

INSTITUTO AGRONÔMICO

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
TROPICAL E SUBTROPICAL**

**RADIOSENSIBILIDADE DE DOIS TIPOS
DE PROPÁGULOS EM CITROS**

DANIELA LOSCHTSCHAGINA GONZAGA

**Orientadora: Rose Mary Pio
Co-orientador: Rodrigo Rocha Latado**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Tecnologia de Produção Agrícola

Campinas, SP
Abril, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Á Deus

“Se voltares as costas à luz, nada mais
verás além da tua própria sombra”

(Autor desconhecido)

DEDICO

Aos meus pais Diógenes e Gal pelo imenso
amor, educação e formação dedicados ao
longo de minha vida.

Tudo o que hoje me tornei.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto Agronômico de Campinas pela oportunidade de cursar mestrado em Tecnologia de Produção de Plantas.
- Ao Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ por todas as oportunidades de ensino e pesquisa que vivenciei desde a iniciação científica.
- À Dra. Rose Mary Pio, pela orientação e aprendizado que tive ao longo do curso.
- Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado pela orientação e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) na pessoa do Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto, pela irradiação dos materiais vegetais utilizados neste trabalho.
- À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.
- Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal (Centro APTA Citros Sylvio Moreira) Aparecido da Silva Junior, Lilian Povedano, Thiago, Kelly, “Chica”, pelo convívio e auxílio durante a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Aspectos Econômicos dos Citros	02
2.2 Aspectos Gerais do Gênero <i>Citrus</i>	03
2.3 Variedades e Híbridos de Tangerinas	04
2.3.1 Tangor Murcott	04
2.3.2 Tangerina Thomas.....	05
2.3.3 Tangerina Fremont.....	05
2.4 Porta-enxertos de citros	05
2.4.1 Limão Cravo	06
2.5 Melhoramento Genético de Citros	07
2.5.1 Indução de mutações em citros com uso de métodos <i>in vivo</i>	08
2.5.2 Indução de mutações em citros com uso de métodos <i>in vitro</i>	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Material Vegetal	13
3.2 Métodos	13
3.2.1 Indução de mutações pelo método <i>in vivo</i> de tangor e tangerinas.....	14
3.2.1.1 Teste de radiosensibilidade de borbulhas.....	14
3.2.1.2 Irradiação de estacas com dose selecionada e obtenção do pomar para a seleção de mutantes	15
3.2.2 Indução de mutações em citros pelo método <i>in vitro</i>	15
3.2.2.1 Estabelecimento de protocolos para obtenção de gemas adventícias, usando segmentos de epicótilo	15
3.2.2.2 Estabelecimento de protocolos para obtenção de gemas adventícias, usando segmentos internodais de tecido adulto.....	16
3.2.2.3 Teste de radiosensibilidade de segmentos de epicótilo	17
3.2.2.4 Irradiação de explantes com a dose selecionada e obtenção de plantas para a seleção de mutantes	19
3.2.3 Análise comparativa da radiosensibilidade de propágulos <i>in vivo</i> (borbulhas) e <i>in vitro</i> (segmentos de epicótilo)	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Indução de mutações pelo método <i>in vivo</i> de tangor e tangerinas.....	20
4.1.1 Teste de radiosensibilidade de borbulhas.....	20
4.1.2 Irradiação de estacas com dose selecionada e obtenção do pomar para a seleção de mutantes.....	24
4.2 Indução de Mutações em Citros pelo Método <i>in vitro</i>	25
4.2.1 Estabelecimento de protocolos para obtenção de gemas adventícias, usando segmentos internodais e segmentos de epicótilo	25
4.2.1.1 Segmentos internodais	25
4.2.1.2 Segmentos de epicótilo	26
4.2.2 Teste de radiosensibilidade de segmentos de epicótilo	28
4.2.2.1 Irradiação de explantes com a dose selecionada e obtenção de plantas para a seleção de mutantes	32
4.3 Análise Comparativa da Radiosensibilidade de Propágulos <i>in vivo</i>	

(borbulhas) e <i>in vitro</i> (segmentos de epicótilo)	32
5 CONCLUSÕES	37
6 REFERÊNCIAS	38
7 GLOSSÁRIO	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Altura média das brotações (cm) e porcentagem de desenvolvimento de borbulhas. Avaliação feita 60 dias após a irradiação de estacas com diversas doses de mutagênico.	21
Tabela 2 - Resultado do teste F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas das equações de regressões lineares, considerando altura média das brotações desenvolvidas de borbulhas irradiadas com diversas doses de mutagênico.....	24
Tabela 3 - Número médio de brotações regeneradas <i>in vitro</i> a partir de segmentos de epicótilo cultivados em diferentes concentrações de BAP.....	26
Tabela 4 - Número médio de brotações regeneradas <i>in vitro</i> a partir de segmentos de epicótilo cultivados em diferentes concentrações de BAP e porcentagem de epicótilos responsivos.	27
Tabela 5 - Número médio de brotações regeneradas <i>in vitro</i> e porcentagem de explantes responsivos, obtidos a partir de segmentos de epicótilo tratados com doses crescentes de mutagênico.	28
Tabela 6 - Resultado do teste F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas das equações de regressões lineares, considerando número de brotações regeneradas por segmento de epicótilo, após a irradiação com diversas doses de mutagênico.....	30
Tabela 7 - Resultado do teste F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas das equações de regressões lineares, considerando dois tipos diferentes de propágulos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>), após a irradiação com diversas doses de mutagênico.	33
Tabela 8 - Doses GR 30 dos propágulos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> irradiados com diversas doses de mutagênico, obtidas da regressão linear dos dados das três variedades de tangerinas.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - a) Plantas originadas de borbulhas de tangerina Fremont do controle e irradiadas com diversas doses do mutagênico do teste de radiosensibilidade *in vivo*. b) Efeito fisiológico da radiação gama sobre primeiras folhas. c) Plantas obtidas de borbulhas irradiadas com dose única mantidas em estufa. d) Plantas obtidas do teste *in vivo* de radiosensibilidade no campo experimental.22
- Figura 2 - Dados de altura média das brotações desenvolvidas de borbulhas irradiadas com diversas doses de mutagênico, e regressão linear dos dados das três variedades de tangerinas.23
- Figura 3 - a) Número médio de brotações regeneradas por segmento de epicótilo, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama e regressão linear dos dados, de quatro variedades de citros.29
- Figura 4 - a) Epicótilos de limão Cravo submetidos ao teste de radiosensibilidade. b) Brotação microenxertada *in vitro*. c) Planta em processo de aclimatização em estufa. d) Planta com mutações na morfologia. e) Plantas de limão Cravo no campo, provenientes de material irradiado.31
- Figura 5 - Equações de regressão linear dos dados de redução relativa do desenvolvimento de propágulos *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama, em tangor Murcott.34
- Figura 6 - Equações de regressão linear dos dados de redução relativa do desenvolvimento de propágulos *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama, em tangerina Fremont.35
- Figura 7 - Equações de regressão linear dos dados de redução relativa do desenvolvimento de propágulos *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama, em tangerina Thomas.36

GONZAGA, Daniela Loschtschagina. **Radiossensibilidade de dois tipos de propágulos em citros**. 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) – Pós-Graduação – IAC.

RESUMO

A citricultura brasileira apresenta pouca expressão no mercado de frutas frescas e riscos devido à elevada porcentagem do uso do limão Cravo como porta-enxerto. Nos últimos anos, apesar das novas tecnologias, doenças como a morte súbita dos citros (MSC) e a gomose afetam severamente plantas enxertadas sobre o limão Cravo, além de diversas doenças que atacam a copa das árvores. Dentre os cítricos, as tangerinas e seus híbridos formam o grupo mais importante de frutas de mesa no Brasil. Uma importante exigência desse mercado é a comercialização de frutas sem sementes. Assim sendo, para participar mais ativamente deste mercado é preciso modificar o perfil varietal das tangerinas cultivadas no Brasil, que apresentam média de 20 a 30 sementes por fruto. Os citros apresentam dificuldades já conhecidas na aplicação dos métodos tradicionais de melhoramento. Trabalhos nessa área envolvendo mutagênese induzida têm sido conduzidos em vários países, incluindo o Brasil e resultaram em mutantes comerciais de tangerinas, laranjas e limões. O objetivo do presente estudo foi avaliar a radiossensibilidade de propágulos das diversas variedades de citros visando determinar uma dose adequada para o uso programa de melhoramento por indução de mutações, e posteriormente comparar a radiossensibilidade entre dois tipos de propágulos (*in vivo* e *in vitro*) de cada variedade e entre o mesmo propágulo de diferentes variedades. O estudo foi iniciado com um teste de sensibilidade dos materiais, em que foram definidas as GR 30 para as borbulhas (*in vivo*) e GR 30, para os segmentos de epicótilo (*in vitro*). As doses selecionadas para a irradiação de um maior número de material (visando obter 500 plantas irradiadas de cada variedade de cada tratamento) foram de 18,7 e 18,2 Gy para Thomas, 29,9 e 13,7 Gy para Fremont e 14,0 e 16,1 Gy para Murcott, utilizando os métodos *in vivo* e *in vitro* respectivamente, e apenas no método *in vitro* de limão Cravo a dose foi de 20,7 Gy. Posteriormente as populações das plantas irradiadas serão avaliadas posteriormente em busca de mutantes que apresentem frutos sem sementes (no caso das tangerinas) ou com outras características, tais como: porte compacto, alteração no período de maturação dos frutos ou maior resistência a doenças e pragas, visando o lançamento de novas variedades comerciais.

Palavras chave: tangor, mutações, raios-gama.

GONZAGA, Daniela Loschtschagina. **Radiosensitivity of two types of propagules in citrus.** 2009. 45f. Dissertation (Master's degree in Technology of Agricultural Production) – Postgraduate – IAC.

ABSTRACT

The Brazilian citriculture presents a little expressive position in the worldwide fresh fruit market. Despite its remarkable development with the adoption of new technologies, diseases such as citrus sudden death (CSD) and gummosis of *Phytophthora* severely attacked plants grafted on Rangpur lime, beyond other diseases that also attack the suou. Among the citrus species, the mandarins and their hybrids represent the most important group for the fresh fruit market. In Brazil an important requirement of this market is the commercialization of seedless fruits. Therefore, to participate more actively in this market its necessary to modify the profile of mandarin varieties grown in Brazil, which have an average of 20 to 30 seeds per fruit. The citrus shows difficulties for applying the traditional methods of breeding. Induced mutagenesis methods has been used in several countries, including Brazil, and has resulted in commercial mutants of mandarins, oranges and lemons. The purpose of this study was to evaluate the radiosensitivity of plants of different varieties of citrus to determine an appropriate dose for use in program improvement by induced mutations, and then compare the radiosensitivity of two types of plants (*in vivo* and *in vitro*) of each variety and between the same propagule of different varieties. The experiment was initiated with a sensitivity test for plant material, which was defined by the GR 30 to the citrus buds (*in vivo*) and the epicotyl segments (*in vitro*). The selected doses for irradiation of many materials (aiming to get 500 plants of each variety) were, *in vivo* 18.7 Gy to Thomas, 29.9 Gy to Fremont, 14.0 Gy to Murcott and only in the *in vitro* method of Rangpur lime the final dose was 20.7 Gy. The final doses for irradiation of many materials (aiming to get 500 plants of each variety) were, *in vitro* 18.2 Gy to Thomas, 13.7 Gy to Fremont, 16.1 Gy to Murcott. Populations of irradiated plants will be evaluated looking for seedless fruit mutants (in the case of mandarins) or other characteristics such as smaller canopy plants, longer off-season maturation or greater resistance to diseases and pests in order to release new commercial varieties.

Key words: tangor, mutation, gamma rays.

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira destaca-se como a de maior expressão em nível mundial, com uma população de plantas da ordem de 270 milhões, distribuídas em todos os Estados do país, numa área superior a 900 mil hectares, sendo o Estado de São Paulo o maior responsável pela exportação de laranja e produtos cítricos (NEVES & JANK, 2006).

A produção mundial de citros em 2006 foi de aproximadamente 108 milhões de toneladas, sendo o Brasil o maior produtor, responsável por 27,9% dessa produção. O Estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro de laranja, produzindo 18 milhões de toneladas, o que corresponde a 80,4% da produção total de laranja no país (FAO, 2008).

O porta-enxerto de citros mais utilizado nos plantios comerciais é o limão Cravo em virtude de suas boas qualidades agronômicas. Dentre elas podemos citar a precocidade na formação das mudas, compatibilidade com todas as variedades de copa, indução de boa produção, resistência à seca e tolerância à tristeza. No entanto, apresenta alta suscetibilidade ao “declínio dos citros”, gomose e Morte Súbita dos Citros (MSC) o que tem causado a eliminação de milhões de plantas cítricas por ano no Brasil (POMPEU JUNIOR, 2001; SOARES FILHO et al., 2007).

O consumo de frutas cítricas de casca solta está em fase de expansão em diversos países e poderá crescer também no Brasil. Com um imenso mercado consumidor, o país apresenta grande diversidade de clima e solo, o que poderá influir positivamente na qualidade da fruta para consumo *in natura*.

A produção mundial de tangerinas e seus híbridos se situa ao redor de 16 milhões de toneladas anuais, sendo a China o maior produtor, seguida pela Espanha e Japão. O Brasil produziu cerca de 1,2 milhão de toneladas em 2005, sendo que a exportação foi de apenas 10,7 mil toneladas em 2006 e o restante, foi comercializado no mercado interno. O Estado de São Paulo é o maior produtor de tangerinas, com aproximadamente 546 mil toneladas em 2007 (FNP, 2008).

