida na fenda longitudinal do porta-enxerto. Para facilitar a união, as partes em contato foram enroladas com parafilme. As plantas minienxertadas foram cobertas com sacos plásticos transparentes, de forma a estabelecer uma câmara úmida, e mantidas em telado sob condições de temperatura média de ± 27° C (Figura 1). Passados 30 dias, os sacos plásticos foram desamarrados e retirados após 1 semana, e o parafilme mantido até a total união entre as partes, ocorrida em média após 60 dias.

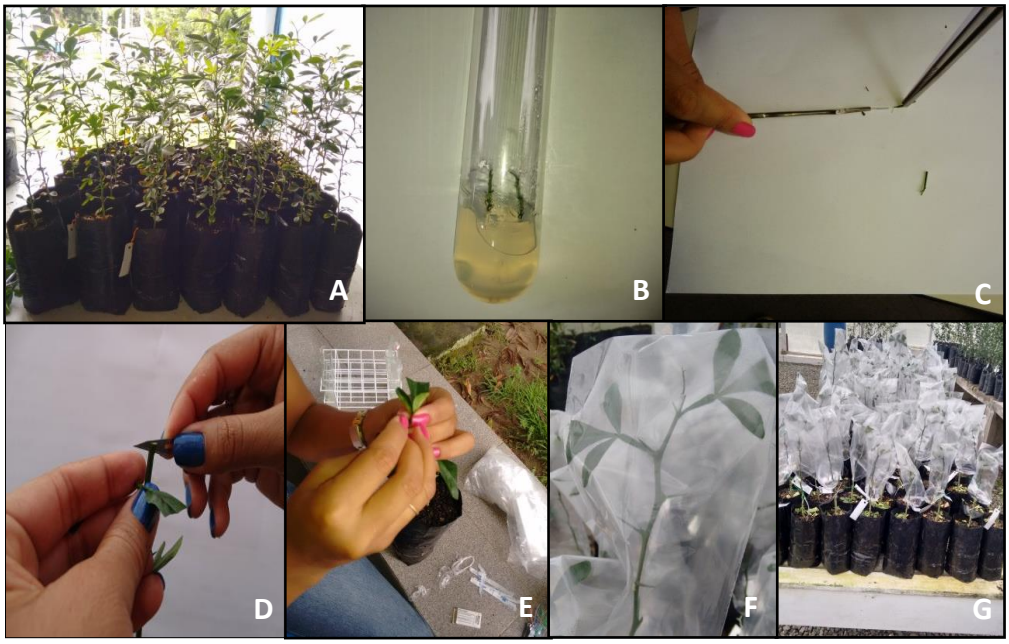

Figura 1. Procedimentos de minienxertia: porta-enxertos para desfolhagem e decaptação da região apical (A); segmentos apicais desfolhados e seccionados *in vitro* (B); cortes em forma de cunha na base do segmento (C); corte em fenda longitudinal no caule do porta-enxerto (D); inserção do segmento apical na fenda longitudinal do porta-enxerto (E); e plantas minienxertadas cobertas com saco plástico (F e G).

Experimento I:

Foram utilizadas segmentos apicais de 1 cm e 2 cm de altura da tangerineira ‘Clementina’ sobre os porta-enxertos citrandarin ‘Indio’ e

citrandarin ‘Riverside’. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 2 (dois tamanhos de segmentos apicais e dois porta-enxertos), com 20 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por um porta-enxerto e um segmento apical. As avaliações foram realizadas aos 120 dias da instalação do experimento em casa de vegetação.

As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência do enxerto, número de folhas, altura da copa (cm) e diâmetro do enxerto (mm), a 1 cm acima da região da enxertia e comprimento da lâmina foliar (cm) da folha mais expandida no terço superior da planta (Figura 2). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR, versão 5.5 (FERREIRA, 2011) a 5 % de significância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Os valores de contagem número de folhas foram transformados em $\sqrt{x+1}$ visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

