

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

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

**RESUMO** - Gemas axilares de 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata* Raf.) excisadas de plantas obtidas através de germinação de sementes *in vitro*, foram cultivadas em meio básico "MS" suplementado de todas as combinações possíveis de NAA e BAP nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l. O melhor índice de multiplicação de gemas se deu com NAA-1,0 + BAP-1,0 mg/l e de enraizamento de brotos com IBA-1,0 a 2,0 mg/l ou NAA-5,0 + BAP-0,1 mg/l ou ainda NAA-1,0 + IBA-2,0 mg/l. As doses mais elevadas de BAP (a partir de 1,0 mg/l) evidenciaram alta percentagem de explantes que formaram calos, os quais mostraram elevada capacidade de regeneração de plantas.

Termos para indexação: cultura de tecidos, citros.

## MICROPROPAGATION OF TRIFOLIATA THROUGH AXILIARY BUDS *IN VITRO* CULTURE

**ABSTRACT** - Axillary buds of Trifoliata (*Poncirus trifoliata* Raf.) excised from seedlings obtained *in vitro* were cultivated on "MS" medium additionated all of the possible combinations of NAA and BAP (0,0; 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l). The highest frequency of bud multiplication occurred with NAA-1,0 + BAP-1,0 mg/l and rooting with IBA from 1.0 to 2.0 mg/l or NAA-5,0 + BAP-0,1 mg/l or NAA-1,0 + IBA-2,0 mg/l. High frequency of embryogenic callus was observed on the increased doses of BAP (up 1,0 mg/l).

Index terms: tissues culture, citrus.

## INTRODUÇÃO

Os porta-enxertos utilizados para as espécies cítricas são em sua maioria *seedlings*, o que implica na manutenção de plantas de onde se colhem os frutos para extração das sementes e, em variabilidade, das mudas em função do sistema reprodutivo com elevada taxa de polinização cruzada.

A micropropagação *in vitro* através da cultura de ápices caulinares e gemas axilares permite a obtenção de um grande e previsível número de plantas geneticamente iguais em curto espaço de tempo, desde que sejam propiciadas condições ideais, principalmente no que diz respeito ao meio de cultura.

Há uma grande similaridade na resposta entre gemas crescidas *in vivo* e *in vitro*, o que permite também o estudo *in vitro* de fatores que controlam fenômenos complexos tais como diferenciação e

desenvolvimento de gemas florais (Altman & Goren 1977).

Um bom desenvolvimento de gemas foi obtido em meio formulado por Murashige & Skoog (1962) - meio "MS" adicionado de cinetina + ácido naftaleno acético (NAA) - 1,0 mg/l (Bouزيد 1975). Uma gema de *C. grandis* cultivada em meio "MS" modificado por Chaturvedi & Mitra (1974) e suplementado por BA-0,25 + NAA-1,0 mg/l, produziu 10 a 30 novas gemas e todas desenvolveram brotos. BA e cinetina induziram a formação de mais de seis gemas adventícias em lugar de duas, que normalmente desenvolvem.

A desfolhação da planta antes da coleta das gemas estimulou o crescimento *in vitro* de novos brotos (Altman & Goren 1977). Ápices caulinares de *C. microcarpa* Bunge foram cultivados em meio "White", suplementado por adenina-40 mg/l ou leite de coco-40% (Rangaswamy 1975). A mais prolífica fonte de brotos para diversas variedades foram as gemas axilares dos nós tanto jovens quanto adultos, em meio "MS" suplementado por BA-0,5 à 2,0 mg/l (Barlass & Skene 1982).

O enraizamento de brotos de *C. grandis* foi melhor estimulado por NAA-0,1 à 0,5 mg/l (Chaturvedi & Mitra 1974) e de *C. limettioides*

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 2 de fevereiro de 1988.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof. - Adjunto, Dep. de Agric., Esc. Sup. de Agric. de Lavras, Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof. - Assist., Dep. de Genética, ESALQ e Pesq. do Centro de Energia Nuclear na Agric. (CENA), Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

por NAA-0,1 à 2,5 + cinetina 0,1 mg/l (Bhansaly & Arya 1979).

### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), órgão da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP. Os frutos da cultivar Trifoliata (*Poncirus trifoliata* Raf.), foram obtidos junto à Estação Experimental de Limeira, unidade do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP.