Devido à carência de variedades com qualidade e que apresentam frutos sem sementes, as exportações brasileiras de tangerinas se limitam ao tangor Murcott que, apesar de possuir excelentes características organolépticas, produz frutos com número elevado de sementes, em torno de 20 (FIGUEIREDO, 1991).

Num estudo anterior realizado no Centro APTA Citrus Sylvio Moreira/IAC foram selecionadas 42 novas variedades, dentre elas as tangerinas Thomas e Fremont, que se destacaram por apresentar frutos com boa qualidade (tamanho, cor e sabor) e resistência à mancha marrom de *Alternaria*, uma importante e limitante doença que afeta a cultura. No entanto, uma característica indesejável apresentada por ambas é o número médio de sementes por fruto ser alto, 16,4 e 12, respectivamente (PIO et al., 2002 e 2004).

Como o incremento das exportações brasileiras de tangerinas e seus híbridos depende, necessariamente, do plantio de pomares de variedades com frutos sem sementes o melhoramento de variedades já cultivadas e comercializadas no país, pela facilidade de já serem conhecidas por parte dos produtores, ao invés do que ocorreria numa possível introdução de materiais sem sementes selecionados em outros países, é importante e permite a obtenção e o lançamento de novas variedades brasileiras com características superiores e/ou interessantes que podem resultar no estímulo à diversificação varietal de tangerinas.

O melhoramento genético tradicional de citros por meio de cruzamentos controlados apresenta uma série de entraves que dificultam sua aplicação, como a poliembrionia, a alta heterozigosidade, auto-incompatibilidade e o longo período de juvenilidade. Em decorrência disto é interessante o uso de novas técnicas, principalmente biotecnológicas, como apoio a programas de melhoramento de citros, de forma que os avanços possam ocorrer mais rapidamente (ALMEIDA, 2002).

O uso de mutagênese induzida já foi comprovada por vários trabalhos e em grupos de pesquisas de diversos países pela facilidade de se obter mutantes espontâneos. Pode-se afirmar que a maioria dos citros usados como variedades de copa foi originada de mutações espontâneas, restando um pequeno número de variedades, originadas por meio de hibridação.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a radiosensibilidade de propágulos das diversas variedades de citros visando determinar uma dose adequada para o uso programa de melhoramento por indução de mutações, e posteriormente comparar a radiosensibilidade entre dois tipos de propágulos (*in vivo* e *in vitro*) de cada variedade e entre o mesmo propágulo de diferentes variedades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Econômicos dos Citros

O sistema agroindustrial citrícola no Brasil movimentava R\$ 9 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. Inovações em pesquisa, tecnologia e logística estão na base da eficiência e liderança desta área no país, que exportou em 2006, US\$1,5 bilhões em suco de laranja. Este valor representa 82% do mercado mundial de suco de laranja, cujo consumo cresce a taxa de 2% a 4% ao ano (NEVES & JANK, 2006).

O setor apresenta-se importante não somente em termos econômicos, mas também no aspecto social, sendo que a produção de citros empregou 11,2% da força de trabalho agrícola do Estado de São Paulo e 2,2% do Brasil, em 2002 (SEADE, 2003).

Atualmente, a produção de citros está localizada em praticamente todo o Estado de SP, desde o sul até o norte, que junto com a região do triângulo mineiro, formam o “cinturão citrícola”. As regiões norte e noroeste do Estado de SP concentram a maior produção, 45% do total, que estão sujeitas a diminuir, dadas as fortes pressões das doenças, principalmente o *huanglongbing* (HLB) (NEVES et al., 2007) e da concorrência com a cultura da cana-de-açúcar (NEVES & LOPES, 2005).

O deslocamento da citricultura para a região sudoeste foi uma alternativa para reduzir a pressão de doenças como a MSC e a Clorose Variegada dos Citros (CVC), que tornou o controle fitossanitário oneroso e dependente da alta tecnologia além de causar danos irreversíveis, como a erradicação de pomares.

Desde 2000, a área plantada permaneceu praticamente a mesma no Estado de São Paulo, ao contrário da produtividade, que nos últimos seis anos cresceu 21%. Os pomares mais novos são os grandes responsáveis por este ganho de produtividade, em função de alguns fatores: maior densidade de plantio, rígido controle fitossanitário e uso de irrigação (cerca de 15% de toda área citrícola), sendo que este último fator também contribuiu para uma menor variação entre as safras (NEVES et al., 2007), além do uso de mudas de qualidade e novas tecnologias na condução de pomares (NEVES & LOPES, 2005).

2.2 Aspectos Gerais do Gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* e outros gêneros relacionados à subfamília *Aurantioideae*, família *Rutaceae*, são nativos da região sudeste do continente asiático (SWINGLE & REECE, 1967; SOOST & CAMERON, 1975). O número básico de cromossomos é $x = 9$, sendo a diploidia ($2n = 2x = 18$) a sua condição mais freqüente (MOREIRA & PIO, 1991).

As plantas desse gênero geralmente apresentam plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial (ARAÚJO et al., 2005).

As espécies do gênero *Citrus* geralmente reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e fecundação cruzada, e assexuadamente, por meio de apomixia nucelar (MACHADO et al., 2005).

A provável origem e distribuição de diversas espécies cultivadas tem sido investigada e reportada por diversos autores (CHAPOT, 1975; BARRETT & RHODES, 1976). Acredita-se que as tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) sejam nativas da Indochina e do Sul da China, sendo sua região inicial de distribuição o Leste da Índia (DONADIO et al., 2005).

2.3 Variedades e Híbridos de Tangerinas

A tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) pertence ao segundo grupo de citros mais plantado no Estado de São Paulo, perfazendo uma população de 7,0 milhões de plantas em 2007 (FNP, 2008). No entanto, apresenta pouca diversidade com relação ao número de variedades cultivadas no Brasil. Com destaque para os plantios de tangerina Ponkan (*C. reticulata*) e tangor Murcott (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* L. Osb) (PIO et al., 2005). Em 2001, a tangerina Ponkan representava 60% do total de plantas, seguida do tangor Murcott (20%), das mexericas (15%) e outras variedades (5%) (POMPEU JUNIOR, 2001).

Na propagação comercial dos citros, o método mais utilizado é a enxertia, por meio da borbullia para evitar problemas como variações genéticas devido às hibridações, e juvenilidade, característica observada em plantas de pé-franco (CARVALHO et al., 2005).

2.3.1 Tangor Murcott

O tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*) foi originado do cruzamento de tangerina com laranja doce, realizado por W.T. Swingle, na Flórida, onde, já em 1933, acreditava-se que poderia ter valor comercial. Foi propagado por Charles Murcott Smith e J. Ward Smith. Nos Estados Unidos é chamado de tangerina Honey (SAUNT, 1990).

Apesar de ser a segunda variedade de tangerina mais plantada no Estado de São Paulo, em maio de 2003, entre as mudas produzidas nos viveiros, 0,84% representavam essa variedade, contra 0,5% da tangerina Ponkan. Isto se deve ao fato do tangor Murcott

se prestar tanto para a indústria como para o mercado, e também por ser considerada como uma importante variedade para a exportação como fruta *in natura*. (PIO et al., 2005).

Seus frutos são de tamanho médio, massa média de 140g, cerca de 20 sementes por fruto, formato achatado, com uma pequena reentrância no seu eixo central (oposto ao lado do pedúnculo). Sua casca é de cor laranja escura e sua textura é firme; seu suco é abundante, representando cerca de 48% do peso do fruto, com teor de sólidos solúveis próximo a 12,6° Brix e 0,92% de acidez titulável (DAVIES & ALBRIGO, 1994; FIGUEIREDO, 1991).

2.3.2 Tangerina Thomas

Introduzida da África do Sul, a tangerina Thomas apresenta frutos de forma oblata, de tamanho médio e coloração laranja-avermelhada, casca lisa e aderente. Ápice e base truncados com pequeno colarinho. Massa média de 161g. Polpa de coloração laranja, com a média de 16 sementes por fruto. Suco correspondendo a 38% da massa do fruto, com teores médios de sólidos solúveis de 13,1° Brix; acidez de 1,2% e *ratio* de 10,1. Variedade promissora para exportação, tendo em vista o sabor, bastante adequado ao paladar do consumidor estrangeiro (PIO et al., 2005).

2.3.3 Tangerina Fremont

Originária de cruzamentos das tangerinas Clementina e Ponkan (*Citrus Clementina* hort. ex Tan x *Citrus reticulata* Blanco), realizado por P.C Reece, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, em Orlando, Flórida, e depois selecionado por J.R. Furr, na Califórnia, antes de ser liberado em 1964. Apresenta plantas de porte médio, com boa produtividade. Frutos de maturação precoce a meia-estação, tamanho médio, forma oblata, casca lisa e ligeiramente frouxa. Massa média de 103g, com média de 13 sementes por fruto, casca e polpa de coloração alaranjada forte; 51% de rendimento em suco; sólidos solúveis de 12,0 °Brix; acidez de 1,0% e *ratio* de 11,9 (PIO et al., 2005).

2.4 Porta-enxertos de citros

O porta-enxerto é fundamental na formação da muda cítrica, visto que ele pode interferir no desenvolvimento e vigor da copa, na precocidade de produção, na quantidade e qualidade da produção, no período de maturação dos frutos, na resistência

à pragas e doenças e na capacidade de adaptação da planta às condições edafoclimáticas desfavoráveis, preservando as características fundamentais das copas desejadas (POMPEU JUNIOR, 2005).

As sementes da maioria das variedades cítricas apresentam a característica de possuir um ou mais embriões sexuados (zigóticos), bem como um número variável de embriões nucelares formados pela diferenciação das células somáticas do nucelo. Esses embriões nucelares possuem o mesmo genoma da planta-mãe e, ao germinar, dão origem a plantas idênticas entre si e em relação à planta original. (POMPEU JUNIOR et al., 2005).

As plantas de variedades de porta-enxerto são corriqueiramente propagadas por sementes, devido à facilidade de se obter plantas nucelares a partir de sementes e porque plantas originadas de sementes geralmente apresentam melhor sistema radicular.

2.4.1 Limão Cravo

O limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) é um lemandarin, isto é, um híbrido natural de limão (*C. limon*) e tangerina (*C. reticulata*), com origem na região de Canton, sul da China (SWINGLE, 1948). Na classificação de TANAKA, (1954), o limão Cravo é considerado uma espécie (*C. limonia*), nativa da Índia (*apud* POMPEU JUNIOR, 2005, p. 62).

Supõe-se que o limão Cravo tenha sido introduzido no Brasil por colonizadores. De acordo com POMPEU JUNIOR (2005) a primeira referência ao seu uso como porta-enxerto no Brasil foi feita por ROLFS & ROLFS (1931), que encontraram em Minas Gerais plantas de laranjas enxertadas nesse porta-enxerto, plantadas em 1900.

No Estado de São Paulo, vem sendo comercialmente empregado desde 1920, porém seu uso foi ampliado a partir do ano de 1950, vindo a substituir a laranja Azeda pela suscetibilidade desta ao vírus da tristeza dos citros. As razões para o grande uso do limão Cravo como porta-enxerto são muitas, entre elas: tolerância à tristeza, resistência à seca, facilidade na obtenção das sementes, grande vigor no viveiro antes e depois da enxertia, bom pegamento das mudas por ocasião do plantio no pomar, rápido crescimento das plantas, produção precoce, altas produções de frutos de regular qualidade, compatibilidade com todas as cultivares de copa, média resistência ao frio e bom desempenho nos solos arenosos. (POMPEU JUNIOR, 2005).

A vulnerabilidade do parque cítrico brasileiro é grande, devido à utilização de apenas um porta-enxerto em grande escala. Um exemplo é a MSC, doença que afeta

plantas cítricas enxertadas sobre limão Cravo, nas regiões norte do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro (FUNDECITRUS, 2009). A MSC apresenta uma ameaça potencial para a citricultura em todo país, uma vez que afeta todas as variedades comerciais de laranja doce, tangerinas Cravo e Ponkan, enxertadas sobre limão Cravo e, até o momento, não são conhecidos variedades de limão Cravo resistentes ou tolerantes (BASSANEZI et al., 2003).

2.5 Melhoramento Genético de Citros

Relatos indicam que os primeiros programas de melhoramento de citros foram realizados no Estado da Flórida (EUA), por SWINGLE e WEBBER, a partir de 1893 (DAVIES & ALBRIGO, 1994).

O melhoramento genético tem sido utilizado de forma eficiente na busca de soluções para resolver ou minimizar problemas agrônômicos e fitossanitários dos citros. O objetivo dos programas de melhoramento é selecionar novas variedades contendo características agrônômicas desejáveis tais como: sabor e aspecto do fruto que agradem ao consumidor, alta produção, plantas com porte baixo, maior amplitude do período de colheita, tolerância e/ou resistência a pragas e doenças, dentre outras (ALMEIDA et al., 2002).

O melhoramento genético de citros via cruzamentos controlados apresenta uma série de entraves que dificultam a sua aplicação. Dentre estes podem ser citados a poliembrionia, a alta heterozigosidade, auto-incompatibilidade e o longo período de juvenildade (GROSSER & GMITTER JUNIOR, 1990), além dos altos custos e de longa duração. Por isso que novas técnicas, principalmente as biotecnológicas, devem ser utilizadas para que os avanços ocorram mais rapidamente (ALMEIDA et al., 2002).

