

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Fusão de protoplastos de citros e avaliação da resistência do híbrido somático laranja ‘Hamlin’ + mexerica ‘Montenegrina’ a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa*

**Alexandra Pavan**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba  
2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Alexandra Pavan**  
**Bióloga**

Fusão de protoplastos de citros e avaliação da resistência do híbrido somático laranja  
'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella*  
*fastidiosa*

Orientador:  
Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES**  
**MOURÃO FILHO**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de**  
**Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia**  
**e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba**  
**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DI VI SÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/ USP**

Pavan, Alexandra

Fusão de protoplastos de citros e avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' a *Xanthomonas axonopodis* pv. citri e *Xylella fastidiosa* / Alexandra Pavan. -- Piracicaba, 2006.  
80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cancro (doença de planta) 2. Citricultura 3. Clorose variegada dos citros 4. Hibridação vegetal 5. Protoplastos vegetais I. Título

CDD 634.3

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**



*DEUS*  
**AGRADEÇO**

*Aos meus pais Neusa e  
Antonio Orlando*  
**DEDICO**

*A minha família, minha irmã e amigos queridos*  
**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Gloriosa Santa Rita de Cássia, minha protetora, que intercedeu e me ajudou nas horas em que eu mais precisava.

A Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Ciências Biológicas e Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e recursos financeiros para o desenvolvimento do trabalho.

A FUNDECITRUS, pelo apoio financeiro que permitiu a condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela orientação e atenção.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz Madalena Januzzi Mendes, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP, por todo apoio e pela atenção durante a realização do trabalho.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, na pessoa do Prof. Dr. Jorgino Pompeu Jr., pelo fornecimento do material vegetal utilizado na pesquisa.

A Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, na pessoa do Prof. Dr. Eduardo Sanches Stuchi, pelo fornecimento do material vegetal utilizado na pesquisa.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Lúcia Carneiro Vieira, do Laboratório de Genética da ESALQ/USP, pela oportunidade de aprendizado, pela disponibilidade e pela atenção.

A Carlos Alberto de Oliveira, pelo auxílio nas análises moleculares e contagem de cromossomos.

Ao Prof Dr. João Roberto Spotti Lopes, Matê e Fernanda do laboratório de Insetos Vetores (LIV), pela oportunidade e orientação na avaliação à clorose variegada dos citros.

A Solizete, Luciane, pelo apoio e convívio.

Aos funcionários David Ulrich, Aparecido Donizete Serrano, José Antônio Volpato e Éder de Araújo Cintra, por toda a ajuda.

Ao Departamento de Fitopatologia, em especial Roque Seille pela ajuda nos experimentos de Cancro cítrico.

A amiga Márcia Calixto, em especial, pelos ensinamentos, companheirismo e grande ajuda.

Aos meus queridos amigos do laboratório Weliton, Maria Angélica, Fernando, Rafael, Evandro, Dayse, Suane, Gustavo, Leandro, Rosely, Amancio, Monita e Marines que tanto me ensinaram, me ajudaram e me fizeram crescer, num convívio diário de amizade, respeito, solidariedade e incentivo.

Aos amigos queridos Fernanda Salvador, Angélica, Fernanda, Patrícia, André, Héctor, Eder, Dolorice, Rogério, Marcos, Carol, pelos momentos de risadas, amizade e incentivos.

As minhas amigas queridas Cristiane, Daiana, Kamila, Camila e Ana Luiza pelo incentivo, pelos momentos de descontração e grande amizade.

Ao querido Aigo pelo carinho e companheirismo.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Citrus</i> .....	17
2.2 Cultivares copa.....	17
2.3 Doenças bacterianas: clorose variegada dos citros e cancro cítrico.....	19
2.4 Melhoramento genético e biotecnologia para produção de novos cultivares de citros.....	20
2.5 Hibridação somática via fusão de protoplastos.....	23
2.6 Considerações finais.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Obtenção e estabelecimento de explantes para isolamento de protoplastos.....	29
3.2 Hibridação somática via fusão de protoplastos.....	30
3.2.1 Material vegetal.....	30
3.2.2 Isolamento, purificação, fusão e plaqueamento dos protoplastos.....	31
3.2.3 Cultura dos protoplastos, indução à embriogênese, regeneração e aclimatização de plantas.....	32
3.2.4 Confirmação da hibridação somática.....	35
3.3 Avaliação do híbrido somático laranja ‘Hamlin’ + tangerina ‘Montenegrina’ em relação à resistência à bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	37
3.3.1 Produção das mudas.....	37
3.3.2 Inoculação.....	38
3.3.3 Isolamento primário e quantificação bacteriana.....	40
3.3.4 Análise molecular “Reação de polimerase em cadeia” (PCR).....	41
3.3.5 Análise estatística.....	42

3.4 Avaliação do híbrido somático laranja 'Hamlin' ( <i>C. sinensis</i> ) + tangerina 'Montenegrina' ( <i>C. deliciosa</i> ) em relação à resistência à bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .....	42
3.4.1 Produção de mudas.....	42
3.4.2 Inoculação.....	43
3.4.3 Quantificação de cancro cítrico .....	43
4 RESULTADOS DISCUSSÃO.....	45
4.1 Obtenção e estabelecimento de explantes para isolamento de protoplastos....	45
4.2 Hibridação somática.....	47
4.2.1 Plantas obtidas pela fusão de protoplastos.....	47
4.3 Avaliação do híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' em relação à resistência à bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> .....	57
4.4 Avaliação do híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' em relação à resistência à bactéria <i>Xantomonas axonopodis</i> pv <i>citri</i> .....	60
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS.....	71

## RESUMO

### **Fusão de protoplastos de citros e avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa***

Buscou-se produzir híbridos somáticos entre laranjas doces (*Citrus sinensis*) com tangerinas, mexericas (*C. reticulata*, *C. reshni*, *C. sunki*, *C. deliciosa*), tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) ou tangelo 'Orlando' (*C. reticulata* x *C. paradisi*), além da avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*) + mexerica 'Montenegrina' (*C. deliciosa*) a *Xanthomonas axonopodis* cv. *citri* e *Xylella fastidiosa*. Foram utilizados como fonte de protoplastos calos embriogênicos e folhas coletadas de plântulas germinadas *in vitro* e de plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Após o isolamento, protoplastos provenientes de calos e/ou suspensões embriogênicas foram fundidos quimicamente por polietilenoglicol (PEG) com protoplastos não embriogênicos oriundos de mesófilo foliar. Os calos provenientes da fusão foram induzidos a formação de embriões somáticos para posterior germinação e regeneração de plantas. As plantas regeneradas foram individualizadas, enraizadas ou microenxertadas e aclimatizadas em casa-de-vegetação. A confirmação da hibridação somática foi feita por análise morfológica, análise do DNA com marcadores moleculares do tipo RAPD, determinação da ploidia com a contagem do número de cromossomos e/ou citometria de fluxo. Foram obtidos dois híbridos somáticos do genitor embriogênico laranja 'Hamlin' com os genitores não embriogênicos mexerica 'Montenegrina' e tangerina 'Dancy'. Ambos híbridos somáticos obtidos podem apresentar características complementares dos genitores, podendo ser utilizados diretamente como copa e em programas de melhoramento de copa de citros. O híbrido somático laranja 'Hamlin' com mexerica 'Montenegrina' foi avaliado mostrando resistência a *Xanthomonas axonopodis* cv. *citri* e a *Xylella fastidiosa*.

Palavras-chaves: cancro cítrico, clorose variegada dos citros, melhoramento de cultivares.

## ABSTRACT

### **Citrus protoplast fusion and evaluation of the somatic hybrid 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa***

This research aimed to produce new somatic hybrid combinations between sweet orange (*Citrus sinensis*) with mandarins (*C. reticulata*, *C. reshni*, *C. Sunki*, *C. deliciosa*), tangors (*C. reticulata* x *C. sinensis*) or 'Orlando' tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*), and also evaluate the somatic hybrid 'Hamlin' sweet orange (*Citrus sinensis*) + 'Montenegrina' mandarin (*Citrus deliciosa*) for resistance to *Xanthomonas axonopodis* cv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. Protoplast sources included embryogenic calli or suspension-culture derived calli, and leaves collected from plants cultivated *in vitro* or in screenhouses. After protoplast isolation, embryogenic protoplasts were chemically fused by polyethylene glycol (PEG) with mesophyll-derived non-embryogenic protoplasts. Fusion-derived calli were further cultured to embryo induction, germination, and plant regeneration. Regenerated plants were individually rooted or micrografted, and further acclimated in screenhouse. Somatic hybridization was confirmed by analysis of leaf morphology, molecular analysis by RAPD markers, ploidy determination by chromosome counting or flow cytometry. The production of the somatic hybrids 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin and 'Hamlin' sweet orange + 'Dancy' mandarin was confirmed. These hybrids may have complementary traits from both progenitor and be used directly as scion cultivars or as parental lines in scion improvement programs. 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid was resistant to *Xanthomonas axonopodis* cv. *citri* and *Xylella fastidiosa*.

Keywords: Asian citrus canker, citrus variegated chlorosis, cultivar improvement.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Isolamento, fusão de protoplastos e regeneração de plantas. a) Calo embriogênico, b) assepsia das folhas para o isolamento de protoplastos, c) folha cortada (seta), d)-e) calo embriogênico e folha em solução enzimática, f)-g) purificação dos protoplastos em peneira de nylon (45  $\mu\text{m}$ ), h) gradiente sacarose/manitol (setas bandas com protoplastos), i) 'pellet' de ambos os genitores (seta), j) fusão de protoplastos (seta), protoplastos verdes provenientes de folha e protoplastos claros proveniente de calos (200x), k) embrião somático em fase globular, l) plântula *in vitro*..... 34
- Figura 2 Inoculação da bacteriana de *X. fastidiosa*. a) Suspensão bacteriana em meio de cultura líquido PBS. b) Aplicação de 5 $\mu\text{l}$  de suspensão bacteriana nos pontos marcados das plantas. c) Planta sendo perfurada com um estilete em cada ponto, para a absorção da suspensão bacteriana..... 39
- Figura 3 a) Inoculação por aspersão de ambos lados das folhas com suspensão de *X. axonopodis* pv. *citri* (isolado IBSBF 1421) na concentração de  $10^6$  UFC/mL<sup>-1</sup>. b) Planta inoculada..... 44
- Figura 4 Híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' (planta1). a) Planta mantida em casa de vegetação. b) Análise molecular - Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; colunas 7 a 9 = 'primer' A10; colunas 10 a 12 = 'primer' A7. Colunas 1, 4, 7 e 10 = laranja 'Hamlin'; colunas 2, 5, 8 e 11 = Híbrido somático de laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' e colunas 3, 6, 9 e 12 = tangerina 'Montenegrina'. P = marcador 1 kb. c) Análise citológica confirmando a poliploidia pelo contagem do número de



- cromossomos nas células de raízes, sendo  $2n=4x=36$ . d) Morfologia foliar do genitor laranja 'Hamlin' (esquerda), do híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' (centro) e do genitor tangerina 'Montenegrina' (direita)..... 50
- Figura 5 Híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' (planta2). a) Planta em casa de vegetação. b) Análise molecular - Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; colunas 7 a 9 = 'primer' A10; colunas 10 a 12 = 'primer' A7. Colunas 1, 4, 7 e 10 = laranja 'Hamlin'; colunas 2, 5, 8 e 11 = Híbrido somático de laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' e colunas 3, 6, 9 e 12 = tangerina 'Montenegrina'. P = marcador 1 kb. c) Morfologia foliar do genitor laranja 'Hamlin' (esquerda), do híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' (centro) e do genitor tangerina 'Montenegrina' (direita)..... 51
- Figura 6 Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares dos híbridos somáticos e dos padrões diplóides 2x. P1) Padrão diplóide laranja 'Hamlin' (canal 53). P2) Padrão diplóide tangerina 'Montenegrina' (canal 50). T2) laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' (planta 1) (canal 103). T3) laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' (planta 2) (canal 73 e 98)..... 52
- Figura 7 Híbrido somático laranja 'Hamlin'+ tangerina 'Dancy'. a) Planta em casa de vegetação. b) Análise molecular. Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; 7 a 9 = 'primer' A7. Colunas 1, 4 e 7 = laranja 'Hamlin'; colunas 2, 5 e 8 = Híbrido somático de laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' e colunas 3, 6 e 9 = 'Dancy'. P = marcador 1 kb. c) Morfologia foliar do genitor

- laranja 'Hamlin' (esquerda), do híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' (centro) e do genitor tangerina 'Dancy' (direita)..... 53
- Figura 8 Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares do híbrido somático e dos padrões diplóides 2x. P1) Padrão diplóide laranja 'Hamlin' (canal 53). PB1) Padrão diplóide tangerina 'Montenegrina' (canal 50). T1) laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' (canal 102)..... 54
- Figura 9 Planta tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' (planta 1). a) Planta em casa de vegetação. b) Análise molecular. Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; 7 a 9 = 'primer' A10; colunas 10 a 12 = 'primer' A7. Colunas 1, 4, 7 e 10 = tangor 'Murcote'; colunas 2, 5, 8 e 11 = planta 'Murcote'+ 'Hamlin' e colunas 3, 6, 9 e 12 = laranja 'Hamlin' P = marcador 1 kb. c) Morfologia foliar do genitor tangor 'Murcote' (esquerda), do híbrido tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' (centro) e do genitor laranja 'Hamlin' (direita)..... 55
- Figura 10 Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares planta tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' e dos padrões diplóides 2x. PA3) Padrão diplóide tangor 'Murcote' (canal 50). P1) Padrão diplóide laranja 'Hamlin' (canal 53). T4) tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' (planta 1) (canal 55) As plantas 2, 3 e 4 também obtiveram canal 55..... 56
- Figura 11 a) Plantas de laranja 'Hamlin' mostrando a superfície adaxial das folhas com sintomas da bactéria *X. fastidiosa* causadora da CVC. b) Plantas de laranja 'Hamlin' mostrando a superfície abaxial da folha com sintomas da bactéria *X. fastidiosa* causadora da CVC..... 59
- Figura 12 Severidade do Cancro cítrico em folhas de laranja 'Hamlin' (H), laranja 'Hamlin'+ tangerina 'Montenegrina' (H+MN) e

tangerina 'Montenegrina' (M), 30 dias após a inoculação com suspensão bacteriana ( $10^6$  UFC/mL<sup>-1</sup>) de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. As médias foram calculadas considerando a laranja 'Hamlin' com 100% de severidade..... 61

Figura 13 Lesões de Cancro cítrico: a) laranja 'Hamlin', b) híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Montenegrina' e c) tangerina 'Montenegrina'..... 61

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Desenvolvimento de calos embriogênicos cultivados em meio de cultura EME, com ou sem adição de (5 mg.L <sup>-1</sup> ) 6-benzilaminopurina (BAP).....	46
Tabela 2	Calos embriogênicos obtidos a partir de óvulos abortados em meio de cultura EME (0,146) com e sem BAP (6-benzilaminopurina).....	46
Tabela 3	Porcentagem de plantas de citros positivas para <i>Xylella fastidiosa</i> (isolado CCT6570) por isolamento em meio de cultura e por PCR, 4 e 8 meses após inoculação com suspensão de células bacterianas (8,7 x 10 <sup>10</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> )..	59
Tabela 4	Quantificação populacional de <i>Xylella fastidiosa</i> (isolado CCT6570) em plantas de citros, 4 e 8 meses após a inoculação de uma suspensão de células bacterianas (8,7 x 10 <sup>10</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> ).....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as frutíferas, os citros têm ocupado lugar de destaque nacional e internacional e, entre as frutas cítricas, as laranjas são as produzidas em maior quantidade no mundo. O Brasil ocupa hoje a primeira posição na produção mundial de laranjas, sendo também o maior produtor de suco concentrado do mundo (FAO, 2006), seguido pela China, Estados Unidos e México. O Estado de São Paulo domina tanto a produção de laranja quanto a de lima ácida e tangerinas. Os demais Estados representam 21% da produção nacional de laranjas (BOTEON; NEVES, 2005).

Apesar da importância do Brasil como produtor mundial de citros, a produtividade desta cultura tem sido afetada por problemas fitossanitários e a ausência de maior número de variedades copa e porta-enxerto. A obtenção de variedades melhoradas quanto à tolerância a problemas fitossanitários auxiliaria no desenvolvimento da citricultura. Entretanto, existem dificuldades para os programas de melhoramento tradicional para obtenção destas variedades devido à aspectos da biologia reprodutiva do gênero *Citrus*, tais como, o longo período de juvenilidade, a presença de embriões nucleares (poliembrião), incompatibilidade, esterilidade sexual e alta heterozigose (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; OLIVARES-FUSTER et al., 2005).

