

Propagação clonal de cultivares de *Citrus* sp. pelo cultivo direto de meristemas *in vitro*

Gilmar Roberto Zaffari¹, Osvino Leonardo Koller¹, Eliséo Soprano¹, Dilnei Souza Medeiros² e Henri Stuker¹

Resumo – Com objetivo de aumentar a eficácia da produção *in vitro* de mudas de citros livres de vírus, avaliou-se o efeito da composição de diferentes meios de cultura sobre o desenvolvimento de meristemas de ápices caulinares. Os meristemas foram extraídos, desinfestados e inoculados em meio MS adicionado de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento. A melhor interação genótipo-meio de cultura foi considerada quando os meristemas obtiveram probabilidade de desenvolvimento maior que 0,75. Os meios de cultura que promoveram melhor resposta tinham em sua composição a presença de pelo menos dois (ANA e GA₃; BAP e GA₃; BAP e ANA) ou os três reguladores de crescimento em baixas concentrações. A formação de calos a partir dos meristemas foi observada em todos os cultivares. A maior taxa de sobrevivência de meristemas ocorreu nos meios de cultura com 0,5mg/L de ANA e 0,25 e 0,50mg/L de GA₃. O cultivo direto de meristemas de citros não mostrou ser promissor. Entretanto, estabeleceu-se uma sinalização adequada no meio de cultura para induzir o início do desenvolvimento da parte aérea e a diferenciação de calos nas células meristemáticas.

Termos para indexação: Micropropagação, limpeza clonal, citros, organogênese direta.

Clonal propagation of *Citrus* sp. cultivars using direct cultivation of *in vitro* meristems

Abstract – In order to increase the effectiveness of *in vitro* production of virus-free citrus seedlings, we assessed the effect of composition of different culture media on the development of shoot Apex meristem. The meristem were extracted, disinfected and inoculated in MS medium added with different combinations and concentrations of growth regulators. The best genotype-culture medium interaction was considered when the meristem obtained probability of developing greater than 0.75. The media culture that promoted best response had in its composition the presence of at least two (ANA and GA₃; BAP and GA₃; BAP and ANA) or the three growth regulators at low concentrations. Callus formation from the meristem was observed in all cultivars. The highest survival rate of meristem occurred in culture media with 0.5mg/L of ANA and 0.25 and 0.50mg/L of GA₃. Direct cultivation of citrus did not prove to be promising. However, a suitable signal in the culture medium was settled to induce the early development of the shoots and callus differentiation in meristematic cells.

Index terms: Micropropagation, clone cleaning, citrus, direct organogenesis.

Introdução

A micropropagação é um importante método de propagação assexuada (George et al., 2008; Sharma et al., 2009). O uso dessa técnica na produção de mudas livres de vírus constitui-se em estratégia importante para a multiplicação de plantas-matrizes. Durante os últimos anos, a limpeza clonal pela micropropagação tem sido usada para diversas espécies de plantas (George et al., 2008). A microenxertia em citros, técnica descrita por Navarro et al. (1975), é utilizada há décadas pelos laboratórios de cultura de tecidos de plantas como método para a limpeza de vírus. Embora a técnica tenha sofrido constantes aperfeiçoamentos ao longo

do tempo, o processo é meticuloso e de baixo rendimento devido à baixa taxa de pegamento do microenxerto.

Uma das alternativas para aumentar o rendimento da produção de mudas livres de vírus em laboratório é a regeneração de plantas pela organogênese direta, isto é, o cultivo direto de meristemas. Essa técnica consiste em utilizar o meristema apical caulinar para produzir plantas sem o processo de microenxertia. Os meristemas apicais têm a capacidade genética e fisiológica de manter a divisão e a diferenciação celular gerando, assim, novos tecidos e órgãos e formando um novo indivíduo completo com as mesmas características da planta-matriz. Na organogênese direta, cada

meristema produz apenas uma planta. Porém, quando esse meristema produz calo, podem-se gerar muitas plantas a partir de um único meristema (George et al., 2008). Cardoso et al. (2012) obtiveram plantas de citros da laranja doce 'Tobias' a partir de calo formado do tecido de ovário, por embriogênese somática. Singh et al. (2011) usaram meristemas apicais caulinares como explantes e obtiveram a regeneração de plantas completas de *Citrus jambhiri* no meio MS suplementado de benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e ácido naftaleno acético (ANA).