Segundo GROSSER & GMITTER JUNIOR (1990), pelos citros formarem um grupo de espécies de multiplicação quase que exclusivamente vegetativa, a maioria das novas variedades copa utilizadas comercialmente foi originada a partir de seleção massal de *seedlings* obtidos em cruzamentos naturais ou de mutantes espontâneos selecionados em ramos, originados em variedades já existentes.

As laranjas Piralima e Baianinha de Piracicaba se constituem em bons exemplos de variedades comerciais obtidas no Brasil a partir de seleção de mutações espontâneas (MOREIRA & PIO, 1991). POMPEU JUNIOR (2001) selecionou um clone mutante de tangor Murcott que apresenta menor número de sementes por fruto (em torno de sete sementes), a partir de frutos desenvolvidos num ramo que sofreu mutação espontânea.

Essa variedade foi propagada, por meio de enxertia, e foram realizados novos ciclos de seleção. Atualmente, mais de 10.000 plantas do clone já estão sendo cultivadas comercialmente e o mutante recebeu o nome de tangor Murcott J.

Alguns híbridos de tangerinas têm mostrado bom potencial em países como Espanha, Israel, Estados Unidos, Austrália e Japão. Como exemplo podemos citar os plantios do tangor Murcott na Austrália em regiões onde as clementinas não se adaptaram bem. No Japão, o plantio de Murcott em estufas possibilitou a produção de frutos com maturação tardia (abril e maio), excelente coloração laranja-avermelhado e sem lesões (SAUNT, 1990).

Na região mediterrânea, em especial no Marrocos e na Espanha, clones mutantes de tangerinas clementinas têm sido selecionados e resultaram em novas variedades com frutos com alteração no período de maturação (SAUNT, 1990).

2.5.1 Indução de mutações em citros com uso de métodos *in vivo*

Apesar da importância das mutações espontâneas na obtenção de novas variedades de citros, a frequência de aparecimento destas mutações é baixa e pode ser aumentada pela mutagênese induzida. Por isto, esta metodologia tem sido rotineiramente utilizada em programas de melhoramento de citros em vários países (TULMANN NETO et al., 1990).

HEARN (1984) relatou a obtenção nos EUA de uma importante variedade de pomelo (*grapefruit*) chamada de Star Rubi, a partir de indução de mutações com raios nêutrons. SPIEGEL-ROY et al. (1985; 1990) obtiveram mutantes com frutos sem sementes de limão Eureka e limão Villafranca, a partir de irradiação de estacas (borbulhas). SHANCHUN et al. (1991) irradiaram sementes de uma variedade de laranja bastante cultivada na China com 100 Gy de raios-gama, e selecionaram dois clones mutantes sem sementes. Os autores observaram que as plantas apresentaram estabilidade para a característica ausência de sementes, que pode ser transmitida após multiplicação.

LATADO et al. (2001) avaliaram 127 clones mutantes de laranjeira Pêra obtidos em trabalhos anteriores a partir de borbulhas irradiadas com raios-gama. Desses, foram selecionados nove clones que apresentaram frutos sem sementes (menos de uma semente por fruto) e 15 clones com frutos contendo baixo número de sementes (entre uma e duas sementes por fruto) foram selecionados.

A indução de mutações pode ser realizada com uso de radiações ou agentes mutagênicos químicos, que são utilizados para incrementar o número de mutantes observados. As principais alterações observadas a nível de DNA são as mutações gênicas, aberrações cromossômicas ou extranucleares (TULMANN NETO et al., 1998).

O tratamento mutagênico de meristemas multicelulares (gemas, embriões, borbulhas ou ápices caulinares) em plantas, geralmente resulta na formação de setores quiméricos instáveis. Nesses casos, normalmente é necessária a realização de podas sucessivas no ramo ou na planta irradiada, com o objetivo de ampliar o setor mutado até se conseguir a sua estabilização (TULMANN NETO et al. 1998).

SPIEGEL-ROY et al. (1990) avançaram até a terceira geração de podas sucessivas para estabilizar ramos mutantes de limão sem sementes. TULMANN NETO et al. (1996), observaram quimerismo mesmo após três podas sucessivas em laranja Pêra irradiada. Neste trabalho, devido à presença de quimerismo nas plantas avaliadas, os autores tiveram que selecionar ramos mutantes, avaliando cada planta na forma de quadrantes (norte, sul, leste e oeste), o que dificultou o processo de seleção. No entanto, os resultados foram compensadores, pois clones mutantes de laranja Pêra sem sementes foram selecionados e lançados como novas variedades. Em muitos dos mutantes obtidos, verificou-se alterações de importância agronômica, sendo que dos 46 mutantes selecionados com menor número de sementes, dois foram selecionados por não apresentarem alterações significativas para características de interesse agronômico. Tudo isso afirma a necessidade e a vantagem de trabalhar com um grande número de plantas por população, permitindo a seleção dos melhores mutantes (LATADO et al., 2005).

Os resultados descritos acima demonstram a possibilidade da obtenção de plantas mutantes sem sementes em várias espécies de citros, a partir de trabalhos de mutagênese induzida *in vivo*.

Uma questão importante é a existência de variação na sensibilidade à dose de mutagênico utilizada, entre plantas de diferentes variedades ou entre plantas de diferentes espécies, assim como entre diferentes propágulos de uma mesma planta (sementes, borbulhas, ápice caulinar, explantes *in vitro*, etc...). Antes de induzir mutações em plantas, há a necessidade de realizar testes de radiosensibilidade para se determinar a dose mais apropriada, buscando sempre maximizar as chances de obter mutantes com valor econômico (TULMANN NETO et al., 1990).

Os testes de radiosensibilidade geralmente são planejados para se avaliar os efeitos fisiológicos de diferentes doses de radiação na taxa de crescimento ou na mortalidade de plantas. Como a frequência de ocorrência de efeitos fisiológicos tem alta correlação com a frequência de aparecimento de mutações, é possível escolher uma dose intermediária, isto é, aquela que possibilita a ocorrência de mutações, sem, contudo, causar elevado dano fisiológico (TULMANN et al., 1998).

DOUGLAS (1986) trabalhando com induções de mutações de álamo em cultivo *in vitro* observou que mais de 90% dos mutantes eram albinos ou apresentaram alguma deficiência de clorofila, e também alguns ramos apresentaram folhas distorcidas.

2.5.2 Indução de mutações em citros com uso de métodos *in vitro*

A cultura dos citros tem sido bastante estudada no que se refere ao desenvolvimento de protocolos visando a regeneração de brotações. Os primeiros trabalhos envolvendo cultura de tecidos em citros iniciaram-se na década de 1950. Entretanto, avanços mais significativos foram obtidos com o desenvolvimento dos meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969).

Ao longo desses anos de pesquisa foi demonstrada a possibilidade de regenerar plantas usando vários sistemas de cultivo *in vitro*, utilizando as vias de organogênese (MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002) e embriogênese somática (GLORIA et al., 2000; SILVA et al., 2008). A organogênese *in vitro* de citros já foi descrita em vários trabalhos com uso de diversos explantes, tais como: segmentos de raízes, segmentos de folhas, segmentos internodais (PEÑA et al., 1995a) e segmentos de epicótilo (MOORE et al., 1992; KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1997).

O sucesso na regeneração *in vitro* de brotações ou de embriões depende de vários fatores, como: genótipo, tipo, idade e o tamanho dos explantes, os meios de cultura, as condições de cultivo e os tipos e dosagens de reguladores vegetais exógenos utilizados, os quais se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (THORPE, 1994; MOREIRA-DIAS et al., 2001). Entre os reguladores vegetais, as citocininas promovem a divisão celular e estimulam a iniciação e o crescimento de gemas adventícias em diversas espécies e a 6-benzilaminopurina (BAP) parece ser a citocinina mais adequada para a indução de gemas adventícias (BEYL, 2000).

A suplementação do meio de cultura com citocinina, principalmente o BAP, tem sido considerada fundamental para obter as melhores respostas na organogênese *in*

in vitro, em espécies cítricas (MOREIRA-DIAS et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a, 2005b).

Muitos autores utilizaram meios de cultura MS e MT acrescidos com até 10 mg/L de BAP, visando a regeneração de plantas de citros por meio de organogênese. SIM et al. (1989) concluíram que o melhor meio para a indução da organogênese em segmentos de epicótilo de *Citrus mitis* Blanco foi a adição de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. MAGGON & SINGH (1995) consideraram que a organogênese de laranja Mousambi, usando segmentos de epicótilo e hipocótilo de plântulas *in vitro*, apresentou melhor resposta quando usaram 2,0 mg/L de BAP.

ALMEIDA (2002) desenvolveu um estudo sobre indução de organogênese a partir de segmentos de epicótilo fazendo a caracterização histológica das brotações de laranja Valência. Os explantes foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura MT suplementado com 1,0 mg/L de BAP e as amostras foram coletadas a cada cinco dias a partir do dia da introdução até o 25º dia de cultivo, quando apresentaram gemas desenvolvidas. O autor concluiu que a organogênese seu deu na forma direta e que as áreas meristemáticas na zona cambial eram as responsáveis pela formação das gemas adventícias.

A composição e concentração de fitorreguladores no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Diferenças entre as citocininas têm sido relatadas, sendo que o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, enquanto que cinetina (CIN) e isopentenil-adenina (2iP) têm permitido apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS et al., 1998).

Os efeitos dos fitorreguladores BAP, CIN e ANA, isoladamente ou em combinações, foram avaliados na multiplicação *in vitro* de brotos de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing, a partir de segmentos internodais (AL-BAHRANY, 2002). SILVA et al. (2008), trabalhando com o cultivo *in vitro* de epicótilos de laranja Azeda, observaram que o maior número de brotos foi obtido no meio de cultivo com 2 mg/L de BAP, 1 mg/L de CIN e 1 mg/L de ANA. ALMEIDA (2002), trabalhando com indução de organogênese em diversas variedades de laranja (Valência, Natal e Hamlin) e limão Cravo, a partir de segmentos de epicótilo, obteve a melhor resposta quando adicionou 1,0 mg/L de BAP ao meio.

Combinações entre BAP e ANA também foram estudadas na organogênese de limão Cravo e laranja Azeda por SCHINOR et al. (2006). Os autores constataram que a presença do BAP foi fundamental para induzir resposta morfogênética a partir de segmentos internodais e, em combinações com baixos níveis de ANA, estimulou a regeneração de gemas.

A indução e seleção de mutantes com características desejáveis, aliadas à técnica de cultivo *in vitro*, oferecem uma série de vantagens sobre os métodos convencionais, particularmente quando o objetivo é a mudança de uma ou várias características de um clone de alta produção e bem adaptado ao ambiente de cultivo. As técnicas *in vitro* proporcionam o tratamento mutagênico e a multiplicação de um grande número de genótipos selecionados num pequeno espaço físico e em ambiente livre de patógenos, com riscos mínimos de perdas de variantes ou mutantes (AHLOOWALIA & MALUSZYNSKI, 2001).

Mesmo em trabalhos de indução de mutações *in vitro*, um fato que deve ser considerado é a produção de mutantes quiméricos a partir do material irradiado. Para limitar esse quimerismo podem ser utilizados a irradiação de explantes unicelulares (protoplastos) ou de explantes que regeneram plantas a partir de uma ou poucas células. Este último é o caso da embriogênese somática de citros, originada a partir de calos embriogênicos ou da organogênese, com a obtenção de brotações adventícias originadas diretamente de segmentos internodais ou de segmentos de epicótilo (ALMEIDA et al., 2002).

A indução *in vitro* de brotações adventícias em citros, a partir de segmentos internodais jovens ou maduros e de segmentos de epicótilo é uma técnica bastante difundida, pela capacidade de produzir plantas não-quiméricas, num curto intervalo de tempo. A comprovação de que as brotações adventícias regeneradas a partir de segmentos de epicótilos ou segmentos internodais de citros, apresentam origem unicelular ou a partir de poucas células, foi obtida em experimentos de produção de plantas geneticamente transformadas (transgênicas), regeneradas a partir de explantes co-cultivados em meio contendo *Agrobacterium sp.* (MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995b, 1996 e 1997; KANEYOSHI et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1996).

LATADO et al. (1993), trabalhando com mutagênese *in vitro* em crisântemo, obtiveram somente plantas mutantes com coloração única, após o tratamento mutagênico de pedicelos florais imaturos, seguido da organogênese direta. A justificativa para o fato foi a de que as gemas adventícias *in vitro* de crisântemo teriam

sido originadas a partir de apenas uma célula mutada, presente na camada mais externa da epiderme dos pedicelos florais.

Segundo BROERTJES & VAN HARTEN (1988), o gênero *Citrus* pode ser considerado como um exemplo instrutivo para a observação de diferenças da radiosensibilidade entre diversos explantes. Como exemplos, podem ser citados os trabalhos de SPIEGEL-ROY & PADOVA (1973) que determinaram a LD 50 (dose letal para 50% dos explantes) de sementes de laranja Shamouti como próxima de 100 Gy. Para estacas e borbulhas, os mesmos autores consideram que as doses entre 40-80 Gy seriam as mais recomendadas.