A biotecnologia pode colaborar incorporando novas variedades em programas de melhoramento ou, até mesmo, com o lançamento direto de novas variedades. A produção de híbridos somáticos e cíbridos, via fusão de protoplastos, tornou-se uma ferramenta importante nos programas de melhoramento de variedades de citros no mundo. A fusão de protoplastos pode manter a combinação genética de ambos os progenitores envolvidos na hibridação, devido ao fato de não existir segregação meiótica na hibridação somática, resultando na possível expressão aditiva das características dos híbridos, podendo manter-se assim expressos os genes de interesse de ambos os genitores (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). As fases seguintes da obtenção dos híbridos somáticos incluem a propagação das plantas regeneradas para instalação de ensaios que irão confirmar a possível herança genética a resistência ou tolerância a doenças e a condições abióticas.

Visando colaborar com o melhoramento de citros via fusão de protoplastos, buscou-se neste trabalho produzir híbridos somáticos utilizando-se genitores de laranjas (*Citrus sinensis*) com tangerinas, mexericas (*C. reticulata*, *C. reshni*, *C. sunki*, *C. deliciosa*), tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e tangelo 'Orlando' (*C. reticulata* x *C. paradisi*) a fim de combinar características complementares, principalmente de resistência à doenças, para serem utilizados no melhoramento de citros. Além disso, realizou-se avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*) + mexerica 'Montenegrina' (*C. deliciosa*) a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 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 (SOOST; CAMERON, 1975; SWINGLE; REECE, 1967). O número básico de cromossomos é  $x = 9$ , sendo a diploidia ( $2n = 2x = 18$ ) a condição mais freqüente do gênero *Citrus* (MOREIRA; PIO, 1991). São representados por plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos contendo vesícula preenchidas por um suco de grande interesse comercial (ARAÚJO et al., 2005). As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e polinização cruzada, e assexuadamente, de apomixia nucelar (MACHADO et al., 2005).

A maioria dos estados brasileiros cultiva frutas cítricas. Entretanto, São Paulo domina tanto a produção de laranja como a de lima ácida 'Tahiti' e tangerinas. A instalação de um parque industrial voltado ao mercado externo de suco e a proximidade das metrópoles nacionais de maior poder aquisitivo tornou São Paulo o maior pólo mundial citrícola. Os demais Estados representam 21% da produção nacional de laranjas – com destaque para Bahia, Sergipe, Minas Gerais e Paraná. O foco comercial da cadeia é a produção e comercialização industrial da laranja. Atualmente, 70 a 80% da produção paulista destina-se a industrialização. Na produção de suco, 98% do volume é vendido ao mercado internacional, com a maior parte sendo engarrafada pelas empresas européias e norte-americanas (BOTEON; NEVES, 2005).

### 2.2 Cultivares copa

Os cítricos utilizados em plantios comerciais como variedades copa estão, basicamente, distribuídos em laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas, pomelos e outras de menor importância comercial. Em todas as épocas da história da citricultura, pouca diversidade de variedades pôde ser notada. A citricultura nacional se vem mostrando bastante vulnerável aos diversos problemas fitossanitários que tem surgido

ao longo da sua história. As laranjas (*C. sinensis*) predominam na maioria dos países citrícolas com, aproximadamente, dois terços dos plantios, ficando o restante para as demais espécies. No Brasil, e particularmente no Estado de São Paulo, elas encontram, de maneira geral, boas condições edafoclimáticas para cultivo comercial. Dentre as laranjas comerciais destacam-se 'Pêra', 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' (PIO et al., 2005). O cultivar 'Hamlin' se destina principalmente ao mercado externo e a industrialização (FIGUEIREDO, 1991), apresenta maturação precoce e as plantas são muito produtivas. Alguns países cultivam laranja 'Hamlin', entre eles Estados Unidos, Brasil e África do Sul.

As tangerinas e seus híbridos constituem um grupo bastante diversificado. Apesar de toda essa diversidade, o cultivo de tangerinas vem, ao longo dos anos, baseando-se em um pequeno número delas. Na década de sessenta, os plantios de tangerina 'Cravo' (*C. reticulata*) eram representativos, vindo a decrescer para cerca de 20% nos anos noventa. Em 2000, as tangerinas representavam cerca 4% do total de plantas cítricas existentes no Estado de São Paulo. Duas delas mantêm-se com expressividade nos plantios tangerina 'Ponkan' (*C. reticulata*) e tangor 'Murcote' (*C. sinensis* x *C. reticulata*). As demais, 'Mexerica-do-rio' (*C. deliciosa*) e, principalmente a tangerina 'Cravo', representam níveis baixos de expressividade (PIO et al., 2005). Dentre as mexericas (*C. deliciosa*) cultivadas no Brasil, tem-se a tradicional 'Mexerica-do-rio' e a 'Montenegrina' (PIO et al., 2005). A 'Montenegrina', surgiu de mutação ou recombinação no progênie nuclear ou zigótica da variedade 'Caí' nome regional da 'Mexerica-do-rio'. Apesar da 'Montenegrina' ser em média, menos produtiva que as demais mexericas, seu cultivo se tem expandido em função de ser tardia permitindo a ampliação do período de safra e à qualidade dos frutos, sendo algumas das características, as quais tornam vantajosas para uso como genitores no melhoramento genético, a mexerica 'Montenegrina' é também conhecida como mexerica 'Tardia da Sicília' (RODRIGUES; DORNELES, 1999).



### 2.3 Doenças bacterianas: clorose variegada dos citros e cancro cítrico

Muitas doenças prejudicam a citricultura mundial. Duas doenças bacterianas são graves no Brasil: o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e a clorose variegada dos citros (CVC) (*Xylella fastidiosa*) (FEICHTENBERGER, 2000) que estão sendo responsáveis, indiretamente, pela diminuição do rendimento citrícola brasileiro.

A CVC foi constatada em pomares brasileiros em 1987, no Norte de São Paulo, reduzindo a produção e o tamanho dos frutos das principais variedades de laranjas. A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (WELLS et al., 1987), transmitida e disseminada por cigarrinhas que, depois de instalada na planta, se multiplica e obstrui os vasos do xilema (ALMEIDA et al., 2001). A obstrução causa sintomas típicos, em ramos, folhas e diminuição do tamanho dos frutos, tornando inviáveis para o consumo. Além dos prejuízos que causa, trouxe a necessidade de reestruturação das técnicas de produção de mudas, a obrigatoriedade do monitoramento dos vetores da doença nas regiões mais afetadas, a utilização de podas de ramos com sintomas e a busca de variedades resistentes (LARANJEIRA, 1997). As laranjas aparecem como os hospedeiros mais suscetíveis de *X. fastidiosa*. Tangerinas e seus híbridos podem apresentar sintomas em condições de campo, embora numa intensidade bem menor que as laranjas (PIO et al., 2005). Laranjeira et al. (1998) observaram que cultivares como a 'Mexerica-do-rio' (*C. deliciosa*) não são fontes de inóculo à CVC pela ausência de sintomas em folhas e/ou frutos em condições de campo.

O cancro cítrico foi descrito pela primeira vez nos EUA, em 1915. A doença é originária da Ásia, onde ocorre endemicamente em todos os países produtores (PIO et al., 2005). O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, foi introduzido no Brasil em 1957, na região de Presidente Prudente (SP). Algumas das conseqüências da doença são quedas de folhas e frutos e diminuição de produção. Em órgãos jovens das plantas, a bactéria causadora do cancro cítrico pode penetrar por aberturas naturais dos tecidos de folhas, ramos e frutos; já em folhas, frutos e ramos desenvolvidos, ela penetra através de ferimentos (PIO et al., 2005). As perdas causadas dependem da severidade da doença, mas envolvem basicamente a desfolha com conseqüente destruição das plantas e queda prematura dos frutos, além da

depreciação de seu valor comercial pela presença de lesões (LEITE JUNIOR, 1990). Com a constatação da bactéria nas áreas de plantio, torna-se necessário fazer-se a erradicação do foco e plantas adjacentes, previsto em lei federal (FUNDECITRUS, 1997). Cultivares com adequado nível de resistência ao cancro cítrico são fundamentais para o estabelecimento de novos plantios em regiões onde *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* tenha sido erradicada, bem como em outras áreas que estejam sendo cultivadas com citros. Ampla variação nos níveis de resistência ao cancro cítrico entre espécies, híbridos e cultivares de *Citrus* são constatadas. Leite Junior (1990) relata que laranja 'Hamlin' é suscetível e a tangerina 'Mexerica-do-rio' é moderadamente resistente a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, considerando a incidência da doença em folhas e frutos. Experimentos de inoculação artificial do patógeno em plantas tetraploides e híbridos triplóides limaquat 'Lakeland' x lima 'Key' + laranja 'Valencia' e limaquat 'Lakeland' x laranja 'Hamlin' + limão 'Feminello' confirmaram resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (VILORIA et al., 2004). O desenvolvimento de variedades cítricas de resistência a doenças é ainda a forma mais econômica e eficiente de controlar doenças como o cancro cítrico e a CVC (COLETTA FILHO; MACHADO, 2002).

#### **2.4 Melhoramento genético e biotecnologia para produção de novos cultivares de citros**

Os primeiros programas de melhoramento de citros foram iniciados na Flórida, em 1893, com Swingle e Webber. Desde então, numerosos programas foram desenvolvidos com diversos objetivos (DAVIES ; ALBRIGO, 1994).

Os programas de melhoramento genético em citros são divididos em duas categorias: o melhoramento para variedades copa e para variedades de porta-enxerto. Isto se deve ao fato da planta cítrica ser constituída por dois indivíduos distintos: copa, e o porta-enxerto. Desta forma, cada categoria deve ter objetivos específicos (POMPEU JUNIOR, 1991).

No melhoramento para variedades copa, o destaque deve ser dado a características como, a produtividade, qualidade de frutos e resistência a pragas e

doenças. Além disso, especial atenção deve ser dada a produção de frutos com ausência de sementes ou com baixo número delas (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1978). Para o melhoramento de variedades porta-enxerto deve-se focar, além de resistência a pragas e doenças, a tolerância a adversidades climáticas e edáficas (GROSSER et al., 1998b).

O melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa, devido à descontinuidade nos programas estabelecidos e a fatores biológicos característicos da espécie como, por exemplo, longos ciclos de reprodução, juvenilidade, poliembrião nucelar (apomixia), alta heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade gametofítica e poliploidia (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; LING et al., 1989).

A alta heterozigose dos citros é atribuída a frequentes mutações vegetativas, alto índice de infertilidade nos cruzamentos e a embrião nucelar (MOREIRA; PIO, 1991). Muitos híbridos produzidos naturalmente no campo são perpetuados pela embrião nucelar (DAVIES; ALBRIGO, 1994) e são fatores contribuintes para a falta de conhecimento e dificuldade de estudos genéticos dos citros.

A apomixia ou embrião nucelar representa um dos maiores obstáculos para programas de melhoramento via hibridação sexual em citros. Os embriões nucleares competem com o embrião zigótico por espaço e nutrientes nas sementes em desenvolvimento resultando, freqüentemente, na perda do embrião zigótico. Para Grosser; Gmitter Junior (1990a) o efeito mais marcante da poliembrião está na ausência ou na produção de poucas plantas híbridas a partir de cruzamento controlados.

A poliploidia é um dos fatores que interferem na já complexa transmissão de caracteres. O número básico de nove cromossomos aparece em algumas variedades, não somente multiplicado por dois, mas também em maior número, como ocorre com as formas tetraplóides e triplóides (IWAMASA; NITO, 1988). Segundo Moreira; Pio (1991), as plantas tetraplóides ( $2n=4x=36$  cromossomos) apresentam as folhas maiores na largura, mais espessas e a coloração tende a ser mais escura.

A partenocarpia, desenvolvimento de frutos sem fertilização levando à formação de frutos sem sementes, ocorre em citros devido à esterilidade gamética ou auto-

incompatibilidade. A esterilidade gametofítica e a auto-fecundação têm sido, juntamente com a triploidia, as principais causas do aparecimento de frutos sem sementes (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; VARDI; GALUN, 1989).

A maioria das espécies de citros tem longo período juvenil, levando cinco ou mais anos até a primeira floração (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) e de 10 a 15 anos para que possam ser bem avaliadas as características de produção e qualidade dos frutos. Isso torna o melhoramento de citros atividade de longo prazo, caro, além de exigir grande extensão de terra (DAVIES; ALBRIGO, 1994; KOLLER, 1994).

Os desafios ao melhoramento de citros persistem, apesar de todo avanço em produção no Brasil e no mundo. A necessidade de ampliação das bases genéticas atuais dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente, impõem a necessidade de desenvolver programas de melhoramento (MACHADO et al., 2005). A biotecnologia vem contribuindo, em vários aspectos, para facilitar a utilização da variabilidade disponível, incorporando novas variedades em programas de melhoramento ou, até mesmo, com o lançamento direto de novas variedades (GROSSER et al., 1996a; OLLITRAUT; LURO, 1995). Dentre as ferramentas biotecnológicas destacam-se a hibridação somática, transformação genética, cultura de tecidos e a biologia molecular, (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a).

A regeneração de plantas, por organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro*, é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento genético (GMITTER JUNIOR et al., 1992). Em citros, protocolos de cultura de tecidos encontram-se descritos para um grande número de espécies e gêneros relacionados, permitindo-se hoje que a técnica de hibridação somática seja parte integrante de programas de melhoramento em vários países (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a).

## 2.5 Hibridação somática via fusão de protoplastos

Segundo Carneiro et al. (1998), são denominados protoplastos as células vegetais desprovidas de parede celular e a ausência da parede celular permite realizar diversas manipulações experimentais, tais como a extração de organelas celulares, a produção de híbridos somáticos e a transferência gênica via transformação genética.

Protoplastos podem ser isolados de várias fontes, como de folhas, tétrades de flores (para protoplastos haplóides), calos embriogênicos, não embriogênicos e culturas embriogênicas em suspensão, sendo esta a fonte mais apropriada para a obtenção de protoplastos com potencial embriogênico (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). Segundo estes autores, um dos genitores utilizado na fusão de protoplastos deve ter alta capacidade embriogênica, para o sucesso do processo de regeneração das plantas via embriogênese somática a partir de calos, sendo esta uma das limitações da técnica.

O método mais utilizado para isolamento dos protoplastos consiste na digestão enzimática da parede celular. A parede celular dos vegetais é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e pectina. Segundo Carneiro et al. (1998), as preparações comerciais das enzimas constituem-se de frações parcialmente purificadas de extratos de microrganismos, os quais possuem atividades celulolítica, hemicelulolítica ou pectocelulolítica. As enzimas mais comumente utilizadas tem sido a celulase Onozuka R10, a pectinase Macerozyme R10 e a celulase Dresilase, extraídas, respectivamente, dos microrganismos *Trichoderma viridae*, *Rhizopus* sp. e *Ipex lacteus*.

As primeiras pesquisas envolvendo o estudo da regeneração de plantas cítricas a partir de protoplastos foram realizados no início da década de 70, quando Kochba et al. (1972) relataram a produção de calos embriogênicos de laranja 'Shamouti' (*C. sinensis*), a partir da cultura de óvulos. Vardi et al. (1975) isolaram protoplastos totipotentes, os quais, cultivados em meios de cultura apropriados, permitiram a obtenção de calos e a recuperação de embriões. A partir daí, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos, relatando a regeneração de plantas a partir de protoplastos de *Citrus*.

Os métodos mais usados para induzir as fusões de protoplastos incluem: aplicação de corrente elétrica (eletrofusão) (ZIMMERMAN, 1982), o tratamento químico

com polietilenoglicol (PEG) (KAO; MICHAYLUK, 1974; NEGRUTIU et al., 1986) e também o método eletroquímico (OLLIVARES-FUSTER et al., 2005). Estas técnicas têm como princípio favorecer a agregação de protoplastos, que normalmente se repelem por causa das cargas negativas da membrana plasmática, e induzir a instabilidade das membranas (BENGOCHEA; DODDS, 1986).