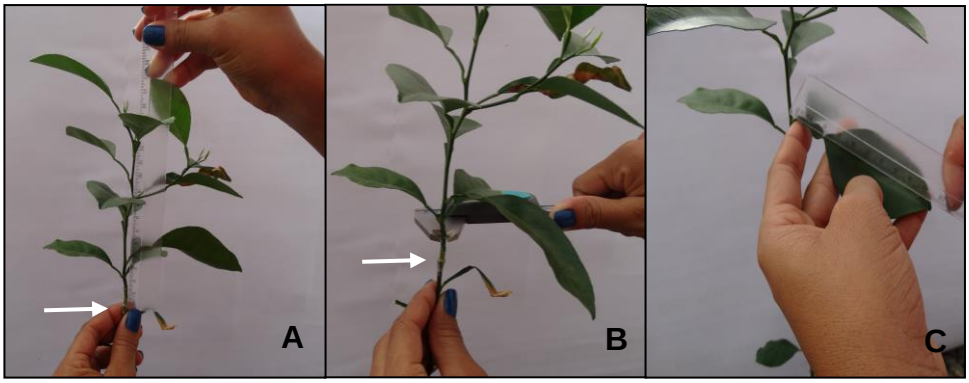

Figura 2. Avaliação das plantas minienxertadas quanto a: (A) altura da copa, (cm); (B) diâmetro do enxerto (mm) com auxílio de um paquímetro; e (C) comprimento da lamina foliar da folha mais expandida no terço superior da planta (cm). A seta indica a região da minienxertia.

Experimento II:

Estudou-se a combinação de segmentos apicais de 1,5 cm de altura das variedades laranjeira ‘Pera’, tangerineira ‘Sunki Tropical’ e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’ sobre os porta-enxertos citrandarin ‘Indio’, HTR - 069 e LRF x (LCR x TR) - 005. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado,

em esquema fatorial 3 x 3 (três variedades copas e três variedades portas-enxertos), com 15 repetições. A parcela experimental foi constituída por um porta-enxerto e um segmento apical.

As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência do enxerto, número de folhas, altura da copa (cm) e diâmetro do enxerto (mm), a 1 cm acima da região da enxertia e altura da lâmina foliar (cm) da folha mais expandida no terço superior da planta (Figura 2). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR, versão 5.5 (FERREIRA, 2011) a 5 % de significância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Os valores de contagem número de folhas foram transformados em $\sqrt{x+1}$ visando o atendimento das pressuposições da análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I:

As porcentagens de sobrevivência obtidas nos diferentes porta-enxertos foram similares (33 % e 35 %, para o citrandarin ‘Indio’ e o citrandarin ‘Riverside’, respectivamente), não havendo diferenças entre os genótipos estudados (Tabela 1). Já para o fator de variação tamanho do segmento apical, a maior porcentagem de sobrevivência foi obtida quando se utilizou segmento apical com 2 cm de altura (55 %).

Avaliando-se a interação entre porta-enxerto e tamanho do segmento apical, a taxa de sobrevivência variou entre 10 % e 60 %, sendo os insucessos atribuídos em parte às contaminações fúngicas dos segmentos apicais.

A morte dos segmentos apicais pode ainda ser atribuída ao processo de adaptação dos mesmos, uma vez que esses foram provenientes de condições controladas de temperatura, luminosidade e nutrição em laboratório. Porém, o fator mais relevante para o insucesso na minienxertia pode ter sido a incompatibilidade entre os tecidos envolvidos, dado ser este um fator de grande influência para o sucesso da enxertia. Essa compatibilidade é determinada pelo pegamento entre porta-enxerto e cultivar copa, o qual é definido por três fases:

a formação de calo com estabelecimento de contato entre as regiões cambiais dos dois tecidos, a diferenciação de células parenquimáticas do calo em novas células cambiais, que conectam os câmbios desses dois tecidos, e a formação da continuidade dos floema e xilema, sendo esta última fase fundamental para o sucesso da enxertia (HARTMANN et al., 2010; PINA et al., 2012). Sem a ocorrência desses processos não há a união entre as partes, o que se caracteriza como incompatibilidade entre os tecidos.