Já para experimentos *in vitro*, que segundo SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1973) apresentam tecidos bem menos sensíveis, a melhor dose para *Citrus* parece ser em torno de 200 Gy, mas com ressalva para os epicótilos, que foram considerados como bastante sensíveis, tendo a dose ótima sido situada entre 20 e 40 Gy.

A realização de trabalhos de indução de mutações envolvendo o uso de segmentos internodais ou de epicótilo como explantes a serem irradiados, devem ser iniciados com a realização de experimentos preliminares para a determinação da radiosensibilidade dos diferentes propágulos e dos genótipos a serem utilizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As estacas, borbulhas e sementes de limão Cravo, tangor Murcott IAC 221, tangerinas Thomas IAC 519 e Fremont IAC 543, utilizadas no presente estudo, foram obtidas de plantas mantidas na borbulheira e no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC, Cordeirópolis, SP.

3.2 Métodos

Na primeira etapa do trabalho foram realizados testes de avaliação da radiosensibilidade de propágulos *in vivo* e *in vitro* (borbulhas e segmentos internodais, respectivamente), visando a determinação de dose apropriada de mutagênico (raios-gama) a ser utilizada nas fases posteriores do programa de melhoramento de tangerinas por indução de mutações.

Na fase seguinte, um maior número de propágulos foi tratado com mutagênico visando obter duas populações de plantas irradiadas para cada variedade, com origens

distintas, com uso do método de irradiação *in vivo* e método *in vitro*. A exceção ocorreu para a variedade de limão Cravo, em que foi obtida apenas uma população de plantas irradiadas pelo método *in vitro* (irradiação de segmentos de epicótilo e regeneração de plantas).

3.2.1 Indução de mutações pelo método *in vivo* de tangor e tangerinas

3.2.1.1 Teste de radiosensibilidade de borbulhas

Ramos contendo borbulhas das variedades tangor Murcott, tangerinas Thomas e Fremont foram obtidas de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação (borbulheiras), sendo irradiadas com doses de 10, 20, 30, 40 e 50 Gy de raios-gama, na fonte de Cobalto 60 do CENA/USP (Piracicaba, SP). A taxa de dose utilizada foi de aproximadamente 800 Gy/h. Borbulhas não irradiadas foram usadas como controle experimental.

Após a irradiação, as borbulhas foram enxertadas sobre plantas de limão Cravo, sendo utilizadas 40 borbulhas por variedade e por dose, num delineamento inteiramente casualizado.

Após 60 dias da enxertia foram feitas avaliações dos seguintes parâmetros: porcentagem de borbulhas desenvolvidas e a altura das brotações desenvolvidas (M1V1).

A análise estatística dos dados obtidos como o parâmetro altura das brotações desenvolvidas foi feito para cada variedade separadamente com uso do teste F, seguido do teste de Tukey a 5%, este último usado para a comparação das médias dos tratamentos. A seguir, realizou-se a análise de regressão linear dos dados médios obtidos em cada dose de mutagênico para cada variedade e a análise de paralelismo e coincidência de retas obtidas nos experimentos com as três variedades estudadas.

A análise estatística de coincidência de retas objetiva avaliar se o efeito da radiação sobre as borbulhas foi distinto entre as diversas variedades. Caso o teste F seja significativo para coincidência de duas retas, demonstra-se que as retas não são iguais e, portanto, não apresentam mesma inclinação e nem o mesmo ponto de interseção com o eixo. Já o teste de paralelismo de retas, compara a inclinação das retas de duas variedades com uso do teste t, sendo consideradas como retas paralelas àquelas que possuírem a mesma inclinação de reta (teste t não significativo para paralelismo das retas) (DIXON & MASSEY JR, 1969). Neste caso, demonstra-se que a radiação causa uma mesma taxa de redução (ou de incremento) da altura de brotações desenvolvidas.

3.2.1.2 Irradiação de estacas com dose selecionada e obtenção de plantas para a seleção de mutantes

A dose de mutagênico escolhida para a irradiação de um grande número de borbulhas de cada variedade foi a mais próxima da GR 30 (dose que causa redução de 30% no comprimento das brotações M1V1 em comparação ao controle). As doses selecionadas foram de 18,2 Gy de raios-gama para tangerina Thomas, 13,7 Gy para a Fremont e 16,2 Gy para o tangor Murcott.

Sendo assim, 200 estacas de cada uma das três variedades foram irradiadas com as respectivas doses de mutagênico. As borbulhas foram retiradas e enxertadas em limão Cravo resultando em aproximadamente 2.000 plantas de cada variedade. Os procedimentos para a irradiação e a taxa de dose foram os mesmos utilizados no experimento anterior.

Após a avaliação final do experimento, as plantas foram conduzidas com haste única por meio de podas sucessivas, deixando desenvolver somente os ramos M1V4 (mínimo de três podas). Isto foi feito para possibilitar a observação de setores mutantes maiores nas plantas irradiadas ou, em alguns casos, setores mutantes completos (mutantes periclinais), já estáveis (DONINI & MICKE, 1984).

3.2.2 Indução de mutações em citros pelo método *in vitro*

Neste estudo utilizou-se a metodologia de irradiação de explantes *in vitro* (segmentos de epicótilo) com raios-gama, seguido de regeneração de brotações (gemas adventícias), microenxertias *in vitro* das brotações e aclimatização das plantas.

3.2.2.1 Estabelecimento de protocolos para obtenção de gemas adventícias, usando segmentos de epicótilo

Diversos níveis do regulador de crescimento BAP em meio de cultura *in vitro* foram testados para estabelecer um protocolo otimizado de regeneração de brotações através de gemas adventícias das tangerinas Fremont e Thomas, do tangor Murcott e de limão Cravo, usando segmentos de epicótilo.

Os segmentos de epicótilo foram obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro*. As sementes de cada variedade foram extraídas dos frutos, tratadas com fungicida e armazenadas em câmara fria. Para serem inoculadas foram lavadas com água e sabão,

para retirar o excesso de fungicida e o tegumento externo da semente (testa) foi retirado para facilitar a germinação e reduzir a contaminação.

A desinfestação superficial das sementes foi realizada com uma solução aquosa com 15% de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária a 15%), por cerca de 10 minutos, seguido de três lavagens com água destilada autoclavada. Posteriormente as sementes foram inoculadas em tubos contendo meio de cultura MS semi-sólido composto pela metade da concentração de sais, sem sacarose, sem vitaminas e solidificados com ágar (0,7%).

Os tubos foram mantidos no escuro a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 30 dias, até a germinação das sementes e obtenção de plântulas estioladas com tamanho médio de 10 cm de comprimento.

Foram utilizados como explantes, epicótilos com cerca de 0,5 cm de comprimento, provenientes das plântulas germinadas *in vitro*. Estes segmentos de epicótilo foram inoculados em placas de Petri. Para cada variedade foi testado um meio de cultura semi-sólido (0,7% ágar) composto por sais e vitaminas de MT, 50 g/L de sacarose, 0,5 g/L de extrato de malte, e diferentes níveis de regulador de crescimento, 0,5; 1; 2 e 3 mg/L de BAP.

Para cada tratamento (meio de cultura) foram inoculados cerca de 50 explantes de cada variedade, perfazendo um total de 200 explantes de cada variedade. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

As placas foram mantidas durante duas semanas no escuro, a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e a seguir, transferidas para ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz ($49 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa) e a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, até regenerar as brotações.

A avaliação foi realizada aos 60 dias de cultivo com a contagem do número de brotações regeneradas por explante, sendo que aos 30 dias de cultivo os explantes foram subcultivados para meio fresco.

Após a avaliação, foram calculadas as médias de brotações obtidas por explante, seguido da análise estatística dos dados com uso dos testes F e de Tukey para a comparação das médias dos tratamentos.

3.2.2.2 Estabelecimento de protocolos para obtenção de gemas adventícias, usando segmentos internodais de tecido adulto

Neste experimento o objetivo foi testar diversos níveis de reguladores de crescimento em meio de cultura *in vitro* para estabelecer um protocolo otimizado de

regeneração de brotações por meio de gemas adventícias do tangor Murcott, das duas variedades de tangerina e de limão Cravo, usando segmentos internodais de tecido adulto.

Para cada variedade foi testado o meio de cultura semi-sólido composto por sais e vitaminas de MT, 50 g/L de sacarose, 0,5 g/L de extrato de malte, variando somente o nível dos reguladores de crescimento. Foram instalados dois experimentos distintos.

No primeiro experimento foram testados os níveis de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L de BAP e no segundo, tratamentos em fatorial, contendo os níveis de 3,0 e 4,5 mg/L de BAP e 0,0 e 0,3 mg/L de cinetina.

Foram utilizados segmentos internodais coletados de plantas mantidas em casa de vegetação. Os explantes foram retirados de brotações novas das plantas de cada variedade e lavados com sabão e água corrente. Em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar), os segmentos internodais foram imersos em solução de etanol a 70% (v/v) e Tween 20 a 0,1% (agente surfactante) por 1 minuto, depois foram desinfestados, também por imersão, em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5% diluída em água destilada (1:1) por 10 minutos e em seguida lavados três vezes com água destilada autoclavada. Após as lavagens, os segmentos foram cortados com cerca de 1,0 cm de comprimento e inoculados em placas de Petri com meio de cultura semi-sólido composto por sais e vitaminas de MT (como descrito no experimento anterior).

Em cada meio de cultura foram inoculados cerca de 50 explantes de cada variedade. O delineamento experimental foi em fatorial.

As placas foram mantidas durante duas semanas no escuro, a 25 ± 1 °C e a seguir, transferidas para ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz ($49 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa) e a 25 ± 1 °C.

A avaliação foi realizada aos 60 dias de cultivo com a contagem do número de brotações regeneradas por explante, sendo que aos 30 dias os explantes foram subcultivados para meio fresco.

3.2.2.3 Teste de radiosensibilidade de segmentos de epicótilo

Os testes de radiosensibilidade de segmentos de epicótilo foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes doses de raios-gama, no número de brotações regeneradas em cada explante, após 60 dias de tratamento mutagênico e cultivo *in vitro*.

As irradiações foram realizadas na Fonte *GammaCell* do CENA/USP, com doses de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 Gy de radiação gama e com taxa de dose média de 800 Gy/h.

Os explantes, obtidos das plântulas germinadas *in vitro*, foram seccionados com cerca de 0,5cm de comprimento. Foram inoculados cerca de 40 epicótilos por placa, por dose de radiação, com delineamento experimental inteiramente casualizado. No total foram utilizados cerca de 240 explantes por variedade.

Após irradiar os explantes, os mesmos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura semi-sólido novo, para evitar o efeito deletério da radiação sobre o meio de cultivo, composto por sais e vitaminas de MT, 50 g/L de sacarose, 0,5 g/L de extrato de malte e suplementado com 2,0 mg/L de BAP, definido no experimento anterior, visando a regeneração de plantas via organogênese.

As placas foram mantidas durante duas semanas no escuro, a 25 ± 1 °C e a seguir, transferidas para ambiente com fotoperíodo de 16 horas de luz ($49 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa) e a 25 ± 1 °C, até regenerar as brotações.

O efeito das diversas doses de mutagênico nos explantes foi avaliado aos 60 dias de cultivo por meio da avaliação do número de brotações regeneradas por explante inoculado e a porcentagem de explantes responsivos, ou seja, que regeneraram pelo menos uma brotação. O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados do parâmetro número de brotos por explante inoculado foram transformados por raiz de $x + 0,5$, antes da realização das análises estatísticas.

Para a análise estatística dos dados foi feito o teste F, seguido de comparação das médias pelo teste de Tukey a 5%. A dose escolhida para a continuação do trabalho foi a mais próxima da GR 30 (dose que causou a redução de 30% no número de brotações regeneradas por explante inoculado).

A seguir, realizou-se análise de regressão linear dos dados médios obtidos em cada dose de mutagênico, para cada variedade e a análise de paralelismo e coincidência de retas, com dados das quatro variedades estudadas, como descrito anteriormente no item 3.2.1.1. O objetivo desta última análise é verificar os efeitos da radiação sobre a taxa de regeneração de brotações a partir de segmentos de epicótilo das diversas variedades.

Cada brotação desenvolvida foi microenxertada em plântulas de citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*) ou citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) cultivadas *in vitro*, pelo seguinte método: as plantas foram obtidas por

meio de germinação de sementes *in vitro* semelhante ao método descrito para a obtenção dos segmentos de epicótilo, e após aproximadamente 30 dias de cultivo, cada plântula foi decapitada e realizando-se um corte em forma de “T” invertido. Para cada planta de porta-enxerto, uma brotação irradiada foi destacada do epicótilo e colocada no corte.

A fase final para aclimatização foi realizada com a enxertia da brotação após sessenta dias de cultivo *in vitro*, em plantas de limão Cravo cultivadas *in vivo*. As plantas enxertadas foram mantidas em estufa e os enxertos foram cobertos com saco plástico por uma semana para manutenção da umidade relativa dentro do ambiente, seguido da remoção parcial e depois total do saco plástico, resultando em redução gradual da umidade relativa do ar até igualar com a umidade relativa ambiental.

A aclimatização foi completada com o transplante das plantas para vasos contendo mistura de solo e substrato comercial, na proporção de 1:1, e transferência para casa de vegetação.

Após o período de 3 a 6 meses de crescimento em vasos, as plantas foram levadas para o telado (sombrite 50%), seguido de transferência para local a céu aberto, para completar a aclimatização. Posteriormente ocorrerá o transplante das mudas para o campo experimental.

