

# MICROPROPAGAÇÃO DA LARANJA 'VALÊNCIA' ATRAVÉS DA CULTURA DE GEMAS AXILARES *IN VITRO*<sup>1</sup>

MOACIR PASQUAL<sup>2</sup> e AKIHIKO ANDO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Plântulas da cultivar 'Valência' (*Citrus sinensis* Osb.) foram obtidas por cultura *in vitro* de embriões nucelares extraídos de sementes de frutos em desenvolvimento, aproximadamente doze semanas após a polinização. Suas gemas foram excisadas e cultivadas em meio "MS" suplementado de todas as combinações possíveis de ácido naftaleno acético (NAA) e 6-benzilamino purina (BAP) nas concentrações de 0,0, 0,2, 2,0, e 5,0 mg/l. A maior taxa de multiplicação se deu com NAA - 0,2 + BAP - 0,2 mg/l, obtendo-se em média 6,18 brotos por gema. Os brotos foram transferidos para meio de enraizamento suplementado de NAA-0,1, 0,5, 1,0 e 5,0, IBA-1,0, 2,0, 5,0 e 10,0, NAA-0,1, 1,0 ou 5,0 + IBA-2,0, NAA-1,0 + IBA-5,0, NAA-5,0 + BAP-0,1 e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) - 5,0 mg/l. Registrou-se um enraizamento médio superior a 90% com NAA-0,1 à 1,0 + IBA (ácido indol butírico) - 2,0 mg/l.

**Termos para indexação:** *Citrus sinensis*, cultura de tecidos, micropropagação, enraizamento, citros.

## MICROPROPAGATION OF 'VALÊNCIA' ORANGE THROUGH CULTURE OF AXILLARY BUDS *IN VITRO*

**ABSTRACT** - Plants of 'Valência' (*Citrus sinensis* Osb.) were obtained by vegetative propagation through *in vitro* culture of nucellar embryos from seeds of developing fruits, twelve weeks after pollination. The axillary buds were excised and cultured on "MS" media supplemented with all of the possible combinations of NAA and BAP at 0.0, 0.2, 2.0 and 5.0 mg/l concentrations. The highest frequency of bud multiplication was observed on NAA-0.2 + BAP-0.2 mg/l with 6.18 new buds for each explant. The shoots were removed for "MS" media addition by NAA-0.1, 0.5, 1.0, 5.0, IBA-1.0, 2.0, 5.0, 10.0, NAA-0.1, 1.0 or 5.0 + IBA-2.0, NAA-1.0 + IBA-5.0, NAA-5.0 + BAP-0.1 and GA<sub>3</sub> - 5.0 mg/l. The best results (90%) were showed by NAA-0.1 and 1.0 + IBA-2.0 mg/l.

**Index terms:** *Citrus sinensis*, tissue culture, micropropagation, rooting, citrus.

## INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos constituem excelente instrumento de trabalho à disposição de pesquisadores das mais diferentes áreas do conhecimento científico. Especificamente para o caso de plantas que são de difícil propagação, ou cuja multiplicação é muito demorada, ou, ainda, que normalmente se propagam por sementes gerando alguma variabilidade genética, estas dificuldades podem ser prontamente superadas através da propagação *in vitro*.

Uma vez identificada uma planta com características superiores, esta precisa ser multiplicada em larga escala e rapidamente, o que é possível pela cultura de ápices caulinares e gemas axilares. A similaridade na resposta entre as gemas crescidas *in vitro* e *in vivo*

é significativa, o que permite também o estudo *in vitro* de fatores que controlam fenômenos complexos tais como diferenciação e desenvolvimento de gemas florais (Altman & Goren 1977).

A rápida multiplicação *in vitro* oferece uma abundante fonte de meristemas que podem ser utilizados na microenxertia, já em condições assépticas, evitando-se a perda por contaminação, que, normalmente, se observa quando do uso de material oriundo do campo, onde está exposto ao ataque de microorganismos. Na microenxertia depende-se, para retirada de meristemas, dos surtos de brotação, que ocorrem apenas em determinadas estações do ano, ao passo que, se estas brotações forem obtidas em laboratório, essa limitação é também facilmente contornada. Outra vantagem é a possibilidade da adição de antibióticos ou substâncias antivirais ao meio e cultura, contribuindo para minimizar a concentração de patógenos nos ápices caulinares (Navarro et al. 1975).

Um bom desenvolvimento de gemas foi obtido em meio "MS" adicionado de cinetina e ácido naftaleno acético (NAA) - 1,0 mg/l (Bouziid 1975). Uma gema de *Citrus grandis* cultivada em meio "MS" modificado por Chaturvedi & Mitra (1974) e suplementado por 6-benzilamino purina (BAP)-0,25 e NAA 1,0 mg/l, produziu 20-30 novas gemas e todas

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de abril de 1989, Trabalho desenvolvido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof.-Adjunto, Dep. de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Dr., Prof.-Assistente, Dep. de Genética/E-SALQ e pesquisador do CENA. Bolsista do CNPq.

desenvolveram brotos. Estes brotos enraizaram neste mesmo meio adicionado de NAA-0,1 a 0,5 mg/l.