As maiores taxas de sobrevivência dos segmentos apicais foram obtidas com os porta-enxertos citrandarin ‘Riverside’ (60 %) e citrandarin ‘Indio’ (50 %) minienxertadas com segmentos de 2 cm de altura. Quando se utilizou segmentos com 1 cm de altura, as porcentagens de sobrevivência foram de 10 % (citrandarin ‘Riverside’) e 15 % (citrandarin ‘Indio’) (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência da tangerineira ‘Clementina’ minienxertada em citrandarin ‘Indio’ e citrandarin ‘Riverside’ aos 120 dias após a minienxertia, por meio de segmentos apicais de 1 cm e 2 cm de altura.

Porta-enxerto (PE)	Sobrevivência (%)
Citrandarin ‘Indio’	33
Citrandarin ‘Riverside’	35
Tamanho do segmento apical (TSA)	
1 cm	13
2 cm	55
PE x TSA	
Citrandarin ‘Indio’ x 1 cm	15
Citrandarin ‘Indio’ x 2 cm	50
Citrandarin ‘Riverside’ x 1 cm	10
Citrandarin ‘Riverside’ x 2 cm	60

n = 20

A existência de mais tecidos para o acúmulo de carboidratos nos segmentos apicais de maior tamanho pode ter favorecido o seu desenvolvimento, pois de acordo com Fachinello et al. (2005), maiores reservas de carboidratos estão relacionadas com maiores porcentagens de sobrevivência das estacas. No entanto, o tamanho dos segmentos apicais não influenciou no número de folhas, na altura do enxerto, no diâmetro do enxerto e no comprimento da lâmina foliar, quando da utilização da variedade copa

tangerineira ‘Clementina’ sobre os porta-enxertos citrandarin ‘Indio’ e citrandarin ‘Riverside’ (Tabela 2).

Após o período de 120 dias, foi possível verificar uma conexão bem estabelecida entre porta-enxerto e enxeto, verificando-se na região da enxertia um pequeno calejamento, demonstrando que houve a união entre as partes (Figura 3). Pina et al. (2012) verificando maior acoplamento plasmodesmal em células do calo na região da enxertia em *Prunus* spp., afirmam que essas células desempenham papel fundamental na interação porta-enxerto e cultivar copa.

Tabela 2. Médias de variáveis número de folhas, altura da copa, diâmetro do enxerto e comprimento da lâmina foliar da tangerineira ‘Clementina’ minienxertada em citrandarin ‘Indio’ e citrandarin ‘Riverside’ aos 120 dias após a minienxertia, por meio de segmentos apicais de 1 cm e 2 cm de altura.

Valor F	Número de folhas	Altura da copa (cm)	Diâmetro do enxerto (mm)	Comp. da lâmina foliar (cm)
Porta-enxerto (PE)	0,01^{ns}	5,47 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,39 ^{ns}
Tamanho do segmento apical (TSA)	0,10 ^{ns}	20,78 ^{ns}	0,04 ^{ns}	14,75 ^{ns}
PE*TM	0,01 ^{ns}	1,85 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,34 ^{ns}
CV (%)	26	26	16,72	26
Porta Enxerto				
Citrandarin ‘Indio’	8,23	7,01	1,84	4,95
Citrandarin ‘Riverside’	8,14	6,11	1,85	4,71
Tamanho do segmento apical				
1 cm	8,80	8,38	1,93	6,38
2 cm	8,04	6,12	1,83	4,48

^{ns}- não significativo (P<0,05).

Os enxertos que sobreviveram e estabeleceram uma união com o porta-enxerto apresentaram características vigorosas, como presença de folhas verdes e um bom desenvolvimento. Dessa forma, a metodologia empregada nesse trabalho pode ser uma nova opção de enxertia para citros, promovendo ainda a propagação de variedades triploides em larga escala e com alta qualidade fitossanitária.

Figura 3. Plantas minienxertadas de tangerineira ‘Clementina’ com 1 cm e 2 cm de tamanho, respectivamente, aos 120 dias após a minienxertia sobre (A) citrandarin ‘Indio’ e (B) citrandarin ‘Riverside’.

Experimento II:

Avaliando os efeitos isolados as plantas enxertadas sobre o porta-enxerto HTR - 069 apresentaram maior porcentagem de sobrevivência, com 62 % de sucesso. O citrandarin ‘Indio’ e o LRF x (LCR x TR) - 005 apresentaram resultados similares (40 % e 42 %, respectivamente) para a sobrevivência das plantas enxertadas sobre esses híbridos (Tabela 3).