As sementes tiveram seus integumentos removidos e foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, lavadas com água destilada autoclavada por três vezes e colocadas para germinar em frascos contendo meio líquido constituído pelos macro e micronutrientes do meio "MS".

Quando os *seedlings* apresentavam aproximadamente seis semanas, suas gemas axilares foram excisadas em condições assépticas e inoculadas em meio "MS" (Murashige & Skoog 1962), adicionado de todas as combinações possíveis de NAA e BAP nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l. O pH do meio foi ajustado para 5,7 e solidificado com ágar-8 g/l.

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

A avaliação, estabelecendo-se o número médio de brotos com mais de 1 cm por tubo remanescente, foi realizada após dois meses da inoculação, quando os brotos formados foram excisados e transferidos para meio de enraizamento. Nesta mesma ocasião, registrou-se a presença de raízes e calos.

Segmentos do caule com aproximadamente 1 cm de comprimento, apresentando duas gemas em média, obtidos do experimento de multiplicação de gemas axilares,

foram inoculados em tubos (20 cm x 2 cm), contendo 15 ml do meio "MS" adicionado de (em mg/l): NAA 0,1; 0,5; 1,0 ou 5,0; IBA 1,0 ou 2,0; NAA 0,1 + IBA 2,0; NAA 5,0 + IBA 2,0; NAA 5,0 + BAP 0,1; ou GA<sub>3</sub> 5,0. Foram feitas dez repetições, cada uma constituída de cinco tubos.

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

Os dados foram tomados em percentagem de enraizamento com relação aos tubos remanescentes por ocasião da remoção das plantas dos tubos de ensaio. As plantas foram acondicionadas em potes com terra, esterco e areia (4:1:1) e mantidas em câmara úmida por dez dias para depois serem transferidas para casa de vegetação.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' houve uma diferença altamente significativa com relação ao número de brotos, entre os diversos níveis de BAP e para a interação NAA x BAP. O desdobramento para BAP dentro de NAA foi significativo a 1% para todos os níveis de NAA, enquanto o desdobramento para NAA dentro de BAP mostrou-se com significância a 1% apenas dentro de BAP-5,0 e 10,0 mg/l (Tabela 1).

O teste de Tukey a 5% indicou BAP-1,0 mg/l como o tratamento que produziu o maior número de brotos, diferindo de todos os demais para a média e dentro de cada nível de NAA, exceto para NAA-0,0 mg/l, onde BAP-1,0 e BAP-0,1 mg/l foram estatisticamente iguais (Tabela 1 e Fig. 1).

A maior produção de brotos em 'Trifoliata' se deu com a combinação BAP-1,0 + NAA-1,0 mg/l, porém, não diferindo estatisticamente de todas as demais doses de NAA, neste nível de BAP.

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

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)					Média
	0,0	0,1	1,0	5,0	10,0	
0,0	0,66c	0,74c	0,89c	0,49d	0,37d	0,63e
0,1	4,37ab	3,18b	3,69b	3,49b	2,77b	3,50b
1,0	4,84a	6,11a	7,00a	5,69a	4,94a	5,72a
5,0	3,08bA	0,79cB	1,30cB	1,42cB	1,66bcB	1,65c
10,0	0,55cBC	2,16bA	0,22dC	1,29cAB	1,39cA	1,12d
Média	2,70	2,60	2,62	2,48	2,23	

\* = brotos com raiz (%).