A micropropagação de plantas de citros livres de vírus por meio do cultivo direto de meristemas pode contribuir de forma significativa para posicionar

Recebido em 29/11/12. Aceito para publicação em 12/12/12.

¹ Engenheiros-agrônomo, Drs., Epagri / Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88318-112 Itajaí, SC, e-mails: gzaffari@epagri.sc.gov.br, osvino@epagri.sc.gov.br, esoprano@epagri.sc.gov.br, stuker@epagri.sc.gov.br.

² Técnico em Química, Epagri / Estação Experimental de Itajaí.

o Estado de Santa Catarina como um produtor de mudas cítricas de elevada qualidade genética e fitossanitária, estimulando o desenvolvimento da cadeia produtiva. Aproximadamente 45,8% do total das frutas cítricas consumidas *in natura* e industrializadas em Santa Catarina são produzidas no próprio estado. Quando considerado apenas o mercado *in natura*, de 133.000t ao ano, a importação de frutos atinge 77,3% (Koller, 2001). Santa Catarina é um estado tradicional em produção de mudas cítricas. No passado, atendia tanto o mercado interno quanto o externo, exportando mudas para o Paraná e Mato Grosso do Sul. A quantidade produzida de 1991 a 1993 chegou a 1 milhão de mudas por ano (Koller, 1997). Muitos dos plantios realizados resultaram em fracasso, devendo-se o insucesso, como fator primordial, à baixa qualidade genética e sanitária das mudas.

As variedades de citros são propagadas tanto sexuada quanto assexuadamente. Geralmente, os porta-enxertos são obtidos a partir de sementes, enquanto a maioria dos cultivares copa de interesse comercial é propagada por vários métodos assexuados (Chaudhary, 1994). Com o emprego da multiplicação vegetativa, a ocorrência de doenças causadas por vírus tem-se agravado. No caso dos citros, sabe-se há anos da existência de pelo menos quinze espécies de vírus afetando as plantas (USDA, 1968), e esse número vem aumentando com o passar dos anos.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um protocolo alternativo ao da microenxertia, com técnica mais simples, barata e de maior rendimento para a regeneração de plantas de citros livres de vírus, a partir de meristemas, e assim proceder à limpeza de vírus em cultivares cítricos de interesse para Santa Catarina.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Epagri/Estação Experimental de Itajaí (EEI), no município de Itajaí, Santa Catarina, no período de novembro de 2010 a abril de 2012. No Banco Ativo

de Germoplasma de Citros da EEI, foram coletadas brotações novas, com 3 a 5cm de comprimento, de plantas-matrizes dos cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) Baianinha EEI, Frank, SCS454 Catarina, SCS455 Reinaldo, SCS456 Sigmar; e SCS457 Souza, além dos cultivares de tangerina Montenegrina (*C. deliciosa* Tenore) e Oronules (*C. clementina* Tanaka).

Os meristemas foram excisados com auxílio de lupa estereoscópica, em aumento de 40x, e imersos em placa de Petri contendo água destilada esterilizada. Em seguida, os meristemas foram desinfestados com NaClO 0,25% em câmara de fluxo laminar durante 10 minutos. O cultivo dos meristemas foi realizado em frascos de vidro (100 x 40mm) contendo os sais e as vitaminas do meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) (MS) e combinações dos reguladores de crescimento BAP (0, 0,5, 1 e 2mg/L), ANA (0, 0,5, 1 e 1,5mg/L) e ácido giberélico - GA₃ (0, 0,25, 0,5, e 1mg/L), totalizando 64 tratamentos, com exceção do cultivar copa SCS456 Sigmar, que teve 32 tratamentos BAP (0 e 0,5mg/L), ANA (0, 0,5, 1 e 1,5mg/L) e GA₃ (0, 0,25, 0,5, e 1mg/L). As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2°C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, luz branca fria fluorescente, de intensidade de 50µmol/m²/s e 16 horas de fotoperíodo, por 450 dias.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com sete repetições por tratamento, em arranjo fatorial 7 x 4 x 4 x 4, composto por sete cultivares de citros e combinações de quatro concentrações dos três reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura basal. Um segundo experimento consistiu na inoculação dos meristemas em seis meios de cultura: M1 (MS + 0,5mg/L ANA + 0,25mg/L GA₃); M2 (MS + 0,5mg/L ANA + 0,5mg/L GA₃); M3 (MS + 1,5mg/L ANA + 0,5mg/L BAP + 0,25mg/L GA₃); M4 (MS + 1mg/L ANA + 1mg/L GA₃); M5 (MS + 1mg/L BAP + 0,5mg/L GA₃); M6 (MS). Houve dez repetições por tratamento, e cada repetição consistiu em um meristema por frasco.