Barlass & Skene (1982) cultivaram nós, entrenós e ápices caulinares excisados de ramos jovens e adultos de diversas cultivares de citros. Nós e entrenós foram inoculados em meio "MS" sólido com BAP-2,0 mg/l e ápices caulinares em meio "MS" líquido (integral e 1/2 da concentração) adicionado de BAP-0,5 a 2,0 mg/l. Culturas foram mantidas à luz por quinze horas a 27°C, e nove horas no escuro a 20°C. Os ápices evidenciaram um crescimento muito modesto. Os entrenós de ramos jovens brotaram prontamente, porém nos adultos não houve crescimento. A mais prolífica fonte de brotos para todas as variedades foram as gemas axilares dos nós, tanto jovens quanto adultos. O enraizamento destes brotos se deu com a presença de altos níveis de auxina (NAA -1,8 a 4,6 mg/l).

#### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), órgão da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP. Os frutos da cultivar Valência (*Citrus sinensis* Osb.), com aproximadamente doze semanas após a polinização, foram obtidos junto à E.E. de Limeira, unidade do Instituto Agromônico de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP.

Foram utilizadas plantas obtidas através de cultura de núcleos conforme metodologia descrita por Pasqual et al. (1983). Suas gemas axilares foram excisadas em condições assépticas e inoculadas em meio "MS" adicionado de todas as combinações possíveis de NAA e BAP nas concentrações de 0,0; 0,2; 2,0 e 5,0 mg/l. O pH do meio foi ajustado para 5,7 e solidificado com 8 g/l de ágar.

Cada tubo (10 x 2 cm), contendo 10 ml de meio, foi inoculado com uma gema acompanhada de um pequeno segmento do caule (aproximadamente 0,5 cm). Foram usadas onze repetições cada uma constituída de quatro tubos de ensaio.

A avaliação, estabelecendo-se o número médio de brotos com mais de 1 cm por tubo, foi realizada após dois meses de inoculação, quando os brotos formados foram excisados e transferidos para meio de enraizamento.

Segmentos do caule com aproximadamente 1 cm de comprimento, apresentando duas gemas em média, foram inoculados em tubos (20 x 2 cm) contendo 15 ml do meio "MS" adicionado dos seguintes reguladores de crescimento (em mg/l): NAA-0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0; IBA (ácido indol butírico)-1,0; 2,0; 5,0 ou 10,0; NAA-0,1 + IBA-2,0; NAA-1,0 + IBA-2,0 ou 5,0; NAA-5,0 + IBA-2,0; NAA-5,0 + BAP-0,1 ou GA<sub>3</sub> (ácido giberélico)-5,0. Foram feitas dez repetições, cada uma constituída de cinco tubos.

Todas as culturas foram mantidas sob um regime de 16 horas diárias de luz a 27 ± 2°C.

Os dados foram tomados em percentagem de enraizamento com relação aos tubos remanentes por ocasião da

remoção das plantas dos tubos de ensaio. As plantas foram acondicionadas em potes com terra, esterco e areia (4:2:1) e mantidas em câmara úmida por dez dias, para depois serem transferidas para casa de vegetação.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como se observa na Tabela 1, houve, para a cv. Valência, uma diferença altamente significativa quanto ao número médio de brotos com mais de 1 cm de comprimento entre os diversos níveis de NAA e BAP e também para a interação. Os desdobramentos de NAA dentro de BAP e de BAP dentro de NAA também mostraram significância ao nível de 1% para todos os casos, exceto para NAA dentro de BAP-5,0 mg/l e BAP dentro de NAA-5,0 mg/l.

Melhores resultados foram obtidos com NAA-0,0 e 0,2 mg/l tanto em termos médios como principalmente na dose mais baixa de BAP (0,2 mg/l). O BAP-0,2 mg/l foi significativamente superior aos demais tratamentos, tanto para a média, como dentro de todos os níveis de NAA (Tabela 1, Fig. 1). A combinação mais eficiente destes dois elementos se deu em NAA-0,2 e BAP-0,2 mg/l, com uma produção média de 6,18 novos brotos com mais de 1 cm por gema cultivada *in vitro*.

Resultados similares foram obtidos por Chaturvedi & Mitra (1974) com o cultivo de gemas axilares de *Citrus grandis* em meio suplementado por NAA-0,0 e BAP-25 mg/l, produzindo até 20 a 30 novas gemas a partir de um único explante. A adição de cinetina-1,0 e NAA-1,0 mg/l (Bouazid 1975) ou apenas de BAP - 0,5 a 2,0 mg/l (Barlass & Skene 1982) também promoveram uma boa multiplicação de gemas axilares.