**PEG (polietilenoglicol):** É o método mais utilizado em citros (PIO et al., 2005). Este método permite fácil determinação da eficiência da fusão já que heterocariontes podem ser facilmente identificados pela presença de marcadores distintos de ambas fontes de genitores (corpos amiláceos dos protoplastos derivados de culturas embriogênicas e cloroplastos de protoplastos derivados de folhas). Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a), esta técnica é eficiente, barata e não influencia na viabilidade dos protoplastos.

**Eletrofusão:** Na eletrofusão, os protoplastos são submetidos a um campo de corrente alternada de baixa voltagem e, subsequentemente, à aplicação de um ou mais pulsos de corrente contínua de alta intensidade, alinhando os protoplastos e gerando poros temporários nas membranas que permite a fusão dos protoplastos que estiverem mais próximos (CARNEIRO et al., 1998). Este processo é também adaptado para a hibridação somática de *Citrus* por diferentes grupos (GUO; DENG, 1998; OLLITRAULT et al., 1996). Estes autores preferem utilizar a técnica da eletrofusão na hibridação somática, por permitir a obtenção de um maior número de protoplastos envolvidos em fusão do que o método químico, com PEG, além de uma melhor reprodutividade dos resultados. Entretanto, esta técnica requer o uso de aparelhos de alto custo, o que limita a sua aplicação em larga escala.

**Eletroquímica:** Segundo OLLIVARES-FUSTER et al., (2005) é um método novo que incorpora as vantagens dos dois processos baseando na agregação química de células com uma baixa concentração de PEG e a subsequente aplicação de pulsos de corrente contínuo. A aplicação deste protocolo é direta e os resultados são consistentes com respeito à formação de heterocários e desenvolvimento pós-fusão, sendo um método eficiente de regeneração de híbridos somáticos e cíbrido de *Citrus*.

A hibridação somática de protoplastos de plantas é uma técnica pela qual as propriedades celulares podem ser modificadas mediante fusões nucleares e/ou

citoplasmáticas (CARNEIRO et al., 1998) gerando uma variabilidade genética adicional. A técnica consiste no isolamento e fusão de protoplastos (células sem parede celular) com a possível produção de híbridos tetraplóides heterozigotos, ou alotetraplóides (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; GROSSER et al., 1998a).

Os protoplastos após tolerarem a indução a fusão de protoplastos são cultivados em meio nutritivo, para estimular a regeneração da parede celular e divisão das células (CARNEIRO et al., 1998). Em cultura, as células se dividem formando colônias e, por meio de variações na composição do meio, densidade celular, frequência de subcultura, condições adequadas de temperatura e luminosidade, pode-se regenerar plantas por embriogênese somática (GRAMBOW et al., 1972).

A confirmação da hibridação somática é realizada em cada planta regenerada, com base na morfologia foliar (espessura e formato), análise de DNA tipo RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), determinação da ploidia com a contagem do número de cromossomos onde é esperado que híbridos somáticos alotetraplóides de citros tenham 36 cromossomos, sendo 18 cromossomos de cada um dos genitores diplóides (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; PIO, et al., 2005) e pela citometria de fluxo (CHENG et al., 2003).

Segundo Grosser; Gmitter Junior (1990a) a hibridação somática tem vantagens sobre a hibridação sexual para o melhoramento de citros, pois permite combinar genitores com possíveis características complementares sem perda significativa do vigor, resultando na provável expressão aditiva das características dominantes nos híbridos. Este é um processo que combina os genomas nucleares de ambos os genitores. Em contraste à hibridação sexual, em que a herança citoplasmática é predominantemente maternal, os híbridos somáticos permitem a contribuição de ambos os genitores (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b).

Os híbridos somáticos apresentam a vantagem de serem alotetraplóides, mantendo os genes dos genitores por não haver segregação meiótica. A hibridação somática tem sido extensivamente aplicada (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; 1990b), favorecendo o desenvolvimento de híbridos interespecíficos (TUSA et al., 1990); intergenéricos de genitores sexualmente compatíveis (DENG et al., 1992;

GROSSER et al., 1988a), intergenéricos de genitores sexualmente incompatíveis (GROSSER et al., 1988b; LING; IWAMASA, 1994) e cíbridos (GROSSER et al., 1996a).

No melhoramento de variedades copa os produtos da hibridação somática podem apresentar potencial para serem utilizados diretamente como copa. Segundo Guo et al., (2004) e Grosser; Gmitter Junior, (2005a) híbridos somáticos tetraploides produziram frutos de boa qualidade, alguns deles apresentaram ausência de sementes ou poucas sementes. Os híbridos também podem ser incorporados ao melhoramento como genitor tetraplóide ( $2n=4x=36$  cromossomos), em cruzamento com variedades diplóides monoembriônicas ( $2n=2x=18$  cromossomos), gerando progênie triplóide ( $2n=3x=27$  cromossomos) (MOURÃO FILHO et al., 1996), potencialmente sem sementes, devido à ausência de complementos cromossômicos não balanceados durante a segregação meiótica, como é o caso do cruzamento de tangelo 'Nova' com o híbrido somático tangelo 'Nova' + laranja 'Succari' (GROSSER et al., 1998b).

Ohgawara et al. (1985) desenvolveram os primeiros trabalhos com a produção de híbridos somáticos a partir do isolamento de protoplastos de *Citrus*, tendo conseguido regenerar uma planta híbrida a partir da fusão de protoplastos de calos embriogênicos de laranja 'Trovia' (*C. sinensis*) com protoplastos de folhas de *Poncirus trifoliata*. O primeiro híbrido interespecífico foi produzido entre laranja (*C. sinensis* cv. 'Washington Navel') e tangerina 'Satsuma' (*C. unshiu* cv. 'Hayashi') (KOBAYASHI et al., 1988b). A partir daí, mais de 250 de híbridos somáticos intergenéricos e interespecíficos já foram produzidos no mundo, contribuindo para o melhoramento de copa e porta-enxerto com resultados promissores (GROSSER et al., 2000a; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005b). Entre estes citam-se os híbridos intergenéricos tangelo 'Nova' + *C. ichangensis* (GROSSER et al., 1996b), kunquat 'Mame' + *P. trifoliata* (MIRANDA et al., 1997), tangelo 'Page' + *Murraya paniculata* L. Jack (GUO; DENG, 1998), laranja 'Hamlin' + *Microcitrus papuana*, laranja 'Succari' + kunquat 'Meiwa' (GROSSER et al., 1996b), laranja 'Valência' + citrange 'Carrizo' (LOUZADA et al., 1992) e híbridos interespecíficos como laranja 'Hamlin' + tangerina 'Ponkan', laranja 'Valência' + tangor 'Murcote' (GROSSER et al., 1998b), laranja 'Washington Navel' + tangor 'Murcote' (KOBAYASHI et al., 1988a), laranja 'Washington Navel' + tangerina



'Satsuma' (KOBAYASHI et al., 1988b) e de lima 'Key' (*C. aurantifolia*) + laranja 'Valência' (GROSSER et al., 1989).

O Brasil vem contribuindo no melhoramento genético de citros com a produção de híbridos somáticos desde 1996, no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da USP/ESALQ e Laboratório de Biotecnologia Vegetal USP/CENA, onde já foram produzidos os híbridos de laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' (MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2000), tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda (BENEDITO et al., 1999), laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso da Flórida', limão 'Cravo' + laranja azeda (MENDES et al., 2001), tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', laranja 'Valência Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Valência Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Valência' cv. 63 + *Fortunella obovata* (COSTA et al., 2003), laranja 'Hamlin' + pomelo 'Indian red' e laranja 'Hamlin' + pomelo 'Singapura' (CALIXTO et al., 2004). Outros grupos de pesquisa têm se dedicado à hibridação somática, em países como Estados Unidos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005a), Nova Zelândia (WU et al., 2005), Espanha (OLIVARES-FUSTER, 2005) contribuindo para o melhoramento genético das espécies cítricas.

As fases seguintes da obtenção dos híbridos somáticos incluem a instalação de ensaios que irão confirmar possíveis heranças genéticas de resistência e tolerância à doença e às condições abióticas. Plantas de laranja 'Valência Rohde Red', sobre porta-enxerto híbrido somático de laranja azeda + lima da Pérsia, produziram mais frutos do que aquela variedade sobre laranja azeda, ainda que as plantas com híbridos tivessem metade do tamanho das árvores com laranja azeda (GROSSER; CHANDLER, 2000). Frutos do híbrido somático laranja 'Valência' + tangor 'Murcote' apresentaram poucas sementes, frutos de boa qualidade e com características de ambos os genitores. O fruto do híbrido somático laranja 'Sucarri' + tangelo 'Page' não apresentaram sementes, excelente qualidade interna, o fruto se parece muito com a laranja, mas é fácil de descascar (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005a).

## 2.6 Considerações finais

Os citros ocupam uma posição de destaque entre as frutíferas, por isso a demanda por pesquisas visando melhoria da cultura é crescente, seja no aspecto fitossanitário ou de qualidade da fruta produzida. Apesar da liderança brasileira na citricultura, a cultura é muito afetada por problemas fitossanitários, contribuindo para reduções de safras nos anos recentes.

A obtenção de variedades melhoradas quanto à tolerância a problemas fitossanitários auxilia no desenvolvimento da citricultura, entretanto, existem dificuldades para os programas de melhoramento para obtenção destas variedades devido a aspectos da biologia reprodutiva do gênero *Citrus*.

Utilizando-se a biotecnologia, tem-se conseguido ultrapassar barreiras naturais ao melhoramento dos citros, contribuindo desse modo com programas de melhoramento convencional e auxiliando no desenvolvimento de variedades com características superiores. A produção de híbridos somáticos de citros e cíbridos, via fusão de protoplastos a fim de combinar características complementares de ambos os genitores, tornou-se uma ferramenta importante nos programas de melhoramento de variedades de citros no mundo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de obtenção de protoplastos, hibridação somática e confirmação da hibridação foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP).

#### 3.1 Obtenção e estabelecimento de explantes para isolamento de protoplastos

Óvulos abortados foram extraídos de frutos maduros de laranjas ‘Valência’, ‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Hamlin’, ‘Baianinha’, ‘Pêra Vacinada’, ‘Lima Verde’, ‘Sanguínea’, ‘Lima’, ‘Abacaxi’, ‘Westin’, ‘Barão’ e ‘Rubi’ (*C. sinensis*); tangor ‘Murcote’ (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e tangerina ‘Cravo’ (*C. reticulata*) coletados de plantas matrizes da coleção de cultivares do Departamento de Produção Vegetal, da ESALQ/USP, e do Banco de Germoplasma do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, em Cordeirópolis-SP.

Após a desinfestação com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 3:1 (v/v), por 20 min, seguida de três lavagens em água deionizada e autoclavada, introduziram-se 25 óvulos por placa de petri (60x100 mm) contendo o meio de cultura EME (0,146 M) (anexo), todos os cultivares de laranjas, tangerina ‘Cravo’ e tangor ‘Murcote’ já citadas foram introduzidas neste meio acrescido de 5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e também sem acréscimo de BAP, para indução à formação de calos embriogênicos, incubados no escuro, a 27°C. Os calos originados foram transferidos para os meios de cultura EME 0,146 M e H+H (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) (anexo), acrescidos de 500 mg.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, sem regulador vegetal. Para manutenção, os calos foram subcultivados a cada quatro semanas.

Para o estabelecimento e cultivo de células em suspensão, pequenas porções dos calos de cada cultivar (cerca de 500 mg) foram introduzidas em Erlenmeyers contendo o meio de cultura líquidos EME 0,146 M ou H+H (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a), incubados no escuro, a 27 °C, sob agitação de 100 rpm.

Para a manutenção das células em suspensão, as culturas foram subcultivadas a cada 14 dias, nos meios EME 0.146 M ou H+H (GROSSER; GMITTER JUNIOR,

1990a), sem a adição de regulador vegetal. Tais suspensões foram utilizadas como fonte de protoplastos somente após oito semanas de cultivo.

Cultivares utilizados para isolamento de protoplastos não embriogênicos foram obtidos a partir de plantas germinadas de sementes de frutos maduros de laranjas 'Hamlin', 'Valência' e 'Pêra' (*C. sinensis*); tangerinas 'Ponkan', 'Cravo', 'Caçula', 'Sunchushakat' e Dancy (*C. reticulata*); mexerica 'Montenegrina' (*C. deliciosa*); tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni*); tangerina 'Sunki' (*C. sunki*), tangores 'Ellendale', 'Murcote' e 'Fortune' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e tangelo 'Orlando' (*C. reticulata* x *C. paradisi*) coletados de plantas matrizes da coleção de cultivares do Departamento de Produção Vegetal, da ESALQ/USP, e do Banco de Matrizes do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira", em Cordeirópolis-SP. Estas plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação ou *in vitro*. Para a introdução do material *in vitro*, as sementes foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 20 min, seguido por 3 lavagens em água deionizada autoclavada de 5 min cada e introduzidas em meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) suplementado com 25 g. L<sup>-1</sup> de sacarose.

### **3.2 Hibridação somática via fusão de protoplastos**

#### **3.2.1 Material vegetal**

Protoplastos foram isolados de calos embriogênicos (Figura 1a) e de mesófilo foliar de plantas cultivadas em casa-de-vegetação ou *in vitro*, de variedades de laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas, mexericas (*C. reticulata*, *C. reshni*, *C. sunki*, *C. deliciosa*), tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*).

As plantas cultivadas em casa-de-vegetação foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, contendo três gotas de detergente, por 20 min, seguido por três enxágues em água deionizada autoclavada de 5 min cada (Figura 1b). Cerca de quatro folhas foram utilizadas para o isolamento de protoplastos, sendo cortadas (Figura 1c) para aumentar a superfície de contato com a solução enzimática. Para

calo em células e suspensão foram utilizadas cerca de 500 mg no isolamento dos protoplastos.

### **3.2.2 Isolamento, purificação, fusão e plaqueamento dos protoplastos**

A metodologia utilizada no isolamento, fusão, cultura de protoplastos e regeneração de plantas, a partir de células embriogênicas, derivadas de calos ou culturas de suspensões celulares, com protoplastos não-embriogênicos de mesofilo foliar foi descrita por Grosser; Gmitter Junior (1990a), com algumas modificações (MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2000). Para o isolamento de protoplastos foi utilizada solução enzimática (anexo) composta por celulase Onozuka R.S., 1% (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.), macerase R10 1% (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.) e pectoliase Y-23 0,2% (Seishin) (GROSSER; CHANDLER, 1987), dissolvidas em solução de manitol (0,7 M),  $\text{CaCl}_2$  (24,5 mM),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,92 mM), ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico MES (6,15 mM), e meio de cultura BH3 (0,7 M) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) (anexo). Para calo e células em suspensão uma proporção de 1:1 de BH3 (0,7 M):solução enzimática (Figura 1d). Para folha foi utilizado uma proporção de 2,5:1 de BH3 (0,7 M):solução enzimática (Figura 1e) . Os protoplastos foram incubados por 14-15 h, sob agitação a 40 rpm no escuro.

A purificação dos protoplastos foi realizada através da passagem dos protoplastos por peneira de nylon de 45  $\mu\text{m}$  (Figura 1f, g) e centrifugações a 100 g (700 rpm) por 5 a 10 min, para retirada da solução enzimática. Nova centrifugação foi realizada em gradiente de sacarose (25%)-manitol (13%) em meio de cultura CPW (FREARSON et al, 1973) (anexo) (Figura 1h), com o objetivo de remover os restos celulares não digeridos. As bandas do gradiente sacarose/manitol foram colocadas em igual volume de ambos os protoplastos a um tubo contendo 5.mL<sup>-1</sup> de BH3. E após nova centrifugação, foi possível coletar o 'pellet' (Figura1i). O 'pellet' foi diluído para a densidade de 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos por mL e misturados, a seguir, igual volume de ambos protoplastos.

Para que ocorra a fusão, duas gotas da mistura de protoplastos foram colocadas em placas de Petri descartáveis (58 x 15 mm), e a fusão é feita pelo método químico,

utilizando solução de 26,6 mM de polietilenoglicol (PEG) (PM=1450) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) (anexo) (Figura 1j). Após a fusão, foram feitas lavagens com solução de eluição A+B (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) (anexo) e três lavagens em meio de cultura BH3 0,7 M e os protoplastos foram plaqueados em meios de cultura líquido BH3 0,7M e EME 0,7 M (anexo).