3.2.2.4 Irradiação de explantes com a dose selecionada e obtenção de plantas para a seleção de mutantes

Os procedimentos para a irradiação de epicótilos, taxa de dose e aclimatização das brotações tiveram procedimentos semelhantes aos descritos no item 3.2.2.2, mas acrescido de irradiação dos segmentos de epicótilos com a dose única determinada para cada variedade, determinada no teste de radiosensibilidade (GR 30).

Após a irradiação dos segmentos de epicótilo foram realizadas avaliações do efeito das doses de raios-gama utilizadas em cada variedade, no número de brotações regeneradas em cada explante, após 60 dias de tratamento mutagênico e cultivo *in vitro*.

As brotações desenvolvidas foram microenxertadas em plântulas de citrumelo Swingle ou citrange Carrizo cultivadas *in vitro*, como descrito no experimento anterior.

3.2.3 Análise comparativa da radiosensibilidade de propágulos *in vivo* (borbulhas) e *in vitro* (segmentos de epicótilo)

O objetivo desta análise foi comparar os efeitos das diversas doses de radiação

gama em propágulos *in vivo* (borbulhas) e *in vitro* (segmentos de epicótilo).

Para isto, foram utilizados os dados das regressões lineares obtidos em cada dose de mutagênico, variedade e tipo de propágulo e comparados estes dados de uma mesma variedade utilizando-se a análise estatística de paralelismo e coincidência de retas.

Neste caso, as análises estatísticas de coincidência e de paralelismo de retas têm como objetivos avaliar se, numa mesma variedade, os efeitos da radiação foram distintos nos dois tipos de propágulos (borbulhas e segmentos de epicótilo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de mutações pelo método *in vivo* de tangor e tangerinas

4.1.1 Teste de radiosensibilidade de borbulhas

Após a irradiação de estacas de tangor Murcott, tangerinas Thomas e Fremont com diversas doses de mutagênico, foram extraídas as borbulhas e realizadas as enxertias em plantas de limão Cravo, com a avaliação da porcentagem de pegamento e altura das brotações aos 60 dias (Figura 1a). Em algumas mudas foram observados efeitos fisiológicos comuns devido à exposição à radiação gama, como as primeiras folhas deformadas (Figura 1b). Na tabela 1 estão dispostos os dados de altura média das brotações e porcentagem de desenvolvimento nesta avaliação.

Pelos resultados dos testes F e de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 1) as diversas doses de radiação causaram reduções altamente significativas na altura das brotações das três variedades avaliadas. O parâmetro porcentagem de desenvolvimento apresentou redução mais acentuada no tangor Murcott em função do aumento da dose de mutagênico. Observou-se alta correlação entre a redução na porcentagem de pegamento em função do aumento das doses de mutagênico (0,93). Nas variedades Fremont e Thomas os valores de correlação obtidos foram de 0,57 e 0,65.

Tabela 1. Altura média das brotações (cm) e porcentagem de desenvolvimento de borbulhas. Avaliação feita 60 dias após a irradiação de estacas com diversas doses de mutagênico.

Doses (Gy)	Fremont (cm)	Thomas (cm)	Murcott (cm)
0	14,85 a (98%)	17,60 a (93%)	13,59 ab (69%)
10	13,27 a (88%)	15,94 a (98%)	15,91 a (55%)
20	15,59 a (100%)	12,50 b (93%)	10,74 b (64%)
30	14,57 a (95%)	11,21 b (98%)	5,66 c (45%)
40	13,16 a (98%)	8,18 b (93%)	1,78 c (21%)
50	4,85 b (62%)	3,17 c (50%)	3,00 c (5%)
Teste F	11,12 **	35,37 **	12,89 **
CV (%)	47,99	39,63	53,79

Alturas médias seguidas da mesma letra na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey <0,05).

() dados em porcentagem de pegamento de borbulhas.



Figura 1 – **a)** Plantas originadas de borbulhas de tangerina Fremont do controle e irradiadas com diversas doses de mutagênico do teste de radiosensibilidade *in vivo*. **b)** Efeito fisiológico da radiação gama sobre as primeiras folhas. **c)** Plantas obtidas de borbulhas irradiadas com dose única mantidas em estufa. **d)** Plantas obtidas do teste *in vivo* de radiosensibilidade no campo experimental.

Nas análises de regressão linear dos dados de altura de brotações, observou-se nas três variedades uma tendência a redução gradual da altura das brotações, em função do aumento das doses de mutagênico (Figura 2).

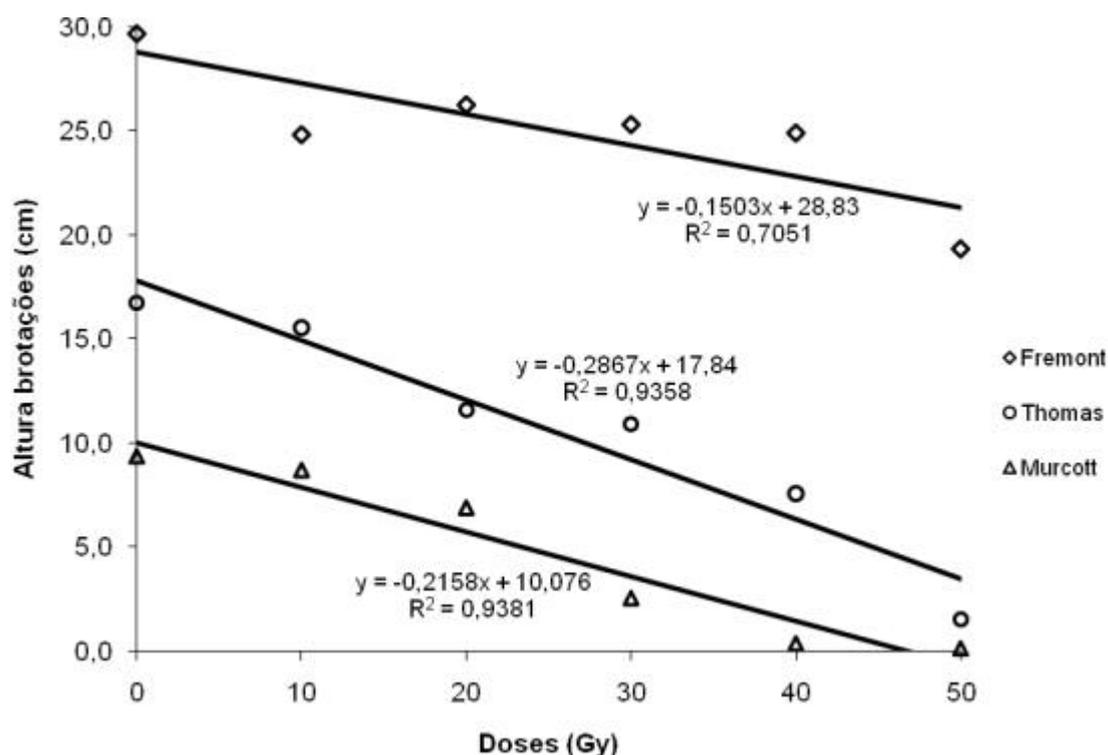


Figura 2. Dados de altura média das brotações desenvolvidas de borbulhas irradiadas com diversas doses de mutagênico, e regressão linear dos dados das três variedades de tangerinas.

Como as equações de retas obtidas para cada variedade (Figura 2) foi possível selecionar a dose GR 30 e GR 50 (doses que causaram a redução de 30% e 50% na altura das brotações, respectivamente). Para a variedade Thomas, as doses de mutagênico determinadas como GR 30 e GR 50 foram de 18,7 e 31,1 Gy de raios-gama. Para a variedade Fremont, as doses foram de 29,9 e 49,9 Gy e para a variedade Murcott, doses 14,0 e 23,3 Gy de raios-gama, respectivamente.

De acordo com os testes de paralelismo e coincidência de retas dos dados de regressão linear da altura de brotações (Tabela 2) pôde-se observar que as duas variedades de tangerina (Thomas e Fremont) apresentaram retas paralelas e coincidentes (testes t e F não significativos) demonstrando que apresentam mesmo ponto de interseção com o eixo “Y” e mesma inclinação, ou seja, mesma sensibilidade às diversas doses de radiação.

No entanto, a análise de paralelismo e coincidência de retas determinou que a reta do tangor Murcott não era coincidente (teste F significativo indica não coincidência), mas paralela em relação às das duas tangerinas. Isto indica que apesar das três variedades apresentarem a mesma taxa relativa de redução de altura de brotações

em função das doses crescentes de mutagênico, o tangor Murcott apresentou sempre menor altura de brotações, mostrando um desenvolvimento mais lento das brotações nessa variedade, mesmo no controle.

Tabela 2 Resultado do teste F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas das equações de regressões lineares, considerando altura média das brotações desenvolvidas de borbulhas irradiadas com diversas doses de mutagênico.

	Thomas x Murcott	Thomas x Fremont	Murcott x Fremont
Teste F	29,38 **	1,08 ns	9,78 **
Teste t	-1,52 ns	-1,27 ns	-0,58 ns

Ao fim do experimento, as plantas foram conduzidas com haste única, por meio de podas sucessivas, deixando desenvolver somente os ramos M1V4 (mínimo de três podas) ou M1V5, para possibilitar a observação de setores mutantes maiores nas plantas irradiadas ou, em alguns casos, setores mutados completos (mutantes periclinais) já estáveis.

As plantas obtidas do experimento inicial de radiosensibilidade (aproximadamente 200 de cada variedade) foram plantadas no campo experimental do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC em dezembro de 2008, com espaçamento adensado (6 x 1m), para avaliação futura em busca de mutantes de interesse (Figura 1d).

4.1.2 Irradiação de estacas com dose selecionada e obtenção do pomar para a seleção de mutantes

Com base nos resultados obtidos no experimento de radiosensibilidade foram irradiadas 2.000 borbulhas de cada uma das variedades, sendo 1.000 delas tratadas com a dose semelhante ao GR 30 estimado e as outras 1.000 borbulhas tratadas com raios-gama na dosagem do GR 50 estimado. Os procedimentos para a irradiação e a taxa de dose foram os mesmos utilizados no experimento anterior. Para a variedade Thomas, as doses de mutagênico utilizadas foram de 18,7 e 31,1 Gy de raios-gama (GR 30 e GR 50). Para a variedade Fremont, as doses foram de 29,9 e 49,9 Gy e para a variedade Murcott, doses 14,0 e 23,3 Gy de raios-gama, respectivamente.

As borbulhas irradiadas foram enxertadas em plantas de limão Cravo, sendo as plantas mantidas em estufas (Figura 1c), até o desenvolvimento necessário para iniciar as podas sucessivas (deixando desenvolver somente os ramos M1V4 ou M1V5). Para

cada variedade estão sendo produzidas 50 plantas obtidas de borbulhas não-irradiadas, que serão utilizadas como controle experimental.

As 2.000 plantas irradiadas de cada variedade mais as plantas controle são mantidas em casa de vegetação e serão plantadas no campo experimental na sequência do trabalho. As plantas provenientes do teste de radiosensibilidade *in vivo* já foram plantadas no campo experimental, e quando iniciarem a fase reprodutiva serão avaliadas na busca por mutantes de interesse.

4.2 Indução de Mutações em Citros pelo Método *in vitro*

4.2.1 Estabelecimento de protocolos para obtenção de gemas adventícias, usando segmentos internodais e segmentos de epicótilo

4.2.1.1 Segmentos internodais

No primeiro experimento em que utilizou-se apenas o BAP como regulador de crescimento nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L, não houve resposta organogênica e quase a totalidade dos explantes oxidaram em menos de 30 dias.

No segundo experimento, onde além do BAP, foram adicionados ao meio de cultivo, a citocinina cinetina, em diferentes concentrações (3,0 e 4,5 mg/L de BAP e 0 e 0,3 mg/L de cinetina). Não houve qualquer regeneração de brotações, apenas uma ligeira formação de calos na superfície seccionada dos explantes.

Este resultado foi divergente aos já relatados por alguns autores, que obtiveram sucesso na regeneração de tecido adulto de outras variedades. TAVANO (2008) obteve sucesso na organogênese *in vitro* a partir de segmentos internodais de limão Volkameriano (*Citrus volkameriana*) e laranja Azeda (*Citrus aurantium*) em meio de cultivo suplementado com 1,0 mg/L de BAP, com 21% e 48% de explantes responsivos, respectivamente.

SCHINOR (2006) obteve sucesso na regeneração de segmentos internodais de limão Cravo e laranja Azeda em meio de cultivo suplementado com 2,0 mg/L de BAP, sendo que o limão Cravo apresentou 82% de explantes responsivos e a laranja Azeda (49%).

KOBAYASHI et al. (2003) relatam que com a utilização de tecido adulto, como segmentos internodais, é possível obter plantas a partir da organogênese *in vitro* que apresentem características de plantas adultas e floresçam rapidamente após o seu desenvolvimento.

Os resultados mostraram a não brotação de gemas adventícias *in vitro* a partir de segmentos internodais das três variedades utilizando-se os meios de cultura propostos. As diferenças existentes entre os experimentos com segmentos internodais podem estar relacionadas a diversos fatores como o genótipo, tamanho dos explantes, condições de cultivo, idade e tipo do material, e também às dosagens e tipos de reguladores vegetais testados.