Em relação ao efeito da copa, observou-se que o limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’ apresentou as maiores taxas de sobrevivência, seguido da laranjeira ‘Pera’ e da tangerineira ‘Sunki Tropical’.

Na interação entre porta-enxertos e variedades utilizadas como copa, as maiores porcentagens de sobrevivência foram alcançadas na combinação do HTR - 069 com o limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’ (73 %), seguido do LRF x (LCR x TR) - 005 também com o limoeiro ‘Cravo’ (67 %) e HTR - 069 com a laranjeira ‘Pera’ (60 %). Respostas na interação entre porta-enxerto e copa variam com o genótipo e em função da compatibilidade entre as partes, pois, de acordo com Pina et al. (2012) essas respostas irão envolver uma série de interações estruturais, bioquímicas e fisiológica entre esses tecidos. Hayashi et al. (2012), estudando enxertia em diferentes genótipos de citros, apontaram maior

porcentagem de brotações de borbulhas de laranjeira ‘Valência’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (98,0 %), quando comparado ao citrumeleiro ‘Swingle’ (66,7 %) aos 49 dias, com o uso de fita fotodegradável.

Tabela 3. Porcentagem de sobrevivência de cultivares copa de citros em três porta-enxertos aos 120 dias após a minienxertia.

Porta-enxerto (PE)	Sobrevivência (%)
Citrandarin ‘Indio’	40
HTR - 069	62
LRF x (LCR x TR) – 005	42
Copa (CO)	
Laranjeira ‘Pera’	47
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	35
Limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’	62
PE x CO	
Citrandarin ‘Indio’ x laranjeira ‘Pera’	53
Citrandarin ‘Indio’ x tangerineira ‘Sunki Tropical’	20
Citrandarin ‘Indio’ x limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’	47
HTR - 069 x laranjeira ‘Pera’	60
HTR - 069 x tangerineira ‘Sunki Tropical’	53
HTR - 069 x limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’	73
LRF x (LCR x TR) - 005 x laranjeira ‘Pera’	27
LRF x (LCR x TR) - 005 x tangerina ‘Sunki Tropical’	33
LRF x (LCR x TR) - 005 x limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’	67

n = 15

Na Tabela 4 pode-se observar a diferença significativa dos porta-enxertos para todas as variáveis, com exceção do comprimento da lâmina foliar. No que diz respeito a variedade copa utilizada verificou-se influencia apenas quanto ao diâmetro do enxerto e no comprimento da lâmina foliar. Não houve diferença significativa na interação porta-enxerto e variedades copa para nenhuma das variáveis analisadas.

As maiores médias para número de folhas (23 e 18,96) foram obtidas com os porta-enxertos citrandarin ‘Indio’ e o LRF x (LCR x TR) - 005, respectivamente. O citrandarin ‘Indio’ também proporcionou uma maior altura

da copa e diâmetro do enxerto em relação aos demais porta-enxertos (Tabela 4).

Passos et al. (2011) destacaram como característica do porta-enxerto citrandarin ‘Índio’ um elevado vigor, o que pode ter propiciado um melhor desenvolvimento para as variedades copa sobre ele enxertadas. Por outro lado, como observado nesse estudo para os demais híbridos envolvendo ‘Trifoliata’, Soares et al. (2015) também observaram que o híbrido HTR-069 determinou redução no tamanho das copas nele enxertadas. O que pode ser atribuído a características genéticas, como o baixo vigor do “Trifoliata” e de alguns de seus híbridos, relatadas por Fochesato et al. (2007). Pois, os porta-enxertos afetam diretamente o vigor da variedade copa enxertada, estando relacionado diretamente ao genótipo e suas relações. Com isto, os porta-enxertos induzem diferenças marcantes no tamanho da copa (SILVA et al., 2012).