As avaliações consideraram o efeito dos meios de cultura sobre o número de meristemas vivos, o desenvolvimento

da parte aérea e a formação de calo. Os dados foram analisados calculando-se a probabilidade de resposta dos cultivares de laranjeira e tangerineira aos meios de cultura.

Resultados e discussão

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, pode-se detectar o desenvolvimento dos meristemas caulinares de todos os cultivares copa (Figura 1). Um maior número de meios de cultura apresentou uma probabilidade entre 0 e 0,5 de desenvolvimento de parte aérea dos explantes (Tabela 1). A melhor resposta morfogênica do cultivar copa SCS456 Sigmar apresentou probabilidade menor que 0,25 em nove meios de cultura. O melhor resultado em termos de interação genótipo-meio de cultura foi considerado quando os meristemas alcançaram probabilidade maior que 0,75 de desenvolvimento de parte aérea. Nessa condição, os cultivares SCS457 Souza, Montenegrina e Oronules apresentaram somente um meio de cultura com resposta, sendo esse diferente entre os genótipos. Por outro lado, o SCS455 Reinaldo apresentou resposta de desenvolvimento da parte aérea em três meios de cultura. Os seis meios de cultura que promoveram probabilidade maior que 0,75 na resposta morfogênica da parte aérea nos meristemas tinham na sua composição a combinação de dois (ANA e GA₃, BAP e GA₃ ou BAP e ANA) ou três reguladores de crescimento (BAP, ANA e GA₃) em baixas concentrações no meio de cultura (Tabela 2). Almeida et al. (2002) e Costa et al. (2004), utilizando segmentos de epicótilos de limão-cravo (*C. limonia*), também verificaram que a maior capacidade de resposta dos tecidos foi obtida em meio de cultura com baixa concentração de citocinina (0,5mg/L de BAP), e que concentrações maiores inibiram a organogênese *in vitro*. Em nenhum dos meios de cultura ocorreu a regeneração de plantas, isto é, formação da parte aérea e sistema radicular. Dos cinco cultivares que apresentaram maior probabilidade de desenvolvimento da parte aérea do meristema, o SCS455 Reinaldo teve a menor resposta genótipo dependente. ►

Tabela 1. Número de meios de cultura que induziram resposta de desenvolvimento de parte aérea e calo em meristemas de cultivares copa de citros, cultivados na formulação básica de Murashige & Skoog (1962) adicionados de reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina), ANA (ácido naftaleno acético) e GA₃ (ácido giberélico), após 450 dias de cultivo *in vitro*

Cultivar copa	Indução do desenvolvimento de parte aérea					Desenvolvimento de calo				
	Intervalos de probabilidade					Intervalos de probabilidade				
	0	< 0,25	0,25 a 0,5	0,5 a 0,75	> 0,75	0	< 0,25	0,25 a 0,5	0,5 a 0,75	> 0,75
SCS 457 Souza	23	19	19	2	1	13	17	30	4	-
Baianinha EEI	48	12	3	1	-	47	15	2	-	-
Frank	54	8	2	-	-	53	10	1	-	-
SCS456 Sigmar	23	9	-	-	-	22	10	-	-	-
SCS455 Reinaldo	28	4	18	11	3	41	16	7	-	-
Montenegrina	15	14	19	15	1	35	17	11	1	-
Oronules	14	14	26	9	1	42	18	4	-	-