### **3.2.3 Cultura dos protoplastos, indução à embriogênese, regeneração e aclimatização de plantas**

Às microcolônias originadas, foram acrescentadas 10 a 12 gotas do meio de cultura 1:1:1 (v:v:v) (anexo), composto por 1 parte de BH3, 1 parte de meio EME (0,6 M) e 1 parte de EME (0,146 M), com o objetivo de iniciar a redução do potencial osmótico do meio. Em subcultivos posteriores (a cada 20 a 30 dias), posterior redução do potencial osmótico foi complementada pela adição de 1-2 ml da mistura 1:2 (v:v) (anexo) de meio BH3:EME (0,146 M) por placa.

Os microcalos originados foram transferidos para o meio de indução a calos, constituído pelo meio EME (0,146 M) (anexo) modificado pela substituição da sacarose por 13 g.L<sup>-1</sup> (37 mM) de maltose (BENEDITO et al., 2000). Em aproximadamente um mês, os microcalos originaram calos e foram subcultivados a intervalos de quatro semanas. Após aproximadamente 3 subcultivos, os calos originaram pequenos embriões (Figura 1k), que foram isolados dos calos e transferidos para meio de cultura EME (anexo) contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Este meio de cultura foi renovado a cada 15 dias. Embriões foram transferidos para meio de expansão, constituído pelo meio EME (anexo) modificado pela adição de 1,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte (meio 1500, GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) (anexo), e posteriormente para meio de germinação e alongamento, constituído pelo meio EME, modificado pela adição de 25 g.L<sup>-1</sup> sacarose, acrescido de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), onde permaneceram até a emissão das primeiras folhas (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). Os embriões germinados originaram plântulas (Figura 1l) que, posteriormente, foram enraizadas em meio de enraizamento RMAN (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a) (anexo) ou microenxertadas e posteriormente aclimatizadas.

As plantas enraizadas foram aclimatizadas, primeiramente, em sala-de-crescimento, sob condições controladas. As plantas foram transferidas para vasos contendo substrato comercial Rendmax<sup>®</sup> autoclavado, tendo sido cobertas com saco plástico. Com o intuito de manter a umidade relativa alta no ambiente de aclimatização das plantas, o saco plástico foi umedecido duas a três vezes por dia, sendo retirado por um período de 5 min, objetivando a adaptação da planta ao ambiente. Ao longo do tempo, este período foi aumentando até a completa retirada do saco plástico dos vasos.

As plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, onde foram cultivadas em substrato comercial Rendmax<sup>®</sup> misturado com adubo Osmocote<sup>®</sup> (22-4-7 N-P-K) (200 g do adubo para cada 25 kg).

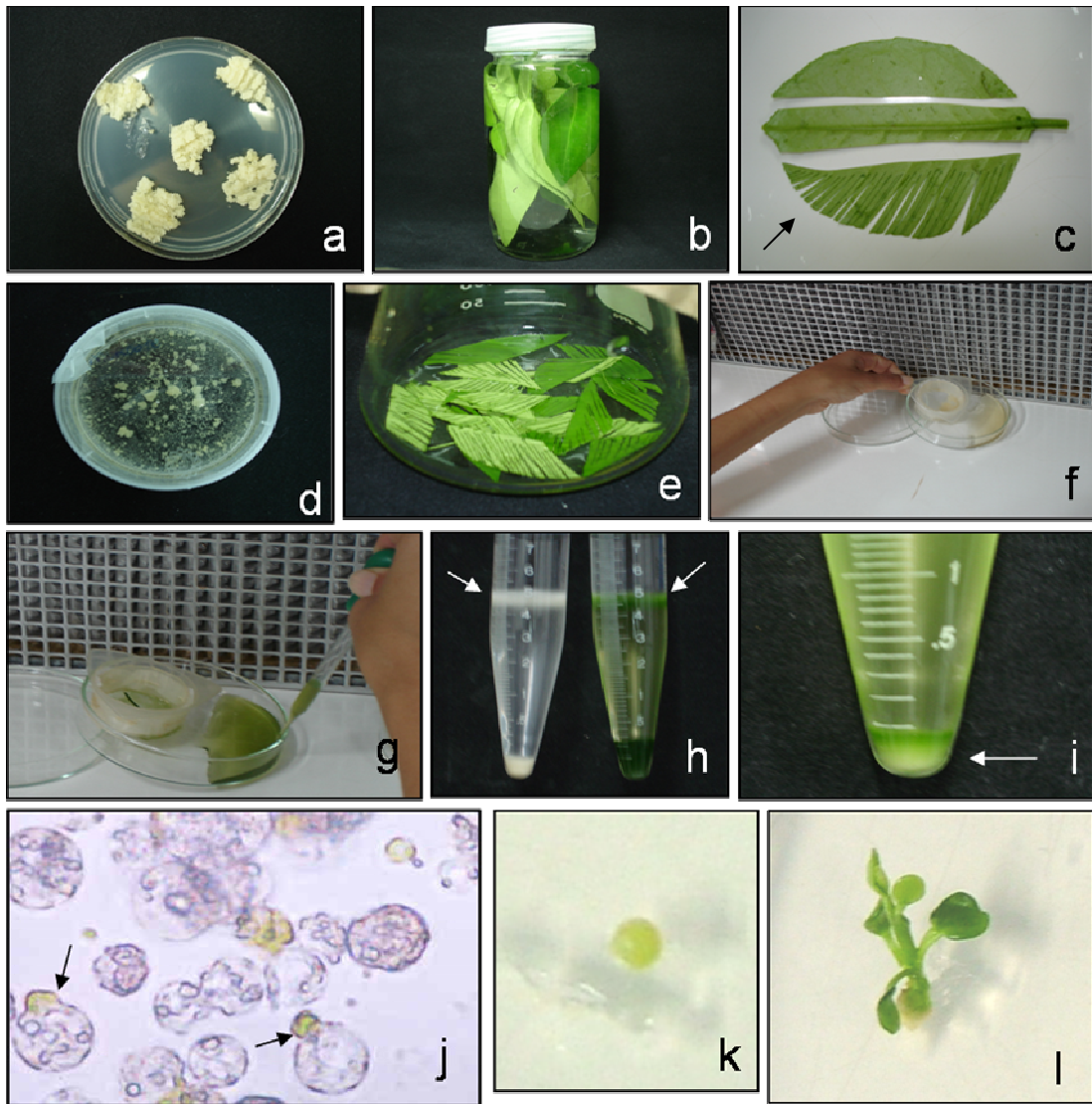


Figura 1 - Isolamento, fusão de protoplastos e regeneração de plantas. a) Calo embriogênico, b) assepsia das folhas para o isolamento de protoplastos, c) folha cortada (seta), d)-e) calo embriogênico e folha em solução enzimática, f)-g) purificação dos protoplastos em peneira de nylon (45  $\mu\text{m}$ ), h) gradiente sacarose/manitol (setas bandas com protoplastos), i) 'pellet' de ambos os genitores (seta), j) fusão de protoplastos (seta), protoplastos verdes provenientes de folha e protoplastos claros proveniente de calos (200x), k) embrião somático em fase globular, l) plântula *in vitro*



### **3.2.4 Confirmação da hibridação somática**

#### **Análise morfológica das plantas regeneradas**

A confirmação da hibridação somática foi realizada pela análise morfológica, determinação da ploidia e análise molecular.

A análise morfológica ocorreu por meio de comparação das características dos genitores e da planta obtida por fusão de protoplastos.

#### **Determinação da ploidia: Contagem do número de cromossomos**

A contagem do número de cromossomos de células meristemáticas de pontas de raízes mitoticamente ativas da planta regenerada foi realizada de acordo com a metodologia de Vieira et al. (1993). Foram coletadas pontas de raiz e em seguida colocadas em solução de 8-hidroxiquinolina 3%, por três horas, a temperatura ambiente. Após esse tratamento, o material foi fixado em álcool etílico e ácido acético (3:1 v/v) por cerca de dezoito horas e, em seguida, as raízes foram lavadas em água destilada (4-5 x). Para proceder a coloração, o material foi transferido para solução de HCl 1 N, em banho-maria a 60 °C, por 8 min, seguido de 4 a 5 lavagens com água destilada. Após as lavagens acrescentou-se o corante reativo de Schiff (fucsina-leucobásica) por 45 min. Após lavagem em água corrente, as pontas de raízes foram esmagadas em carmim acético a 1% para o preparo das lâminas. As lamínulas foram removidas em ácido acético a 45%, após o preparo. Após secagem ao ar, as lâminas foram montadas em Entellan<sup>®</sup> e observadas em microscópio (4000x).

#### **Determinação da ploidia: Citometria de fluxo**

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Amostras das plantas laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' (plantas 1 e 2), laranja 'Hamlin' + tangerina Dancy, e tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' (plantas 1-4) e os padrões de genomas diplóides laranja 'Hamlin', mexerica 'Montenegrina' e tangor 'Murcote', foram analisados por citometria de fluxo. Amostras de folhas jovens verdes e vigorosas de cada uma das plantas aclimatizadas foram coletadas e lavadas em água corrente. O material foi acondicionado em isopor com gelo e enviado em sacos plásticos para análises da ploidia por citometria de fluxo.

Utilizou-se um citômetro PAS II-III Partec<sup>®</sup> equipado com lâmpada HBO 100W e filtros KG1, BG 38 e CG 435. O equipamento foi alinhado e calibrado conforme os protocolos recomendados pela Partec<sup>®</sup>. As suspensões nucleares foram isoladas e coradas com o tampão do kit CyStain UV precise T-DAPI (Partec<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. O material foi processado com três repetições e analisadas pelo software FlowMax<sup>®</sup> v 2.6 (Partec<sup>®</sup>). Não menos que 5000 núcleos foram analisados e amostras com coeficiente de variação (cv) acima de 5% foram descartadas. Os histogramas gerados pelo software foram calibrados para um parâmetro (SSC) e dimensionados no eixo de X em escala linear com 10 bits.

### **Análise de DNA através de marcadores moleculares “DNA polimórfico amplificado ao acaso” (RAPD)**

O DNA genômico das plantas híbridas e de seus genitores foi extraído a partir de folhas, utilizando-se a metodologia de Hoisington et al. (1994). A quantificação foi realizada através da eletroforese de alíquotas de cada DNA, comparando-se com uma série de concentrações de DNA do fago  $\lambda$ . A seleção de 'primers' polimórficos foi realizada a partir de uma avaliação dos produtos de amplificação gerados pelos 'primers' do Kit A-1 a A-20 e o 'primer' AA7 (Invitrogen – Life Technologies), o DNA amplificado de cada 'primer' foi separado em gel de agarose a 1,0% para verificar se havia polimorfismo entre as espécies genitoras. A partir desta seleção preliminar, os 'primers' que revelaram maior número de fragmentos polimórficos amplificados foram utilizados para confirmação da hibridação somática.

A reação de amplificação do DNA (reação de PCR) foi realizada em termociclador (MJ Research®) com o programa descrito por Mendes-da-Glória (1998), com algumas adaptações: 1) 93 °C por 2 min; 2) 92 °C por 1 minuto; 3) 37 °C por 1 minuto; 4) 72 °C por 2 min; 5) 72 °C por 5 min. As etapas de 2 a 4 foram repetidas por 45 ciclos.

Para proceder a amplificação, cada amostra utilizada foi constituída por TRIS-HCl (pH 8,0), 100 mM; KCl, 500 mM; 10x Buffer, 2,5 µl; MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM; dNTPs, 100 µM de cada 'primer', 2,5 µM ; enzima *Taq* polimerase, 1 unidade (Life Biotechnologies ou Pharmacia Biotech); DNA genômico total, 30 ng, resultando num volume final de 25 µl.

A análise do padrão de bandas de DNA foi realizada em gel de agarose a 1,5% (p/v), em solução tampão TBE 0,5x (TRIS-HCl, 45 mM; ácido bórico, 45 mM; EDTA pH 8,0, 1 mM), à temperatura ambiente. A eletroforese da reação de PCR foi conduzida a corrente elétrica de 70 volts, durante 4 h. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg de brometo/100 ml de TEB 1x) e a visualização foi feita com a utilização de luz ultravioleta.

### **3.3 Avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' a bactéria *Xylella fastidiosa*.**

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Insetos Vetores (LIV) no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e casas de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) – Universidade de São Paulo.

#### **3.3.1 Produção das mudas**

Borbulhas do híbrido laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' e seus genitores foram enxertadas em limão 'Cravo' (*C. limonia*), totalizando 47 plantas (19 de cada) e 7 plantas testemunhas do híbrido (controle negativo). As plantas foram cultivadas em sacos plásticos (3,5 L) contendo substrato comercial Rendmax® misturado com adubo

Osmocote® (200 g do adubo para cada 25 kg do substrato) e mantidas em casa-de-vegetação durante todo o procedimento do experimento em temperatura em torno de 20-32 °C. As borbulhas de laranja 'Hamlin' e mexerica 'Montenegrina' foram fornecidas pelo Dr. Jorgino Pompeu Junior (Centro de APTA Citros, Cordeirópolis, SP, Brasil).

### 3.3.2 Inoculação

A estirpe utilizada no experimento de inoculação da bactéria *Xylella fastidiosa* foi a CCT 6570 (isolado de plantas infectadas em Bebedouro-SP, da Coleção de Culturas Tropicais Campinas, Brasil). A bactéria foi repicada por três vezes em meio de cultura sólido "periwinkle wilt gelrite" (PWG) (HILL; PURCELL, 1995a) (anexo). A seguir todo o conteúdo de colônias da placa foi raspado com o auxílio de uma alça de platina e colocado em tampão fosfato salino ("phosphate buffer saline" - PBS) (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,14 mM NaCl; 2,7 mM KCL; pH 7,0) (HILL; PURCELL, 1995b) para a obtenção de uma suspensão bacteriana concentrada. Esta suspensão foi agitada com uma micropipeta e uma alíquota de 60 µL foi adicionada a tubos contendo 200 µL do tampão de preservação succinato citrato fosfato (SPC) (8,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,3 MM succinato dissódico; 3,4 mM citrato dissódico; pH 7,0), acrescido de 30% de glicerol. O isolado foi preservado em ultrafreezer (-80 °C) do Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ. Antes da sua utilização nos experimentos, os isolados foram retirados da ultrafreezer e repicados duas vezes em meio de cultura sólido "periwinkle wilt gelrite" (PWG) (HILL; PURCELL, 1995a) (anexo) incubando, a 28°C, por 25 dias. A inoculação foi realizada em mudas com aproximadamente dois meses sob stress hídrico por 24 h, com bactéria diluída em tampão "phosphate buffer saline" (PBS) (HILL; PURCELL, 1995b). A suspensão bacteriana foi diluída em série e plaqueadas em meio de cultura sólido PWG nas concentrações de 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-10</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e acondicionadas em estufa a 28°C, sendo avaliadas em estereoscópico aos 14 dias do plaqueamento, quanto ao número médio de unidades formadoras de colônias (UFC), obtendo-se a concentração de 8,7 x 10<sup>10</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de tecido. A inoculação foi realizada mecanicamente depositando-se 5µl de solução bacteriana nos pontos marcados no caule e perfurando-se o local por 10 vezes com alfinete entomológico nº 0 (Figura 2). O

controle negativo do experimento (plantas testemunhas), foi inoculado apenas com o tampão (PBS) nas mesmas condições.



Figura 2 - Inoculação da bacteriana de *X. fastidiosa*. a) Suspensão bacteriana em meio de cultura líquido PBS. b) Aplicação de 5µl de suspensão bacteriana nos pontos marcados das plantas. c) Planta sendo perfurada com um estilete em cada ponto, para a absorção da suspensão bacteriana

### 3.3.3 Isolamento primário e quantificação bacteriana

No isolamento primário em meio de cultura e quantificação da população de *X. fastidiosa* em plantas de citros, utilizou-se o método descrito por Hill; Purcell (1995b) adaptado por Almeida et al. (2001).

