

CALOGÊNESE IN VITRO DE LIMA ÁCIDA 'TAITI'

Souza, Elma dos Santos¹; Rebouças, Fabíola Santana²; Carvalho, Zuleide¹; Argôlo, Maria Alice Vicente²; Costa, Maria Angélica Pereira de Carvalho³; Almeida, Weliton A. Bastos³.

¹Estudante de Engenharia Agrônômica da UFRB, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, CEP 44380-000 Cruz das Almas, Bahia, fone (75) 3621-1220, e-mail: elmagrufba@yahoo.com.br;

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (UFRB-BA), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, CEP 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, fone (75) 3621-1220, e-mail: fablly2000@yahoo.com.br; ³Professor do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, CEP 44380-000 Cruz das Almas, Bahia, fone (75) 3621-1220, e-mail: weliton@ufba.br.

INTRODUÇÃO

A lima-ácida-'Taiti' (*Citrus latifolia* Tanaka.), popularmente conhecida no Brasil como um limão, atualmente vem despertando interesse para a ampliação dos plantios comerciais. Isso ocorre em função de seu bom comportamento diante das principais doenças e pragas que estão presentes nos pomares cítricos e que vêm causando grandes prejuízos para os produtores de laranjas doces. O Estado da Bahia é o segundo produtor de lima ácida 'Taiti' do Brasil, com uma produção anual de 44,6 mil toneladas. Os frutos produzidos destinam-se, para o consumo "in natura" no mercado interno e para exportação. Nos últimos anos, com o início das exportações da lima ácida para o mercado europeu, a cultura do 'Taiti' na Bahia vem passando por um processo de acentuada modernização. Essa consolidação do cultivo da lima ácida 'Taiti' como um produto de exportação estimulou o crescimento da área cultivada, cuja produção alcança, aproximadamente, 60% do total colhido na Região Nordeste do Brasil, que totaliza 74,8 mil toneladas (Coelho et al, 2006).

Segundo Coelho et al. (2006) esse interesse sem precedentes do mercado externo pela lima ácida exige, por outro lado, atenção redobrada por parte dos produtores, pesquisadores e agentes da cadeia produtiva em relação à qualidade do fruto e à regularidade na oferta.

A necessidade da ampliação das bases genéticas atuais dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente impõe a necessidade de conduzir programas de melhoramento. No entanto, as dificuldades de se conduzir programas tradicionais de melhoramento em citros são enormes (Machado, 1997). Nesse sentido, a biotecnologia, através de suas técnicas, surge como uma ferramenta altamente promissora no apoio a programas de melhoramento de plantas, (Almeida et al. 2002).

A resposta morfogênética em explantes oriundos de tecido adulto tem sido muito rara, em virtude dos elevados índices de contaminação, bem como pela baixa totipotência. A transformação genética em citros a partir de tecido adulto será de grande importância em programas de melhoramento, pois as plantas regeneradas não apresentariam características juvenis, permitindo dessa forma uma melhor avaliação e seleção no campo e, portanto, aumentando as chances de um novo cultivar seja lançado em um intervalo de tempo menor (Almeida, 2002). Desta forma, este trabalho objetivou induzir a calogênese em segmentos internodais de lima ácida 'Taiti' em função de concentrações de BAP.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza – FAMAM situada no Município de Cruz das Almas, BA. Mudanças de lima ácida 'Taiti', foram enxertadas em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e mantidas em casa de vegetação, onde foram constantemente podadas, preservando-se o ramo principal. As novas brotações formadas no ramo principal foram utilizadas como fonte de explantes, de onde foram extraídos segmentos internodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, que foram desinfestados, durante 20 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%) diluída em água destilada na proporção 4:1. Em seguida os mesmos foram lavados quatro vezes em água destilada e esterilizada.

Nesse experimento, os segmentos internodais foram cultivados horizontalmente em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura DBA₃ (Deng et al.; 1992), suplementado com 25 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com ágar (0,8%) e 500 mg L⁻¹ do antibiótico Ceftriaxona sódica (para controle bacteriano) e BAP (Benzilaminopurina) nas concentrações 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ combinadas com 0,5 mg L⁻¹ de NAA (ácido naftalenoacético). Todos os explantes foram mantidos em ausência de luz à temperatura de 27° ± 2°C e posteriormente, sob fotoperíodo de 16 h (40 μmol. m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições (Placa de Petri contendo 10 segmentos internodais). Após 30 dias avaliou-se o percentual de explantes responsivos para calos, atribuindo-se notas para diferenciar a quantidade de células calogênicas formadas por calos (Figura 1). Para as notas dos calos formados em ambas as extremidades dos segmentos internodais, procedeu-se da seguinte forma:

- a) Nota 0, para ausência de calos;
- b) Nota 1, para calos com quantidade celular inferior a 1/3 do comprimento do explante;
- c) Nota 2, para calos com quantidade celular superior a 1/3 e menor que 2/3 do comprimento do explante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a Figura 1, a formação de calos, quando ocorrida, foi observada em ambas as extremidades dos explantes. A figura 2 apresenta os resultados referentes ao percentual de explantes com calos em nota 0,1 e 2. A concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP combinada com 0,5 mg L⁻¹ de NAA, foi aquela que se destacou apresentando todos os explantes contendo formação de calos. A presença de calos em trabalhos *in vitro* tem sido relacionada com fornecimento exógeno de auxina. Segundo Hussey (1983) a formação e o tipo de organização do calo depende primariamente da espécie vegetal e do tecido utilizado e claro, da composição hormonal do meio de cultivo. Neste trabalho foi fornecido 0,5 mg L⁻¹ de NAA combinada com as concentrações de BAP.