Silva et al. (2012) associam o diâmetro do enxerto a compatibilidade entre copa e porta-enxerto, afirmando que essa variável é um indicativo da adaptação da variedade copa ao porta-enxerto, em uma relação onde o porta-enxerto terá a função de fornecer a sustentação e aporte de água e nutrientes absorvidos no solo, enquanto que a copa promoverá a formação de compostos orgânicos que serão translocados para outros órgãos como as raízes.

Quanto à variedade copa, a laranjeira ‘Pera’ apresentou médias superiores para diâmetro do enxerto (2,76 mm). As maiores médias para comprimento da lâmina foliar (10,10 cm e 8,48 cm) foram obtidas para as variedades copas laranjeira ‘Pera’ e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’ respectivamente (Tabela 4).

O monitoramento da área foliar é uma ferramenta importante para estudar as características fisiológicas relacionadas com o crescimento das plantas, as relações fotossintéticas e os processos de transpiração, bem como é um índice útil na avaliação de danos causados por doenças e pragas foliares (MONTEIRO et al., 2005). Neste estudo, não foi observada uma relação entre o comprimento da lâmina foliar e o desenvolvimento do enxerto, uma vez que não houve diferença estatística entre a altura do enxerto para as copas que apresentaram maiores e menores comprimentos da lâmina foliar.

Estudos com enxertia têm associado o diâmetro do enxerto à sobrevivência do mesmo. Côrrea et al. (2010) e Santos et al. (2016), trabalhando com porta-enxertos de maracujazeiro, *Passiflora alata* e maracujazeiro azedo, respectivamente, identificaram alta porcentagem de sobrevivência, a qual foi atribuída a relação do diâmetro da copa e do porta-enxerto, pois, quanto maior a porcentagem de sobrevivência maior foi o diâmetro da copa e do porta-enxerto. Resultados semelhantes foram observados na minienxertia em citros, uma vez que, de uma maneira geral a relação do diâmetro de copa e porta-enxerto variou em trono de 2,13 a 2,88 mm.

Aos 120 dias após a minienxertia, os enxertos apresentaram altura de 19,73 cm; 16,58 cm e 14,58 cm para laranjeira ‘Pera’, tangerineira ‘Sunki Tropical’ e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’, respectivamente. De acordo com Hayashi et al. (2012), a altura mínima considerada como essencial para a comercialização de mudas é de 30 cm, altura já atingida em mais de 50 % pela laranjeira ‘Pera’.

Tabela 4. Médias de variáveis de crescimento de três cultivares copas de citros em três cultivares de porta-enxertos aos 120 dias após a minienxertia

Valor F	Número de folhas	Altura da copa (cm)	Diâmetro do enxerto (mm)	Comp. da lâmina foliar (cm)
Porta-enxerto (PE)	13,26**	9,61**	3,24 **	7,93 ns
Variedade copa (CO)	0,29 ns	2,39 ns	2,41**	85,08 **
PE*CO	0,56 ns	0,39 ns	- 3,26.10^{7} ns	0,62 ns
CV (%)	20,70	48,71	18,81	31,75
Porta-enxerto				
Citrandarin ‘Indio’	23,00 a	23,90 a	2,88 a	9,04 a
HTR – 069	10,93 b	14,06 b	2,15 b	8,29 a
LRF x (LCR x TR) – 005	18,96 a	13,90 b	2,22 b	7,74 a
Variedade copa				
Laranjeira ‘Pera’	17,28 a	19,73 a	2,76 a	10,10 a
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	15,87 a	16,58 a	2,13 b	5,78 b
Limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’	16,54 a	14,58 a	2,21 b	8,48 a

**significativo (P<0,01), *significativo (P<0,05), ns não significativo (P<0,05). Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

De maneira geral, verifica-se que o procedimento proposto para a minienxertia de citros, a partir de segmentos apicais obtidas *in vitro*, é efetivo, promovendo a união das copas aos porta-enxertos utilizados e a continuidade do crescimento.