4.2.1.2 Segmentos de epicótilo

No primeiro foram testados os níveis de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de BAP e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Foi possível observar o maior número de brotações regeneradas em todas as variedades aponta para a utilização de 2,0 mg/L de BAP.

Tabela 3. Número médio de brotações regeneradas *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo cultivados em diferentes concentrações de BAP.

Concentração de BAP	Número brotos por epicótilo cultivado		
	Tangerina Thomas	Tangerina Fremont	Tangor Murcott
0,5 mg/L	0,37	0,06	0,38
1,0 mg/L	0,52	0,12	0,49
2,0 mg/L	0,80	0,13	0,49

No segundo, foram testados os níveis de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg/L de BAP, com a inoculação de 50 segmentos de epicótilo de cada tratamento e variedade (Tabela 4).

Para a tangerina Fremont, os melhores níveis de BAP utilizados foram os de 1,0 e 3,0 mg/L, com as médias de brotação regenerada por explante situando-se entre 0,23 e 0,6 e porcentagens médias de epicótilos responsivos entre 6,2 e 14,6%, respectivamente.

Para a tangerina Thomas, os níveis de 1; 2 e 3,0 mg/L de BAP foram os melhores com médias variando entre 0,42 e 0,74 brotação por explante, mas semelhantes estatisticamente entre si. As maiores porcentagens de epicótilos responsivos também foram observados nestes níveis (32 a 46%) (Tabela 4).

Tabela 4. Número médio de brotações regeneradas *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo cultivados em diferentes concentrações de BAP e porcentagem de explantes responsivos.

Concentração BAP (mg/L)	Brotos por epicótilo cultivado		
	Tangerina Fremont	Tangerina Thomas	Tangor Murcott
0	0,04 b (3,9%)	0,25 b (25,0%)	0,60 a (50,0%)
0,5	0,04 b (4,0%)	0,23 b (15,4%)	0,40 ab (26,9%)
1,0	0,06 ab (6,2%)	0,42 ab (32,0%)	0,32 ab (26,0%)
2,0	0,02 b (2,1%)	0,66 ab (32,0%)	0,44 ab (22,0%)
3,0	0,23 a (14,6%)	0,74 a (46,0%)	0,22 b (12,0%)
Teste F	3,18 *	4,00 **	2,57 *
CV (%)	20,1	37,5	35,8

Médias seguidas da mesma letra na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey <0,05).

() dados em porcentagem de segmentos de epicótilo responsivos.

Os segmentos de epicótilo do tangor Murcott apresentaram as menores taxas de regeneração com o uso de 3,0 mg/L de BAP, sendo os demais níveis semelhantes estatisticamente (Tabela 4).

Os resultados podem ser explicados se considerarmos que a adição de citocininas em concentrações elevadas no meio de cultivo pode resultar em efeito inibitório, dependendo do cultivar e tipo de explante utilizado. SCHINOR (2006), trabalhando com organogênese de laranja Azeda a partir de segmentos internodais, testou doses crescentes de BAP até 4,0 mg/L, e observou uma redução drástica na regeneração de gemas adventícias e a oxidação de alguns explantes. O autor observou resultados semelhantes em limão Cravo que apresentou maior regeneração de brotações durante o uso de doses intermediárias de BAP, sendo que nos níveis mais extremos (0,0 e 4,0 mg/L) foram observadas as menores taxas de brotações regeneradas.

MOURA et al. (2001) trabalhando com segmentos de epicótilo de laranja Pêra determinaram que o melhor nível de BAP foi de 2,0 mg/L. ALMEIDA et al. (2002) também não encontraram diferenças significativas entre as laranjas Natal, Valência e Hamlin e limão Cravo, na organogênese somática de segmentos de epicótilo entre os níveis de 1,0 e 2,0 mg/L de BAP. SILVA et al. (2005a e 2008) trabalhando com segmentos de epicótilo de tangerina Cleópatra e de laranja Azeda concluíram que o cultivo inicial dos explantes no escuro por 30 dias utilizando-se 2,0 mg/L de BAP induziu a máxima proliferação de gemas adventícias *in vitro* e as maiores médias de explantes responsivos.

4.2.2 Teste de radiosensibilidade de segmentos de epicótilo

Os resultados obtidos com o número de brotações regeneradas por explante e no número de epicótilos responsivos estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Número médio de brotações regeneradas *in vitro* e porcentagem de explantes responsivos, obtidos a partir de segmentos de epicótilo tratados com doses crescentes de mutagênico.

Doses (Gy)	Fremont	Thomas	Murcott	Limão Cravo
0	0,24 (10,6%)	0,40 a (22,2%)	0,60 a (33,3%)	0,89 a (52,9%)
10	0,11 (8,6%)	0,26 a (15,2%)	0,45 ab (27,3%)	1,16 a (63,3%)
20	0,03 (3,0%)	0,11 a (8,5%)	0,42 ab (15,2%)	1,14 a (53,5%)
30	0,06 (6,1%)	0,28 a (15,2%)	0,15 ab (5,9%)	0,56 b (21,8%)
40	0,00 (0,0%)	0,13 a (6,4%)	0,23 ab (12,9%)	0,48 b (17,0%)
50	0,03 (3,0%)	0,04 a (2,2%)	0,03 b (3,0%)	0,23 b (8,6%)
Teste F	1,60 ns	2,27 *	2,68 *	17,34 **
CV (%)	22,55	32,94	38,12	42,81

Médias seguidas da mesma letra na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey <0,05).

() dados em porcentagem de segmentos de epicótilo responsivos.

Observou-se que as diversas doses de radiação causaram efeitos diversos dependendo da variedade avaliada. O tangor Murcott e o limão Cravo apresentaram um desempenho esperado, com a observação de reduções significativas no número de brotações regeneradas por explante em função do aumento da dose de mutagênico e na porcentagem de epicótilos responsivos (Figura 4a).

As duas variedades de tangerina estudadas (Fremont e Thomas) não apresentaram este padrão, mesmo nas doses mais elevadas de mutagênico (50 Gy de raios-gama). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as doses de mutagênico para o parâmetro número médio de brotações regeneradas por explante. Com as análises de correlação pode-se observar alta correlação entre a redução na porcentagem de epicótilos responsivos em função do aumento das doses de mutagênico (maior que 0,8 para as quatro variedades).

Trabalhos envolvendo avaliação de radiosensibilidade de espécies distintas encontram diferentes DL 50, ou seja, diferentes níveis de resistência quanto à taxa de dose e variações de acordo com a idade do material irradiado.

ACHUTEGUI-BETELU & SCHIMIDT (1985) trabalhando com duas espécies selvagens de tuberosas, *Ullucus tuberosus* e *Oxalis tuberosa*, determinaram as DL 50 para irradiação aguda (alta taxa de dose) como sendo 60 Gy e 80 Gy, respectivamente, para tubérculos jovens e 100 Gy para tubérculos mais velhos. Utilizando baixas taxas de

dose, as DL 50 foram 120 Gy e 80 Gy, respectivamente. Os autores avaliaram também, sob as mesmas condições, a radiosensibilidade de uma variedade comercial de *Solanum tuberosum* e definiram que a DL 50 foi sempre menor nela, do que em espécies selvagens, o que sugere que as grandes diferenças existentes na radiosensibilidade entre materiais podem ser devido aos genótipos.

Os dados obtidos com as análises de regressão dos dados estão plotados na Figura 3, bem como as respectivas equações de reta.

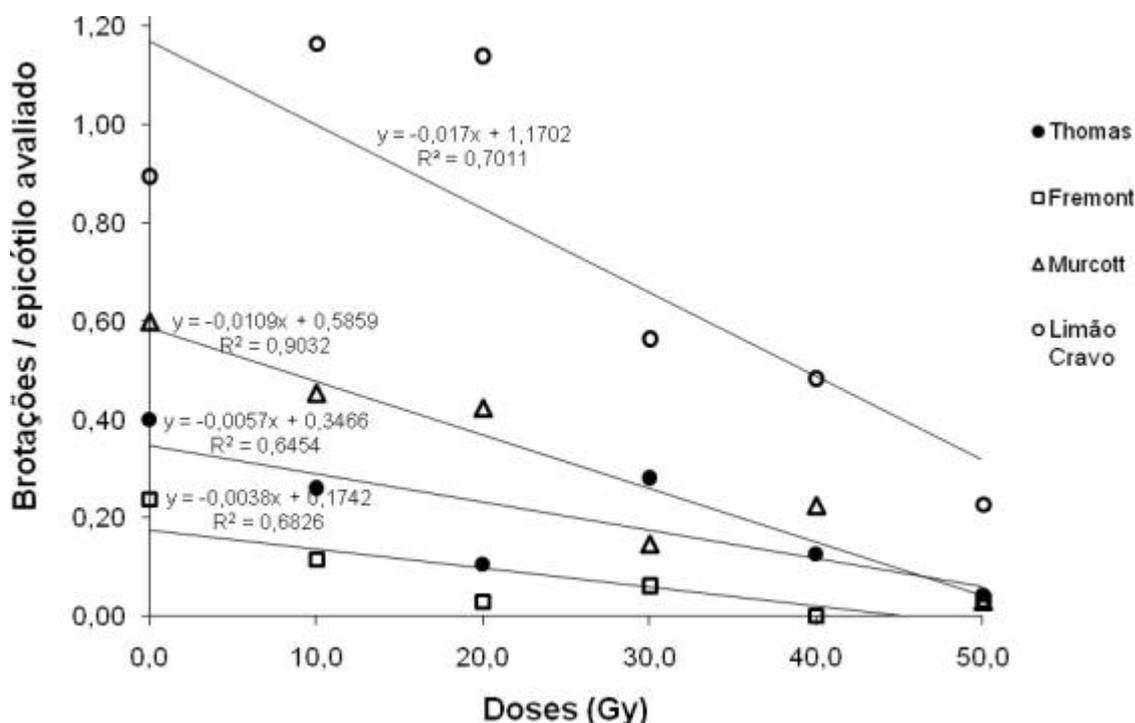


Figura 3. Número médio de brotações regeneradas por segmento de epicótilo, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama e regressão linear dos dados, de quatro variedades de citros.

Utilizando as respectivas equações de regressões lineares foi possível calcular para cada variedade as doses de mutagênico que correspondem ao GR 30 ou GR 50, que seriam respectivamente as doses de 18,2 e 30,4 Gy para a variedade Thomas, 13,7 e 22,9 Gy para a variedade Fremont, 16,1 e 26,8 Gy para o tangor Murcott e, 20,7 e 34,4 Gy para o Limão Cravo.

Os testes de coincidência entre retas indicaram que as quatro variedades apresentaram equações de reta não coincidentes (teste F significativo para coincidência de retas), demonstrando que não apresentam mesma inclinação e nem o mesmo ponto de intersecção com o eixo “Y” (Tabela 6).

Os testes de paralelismo entre retas indicaram que, a exceção da tangerina Fremont e tangor Murcott, as outras apresentam equações de reta paralelas entre si (teste t não significativo para paralelismo de retas) demonstrando que têm a mesma inclinação, isto é, mesma taxa relativa de redução no número de brotações em função do aumento das doses de mutagênico (Tabela 6).

A tangerina Fremont e o tangor Murcott apresentaram equações de retas não coincidentes e não paralelas (Tabela 6), demonstrando que não possuem um mesmo padrão de resposta em função do aumento das doses de mutagênico, sendo que o tangor Murcott apresenta maior sensibilidade ao mutagênico, pois a sua equação de reta possui maior inclinação (Figura 3).

Tabela 6 Resultado do teste F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas das equações de regressões lineares, considerando número de brotações regeneradas por segmento de epicótilo, após a irradiação com diversas doses de mutagênico.

Material <i>in vitro</i>	Tangerina Thomas	Tangor Murcott	Limão Cravo
Tangerina Fremont	F = 4,71 * t = 0,78 ns	F = 24,27 ** t = 3,14 *	F = 25,61 ** t = 2,28 ns
Tangerina Thomas		F = 4,47 * t = 1,84 ns	F = 15,83 ** t = 1,87 ns
Tangor Murcott			F = 9,78 ** t = 1,04 ns

De acordo com o teste t para paralelismo entre retas, o limão Cravo apresentou reta paralela em relação às outras variedades analisadas, porém se destacou por sempre apresentar maior taxa de regeneração de brotações *in vitro*, inclusive no controle (explantos não irradiados).

Todas as brotações foram microenxertadas em citrumelo Swingle ou citrange Carrizo (Figura 4b) e estão sendo aclimatizadas (Figura 4c). Durante o processo de aclimatização de plantas *in vitro* de limão Cravo, pôde-se identificar uma planta mutante que apresentou folhas com diferenças morfológicas drásticas em relação à planta original (Figura 4d).