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

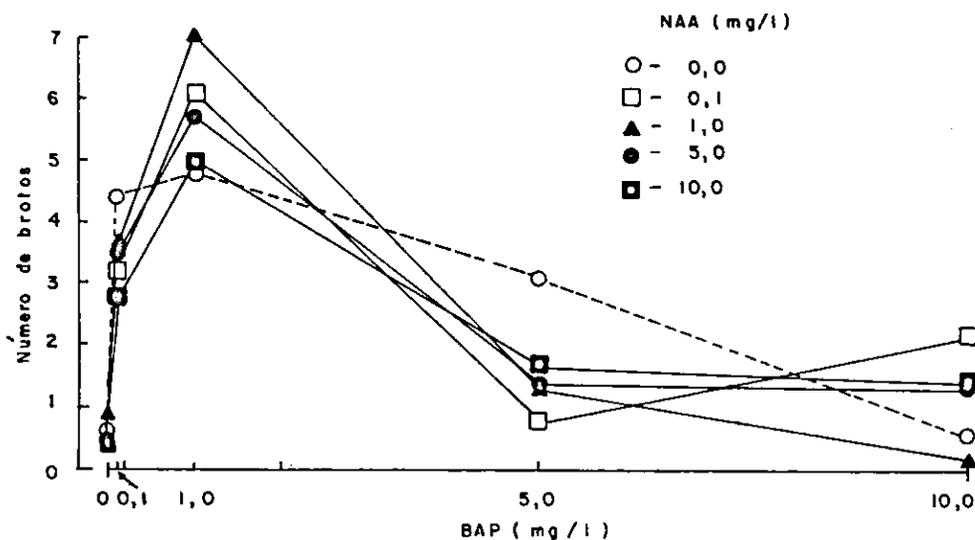


FIG. 1. Número médio de brotos com mais de 1 cm obtidos em cultura de gemas axilares de 'Trifoliata' em diferentes combinações de NAA e BAP.

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

As doses mais elevadas de BAP (a partir de 1,0 mg/l - Tabela 1), independentemente da presença de NAA, evidenciaram alta percentagem de explantes que formaram calos. Estes calos, de coloração esverdeada, cresceram abundantemente e mostraram elevada capacidade de regeneração de plantas, constituindo-se num material muito interessante para estudos de indução de mutações.

Os melhores índices de enraizamento foram obtidos em meio adicionado de IBA-2,0 mg/l e IBA-1,0 mg/l e NAA-1,0 + IBA-2,0 mg/l (Tabela 2).

O NAA-0,1 a 2,5 mg/l sozinho ou combinado com alguma citocinina é citado como sendo o

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

Tratamento (mg/l)	Enraizamento (%)
NAA-0,1	31,5 c
NAA-0,5	11,0 e
NAA-1,0	27,0 cd
NAA-5,0	15,0 de
IBA-1,0	53,0 ab
IBA-2,0	63,5 a
NAA-0,1 + IBA-2,0	36,5 bc
NAA-1,0 + IBA-2,0	52,0 ab
NAA-5,0 + IBA-2,0	30,0 c
NAA-5,0 + BAP-0,1	60,0 a
GA <sub>3</sub> -5,0	8,5 e

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

hormônio responsável pelo enraizamento de brotos de várias espécies de citros (Rangaswamy 1975, Barlass & Skene 1982). Este acentuado efeito do NAA também foi observado, antes da individuali-

zação dos brotos para meio de enraizamento, com a adição de BAP-0,1 mg/l (Tabela 1).

Usando este sistema de propagação *in vitro*, é possível regenerar gemas adventícias e recuperar plantas geneticamente homogêneas derivadas de camadas histogenicamente diferentes de um indivíduo quimérico. Estabeleceu-se, por este processo, uma metodologia que permite a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo e independente da época do ano.

#### CONCLUSÕES

1. A multiplicação de gemas axilares de 'Trifoliata' é mais estimulada por NAA-1,0 + BAP-1,0 mg/l.
2. Doses de BAP superiores a 1,0 mg/l estimulam a formação de calos com elevado potencial morfogênico.
3. Melhor enraizamento de brotos de 'Trifoliata' é obtido com IBA-1,0 a 2,0 mg/l ou NAA-5,0 + BAP-1,0 mg/l, ou NAA-1,0 + IBA-2,0 mg/l.

#### REFERÊNCIAS

- ALTMAN, A. & GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. *Acta Hort.*, 78: 51:60, 1977.
- BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. 'In vitro' plantlet formation from citrus species and hybrids. *Sci. Hort.*, 17:333-41, 1982.
- BHANSALY, R.R. & ARYA, H.C. Organogenesis in *Citrus limettioidea* (Sweet lime) callus culture. *Phytomorphology*, 29:97-100, 1979.
- BOUZID, S.M. Quelques traits du comportement de boutures de citrus en culture *in vitro*. *C.R. Hebed. Seances Acad. Sci. Ser. D.*, 280:1689-92, 1975.
- CHATURVEDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures. *HortScience*, 9(2):118-20, 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-97, 1962.
- RANGASWAMY, N.S. Morphogenesis in explants of 'Citrus microcarpa' bunge grown *in vitro*. *Indian J. Exp. Biol.*, 13(2):213-5, 1975.