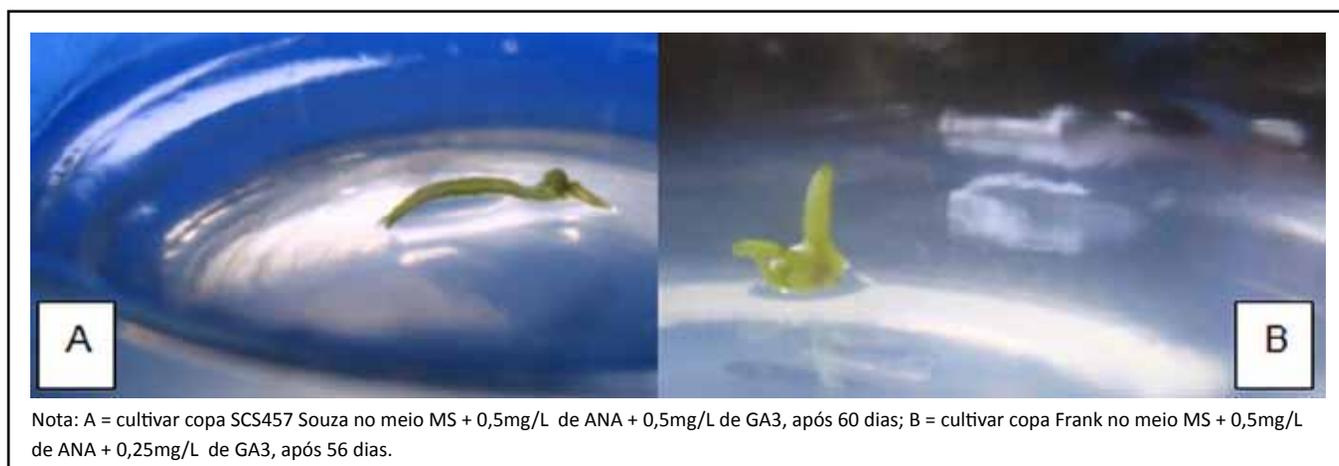


Figura 1. Meristema caulinar asséptico verde e com desenvolvimento da parte aérea cultivada *in vitro*

Tabela 2. Composição dos meios de cultura nos quais os meristemas dos cultivares copa de citros apresentaram probabilidade maior que 0,75 para o desenvolvimento de parte aérea e de 0,5 a 0,75 para o calo

Resposta morfogênica	Cultivar copa	Regulador de crescimento (mg/L)			
		BAP ⁽¹⁾	ANA	GA ₃	
Indução do desenvolvimento da parte aérea	SCS 457 Souza	0,5	1,5	0,25	
	Montenegrina	0,5	1,0	0,25	
	Oronules	1,0	0,5	1,00	
	SCS 455 Reinaldo	-	0,5	0,25	
			1,0	-	0,50
Desenvolvimento de calo	SCS 457 Souza	0,5	0,5	-	
			1,0	-	0,50
			1,0	-	-
			2,0	-	0,25
	Montenegrina	0,5	-	-	

⁽¹⁾ BAP = benzilaminopurina; ANA = ácido naftaleno acético; GA₃ = ácido giberélico

O desenvolvimento de meristemas em plantas de citros *in vitro* é um processo de baixa eficácia e depende do genótipo, do tipo do explante, do meio de cultura e das condições de incubação (Khan et al., 2009; Tavano et al., 2009; Silva et al., 2008; Molina et al., 2007). O sucesso da organogênese *in vitro* de genótipos de citros tem sido obtido com o uso de explantes de epicótilo, hipocótilo e segmento internodal, porém com variável diferença na capacidade de resposta morfogênica. Em *C. limonia*, 60% dos segmentos de epicótilo e 62% dos segmentos internodais mostraram-se responsivos (Costa et al., 2004). Em segmentos de epicótilo de Troyer e Carrizo citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*), os níveis alcançaram 95% (Moreira-Dias et al., 2001), e 75% dos segmentos de hipocótilo de *C. aurantium* e 77% dos de *C. volkameriano* apresentaram

respostas morfogênicas (Tavano et al., 2009).

A formação e o desenvolvimento de calos a partir dos meristemas foram observados em todos os cultivares copa (Figura 2). Nenhum meio de cultura apresentou probabilidade acima de 0,75 para o desenvolvimento de calo. No segundo experimento, os maiores valores percentuais de sobrevivência de meristemas assépticos ocorreram nos meios de cultura que continham concentrações de 0,5mg/L de ANA e 0,25 e 0,5mg/L de GA₃. Os meios de cultura que continham concentrações

de ANA maiores que 0,5mg/L, com adição de BAP ou ausência de reguladores de crescimento, foram aqueles que resultaram em menores porcentagens de sobrevivência de meristemas assépticos (Tabela 3).

Almeida et al. (2002) cultivaram segmentos de epicótilo de três cultivares de laranja (Natal, Valência e Hamlin) em meio contendo 0,5 a 2,5mg/L de BAP na fase de indução de brotação, que resultou em alto índice de regeneração de plantas. O cultivar SCS457 Souza apresentou o maior número de meristemas vivos considerando-se

todos os meios, porém mesmo assim não foi obtida a regeneração de plantas. Apesar de meristemas apicais caulinares das plantas serem considerados os melhores explantes para a morfogênese *in vitro*, principalmente em termos de capacidade de resposta aos reguladores de crescimento, existe maior dificuldade desse pequeno tecido de se adaptar às condições de cultivo e regenerar uma planta completa (George et al., 2008).