Foram coletadas duas folhas na região do ponto de inoculação para avaliação aos quatro meses, e duas folhas a 50 cm da região do ponto de inoculação aos oito meses. O pecíolo e a nervura central de cada amostra foram destacados com lâmina, e pesados em balança semi-analítica (0,10-0,20g por amostra). Em câmara de fluxo laminar, cada amostra passou por cinco banhos de imersão de dois minutos cada em recipientes contendo álcool (92,8%) (uma vez), hipoclorito de sódio (2%) (uma vez), e água destilada estéril (três vezes) para desinfestação superficial. Após a desinfecção, as amostras foram cortadas em secções de 1-2 mm sobre papel filtro, com o auxílio de uma lâmina esterilizada, e colocadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão PBS autoclavado. Nestes tubos de ensaio as amostras foram trituradas em homogeneizador tipo Turrax<sup>®</sup> (modelo MA102, Marconi) por 10 a 15 segundos, com a rotação da haste giratória de aproximadamente 25.000 rpm. A cada trituração a haste foi desinfetada com álcool e água destilada autoclavada. A suspensão homogeneizada foi plaqueada em meio de cultura sólido PWG com duas alíquotas de 20 µL de cada amostra e também diluída 10x em câmara de fluxo laminar, pela transferência de 200 µL de cada amostra para novo tubo de ensaio contendo 1,8 mL de tampão PBS e plaqueadas duas alíquotas de 20 µL de cada amostra em meio de cultura sólido PWG. Os plaqueamentos foram acondicionadas em estufa a 28°C, sendo avaliadas em estereoscópico aos 14 dias do plaqueamento, quanto ao número médio de unidades formadoras de colônias (UFC) nas duas alíquotas. Para confirmação positiva da bactéria *X. fastidiosa* foi realizado PCR em algumas colônias obtidas no isolamento.

A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC por grama de tecido vegetal (UFC.g<sup>-1</sup>) foi calculada com base no massa inicial das amostras foliares e nas diluições no material vegetal em tampão PBS, utilizando-se a fórmula:  $C = 100 \cdot (1/p) \cdot \text{UFC} \cdot (10)$ , onde n é o fator de diluição e p, o peso amostra foliar em gramas.

### 3.3.4 Análise molecular “Reação de polimerase em cadeia” (PCR)

Para a extração de DNA, utilizou-se o protocolo desenvolvido por Minsavage et al. (1994). Inicialmente, uma porção do pecíolo e nervura central das folhas de cada planta amostrada foi separada e, com auxílio de uma lâmina, cortada em pedaços pequenos. As amostras foram maceradas com a ajuda de um pistilo em cadinho contendo 1 mL de tampão SPC (anexo) previamente lavada com ácido clorídrico (HOLBEN et al., 1988).

Para a amplificação do DNA extraído de plantas, utilizaram-se os oligonucleotídeos (‘primers’) CVC-1 (AGATGAAAACAATCATGCAA) e 272-2-int (GCCGCTTCGGAGAGCATTCT) (POOLER; HARTUNG, 1995), que amplificam um fragmento de 500 pb, e são específicos para *X. fastidiosa* de citros (COLETTA FILHO; MACHADO, 2001). A reação de PCR foi realizada para um volume final de 12 µL para cada amostra, contendo tampão 1x (75 mM tris-HCl (pH 9,0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200 µM de cada dNTP 10 mM; 1 unidade de Taq DNA polimerase (BIOTOOLS do Brasil); 0,4 µM de cada ‘primer’ (CVC-1 e 272-2-int) e de 2 µL (colônia) a 3 µL (planta) de DNA da amostra. A amplificação foi realizada em termociclador, programado para as seguintes condições: 1 ciclo inicial a 94°C por 4 min.; 30 ciclos envolvendo desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 60°C por 1,5 min e extensão a 72°C por 1,5 min; e 1 ciclo final de extensão a 72°C por 10 min; estabilizando a 4°C por tempo indeterminado (POOLER; HARTUNG, 1995).

A análise do padrão de bandas de DNA foi realizada em gel de agarose a 1,5% (p/v), em solução tampão TBE 1x (TRIS-HCl, 45 mM; ácido bórico, 45 mM; EDTA pH 8,0, 1 mM), a temperatura ambiente. A eletroforese da reação de PCR foi conduzida à corrente elétrica de 70 volts, durante 1 h. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg de brometo/100 ml de TEB 1x) e a visualização foi feita com a utilização de luz ultravioleta.

### 3.3.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados de quantificação bacteriana (Log UFC por g de tecido) foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$  e submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

### 3.4 Avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' (*C. sinensis*) + mexerica 'Montenegrina' (*C. deliciosa*) a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Experimento foi desenvolvido no Laboratório Epidemiologia no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) – Universidade de São Paulo.

#### 3.4.1 Produção de mudas

Borbulhas do híbrido laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina', e os padrões laranja 'Hamlin' e mexerica 'Tardia da Sicília' (utilizada como controle negativo) foram enxertadas em tangerina 'Cleopatra' (*C. reshni*), com 10 repetições. O experimento foi repetido duas vezes, perfazendo 60 plantas. As plantas foram cultivadas em tubetes (19,5 x 5,0 cm) contendo substrato comercial Rendmax<sup>®</sup> misturado com adubo Osmocote<sup>®</sup> (200 g do adubo para cada 25 kg do substrato) e mantidas em casa-de-vegetação durante o crescimento das mudas em temperatura em torno de 20-32 °C. As borbulhas de laranja 'Hamlin' e mexerica 'Tardia da Sicília' foram cedidas pelo Dr. Eduardo Sanches Stuchi (Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, Bebedouro, SP, Brasil).



### 3.4.2 Inoculação

O experimento foi conduzido em sala fechada de acordo com as normas de segurança fitossanitária para o cancro cítrico, e dentro de câmaras de crescimento (Conviron®) com temperatura e fotoperíodo controlado.

As mudas com aproximadamente dois meses, apresentando folhas novas e imaturas, sem ferimento, foram inoculadas por aspersão através de um aspersor acoplado a uma bomba a vácuo, via estômatos com suspensão do isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* (estirpe IBSBF 1421), fornecido pelo Dr Júlio Rodrigues Neto do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas/SP. O inoculo de *X. axonopodis* pv. *citri* foi preparado a partir de cultura da bactéria cultivada em nutriente ágar NA (GERHARDT, 1994) (anexo) por 48 h e suspendida em água estéril destilada. A suspensão foi calibrada por colorímetro. Foi utilizado o isolado na concentração de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em ambos os lados das folhas dentro da câmara de crescimento Convicon® e mantidas em câmara úmida por 72h, a  $\pm 28^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 h (Figura 3). Depois de retiradas da câmara úmida, as plantas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos sendo, plantas de laranja 'Hamlin', mexerica 'Tardia da Sicilia' e plantas do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina', totalizando 60 plantas.

### 3.4.3 Quantificação de cancro cítrico

A severidade da doença foi mensurada após 30 dias a inoculação, coletando-se duas folhas de cada planta com lesões de cancro cítrico totalizando 40 folhas por tratamento (20 folhas no primeiro experimento e 20 folhas no segundo experimento). As folhas coletadas foram digitalizadas e a severidade mensurada por um software de quantificação de doença, QUANT v.1.0 (VALE et al. 2001). Os dados de severidade foram analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, pelo PROC GLM do SAS (SAS Inc., 2000).

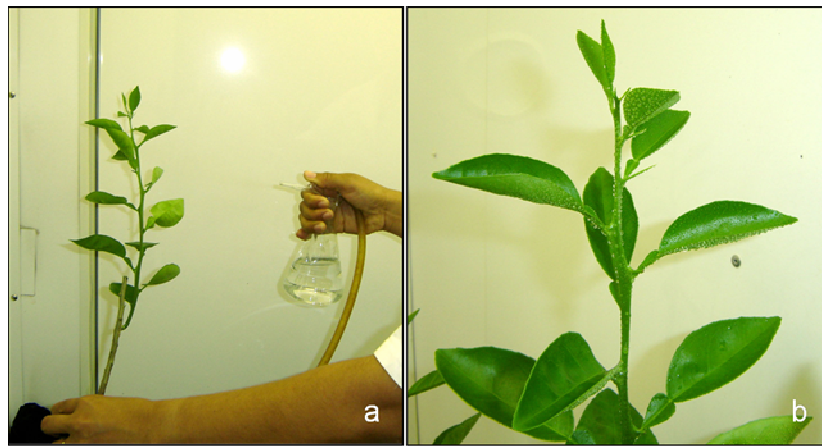


Figura 3 – a) Inoculação por aspersão de ambos lados das folhas com suspensão de *X. axonopodis* pv. *citri* (isolado IBSBF 1421) na concentração de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. b) Planta inoculada

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção e estabelecimento de explantes para isolamento de protoplastos

Na indução à calogênese, todas as variedades introduzidas *in vitro* formaram calos embriogênicos (Tabela 1). A formação de calos embriogênicos ocorreu após aproximadamente 120 dias do cultivo. Observou-se, em geral, maior formação de calos no meio de cultura acrescido de BAP, embora tenha-se registrado variação em função do genótipo. (Tabela 1). Outros trabalhos com calogênese de óvulos abortados também constataram o efeito do genótipo sobre a resposta à indução da calogênese (BENEDITO et al., 2000; MENDES-DA-GLÓRIA, 1998; MOURÃO FILHO; GROSSER, 1992; OLIVEIRA et al., 1994).

Os calos foram subcultivados e mantidos *in vitro* se mostraram claros e friáveis o que é desejável para o isolamento de protoplastos. A multiplicação e o crescimento dos calos foram mais intensos em laranja 'Hamlin' e 'Pera' e tangor 'Murcote'. As demais apresentaram bom desenvolvimento, porém um pouco mais lento. Calos foram classificados em duas categorias, com base na qualidade e vigor: calos friáveis de crescimento lento e calos friáveis de crescimento rápido (Tabela 2).

As culturas em suspensão celular que apresentaram crescimento vigoroso foram utilizadas no isolamento de protoplastos por fornecerem células em quantidades e qualidades adequadas. As demais variedades apresentaram grande potencial embriogênico em meio de cultura para indução de células em suspensão, com grande quantidade de embriões, dificultando o isolamento de protoplastos.

Tabela 1 - Desenvolvimento de calos embriogênicos cultivados em meio de cultura EME, com ou sem adição de (5 mg.L<sup>-1</sup>) 6-benzilaminopurina (BAP)

<b>Explantos com desenvolvimento de calos *</b>		
<b>Variedade</b>	<b>% + BAP</b>	<b>% - BAP</b>
laranja 'Valência'	10,0	8,0
laranja 'Pêra'	8,0	6,0
laranja 'Natal'	9,2	6,4
laranja 'Hamlin'	12,0	4,0
laranja 'Baianinha'	4,0	3,6
laranja 'Pêra vacinada'	3,6	3,2
laranja 'Lima Verde'	45,2	6,8
Laranja 'Sanguínea'	4,8	7,6
laranja 'Lima'	14,0	10,0
laranja 'Abacaxi'	13,2	6,0
laranja 'Westin'	8,8	11,2
laranja 'Baianinha'	4,0	3,6
laranja 'Barão'	3,6	10,4
laranja 'Rubi'	11,6	12,0

\* Foram utilizadas 10 placas para cada meio de cultura de cada variedade, com 25 óvulos abortados por placa (total de 250 explantes por variedade).

Tabela 2 – Calos embriogênicos obtidos a partir de óvulos abortados em meio de cultura EME (0,146) com e sem BAP (6-benzilaminopurina)

<b>Variedades</b>	<b>Calos friáveis</b>
laranja 'Valência'	+
laranja 'Pêra'	++
laranja 'Natal'	+
laranja 'Hamlin'	++
laranja 'Baianinha'	+
laranja 'Pêra vacinada'	+
laranja 'Lima Verde'	+
Laranja 'Sanguínea'	+
laranja 'Lima'	+
laranja 'Abacaxi'	+
laranja 'Westin'	+
laranja 'Barão'	+
laranja 'Rubi'	+
tangor 'Murcote'	++
tangerina 'Cravo'	+

+ crescimento lento

++ crescimento rápido

## 4.2 Hibridação somática

Foram realizadas 54 fusões das combinações de laranjas (*Citrus sinensis*) com tangerinas (*C. reticulata*, *C. deliciosa*, *C. reshni*, *C. sunki*), tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e tangelo 'Orlando' (*C. reticulata* x *C. paradisi*). As primeiras divisões celulares foram observadas aproximadamente 15 a 20 dias após a fusão, originando microcolônias e posteriormente microcalos. Os microcalos foram cultivadas em meio EME (0,146M) modificado pela substituição da sacarose por 13 g.L<sup>-1</sup> de maltose, resultando na embriogênese somática em algumas combinações avaliadas em torno de 60 dias após a fusão dos protoplastos. Entretanto, muitos calos apresentaram baixo vigor embriogênico e embriões com má formação de desenvolvimento. A germinação dos embriões ocorreu em meio EME contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e acrescido de 500 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Somente as fusões envolvendo os genitores embriogênicos laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e 'Abacaxi' e tangor 'Murcote' acarretaram na conversão de plântulas. As plantas regeneradas foram aclimatizadas dentro de um período de 8 meses, que variou de acordo com a qualidade do material obtido *in vitro*.

### 4.2.1 Plantas obtidas pela fusão de protoplastos

As fusões envolvendo laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' resultaram em duas plantas. A planta 1 foi confirmada ser híbrido somático pela análise morfológica apresentando características morfológicas de ambos os genitores, análise molecular (RAPD), os 'primers' que apresentaram polimorfismo envolvendo os genitores de laranja 'Hamlin' e mexerica 'Montenegrina' (planta1) foram AA7 (5' CTA CGC TCA C 3'), A4 (5'AAT CGG GCT G), A7 (5'GAA ACG GGT G 3') e A10 (5'GTG ATC GCA G 3'), determinação da ploidia com a contagem do número de cromossomos de três células, confirmando terem 36 cromossomos (4x) e a citometria de fluxo das suspensões nucleares obtidas das folhas, os picos de leitura da quantidade de DNA em G<sub>1</sub>, após a coloração com DAPI, resultaram histogramas com resolução suficiente para identificar as plantas diplóides (genitores-padrão), tetraplóides (4x) (Figuras 4-6). Na planta 2,

foram realizadas análise morfológica apresentando características morfológicas de ambos os genitores, análises molecular (RAPD), os 'primers' que apresentaram polimorfismo envolvendo os genitores de laranja 'Hamlin' e mexerica 'Montenegrina' (planta 2) foram AA7 (5' CTA CGC TCA C 3'), A4 (5'AAT CGG GCT G), A7 (5'GAA ACG GGT G 3') e A10 (5'GTG ATC GCA G 3'), análise de citometria de fluxo determinando ser um mixoplóide, apresentando células com 3x e células com 4x (Figura 5-6).

As fusões envolvendo laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' resultaram em uma planta. O híbrido somático foi confirmado pela análise morfológica que mostrou as características morfológicas de ambos os genitores, análise de RAPD, os 'primers' que apresentaram polimorfismo envolvendo os genitores de laranja 'Hamlin' e tangerina 'Dancy' foram AA7 (5' CTA CGC TCA C 3'), A4 (5'AAT CGG GCT G) e A7 (5'GAA ACG GGT G 3'). Esses híbridos foram microenxertados, por apresentarem má formação da raiz, em laranja 'Hamlin'. Desta forma, a contagem do número de cromossomos em ápices radiculares, não foi efetuada, mas sua ploidia foi determinada pela citometria de fluxo identificando as plantas diplóides (genitores-padrão), tetraplóide (4x). (Figura 7 e 8).

Fusões de plantas 'Pêra 158' com tangerina 'Ponkan' resultaram em duas plântulas que não sobreviveram à aclimatização.

As fusões envolvendo os genitores tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' resultaram em quatro plantas. A planta 1 foi analisada por análise morfológica que apresentou a morfologia igual do genitor não embriogênico laranja 'Hamlin', análise molecular (RAPD), apresentando polimorfismo igual ao do genitor não embriogênico laranja 'Hamlin', os 'primers' que apresentaram polimorfismo foram AA7 (5' CTA CGC TCA C 3'), A4 (5'AAT CGG GCT G), A7 (5'GAA ACG GGT G 3') e A10 (5'GTG ATC GCA G 3'). Esses híbridos foram microenxertados em laranja 'Hamlin', por não apresentarem enraizamento *in vitro*. Desta forma, a contagem do número de cromossomos em ápices radiculares, não foi efetuada. As quatro plantas foram avaliadas pela citometria de fluxo constatando todas serem diplóide (2x) (Figura 9-10).

As fusões envolvendo laranja 'Abacaxi' + tangerina 'Ponkan' resultaram em 6 plantas. Quatro plantas foram microenxertadas em laranja 'Hamlin'.