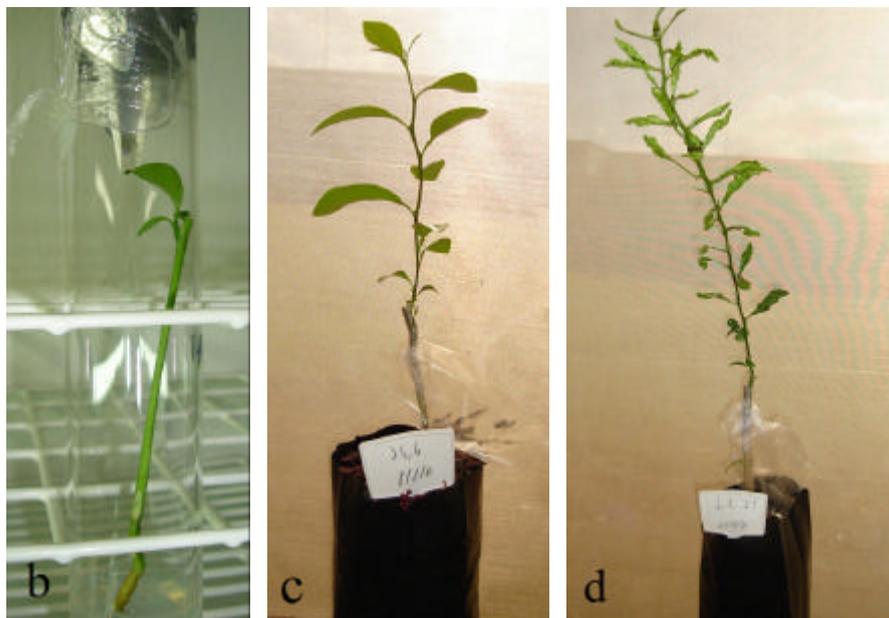
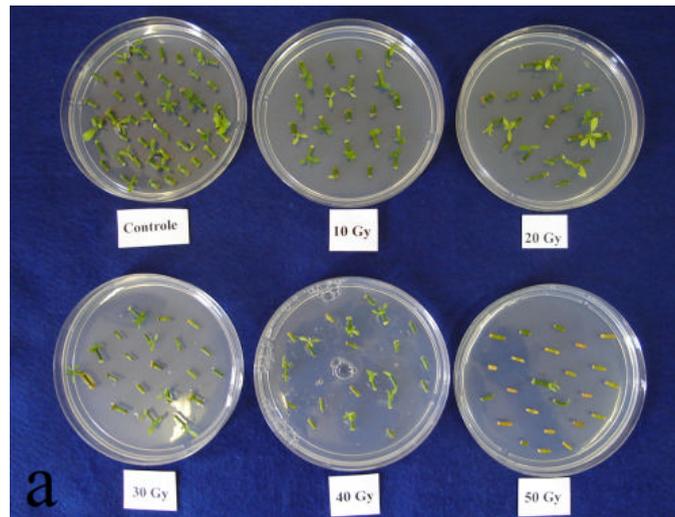


Figura 4 - **a)** Epicótilos de limão Cravo submetidos ao teste de radiosensibilidade. **b)** Brotação microenxertada *in vitro*. **c)** Planta em processo de aclimatização em estufa. **d)** Planta com mutações na morfologia. **e)** Plantas de limão Cravo no campo, provenientes de material irradiado.

4.2.2.1 Irradiação de explantes com a dose selecionada e obtenção de plantas para a seleção de mutantes

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de radiosensibilidade foram realizados experimentos de irradiação de explantes (segmentos de epicótilo) das quatro variedades com dose única de mutagênico.

Nesta etapa, o objetivo foi obter quatro populações de 500 plantas originadas de explantes (segmentos de epicótilo) irradiados e mais 50 plantas-controle, todas obtidas em vários experimentos consecutivos.

Para a variedade Fremont foram realizados quatro experimentos, totalizando 2.835 epicótilos irradiados com a dose de 13,8 Gy de raios-gama (correspondente ao GR 30 da variedade), sendo que nestes experimentos foram regeneradas um total de 492 brotações, o que possibilitou até o momento a obtenção de 165 plântulas *in vitro*. Já para a variedade Thomas, foram instalados cinco experimentos, totalizando 1.386 epicótilos irradiados com a dose de 18,2 Gy, o que resultou em 908 brotações e 241 plântulas cultivadas *in vitro* até o momento. Para a variedade Murcott foram irradiados com a GR 30 (16,1Gy) um total de 1.881 epicótilos distribuídos em cinco experimentos, sendo obtidos 1.486 brotações e 322 plântulas *in vitro* até o momento.

Para o limão Cravo foram obtidas 800 plântulas *in vitro*, dos 1.629 epicótilos irradiados, sendo que todas as plantas obtidas já foram aclimatizadas e plantadas no campo experimental do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC (Figura 4e).

4.3 Análise Comparativa da Radiosensibilidade de Propágulos *in vivo* (borbulhas) e *in vitro* (segmentos de epicótilo)

As análises comparativas da radiosensibilidade demonstraram diferenças significativas entre as equações de regressão quando comparadas para a mesma variedade. Este resultado pode ser observado na Tabela 7 que apresenta os resultados dos testes F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas.

Tabela 7. Resultado do teste F para coincidência e teste t para paralelismo entre retas das equações de regressões lineares, considerando dois tipos diferentes de propágulos (*in vitro* e *in vivo*), após a irradiação com diversas doses de mutagênico.

Propágulo <i>in vitro</i>	Propágulo <i>in vivo</i>		
	Tangerina Thomas	Tangerina Fremont	Tangor Murcott
Tangerina Thomas	F = 160,1 ** t = -7,46 **		
Tangerina Fremont		F = 457,18 ** t = -3,01 *	
Tangor Murcott			F = 69,8 ** t = -7,39 **

Nas Figuras 5, 6 e 7 é possível visualizar as duas equações de regressão linear obtidas após a irradiação de propágulos *in vitro* e *in vivo* de tangor Murcott, tangerina Fremont e Thomas.

Pela Figura 5 é possível notar a presença de um ângulo entre as equações de reta, obtidas pela redução percentual do desenvolvimento dos propágulos *in vivo* e *in vitro* de tangor Murcott, que corresponde à diferença de sensibilidade desses propágulos ao mutagênico. Neste caso, os propágulos *in vivo* apresentaram maior sensibilidade ao mutagênico do que os propágulos *in vitro*, que pode ser verificado pela maior inclinação da reta obtida nos propágulos *in vivo*, o que demonstra que para uma mesma dose de mutagênico, houve maior redução do desenvolvimento dos propágulos *in vivo*. Assim, pôde-se calcular a dose de 14,0 Gy de raios-gama como o GR 30 de propágulos *in vivo* (mais sensível) e a dose de 16,1 Gy, como o GR 30 de propágulos *in vitro* (mais resistente).

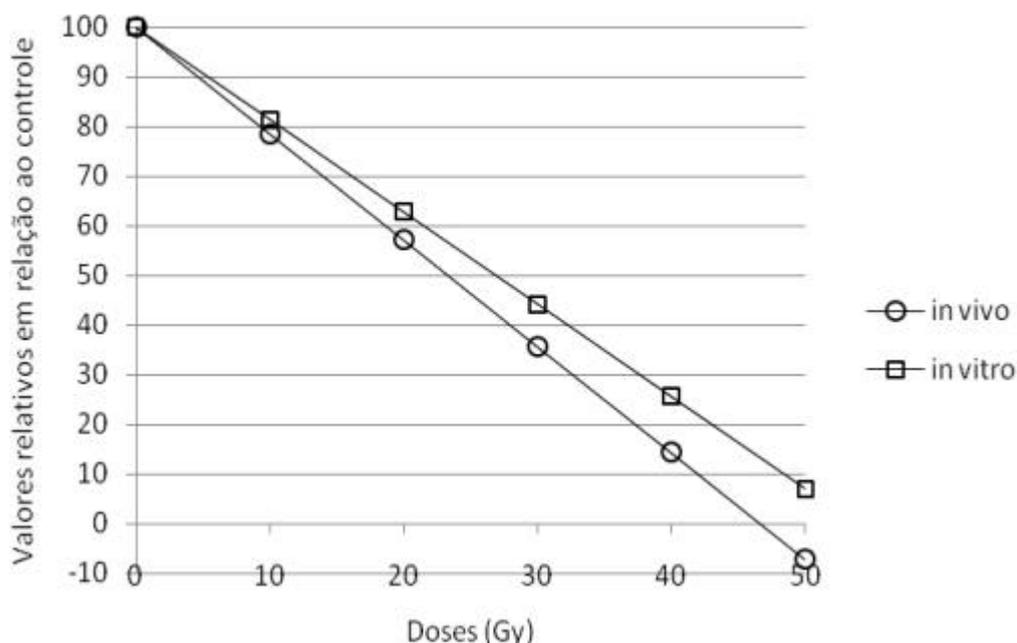


Figura 5. Equações de regressão linear dos dados de redução relativa do desenvolvimento de propágulos *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama, em tangor Murcott.

Pela Figura 6 é possível notar a presença de um maior ângulo entre as equações de reta, obtidas pela redução percentual do desenvolvimento dos propágulos *in vivo* e *in vitro* de tangerina Fremont. Neste caso, os propágulos *in vitro* apresentaram maior sensibilidade ao mutagênico do que os propágulos *in vivo*. Isto pode ser verificado pela maior inclinação da reta obtida neste tipo de propágulo (*in vitro*), o que demonstra que para uma mesma dose de mutagênico, houve maior redução relativa do desenvolvimento dos propágulos *in vitro*.

Assim, pôde-se calcular a dose de 13,7 Gy de raios-gama como o GR 30 de propágulos *in vitro* (mais sensível) e a dose de 29,9 Gy, como o GR 30 de propágulos *in vivo* (mais resistentes).

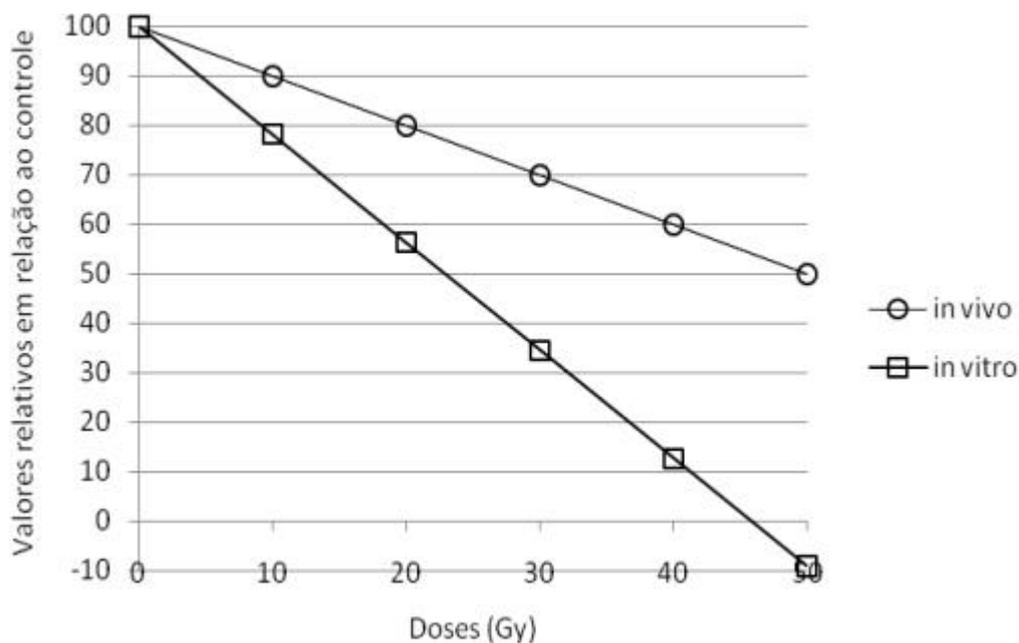


Figura 6. Equações de regressão linear dos dados de redução relativa do desenvolvimento de propágulos *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama, em tangerina Fremont.

Na Figura 7 é possível notar a presença de um ângulo bem menor entre as equações de reta, obtidas pela redução percentual do desenvolvimento dos propágulos *in vivo* e *in vitro* de tangerina Thomas. Neste caso, a proximidade das retas demonstra que os dois tipos de propágulos apresentam sensibilidade similar ao mutagênico, ou seja, proximidade no cálculo de doses, como a GR 30, que foi para os propágulos *in vivo* e *in vitro*, 18,7 Gy e 18,2 Gy, respectivamente.

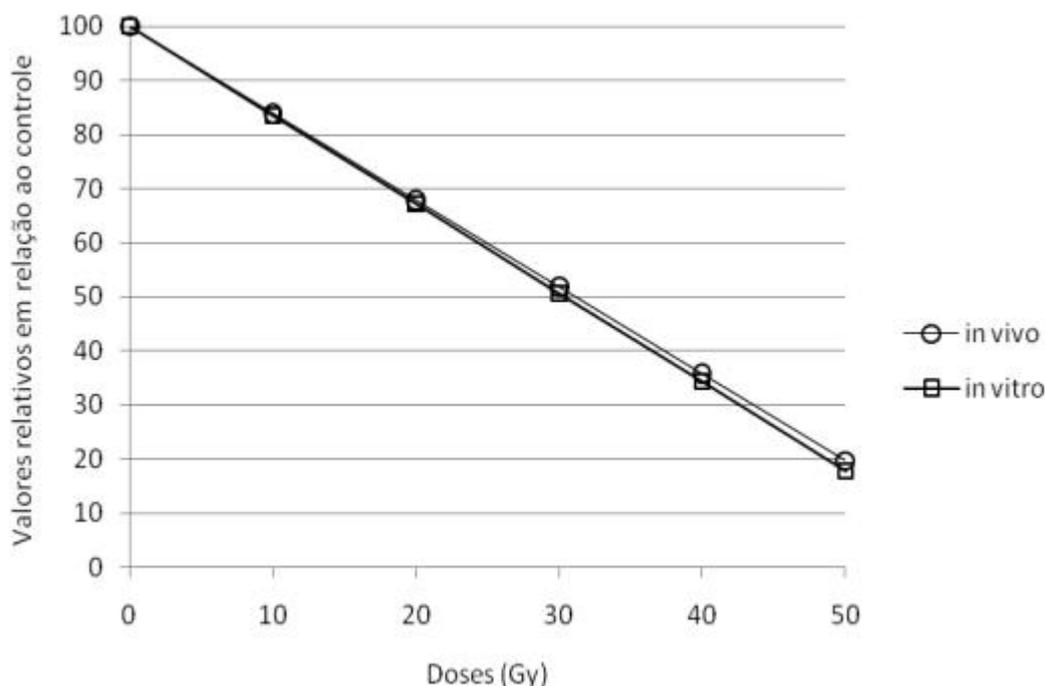


Figura 7. Equações de regressão linear dos dados de redução relativa do desenvolvimento de propágulos *in vitro* e *in vivo*, após o tratamento mutagênico com diversas doses de raios-gama, em tangerina Thomas.