A maior taxa de pegamento obtida foi de 73 % para o HTR - 069 sob o limoeiro 'Cravo Santa Cruz'. No entanto, as variações observadas nas percentagens de pegamento para os demais genótipos podem estar relacionadas ao maior ou menor grau de compatibilidade entre enxerto e porta-enxertos testados. Oliveira et al. (2002) também encontraram variações na porcentagem de pegamento de 34,37 % a 79,16 % na enxertia da cultivar de laranjeira 'Valência', enxertada sobre plântulas dos porta-enxertos limoeiro 'Cravo'; citrange 'Troyer'; tangerineira 'Cleópatra'; trifoliata 'Davis A' e citrumelo 'Swingle'. Assim, na técnica da minienxertia podem ser encontradas porcentagens de pegamento similares as realizadas por meio da enxertia convencional, onde em ambas a técnicas a combinação entre os genótipos irá responder de forma diferente. Um diferencial é que a minienxertia apresentará vantagens como a promoção da multiplicação de variedades triplóides, e a propagação de material livre de patógenos.

CONCLUSÕES

A utilização de segmentos com 1,5 cm de altura facilita o pegamento da minienxertia em relação a ápices de menor tamanho.

O porta-enxerto HTR - 069 apresentou as melhores respostas para sobrevivência das variedades copas laranjeira 'Pera', tangerineira 'Sunki Tropical' e limoeiro 'Cravo Santa Cruz'.

O porta-enxerto citrandarin 'Indio' proporcionou um maior desenvolvimento da altura da copa e do diâmetro do enxerto.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 134-136, 2003.

ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C.; TIRADENTES, A. T.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Metodologia de minienxertia em maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 329-332, 2013.

CHAE, C. W.; YUN, S. H.; PARK, J. H.; HYUN, J. W.; KOH, S. W.; LE, D. H. Micrografting and heat treatment combination for eliminating virus of CTV-infected *Citrus*. **Journal of Life Science**, Índia, v. 23, n. 2, p. 267-272, 2013.

CORRÊA, L. S.; CAVICHIOLI, J. C. C.; OLIVEIRA, J. C.; BOLIANI, A. C. Uso de câmara úmida em enxertia convencional de maracujazeiro-amarelo sobre três porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 591-598, 2010.

CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; GIRARDI, E. A. Propagação. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília-DF: Embrapa, 2013. v. 1, p. 322-345.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J. C. (Ed.) **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 69-109.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FOCHESATO, M. L.; SOUZA, P. V. D.; SCHAFER, G.; MACIEL, H. S. Crescimento vegetativo de porta-enxertos de citros produzidos em substratos comerciais. **Ciência Rural**, Santa maria, v. 37, n. 4, p. 970-975, 2007.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2010, p. 464-511.

HAYASHI, S.; GIRARDI, E. A.; SILVA, S. R.; STUCHI, E. S.; CANTUARIAS-AVILÉS, T. Avaliação de fita fotodegradável para enxertia em mudas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 641-645, 2012.

LEMOS FILHO, J. P.; PEREIRA, J. P.; MEDRADO, M. S.; COSTA, J. D.; PINTO, H. S. Minienxertia da seringueira (*Hevea spp*.): problemas e avanços na técnica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 779-784, 1994.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, 1980.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005, p. 221-277.

MONTEIRO, J. E. B. A.; SENTELHAS, P. C.; CHIAVEGATO, E. J.; GUISELINEI, C.; SANTIAGO, A. V.; PRELA. A. Estimação da área foliar do algodoeiro por meio de dimensões e massa das folhas. **Bragantia**, Campinas n. 64, p. 15-24, 2005.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafiting *in vitro* for virus-free *Citrus*. **Journal of the Americam Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v. 100, n. 5, p. 471-479, 1975.

OHTA, S.; KUNIGA, T.; NISHIKAWA, F.; YAMASAKI, A.; ENDO, T.; IWANAMI, T.; YOSHIOKA, T. Evaluation of novel antiviral agents in the elimination of Satsuma Dwarf Vírus (SDV) by semi-micrografting in *Citrus*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japão, v. 80, n. 2, p. 145-149, 2011.

OLIVEIRA, I. V. M.; DAMIÃO FILHO, C. F.; CARVALHO, S. A. Enxertia em citros por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultra**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 744-747, 2002.

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. **Citrandarin `Índio´**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011a.

PINA, A.; ERREA, P.; SCHULZ, A.; MARTENS, H. J. Graft union formation and cell-to-cell communication via plasmodesmata in compatible and incompatible stem unions of Prunus spp. **Scientia Horticulturae**, Itália, v. 143, p. 144-150, 2012.