A fusão de protoplastos pode ocorrer com a junção dos dois núcleos dos genitores, obtendo-se um híbrido somático (BENGOCHEA; DODDS, 1986), como verificado nos híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' (planta 1) pelas morfológicas, análises moleculares de RAPD, determinação da ploidia com a contagem de 36 cromossomos presentes nas células da planta híbrida e pela citometria de fluxo apresentando células 4x. O híbrido laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' também comprovou ser um híbrido somático. Na fusão de protoplastos pode ocorrer perda cromossômica, como observado no híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' (planta 2), onde na citometria de fluxo constatou a presença de células com 3x e células com 4x (mixoplóide).

Quando o núcleo de um dos genitores é perdido, restando apenas um núcleo na mistura dos dois citoplasmas é chamado de cíbrido (BENGOCHEA; DODDS, 1986). Foi verificado neste trabalho que a planta tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' (planta 1) apresentou polimorfismo e morfologia somente do genitor laranja 'Hamlin' (protoplasto de folha - genitor não embriogênico), concluindo um possível cíbrido. Segundo GROSSER et al. (1996a), a grande maioria dos cíbridos descritos na literatura são provenientes de falhas na fusão nuclear e perda de material genético. Saito et al. (1993) descrevem que as plantas cíbridas obtidas mostraram a morfologia do genitor cujos protoplastos foram isolados de mesofilo foliar. Além disto, segundo esses autores estas plantas continham o genoma nuclear das células do mesofilo combinado com o genoma mitocondrial das células dos calos nucelares, o que mostrou que células cíbridas com o genoma nuclear apenas do genitor não-embriogênico também são capazes de regenerar plantas por embriogênese.

A hibridação somática tem sido aplicada no melhoramento genético de citros, com a produção de híbridos interespecíficos, intergenéricos entre genitores sexualmente compatíveis e incompatíveis e cíbridos. Os híbridos somáticos podem ter potencial para serem utilizados como copa ou porta-enxerto. No melhoramento de copa, os híbridos somáticos poderão ser utilizados diretamente como cultivares copa, com produção de frutos de boa qualidade (GUO et al., 2004). Os híbridos somáticos tetraplóides poderão ser também utilizados em retrocruzamentos para produção de cultivares com frutos sem sementes (MOURÃO FILHO et al., 1996), e também como

novas variedades com tolerância ou/e resistência a doenças, devido as combinações complementares dos genitores (GROSSER et al., 1998a).

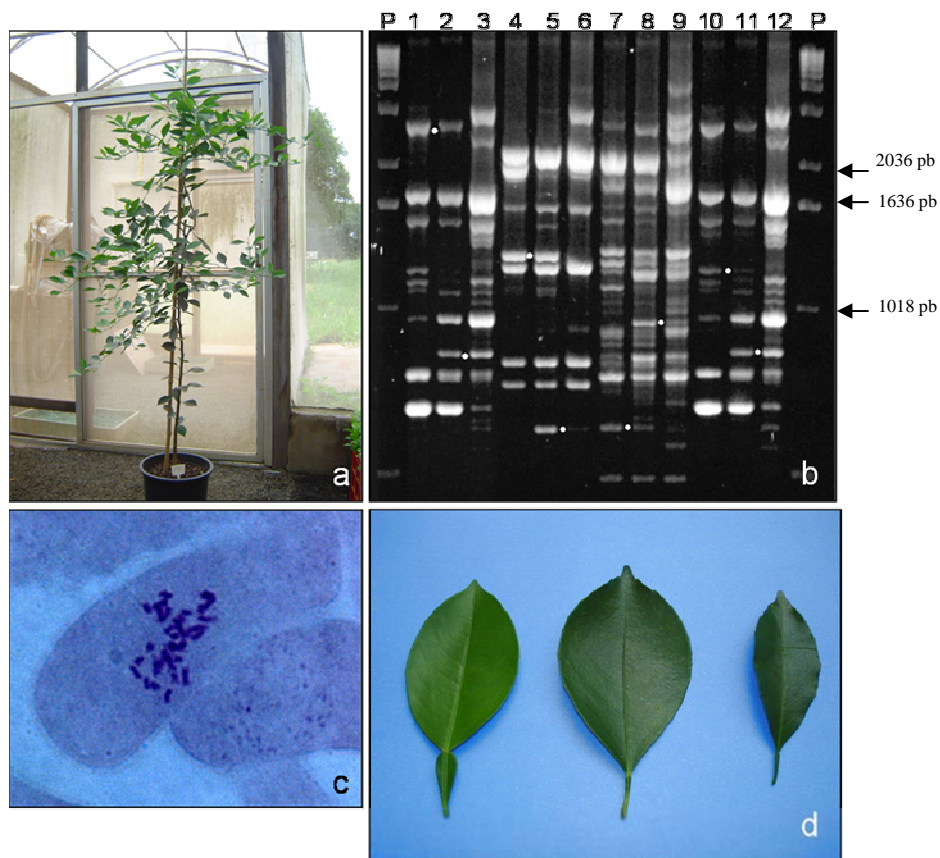


Figura 4 - Híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' (planta1). a) Planta mantida em casa de vegetação. b) Análise molecular - Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; colunas 7 a 9 = 'primer' A10; colunas 10 a 12 = 'primer' A7. Colunas 1, 4, 7 e 10 = laranja 'Hamlin'; colunas 2, 5, 8 e 11 = Híbrido somático de laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' e colunas 3, 6, 9 e 12 = mexericana 'Montenegrina'. P = marcador 1 kb. c) Análise citológica confirmando a poliploidia pelo contagem do número de cromossomos nas células de raízes, sendo  $2n=4x=36$ . d) Morfologia foliar do genitor laranja 'Hamlin' (esquerda), do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' (centro) e do genitor mexericana 'Montenegrina' (direita)



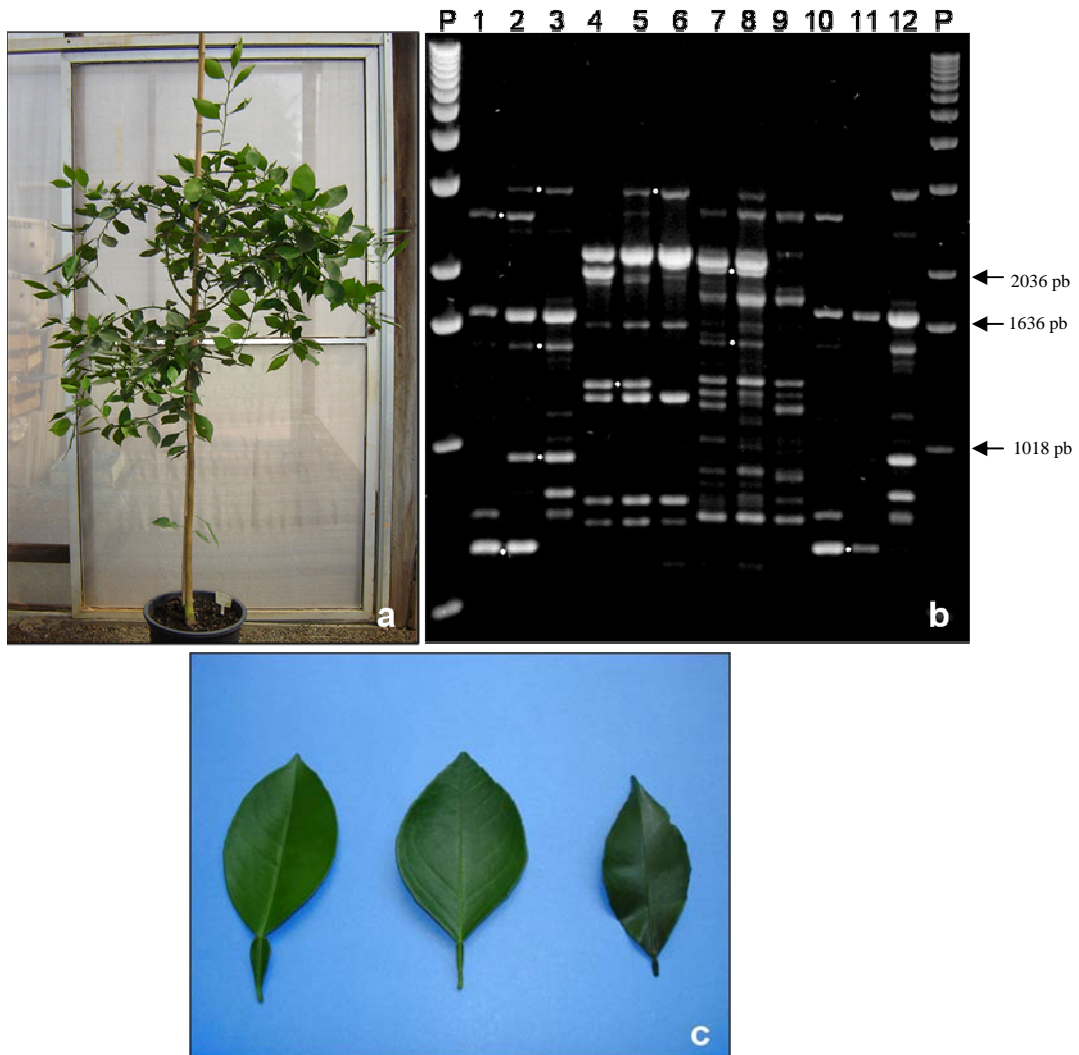


Figura 5 - Híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' (planta2). a) Planta em casa de vegetação. b) Análise molecular - Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; colunas 7 a 9 = 'primer' A10; colunas 10 a 12 = 'primer' A7. Colunas 1, 4, 7 e 10 = laranja 'Hamlin'; colunas 2, 5, 8 e 11 = Híbrido somático de laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' e colunas 3, 6, 9 e 12 = mexericana 'Montenegrina'. P = marcador 1 kb. c) Morfologia foliar do genitor laranja 'Hamlin' (esquerda), do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' (centro) e do genitor mexericana 'Montenegrina' (direita)

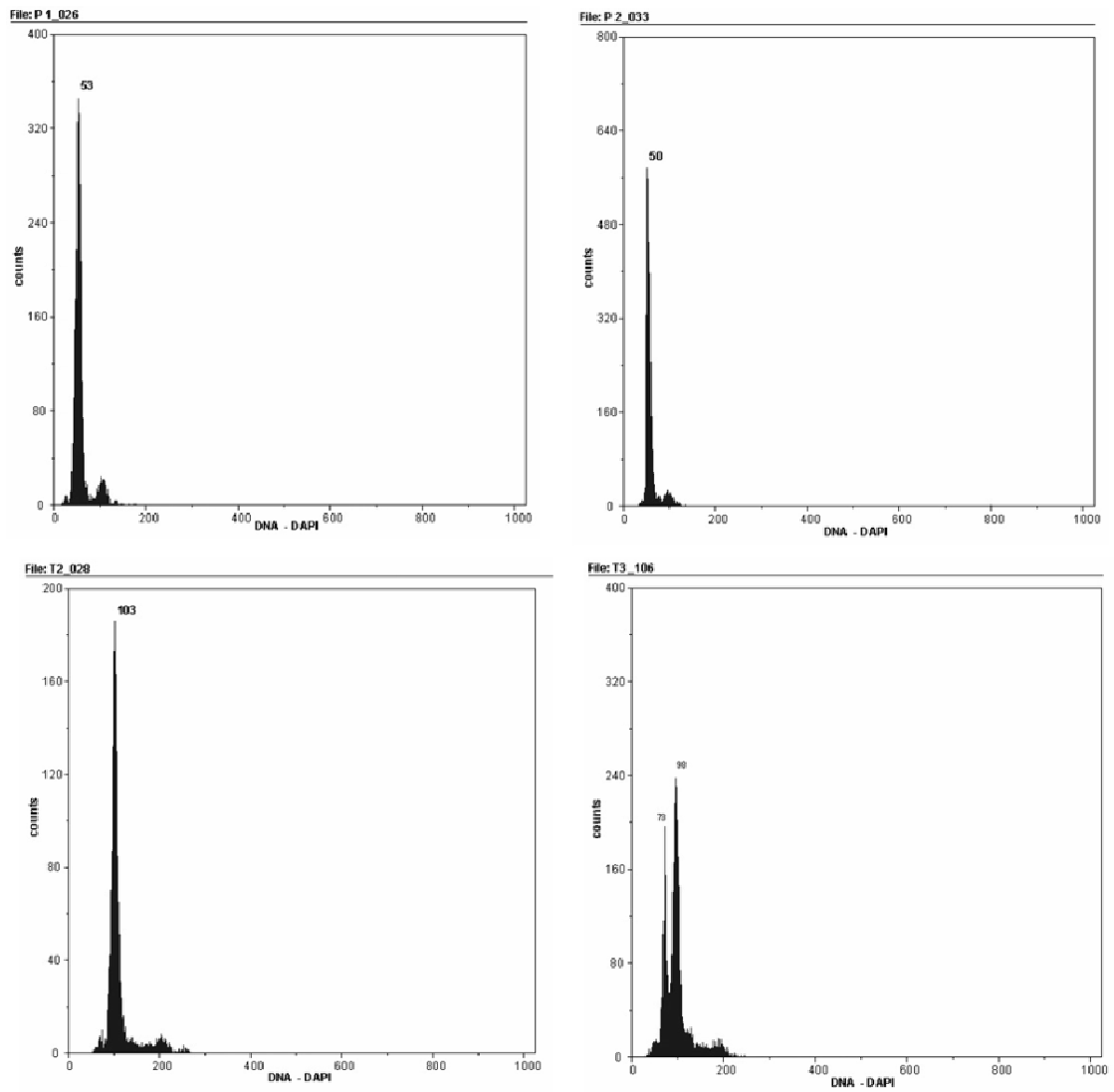


Figura 6 - Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares dos híbridos somáticos e dos padrões diplóides 2x. P1) Padrão diplóide laranja 'Hamlin' (canal 53). P2) Padrão diplóide mexericana 'Montenegrina' (canal 50). T2) laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' (planta 1) (canal 103). T3) laranja 'Hamlin' + mexericana 'Montenegrina' (planta 2) (canal 73 e 98)

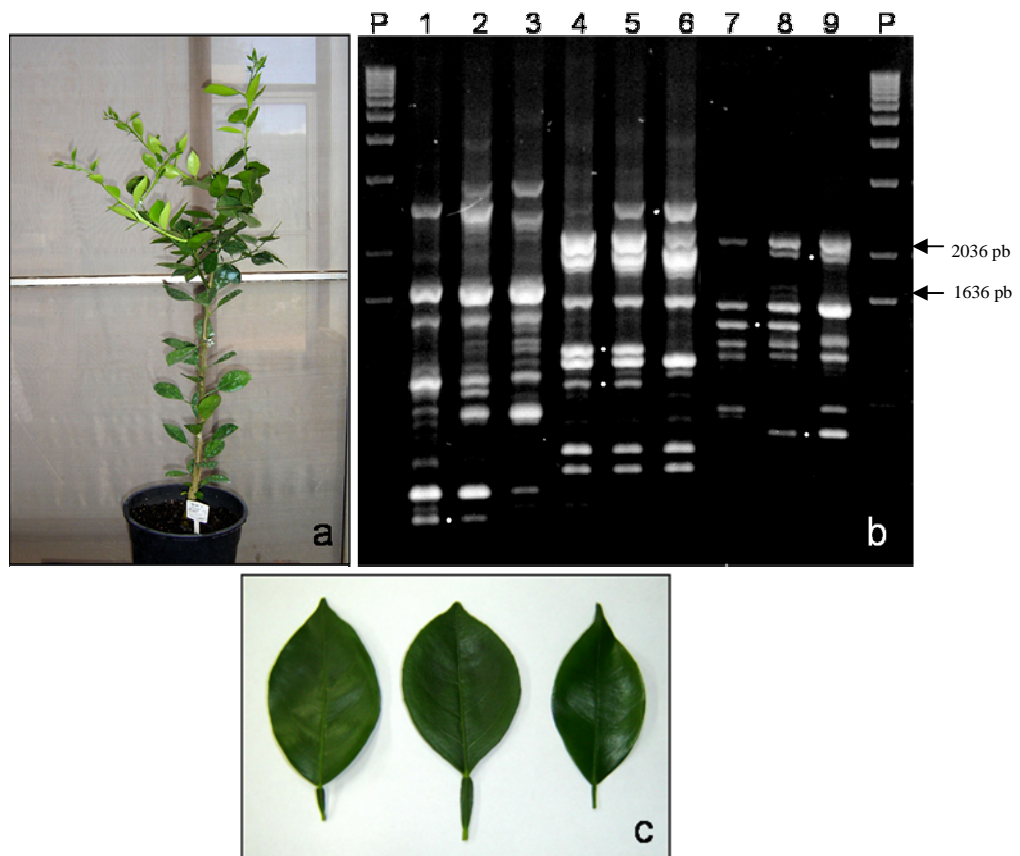


Figura 7 – Híbrido somático laranja 'Hamlin'+ tangerina 'Dancy'. a) Planta em casa de vegetação. b) Análise molecular. Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = 'primer' AA7; colunas 4 a 6 = 'primer' A4; 7 a 9 = 'primer' A7. Colunas 1, 4 e 7 = laranja 'Hamlin'; colunas 2, 5 e 8 = Híbrido somático de laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' e colunas 3, 6 e 9 = 'Dancy'. P = marcador 1 kb. c) Morfologia foliar do genitor laranja 'Hamlin' (esquerda), do híbrido somático laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' (centro) e do genitor tangerina 'Dancy' (direita)