Considerando a necessidade de limpeza clonal dos cultivares copa de citros, é necessário o desenvolvimento de protocolos de propagação clonal a partir de meristemas, uma vez que somente esses explantes possibilitam a obtenção de plantas livres de vírus. Entretanto, no presente trabalho não houve a regeneração de plantas a partir do cultivo direto de meristemas.

Conclusões

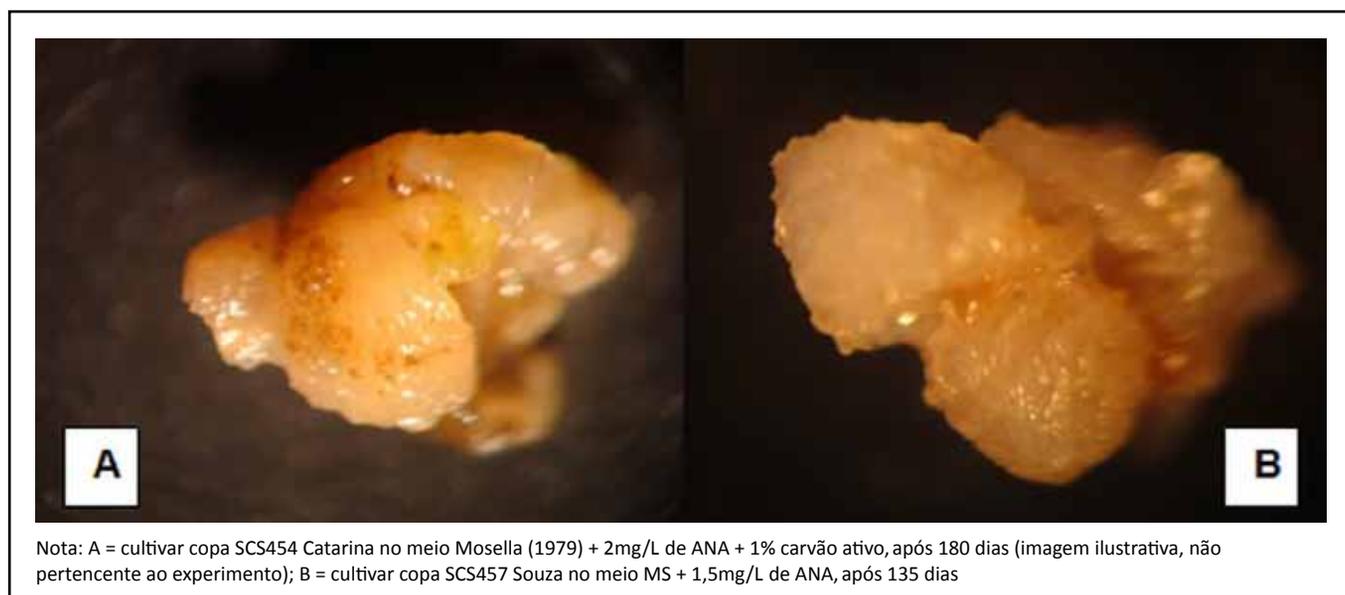
- A condição nutricional e hormonal dos meios de cultura proporcionou a sinalização adequada às células meristemáticas apenas para induzir o início do desenvolvimento da parte aérea e a diferenciação de calo.

- O cultivo direto de meristemas *in vitro* dos cultivares de laranja-doce Baianinha EEI, Frank, SCS454 Catarina, SCS455 Reinaldo, SCS456 Sigmar e SCS457 Souza, e das tangerineiras Montenegrina e Oronules não permitiu a propagação massal de plantas.