Na Tabela 8 estão as GR 30 dos materiais *in vivo* e *in vitro* de cada variedade. A variedade Fremont, que apresentou o maior ângulo entre as retas, têm como GR 30, 29,9 e 13,7Gy para os métodos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Esses valores apresentam maior diferença, quando comparados com os valores de GR 30 das variedades tangerina Thomas (18,7 e 18,2Gy) e tangor Murcott (14,0 e 16,1Gy), que ficaram mais próximos.

Tabela 8 – Doses GR 30 dos propágulos *in vivo* e *in vitro* irradiados com diversas doses de mutagênico, obtidas da regressão linear dos dados das três variedades de tangerinas.

GR 30 (Gy)	Propágulo <i>in vivo</i>	Propágulo <i>in vitro</i>
Tangerina Fremont	29,9	13,7
Tangerina Thomas	18,7	18,2
Tangor Murcott	14,0	16,1

5 CONCLUSÕES

- a) As doses de raios-gama consideradas como GR 30 para propágulos *in vivo* (borbulhas) foram estabelecidas como sendo de 29,9 Gy para tangerina Fremont, 18,7 Gy para tangerina Thomas e 14,0 Gy, para tangor Murcott. O teste de paralelismo entre retas indicou que as três variedades apresentam mesma taxa relativa de redução da altura de brotações em função das doses crescentes de mutagênico.
- b) Pelo teste de radiosensibilidade *in vivo* foi possível determinar que as borbulhas de tangor Murcott são as mais sensíveis aos raios-gama, seguido das variedades de tangerina Thomas e Fremont.
- c) Foi estabelecido como ideal o nível de 2,0 mg/L de BAP nos meios de cultivo de segmentos de epicótilo visando a regeneração de brotações, nas quatro variedades de citros analisadas: limão Cravo, tangor Murcott e tangerinas Thomas e Fremont.
- d) As doses de raios-gama consideradas como GR 30 para propágulos *in vitro* (segmentos de epicótilo) foram estabelecidas como sendo de 13,7 Gy para tangerina Fremont, 18,2 Gy para tangerina Thomas, 16,1 Gy, para tangor Murcott e 20,7 para limão Cravo.
- e) Não foi possível obter brotações de gemas adventícias *in vitro* a partir de segmentos internodais das três variedades de citros analisadas (tangor Murcott e tangerinas Thomas e Fremont) utilizando-se os reguladores de crescimento BAP e cinetina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLOOWALIA, B.S.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. **Euphytica**, v.118, n.2, p.167-173, 2001.
- ACHUTEGUI-BETELU, A.M.; SCHIMIDT, J. Radiation Sensitivity of *in vitro* Cultures of *Ullucus tuberosus* and *Oxalis tuberosa*. In: International Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for Plant Improvement Symposium, Viena, 1985. **Proceedings**. International Atomic Energy Agency, 1986. p.161-166.
- AL-BAHRANY, A.M. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm) Swing. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.285-295, 2002.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURAO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. e RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**. (Piracicaba, Braz.) [online]. 2002, vol.59, n.1, pp. 35-40. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162002000100004&lng=pt&nrm=iso>.
- ALMEIDA, W.A.B.; Caracterização Anatômica da Organogênese *in vitro* e Transformação Genética Via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus* SP., 2002, Tese de Doutorado, ESALQ – USP, Piracicaba, SP, Brasil, 138p.
- ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. 926p.
- BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, v.1, p.105-136, 1976.
- BASSANEZI, R.B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. **Morte Súbita dos Citros**, Araraquara: Fundecitrus, 2003. 54p.
- BEYL, C.A. Getting started with tissue culture. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. Chap.3, p. 21-38.
- BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A.M. Applied mutation breeding in vegetatively propagated crops. Elsevier Science Pub. Amsterdam. 313p. 1988.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. v.1. p.87-132.

CARVALHO, S. A.; GRAF, C. C. D.; VIOLANTE, A. R. Produção de material básico e propagação In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2005. p. 279-316.
CHAPOT, H.; The citrus plant. In: CIBA-GEIGY Agrochemicals technical monograph. Citrus. 1975. n.4. 88 p.

CHAPOT, H. *The citrus plant*. In: CITRUS.CIBA-GEIGY AGROCHEMICALS, ed. Basle, Switzerland, 1975.

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254p.

DIXON, W.J.; MASSEY JR., F.J. **Introduction to statistical analysis**. 3.ed. Tóquio: Mc Graw-Hill Kogakusha, 1969. 638p.

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 JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2005. p. 279-316.

DONINI, B.; MICKE, A. Use of induced mutations in improvement of vegetatively propagated crops. In: Regional Seminar on the utilization of induced mutations for crop improvement for countries in Latin America, Viena, 1985. **Proceedings**. International Atomic Energy Agency and the Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1984. p.79-86.

DOUGLAS, G.C. Effects of gamma radiation on morphogenesis and mutagenesis in cultured stem explants of poplar. In: International Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for Plant Improvement Symposium, Viena, 1985. **Proceedings**. International Atomic Energy Agency, 1986. p.121-128.

FIGUEIREDO, J.O. Variedades de copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A.S. (eds.) **Citricultura Brasileira**, v.1 São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 228-264.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Citros. **Agrianual 2008: Anuário de Agricultura Brasileira**, São Paulo, p. 295 – 303, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx?pageID=567>>. Acesso em 10 jan. 2009.

FUNDECITRUS. Morte súbita dos citros – MSC. Disponível em: < http://www.fundecitrus.com.br/doencas/morte_subita.html>. Acesso em: 07 jan. 2009.

GLORIA, F.J.M.; MOURAO FILHO, F.A.A. e MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplast of Brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 2000, vol.35, n.4, pp. 727-732. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2000000400008&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0100-204X. doi: 10.1590/S0100-204X2000000400008.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. **Plant Breeding Reviews**, v.8, p.339-374, 1990.

HEARN, J. Development of seedless orange and grapefruit varieties through seed irradiation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.109, n.2, p.270-273, 1984.

KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange. **Plant Cell Reports**, v.13, p.541-545, 1994.

KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Tissue and Organ Culture**, v. 74, p.99-102, 2003.

KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; KANEYOSHI, J.; HIGO, H.; HIGO, K. Transformation of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) with a synthetic gene encoding the human epidermal growth factor (hEGF). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.64, p.763-769, 1996.

LATADO, R.R.; TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; IEMMA, A.F.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M.; MACHADO, M.A.; NAMEKATA, T.; CERAVOLO, L.; ROSSI, A.C. Mutantes de laranja 'Pêra' com número reduzido de sementes, obtidos através de mutações induzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.339-344, 2001.

LATADO, R.R.; TULMANN NETO, A.; POMPEU JR., J.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M.; MACHADO, M.A.; NAMEKATA, T.; CERAVOLO, L.; MARANGONI, S.M.N.; ROSSI, A.C. Caracterização agrônômica de mutantes de laranjeira Pêra sem sementes ou com alteração no período de maturação de frutos. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v.26, n.1, p.109-120, 2005.

LATADO, R.R. Indução e uso de mutações *in vivo* e *in vitro* no melhoramento do *Chrysanthemum morifolium* Ram. 1993. 103p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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 JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. 926p.

MAGGON, R.; SINGH, B.D. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, v.63, n.1, p.123-128, 1995.

MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.11, p.238–242, 1992.

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de Citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (eds.) **Citricultura Brasileira**, v.1 São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 116-52.

MOREIRA-DIAS, J. M.; MOLINA, R. V.; GUARDIOLA, J. L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyls segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 87, n.4, p. 275-290, 2001.

MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J. e MOURAO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2001, vol.23, n.2, pp. 240-245. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452001000200007&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0100-2945. doi: 10.1590/S0100-29452001000200007.

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

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requeriment of citrus tissue culture. In: International Citrus Symposium, 1., Riverside, 1969. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. p.1155-1169.

NEVES, M. F.; JANK, M.S. (Coord.). Perspectivas da cadeia produtiva de laranja no Brasil: a Agenda 2015. **Pensa Boletim Online**, São Paulo, 2006. Disponível em:<http://fundacaofia.com.br/pensa/downloads/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.pdf>Acesso em: 07 jan. 2009.

NEVES, M. F.; LOPES, F. **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Editora Atlas, 2005. 225p.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; TROMBIN, G.; AMARO, A. A.; NEVES, E. M.; JANK, M. S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança. São Paulo: Atlas, 2007. 110p.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Proceedings of the 8th Congress International Society Citriculture**, pp 67, 1996.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.14, p.616–619, 1995b.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v.104, p.183–191, 1995a.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO A.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v.16, p.731–737, 1997.

PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; GARCIA, V.X.P. Características físico-químicas dos frutos da variedade Fremont IAC 543 para o mercado de fruta fresca. **Anais...**, CD ROM, Florianópolis, SC, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2004.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2005. p. 39-57.

PIO, R.M.; MINAMI, K.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O. Caracterização e avaliação dos frutos das tangerinas Sul da África e Thomas IAC 519. **Anais...**, CD ROM, Belém, PA, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.

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

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, 2001. p. 75-82.

ROLFS, P.H.; ROLFS, C. A muda de citros. Secretaria da Agricultura o Estado de Minas Gerais, 1931. 126 p.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world**. Sinclair International Ltd. Norwich, 1990, 128p.

SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G. de; AZEVEDO, F.A. de; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.463-466, 2006.

SCHINOR, E. H. Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* SP com o gene da capa protetora e uma sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros 2006. 88p. Dissertação (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SEADE. Sistema Estadual de Análise de Dados. Disponível em <http://www.seade.gov.br>. Acesso em: 17 dez. 2004.

SHANCHUN, C.; FENG, G.; JINREN, Z. Studies on the seedless character of Citrus induced by irradiation. **Mutation Breeding Newsletter**, v.37, p.8-9, 1991.

SILVA, R.P. da; COSTA, M.A.P. de C.; SOUZA, A. da S. ALMEIDA, W.A.B. de. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1153-1159, 2005a.

SILVA, R.P. da; MENDES, B.M.J.; FILHO, F. de A.A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10 p.1331-1337, 2008.

SILVA, R. P.; SOUZA, E. S.; REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n. 3, p. 484-487, 2005b.

SIM, G.E.; GOH, C.J.; LOH, C.S. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco: multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. **Plant Science**, v.59, p.203-210, 1989.

SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOA, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 29, n.2, p. 393-398, 2007.

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

SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J., Mutation breeding in citrus. In: **Induced Mutations in Vegetative-Propagated Plants**. IAEA, p. 91-105, 1973.

SPIEGEL-ROY, P.; PADOVA, R. **Radiosensitivity of Shamouti orange (*Citrus sinensis*) seeds and buds**. Radiation Botany, n.13, p.105-110, 1973.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A.; ELHANATI, A. Seedless induced mutant in lemon (*Citrus limon*). **Mutation Breeding Newsletter**, 26:1, 1985.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A.; ELHANATI, A. Seedless induced mutant in highly seeded lemon (*Citrus limon*). **Mutation Breeding Newsletter**, 36:11, 1990.

SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its relatives of orange sub-family. **The Citrus Industry**. University of California Press. Berkeley and Los Angeles, 1948. Vol.1: 129-418.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.) **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967.

TANAKA, T. **Species problem in Citrus**. (*Revision Aurantiacearum IX*). Japanese Society for the Promotion of Science. Tokyo, Ueno, 1954.

TAVANO, E.C.R. Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja Azeda (*Citrus aurantium*). 73p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K. THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. Chap 2, p. 17-36.

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, 1990. p. 341-378.

TULMANN NETO, A. ; ANDO, A. ; MENDES, B. M. J. . Progressos na Indução e Uso de Mutações In Vitro. In: Antonio Carlos Torres;Linda Styer Caldas;José Amauri Buso. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998, v. 1, p. 459-509.

TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M.; ANDO A.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; CERAVOLO, L.; NAMEKATA, T.; ROSSI, A.C. Indução e seleção de mutantes em laranja 'Pêra' mediante emprego da radiação gama. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.10, p.743-752, 1996.

7 GLOSSÁRIO

- DL: Abreviação de “Dose letal”.
- DL 30: dose de mutagênico que causa morte de 30% dos explantes em relação ao controle.
- GR: Abreviação do termo em inglês “grow reduction”, em português “redução de crescimento”.
- Dose GR 30: dose de mutagênico que causa redução de 30% no crescimento em relação ao controle.
- Radiossensibilidade: sensibilidade dos tecidos vivos à ação dos raios ionizantes.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)