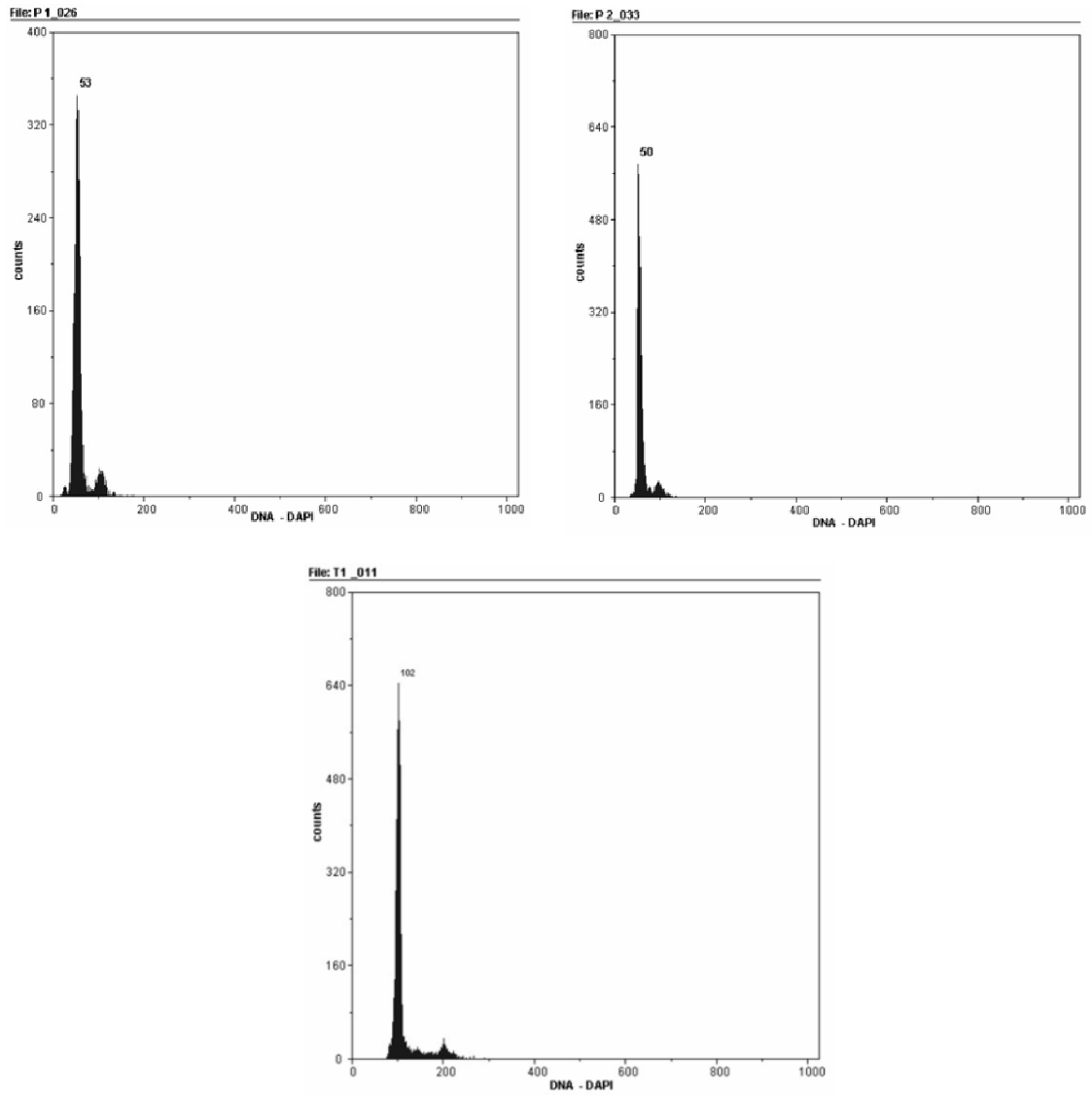


Figura 8 - Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares do híbrido somático e dos padrões diplóides 2x. P1) Padrão diplóide laranja 'Hamlin' (canal 53). PB1) Padrão diplóide mexericca 'Montenegrina' (canal 50). T1) laranja 'Hamlin' + tangerina 'Dancy' (canal 102)

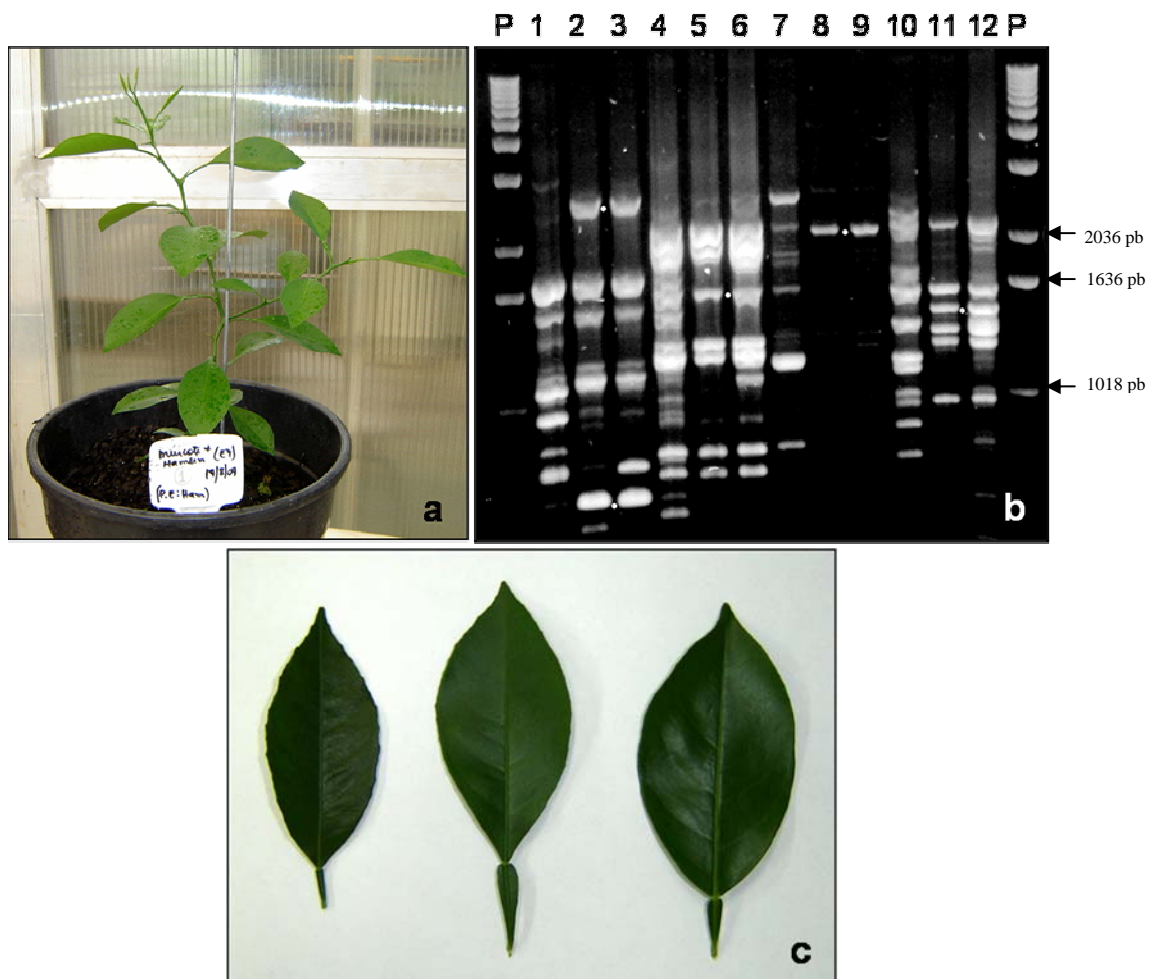


Figura 9 – Planta tangor ‘Murcote’ + laranja ‘Hamlin’ (planta 1). a) Planta em casa de vegetação. b) Análise molecular. Fragmentos de RAPD. Colunas 1 a 3 = ‘primer’ AA7; colunas 4 a 6 = ‘primer’ A4; 7 a 9 = ‘primer’ A10; colunas 10 a 12 = ‘primer’ A7. Colunas 1, 4, 7 e 10 = tangor ‘Murcote’; colunas 2, 5, 8 e 11 = planta ‘Murcote’+ ‘Hamlin’ e colunas 3, 6, 9 e 12 = laranja ‘Hamlin’ P = marcador 1 kb. c) Morfologia foliar do genitor tangor ‘Murcote’ (esquerda), do híbrido tangor ‘Murcote’ + laranja ‘Hamlin’ (centro) e do genitor laranja ‘Hamlin’ (direita)

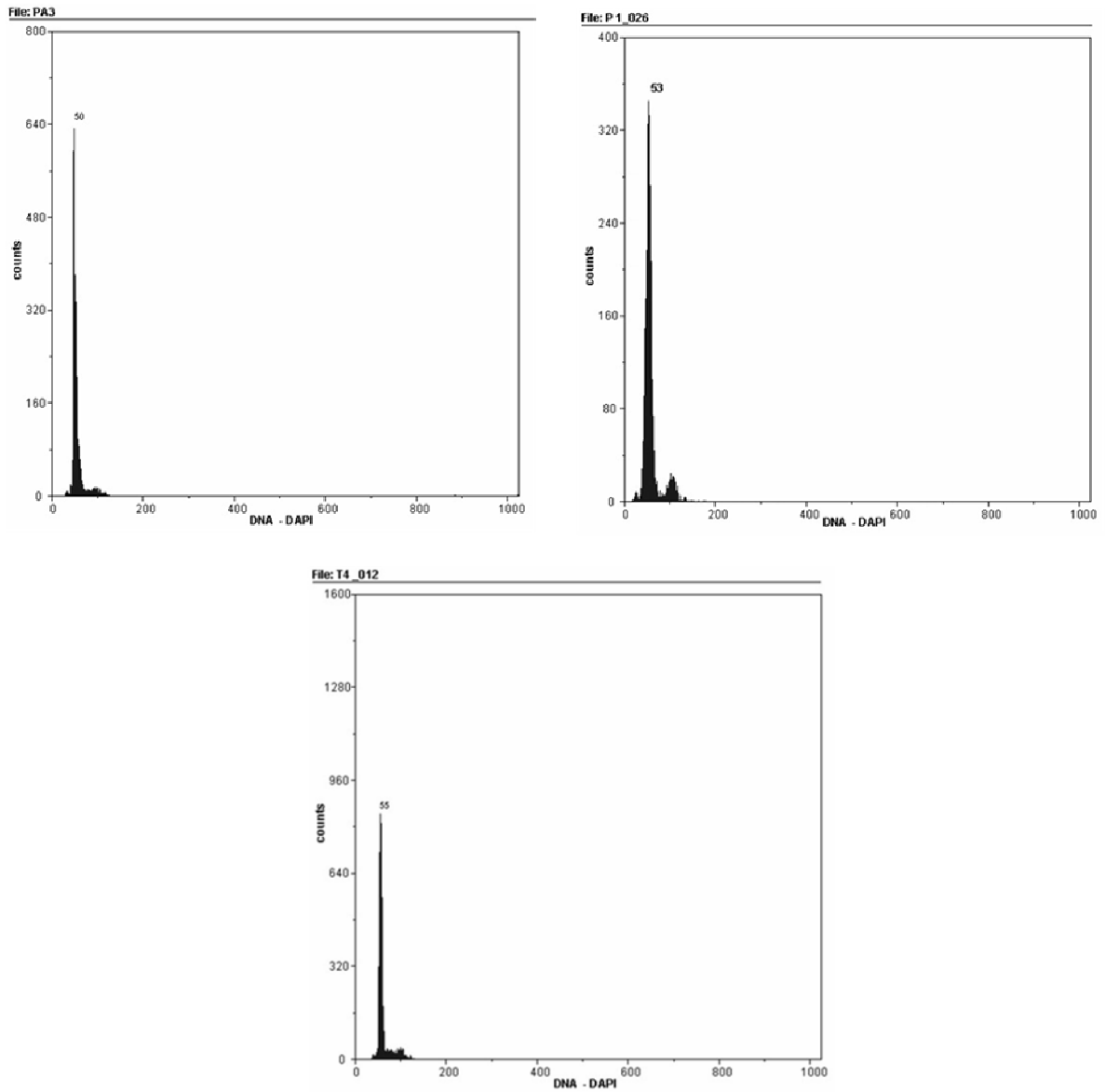


Figura 10 - Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares planta tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' e dos padrões diplóides 2x. PA3) Padrão diplóide tangor 'Murcote' (canal 50). P1) Padrão diplóide laranja 'Hamlin' (canal 53). T4) tangor 'Murcote' + laranja 'Hamlin' (planta 1) (canal 55) As plantas 2, 3 e 4 também obtiveram canal 55

### 4.3 Avaliação da resistência do híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' a *Xylella fastidiosa*

O experimento de avaliação da resistência do híbrido somático a *X. fastidiosa* incluiu avaliações na região do ponto de inoculação para avaliação aos quatro meses, e a 50 cm da região do ponto de inoculação aos oito meses após a inoculação. No isolamento primário em meio de cultura realizado aos quatro meses, observou-se que a porcentagem de plantas infectadas foram semelhantes para a laranja 'Hamlin' e o híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina'. No entanto, aos oito meses a porcentagem de infecção do híbrido em relação a 'Hamlin' foi menor (Tabela 3 e 4).

Foi comprovado na avaliação aos quatro meses que o crescimento da *X. fastidiosa* não foi reduzido no híbrido somático, podendo ser explicado pela grande quantidade de bactéria introduzida pela inoculação artificial, facilitando a multiplicação da bactéria. Com oito meses (folhas coletadas com 50 cm do ponto de inoculação) foi observada uma redução significativa no número de colônias bacterianas, possivelmente devido a limitações ao movimento da bactéria nos vasos do xilema, sugerindo que o híbrido somático possa ter herdado características semelhantes à mexerica 'Montenegrina', referentes a resistência a *X. fastidiosa*. Almeida et al. (2001) observou rápida multiplicação e movimentação da *X. fastidiosa* em laranjas aos quatro meses após inoculação, também verificado neste experimento.

No isolamento em meio de cultura aos quatro meses a população bacteriana média apenas das plantas positivas (com crescimento da bactéria), de laranja 'Hamlin' foi quantificada em 5,8 log UFC.g<sup>-1</sup> de tecido e o híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexerica 'Montenegrina' 6,12 log UFC.g<sup>-1</sup> de tecido. No entanto, oito meses após a inoculação a laranja 'Hamlin' apresentou 5,14 log UFC.g<sup>-1</sup>, e o híbrido somático 5,12 log UFC.g<sup>-1</sup> (dados não apresentados).

Na avaliação dos sintomas de CVC, apenas a laranja 'Hamlin' apresentou lesões foliares em 10% das plantas, nas observações até nove meses da inoculação (Figura 11). Pio et al. (2005) relatam que as laranjas são hospedeiras de *X. fastidiosa* e suscetíveis à CVC. A mexerica 'Montenegrina' não apresentou infecção nas duas

avaliações realizadas por isolamento em meio de cultura e análise de PCR, comprovando a sua resistência à *X. fastidiosa*. A resistência das tangerinas a esse patógeno foi observada por Laranjeira et al. (1998) em trabalhos com avaliação de cultivares e espécies cítricas a *X. fastidiosa*, em que a 'Mexerica-do-rio' (*C. deliciosa*) não apresentou fonte de inóculo à CVC. A mexerica 'Montenegrina' segundo Rodrigues; Dorneles (1999), surgiu de mutação ou recombinação na progênie nucelar ou zigótica da variedade 'Mexerica-do-rio'.