A contribuição de citocinina, especialmente BAP, na formação de calos embriogênicos ou organogênicos em explantes de citros já foi constatada em diversos trabalhos (Almeida et al. 2002; 2003a; 2003b). Oliveira (1993) relata ter obtido 16,25 % de calos de tangerina 'Cleópatra' com o cultivo de nucelos no meio MT contendo 10 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina. Segundo o mesmo autor, os calos de tangerina 'Cleópatra' obtidos neste meio contendo BAP e subcultivados em meio MT (sem reguladores de crescimento), foram os que tiveram a maior taxa de desenvolvimento após 7 subcultivos mensais. Ling & Iwamasa (1994) induziram calos embriogênicos de tangerina 'Ponkan' usando o meio MT acrescido de 5 mg L⁻¹ de BAP. Já

Kobayashi et al. (1984) concluíram que o melhor meio de indução de calos embriogênicos em 11 variedades de citros foi o meio MT suplementado com 10 mg L⁻¹ de BAP.



Figura 1. Segmentos internodais evidenciando calos em ambas as extremidades.

Estas notas para os calos (0, 1, 2 e 3) foram atribuídas com o intuito de estabelecer a qualidade do calo. Segundo Gratapaglia et al. (1998), quanto menor a quantidade celular no calo, menor é a probabilidade de resposta morfogênética. A capacidade de indução da dediferenciação celular é uma das mais importantes características exploradas no cultivo *in vitro* das plantas e encontra-se associada às principais técnicas de melhoramento não convencional (Fehér et al. 2002). A adição exógena do regulador vegetal contribuiu para o processo de dediferenciação celular, formando calos organogênicos com diferentes níveis de dediferenciação e, portanto com diferentes graus de determinação celular.

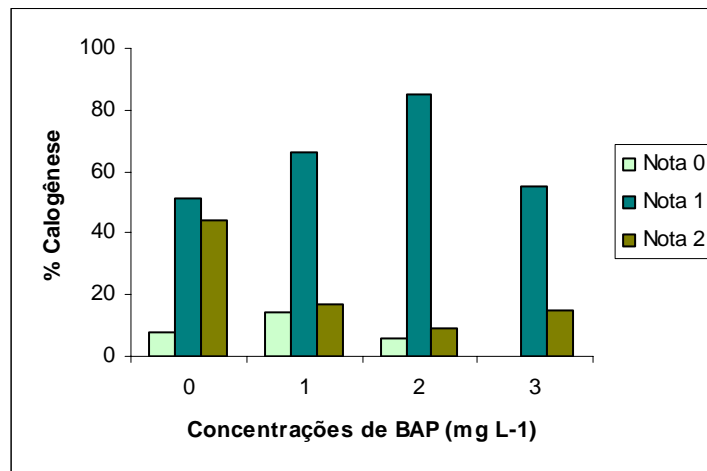


Figura 2. Percentual de calogênese de lima àcida 'Thaiti' em função de concentrações de BAP.

Os tecidos adultos apresentam baixo percentual de resposta morfogênética e são raros os trabalhos obtendo sucesso *in vitro* em citros, destacando-se os realizados por Cervera et al. (1998), Almeida et al. (2003). Neste sentido, considera-se que as respostas obtidas neste trabalho são de suma importância para obter futuros sistemas de regeneração de plantas *in vitro*, via organogênese.

CONCLUSÕES

A utilização do BAP combinado com NAA induz a calogênese in vitro em tecidos adultos de lima ácida 'Taiti'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W. A. B de.; et al. Agrabacterium-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2003a.

ALMEIDA, W. A. B. de; et al. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, v.164, p.203-211, 2003b.

ALMEIDA, W. A. de; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. In vitro organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, v. 59, p. 35-40, 2002.

CERVERA, M.; et al. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Trangenic Research**, v.7, p.51-59, 1998.

COELHO, Y.S.; LORDÊLO, C.M.; CALDAS, R.C. Problemas identificados na lima ácida 'tahiti' do estado da Bahia comercializada na Europa. **Toda fruta**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br>. Acessado em : 25/05/07.

DENG, X. X.; GROSSER, J. W.; GMITER, F. G. J. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* 'Meiwa' com *Citrus sinensis* cv. 'Valencia'. **Science Horticulture**, Amsterdam, v. 49, p. 55-62, 1992.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplastderived alfalfa cells: the role of auxin and stress. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, p.13-14, 2002.

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

HUSSEY, G. In vitro propagation of *G/adiolas* by precocious axillary shoot formation, **Scientia Horticulturae**. 6:287-96.1983.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, I; NAKATANI, N. Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osb.) ovules, and uniformity of regenerated plants. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station**, v.5, p.43-54, 1984.

LING, J.T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *citrus reticulata* and *citropsis gabunensis* through electrofusion. **Plant Cell Reports**, v.13, p.493-497, 1994.

MACHADO, M. A.; A Biotecnologia na citricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, **Brasília**, p. 8-10, nº 1, 1997.

OLIVEIRA, R.P. **Cultura de calos, células em suspensão e protoplastos de porta-enxertos de citros**. Piracicaba, 1993. 117p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PALAVRAS-CHAVE

Citrus latifolia Tanaka, Biotecnologia, Calogênese.