O meio adicionado de NAA -1,0 + IBA - 2,0 mg/l foi o que proporcionou o maior índice de enraizamento de brotos (Tabela 2), não diferindo estatisticamente de NAA-0,1 + IBA-2,0 mg/l pelo teste de Tukey a 5%.

O NAA em diferentes concentrações, sozinho ou combinado com alguma citocinina, é citado como sendo o hormônio responsável pelo enraizamento de brotos de várias espécies de citros (Chaturvedi & Skene 1982). Este acentuado efeito do NAA também foi observado na ausência de BAP (Tabela 1).

TABELA 1. Número médio de brotos em cultura de gemas axilares de 'Valência' em diferentes combinações de BAP e NAA.

	NAA (mg/l)				
	0,0	0,2	2,0	5,0	Média
0,0	0,82 bc A	0,77 b AB	0,00 c C	0,19 BC	0,45 bc
		42,8*	33,3*	75,0*	
0,2	3,71 a A	6,18 a A	2,00 a B	0,73 C	3,16 a
2,0	1,66 b A	0,81 b AB	0,64 b AB	0,32 B	0,86 b
5,0	0,56 c	0,07 b	0,52 bc	0,27	0,36 bc
Média	1,69 A	1,96 A	0,79 B	0,38 B	

\* Brotos com raiz (%)

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para níveis de NAA) não diferem entre si pelo teste Tukey - 5%.

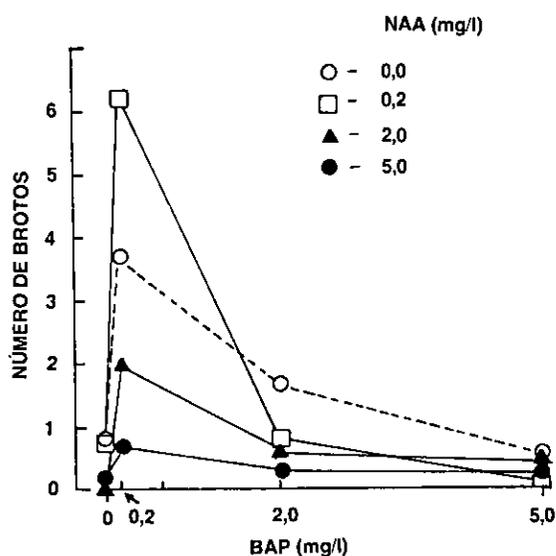


FIG. 1. Número médio de brotos com mais de 1 cm, obtidos em cultura de gemas axilares de 'Valência' em diferentes combinações na NAA e BAP.

## CONCLUSÕES

1. A multiplicação de gemas axilares de Valência é mais estimulada por NAA-0,2 + BAP-0,2 mg/l.

2. Melhor enraizamento de brotos de Valência é obtido com NAA-0,1 a 1,0 + IBA-2,0 mg/l.

## REFERÊNCIAS

ALTMAN, A. & GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. *Acta Hort.*, 78:51-60, 1977.

TABELA 2. Enraizamento de brotos (%) de 'Valência' em meio "MS" suplementado por vários reguladores de crescimento.

Treatamento mg/l	Enraizamento (%)
NAA-0,1	43,0 e
NAA-0,5	53,0 de
NAA-1,0	81,0 bc
NAA-5,0	26,0 f
IBA-1,0	85,0 bc
IBA-2,0	77,0 c
IBA-5,0	60,5 d
IBA-10,0	61,5 de
NAA-0,1 + IBA-2,0	91,0 ab
NAA-1,0 + IBA-2,0	96,0 a
NAA-1,0 + IBA-5,0	44,5 de
NAA-5,0 + IBA-2,0	60,0 de
NAA-5,0 + BAP-0,1	53,5 de
GA <sub>3</sub> -5,0	12,5 g

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey - 5%

BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. *In vitro* plantlet formation from citrus species and hybrids. *Sci. Hort.*, 17:334-41, 1982.BOUZID, S.M. Quelques traits du comportement de boutures de Citrus en culture *in vitro*. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D.*, 280:1689-92, 1975.CHATURVEDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of Citrus from somatic callus cultures. *Hort Sci.*, Virginia, USA, 9(2):118-20, 1974.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T.

Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free  
Citrus. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 100(5):471-9, 1975.

PASQUAL, M.; CRÓCOMO, O.J.; ANDO, A. Regeneração

de plantas cítricas *in vitro* a partir de nucelos. In: CON-  
GRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7,  
Florianópolis, 1983. *Anais . . .* Florianópolis, SBF,  
1983. p.402-7.