Tabela 3. Porcentagem de sobrevivência de meristemas assépticos de cultivares copa de citros cultivados em seis meios de cultura, com a formulação básica de Murashige & Skoog (1962) (MS) adicionados de reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina), ANA (ácido naftaleno acético) e GA₃ (ácido giberélico), após 150 dias de cultivo *in vitro*

Cultivar copa	Sobrevivência dos meristemas (%)					
	Meio de cultura					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
SCS 454 Catarina	57,14	50	25	-	-	-
SCS 457 Souza	87,71	50	42,85	14,28	10	14,28
Baianinha EEI	80	80	44,44	-	-	-
Frank	50	-	-	-	-	-
SCS 455 Reinaldo	62,5	66,66	0	11,11	12,5	33,33
Montenegrina	25	22,22	0	12,5	0	22,22
Oronules	14,28	30	20	12,5	30	0

Nota: M1 = MS + 0,5mg/L ANA + 0,25mg/L GA₃; M2 = MS + 0,5mg/L ANA + 0,5mg/L GA₃; M3 = MS + 1,5mg/L ANA + 0,5mg/L BAP + 0,25mg/L GA₃; M4 = MS + 1mg/L ANA + 1mg/L GA₃; M5 = MS + 1mg/L BAP + 0,5mg/L GA₃; M6 = MS.



Nota: A = cultivar copa SCS454 Catarina no meio Mosella (1979) + 2mg/L de ANA + 1% carvão ativo, após 180 dias (imagem ilustrativa, não pertencente ao experimento); B = cultivar copa SCS457 Souza no meio MS + 1,5mg/L de ANA, após 135 dias

Figura 2. Meristema caulinar asséptico com desenvolvimento de calo *in vitro*

Agradecimento

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (Fapesc) pelo suporte financeiro do projeto.

Literatura citada

1. ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. et al. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.35-40, 2002.
2. CARDOSO, J.; MARTINELLI, A.; LATADO, R. Somatic embryogenesis from ovaries of sweet orange cv. Tobias. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Holanda, v.109, n.1, p.171-177, 2012.
3. CHAUDHARY, M.I. Fruit crops. In: Malik, M.N. (Ed.). **Horticulture**. Islamabad: National Book Foundation, 1994. 422p.
4. COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G. et al. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyls explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, n.1, p.63-74, 2004.
5. GEORGE, F.E.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.-J. Plant propagation by tissue culture. **The background**. 3.ed. Dordrecht, Holanda: Springer, 2008. v.1, 501p.
6. KHAH, E.H.; FU, X.Z.; WANG, J. et al. 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, n.1, p.70-76, 2009.
7. KOLLER, O.L. A citricultura no Estado de Santa Catarina. In: REUNIÃO DA COMISSÃO NACIONAL DE CITRICULTURA, 2., Cruz das Almas, 1995. **Citricultura brasileira, Difusão de material básico e certificação de mudas**, Cruz das Almas. Embrapa/CNPMP, 1997. p.55-60.
8. KOLLER, O.L. Citricultura Catarinense: seus números e suas necessidades. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.14, n.1, p.54-61, 2001.
9. MOLINA, R.V.; CASTELLÓ, S.; GARCÍA-LUIS, A. et al. Light-cytokinin interactions in shoot formation in epicotyls cuttings of Troyer citrange cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Holanda, n.2, v.89, p.131-140, 2007.
10. MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L. et al. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyls segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.87, n.4, p.275-290, 2001.
11. MOSELLA, L. **L'utilization de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux types de virions chez Le pêcher (*Prunus persica* Batsch)**. 1979. 215p Tese Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, França.
12. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
13. NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.100, n.5, p.471-479, 1975.
14. SHARMA, S.; PRAKASH, A.; TELE, A. *In vitro* propagation of citrus rootstocks. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Cluj-Napoca, v.37, n.1, p.84-88, 2009.
15. SILVA, R.P.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. *In vitro* induction and culture of adventitious buds in epicotyls segments of sour orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.10, p.1331-1337, 2008.
16. SINGH, B.; KAUR, A.; SINGH, J. Evaluation of natural exudate gum from *Sterculia urens* as gelling agent in culture media for *in vitro* regeneration of Rough Lemon (*Citrus jambhiri* Lush) shoot tips. **Journal of Biological Sciences**, Faisalābād, v.11, n.5, p.374-380, 2011.
17. TAVANO, E.C.R.; STIPP, L.C.L.; MUNIZ, F.R. et al. *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, Holanda, v.53, n.2, p.395-399, 2009.
18. USDA. United States Department of Agriculture. **Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees**. Washington, DC: USDA, 1968. 96p. (Agriculture Handbook, 333).



Reciclagem: não jogue essa ideia no lixo.

Uma tonelada de alumínio reciclado evita a extração de 5 toneladas de minério.
O alumínio leva de 100 a 500 anos para se decompor na natureza.

Preserve a saúde do planeta.

Governo do Estado de Santa Catarina
Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento da Pesca
Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