SANABAM, R.; SINGH, N. S.; HANDIQUE, P. J.; DEVI, H. S. Disease-free khasi mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) production using *in vitro* microshoot tip

grafting and its assessment using DAS-ELISA and RT-PCR. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 189, p. 208-213, 2015.

SANTOS, C. H. B.; CRUZ NETO, A. J.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; GIRARD, E. A. Porta-enxertos e fixadores de enxerto para enxertia hipocotiledonar de maracujazeiro azedo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 1, p. 30-35, 2016.

SILVA, F. V.; SOARES, F. A. L.; GHEYI, H. R.; TRAVASSOS, K. D.; SUASSUNA, J. F.; CARDOSO, J. A. F. Produção de citros irrigados com água moderadamente salina. **Irriga**, Botucatu, Edição Especial, p. 396 - 407, 2012.

SINGH, B.; SHARMA, S.; RANI, G.; HALLAN, V.; ZAIDI, A. A.; VIRK, G. S.; NAGPAL, A. *In vitro* micrografting for production of *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C*. *deliciosa* Tenora). **Plant Biotechnology Reports**, Japão, v. 2, p. 137-143, 2008.

SOARES, L. A. A.; BRITO, M. E. B.; FERNANDES, P. D.; LIMA, G. S.; SOARES FILHO, W. S.; OLIVEIRA, E. S. Crescimento de combinações copa - porta-enxerto de citros sob estresse hídrico em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 3, p. 211–217, 2015.

WENDLING, I.; HOFFMANN, H. A. **Minienxertia em casa de vegetação**: nova metodologia para propagação vegetativa de *Ilex paraguariensis* – Resultados Preliminares. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 132).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo se buscou adequar condições de cultivo *in vitro* para regenerar porta-enxertos de citros gerados ou recomendados, produzidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticltura e ajustar um protocolo de minienxertia para possibilitar a micropropagação de porta-enxertos e de plantas cítricas triploides.

O primeiro capítulo abordou os efeitos que as variações da formulação basal do meio de cultura, dos reguladores de crescimento ANA e BAP e do pH podem ter na regeneração *in vitro.* Os resultados obtidos mostram que o meio WPM na sua formulação basal foi o mais eficiente na regeneração do porta-enxerto LCREEL x (LCR x TR) - 001, e que o pH 6,0 foi aquele que proporcionou a melhor resposta morfogênica *in* vitro. Quanto aos reguladores vegetais, as combinações de 0,1 mg L^{-1} de ANA com 0,00008 mg L^{-1} de BAP foram as mais competentes na morfogênese *in vitro* do porta-enxerto HTR - 051 em meio WPM.

Assim, os resultados aqui obtidos podem ser aplicados na micropropagação *in vitro* de porta-enxertos de citros e constituir uma alternativa à propagação tradicional de porta-enxertos que apresentam limitações via propagação por sementes, além de proporcionar qualidade fitossanitária, garantia da fidelidade genética e alta produção.

No segundo capítulo foi feito um estudo acerca do tamanho do segmento apical, do genótipo do porta-enxerto e da interação entre cultivar copa e porta-enxerto na técnica da minienxertia em citros. Foi possível constatar que a utilização de segmentos apicais acima de 1,5 cm de comprimento facilita o pegamento da minienxertia em relação a ápices de menor tamanho, que o porta-enxerto HTR - 069 apresentou as melhores

respostas para sobrevivência das variedades copas laranjeira ‘Pera’, tangerineira ‘Sunki Tropical’ e limoeiro ‘Cravo Santa Cruz’, e que o porta-enxerto citrandarin ‘Indio’ proporcionou um maior desenvolvimento da altura da copa e do diâmetro do enxerto.

A minienxertia é uma técnica viável para aplicação na propagação de indivíduos triploides em citros. Novos estudos podem ainda serem desenvolvidos, tendo como base os resultados aqui obtidos, visando alcançar uma elevação na taxa de pegamento, uma vez que esta é uma técnica ainda não utilizada para as espécies cítricas no Brasil.