Nas avaliações de PCR, houve mais detecções positivas com quatro meses do que com oito meses, possivelmente devido a maior população bacteriana presente próxima ao local da inoculação. O controle negativo do experimento (plantas testemunhas), apresentaram resultado negativo para presença de *X. fastidiosa*. Para confirmação da identidade da bactéria *X. fastidiosa* foi realizado também a PCR com algumas colônias do isolamento em meio de cultura confirmando serem positivas.



Tabela 3 - Porcentagem de plantas de citros positivas para *Xylella fastidiosa* (isolado CCT6570) por isolamento em meio de cultura e por PCR, 4 e 8 meses após inoculação com suspensão de células bacterianas ( $8,7 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>)

Tratamentos	Plantas infectadas <sup>a</sup> %			
	4 meses ( região do ponto da inoculação)		8 meses (com 50 cm da região do ponto da inoculação)	
	Isolamento	PCR	Isolamento	PCR
laranja 'Hamlin'	63,15	21	47,36	15,78
mexerica 'Montenegrina'	0	0	0	0
laranja 'Hamlin'+ mexerica 'Montenegrina'	63,15	21	10,52	0

<sup>a</sup> n=19 (número de plantas testadas em cada cultivar)

Tabela 4 - Quantificação populacional de *Xylella fastidiosa* (isolado CCT6570) em plantas de citros, 4 e 8 meses após a inoculação de uma suspensão de células bacterianas ( $8,7 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>)

Tratamentos	População bacteriana (log UFC.g tecido $\pm$ EPM <sup>1</sup> )	
	4 meses ( região do ponto da inoculação)	8 meses (com 50 cm da região do ponto da inoculação)
laranja 'Hamlin'	3,66 $\pm$ 0,18 a	2,43 $\pm$ 0,17a
mexerica 'Montenegrina'	0,0 b	0,0 b
laranja 'Hamlin'+ tangerina mexerica 'Montenegrina'	3,86 $\pm$ 0,19 a	0,53 $\pm$ 0,10 b

<sup>1</sup> Erro padrão da média

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

\* Os dados foram transformados para análise estatística em  $\sqrt{x+1}$



Figura 11 – a) Plantas de laranja 'Hamlin' mostrando a superfície adaxial das folhas com sintomas da bactéria *X. fastidiosa* causadora da CVC. b) Plantas de laranja 'Hamlin' mostrando a superfície abaxial da folha com sintomas da bactéria *X. fastidiosa* causadora da CVC

#### **4.4 Avaliação da resistência do híbrido somático laranja ‘Hamlin’ + mexerica ‘Montenegrina’ a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.**

Os primeiros sintomas foram detectados entre 7 e 8 dias após a inoculação da bactéria. De acordo com os dados de severidade (porcentagem de área foliar lesionada), observou-se que a laranja ‘Hamlin’ apresentou maior porcentagem de severidade, diferindo do híbrido somático e da mexerica ‘Tardia da Sicília’ (utilizada como controle negativo). Esse resultado sugere que o híbrido somático pode ter herdado as características dos genitores com predominância da mexerica ‘Montenegrina’, onde a mexerica ‘Tardia da Sicília’ que é considerado moderadamente resistente à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Figura 12 e 13), como já verificado por Leite Junior (1990) o qual descreve a variedade laranja ‘Hamlin’ suscetível e a ‘Mexerica-do-rio’ (*C. deliciosa*) moderadamente resistente à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Experimentos com híbridos somáticos já foram relatados por Vilorio et al. (2004) utilizando também a inoculação artificial do patógeno em plantas tetraploides e híbridos triplóides, confirmaram resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* a limaquat ‘Lakeland’ x lima ‘Key’ + laranja ‘Valencia’ e limaquat ‘Lakeland’ x laranja ‘Hamlin’ + limão ‘Feminello’.

Os resultados deste trabalho constituem-se em contribuição para a hibridação somática de plantas cítricas, em que o híbrido somático laranja ‘Hamlin’ + mexerica ‘Montenegrina’ demonstrou características dos genitores.

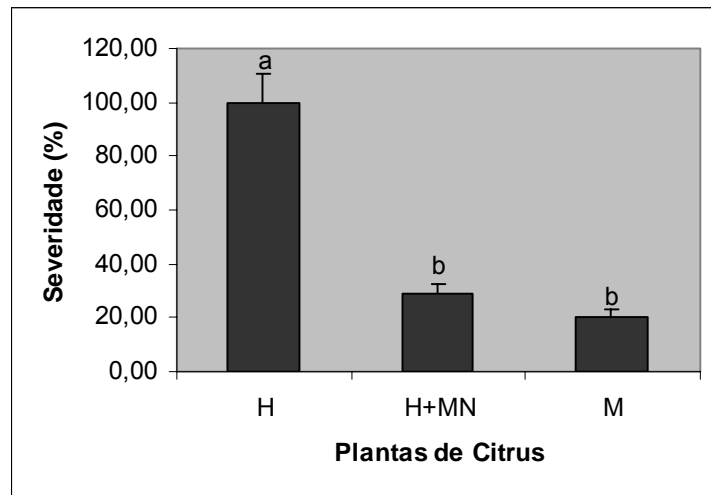


Figura 12 - Severidade do Cancro cítrico em folhas de laranja 'Hamlin' (H), laranja 'Hamlin'+ mexericca 'Montenegrina' (H+MN) e mexericca 'Tardia da Sicilia' (M), 30 dias após a inoculação com suspensão bacteriana ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. As médias foram calculadas considerando a laranja 'Hamlin' com 100% de severidade

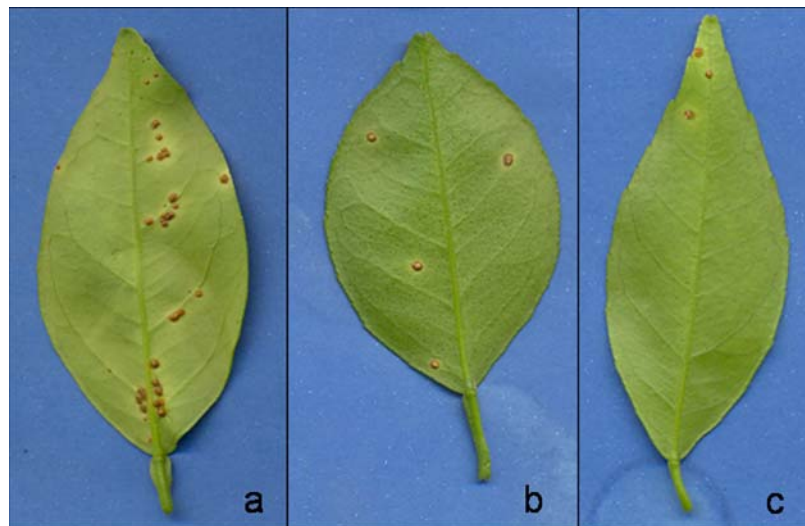


Figura 13 - Lesões de Cancro cítrico: a) laranja 'Hamlin', b) híbrido somático laranja 'Hamlin' + mexericca 'Montenegrina' e c) mexericca 'Tardia da Sicilia'

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste trabalho concluiu-se que:

- Os protocolos utilizados para isolamento, fusão e cultura de protoplastos, bem como para a regeneração e aclimatização de plântulas permitiram a obtenção de híbridos somáticos do genitor embriogênico laranja 'Hamlin' com os genitores não embriogênicos mexerica 'Montenegrina' e tangerina 'Dancy', possível híbrido de tangor 'Murcote' + 'laranja 'Hamlin' e plantas de laranja 'Abacaxi' + tangerina 'Ponkan'.
  
- O híbrido somático laranja 'Hamlin' com mexerica 'Montenegrina' (planta 1), é resistência à Clorose variegada dos citros e ao cancro cítrico.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a *Citrus* strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, p. 382-386, 2001.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag; 2005. 926 p.
- BENEDITO, V.A. **Hibridação somática entre tangerina ‘Cleópatra’ e laranja ‘Azeda’ por fusão de protoplastos**, 62p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, p. 33-38, 2000.
- BENGOCHEA, T.; DODDS, J.H.A. **Plant protoplast**: a biotechnological tool for plant improvement. London:Lord, 1986. 90 p.
- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. 926 p.
- CALIXTO, M.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; VIEIRA, M.L.C. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 721-724, jul. 2004.
- CARNEIRO, V.T.C.; CONROI, T.; BARROS, L.M.G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 413-458.
- CHENG, V.L.; GUO, W.W. DENG, X.X. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) + Meiwa Kunquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 445-451, 2003.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132, 2001.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.

COSTA, M.A.P.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Somatic hybridisation for improvement of citrus rootstock: production of five new combination with potential for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 43, p. 1151-1156, 2003.

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

DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 49, p. 55-62, 1992.

FAO. **FAOSTAT**: statistics database. Disponível em: <http://apps.fao.org> Acesso em: 15 mar. 2006.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças de citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 288-295, 2000. Suplemento.

FIGUEIREDO, J.O. de. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 228-264.

FREASON, E.M.; POWE, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, New York, v.33, p.130-137, 1973.

FUNDECITRUS. Cancro cítrico volta a ameaçar região nobre da citricultura. In: **Manual técnico do cancro cítrico**. Araraquara, 1997. 11 p. (Boletim Técnico).

GERHARDT, P.E. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 791 p.

GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. p. 335-369.

GRAMBOW, H.J.; KAO, K.N.; MILLER, R.A.; GAMBORG, O.L. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. **Planta**, Berlin, v. 13, p. 348-355, 1972.

GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus x Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 31, p. 253-257, 1987.

GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for citrus rootstock improvement. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 6, p. 641-644, 2000.

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germoplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, St Joseph, v. 25, n. 2, p. 147-151, 1990b.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. 2004 SIVB Congress symposium proceedings "Thinking outside the cell": Applications of somatic hybridization in crop improvement, with citrus as a model. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 41, p. 220-225, May/June, 2005a.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Applications of somatic hybridization and cybrization in crop improvement, with citrus as a model. **In Vitro Cell Development Biology**, Gaithersburg, v. 41, p. 220-225, 2005b.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrids plants of *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' and *Poncirus trifoliata* cv. 'Flying Dragon'. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, p. 5-8, 1988a.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia discha*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 75, p. 397-401, 1988b.

GROSSER, J.W.; MOORE, G.A.; GMITTER JUNIOR, F.G. Interspecific somatic hybrid plants from fusions of 'Key' lime (*Citrus aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 39, p. 23-29, 1989.

GROSSER, J.W.; OLLITRAUT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Invited review: somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. **In Vitro Cellular Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 36, p. 434-449, 2000a.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CASTLE, W.S.; CHANDLER, J.L. Somatic hybridization: a new approach to citrus rootstock improvement. **Fruits**, Paris, v. 53, n. 5, p. 331-334, 1998a.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; FLEMING, G.H.; CHANDLER, J.L. Applications of biotechnology to citrus cultivar improvement at the Citrus Research and Education Center. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 535, p. 213-220, 2000b.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; SESTO, F.; DENG, X.X.; CHANDLER, J.L. Six new hybrids somatics and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 1, p. 169-173, 1992b.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; TUSA, N.; REFORGIATO RECUPERO, G.; CUCINOTTA, P. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 672-676, 1996a.

GROSSER, J.W.; JIANG, J.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: II. Rootstock improvement. **HortScience**, St Joseph, v. 33, n. 6, p. 1060-1061, 1998b.

GROSSER, J.W.; JIANG, J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: I. Scion improvement. **HortScience**, St Joseph, v. 33, n. 6, p. 1057-1059, 1998a.

GROSSER, J.W.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; GMITTER JUNIOR, F.G.; LOUZADA, E.S.; RANG, J.; BAERGEN, K.; QUIROS, A.; CABASSON, C.; SCHELL, J.L.; CHANDLER, J.L. Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, p. 557-582, 1996b.

GUO, W.W.; DENG, X.X. Somatic hybrid plantlets regeneration between *Citrus* and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 297-300, 1998.

GUO, W.W.; PRASAD, D.; SERRANO, P.; GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W. Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar development. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 79, n. 3, p. 100-405, 2004.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 202-212, 1995a.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* withing grape and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995b.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN. **Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. 2.ed. México: CIMMYT, 1994. 88 p.

HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, n. 3, p. 703-711, 1998.

IWAMASA, M.; NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated citrus. **Citriculture**, New York, v. 1, p. 265-275, 1988.



- KAO, K.N.; MICHAYLUK, M.R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplast. **Planta**, Berlin, v. 115, p. 335-367, 1974.
- KOBAYASHI, S.; FUJIWARA, K.; OIYAMA, T.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Somatic hybridization between navel orange and 'Murcott' tangor. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1988, New York. **Proceedings...** New York, 1988a. v. 1, p. 135-140.
- KOBAYASHI, S.; FUJIWARA, K.; OIYAMA, T.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*Citrus unshiu*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 14, n. 2, p. 63-69, 1988b.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAM, H. Adventives plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta**, Berlin, v. 106, p. 237-245, 1972.
- KOLLER, O.C. Melhoramento e cultivares. In: **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rígel, 1994. cap. 14, p. 49-62.
- LARANJEIRA, F.F. Dez anos de clorose variegada dos citros: o que sabemos? **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, n. 1, p. 123-141, 1997.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 147-154, jun. 1998.
- LEITE JUNIOR, R.P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. **Circular IAPAR**, Paraná, v. 61, p. 51, 1990.
- LING, J-T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 493-497, 1994.
- LING, J-T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 39, p. 325-333, 1989.
- LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J.L. Eight new somatic hybrid citrus rootstock with potential for improved disease resistance. **HortScience**, St Joseph, v. 27, n. 9, p. 1033-1036, 1992.
- 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 e Fundag, 2005. 926 p.

- MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; FARIAS, P.C.M.; BENEDITO, V.A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 37, n. 4, p. 256-261, 2001.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F.J. **Hibridação somática entre laranja 'Caipira' e limão 'Cravo' através de fusão de protoplasto**. 1998. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplast of Brazilian *Citrus* cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 727-732, 2000.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 456-461, 1994.
- MIRANDA, M.; MOTOMURA, T.; IKEDA, F.; OHGAWARA, T.; SAITO, W.; ENDO, T.; OMURA, M.; MORIGUCHI, T. Somatic hybrid obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 401-405, 1997.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1 p. 116-152.
- MOURÃO FILHO, F.A.; GROSSER, J.W. Callus induction from Citrus relatives: an alternative source of protoplasts for somatic hybridization experimentes. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Tallahassee, v. 105, p. 52-56, 1992.
- MOURÃO FILHO, F.A.A.; GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, University Park, v. 50, n. 2, p. 76-80, 1996.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. p. 1155-1161.
- NEGRUTIU, I.; DE BROWER, D.; WATTS, J.W.; SIDOROV, V.I.; DIRKS, R.; JACOBS, M. Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia viviani*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 72, p. 279-286, 1986.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, J.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 71, p. 1-4, 1985.

OLIVARES-FURTER, O.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. Electrochemical protoplast fusion in citrus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, p. 112-119, 2005.

OLIVEIRA, R.P. de; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. Obtenção e cultura de calos nucleares de limão Cravo, tangerina Cleópatra e *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 115-119, 1994.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; SUDAHONO; VANEL, F.; LURO, F. Somatic hybridization in citrus: some new hybrid and alloplasmic plants. **Citriculture**, New York, v. 2, p. 907-912, 1996.

OLLITRAULT, P.; LURO, F. Amélioration des agrumes biotechnologie. **Fruits**, Paris, v. 50, p. 267-279, 1995.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copa. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. 926 p.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 281-296.

POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chorois. **Current Microbiology**, New York, v. 31, p. 377-381, 1995.

RODRIGUES, L.R.; DORNELLES, A.L.C. Origem e caracterização horticultural da tangerina 'Montenegrina'. **Laranja**, Cordeirópolis. v. 20, n. 1. p. 153-166, 1999.

SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S.; KOBAYASHI, S. Citrus cybrids regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. **Plant Science**, Amsterdam, v. 88, p. 195-201, 1993.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**, Cary, v. 8.0. v. 1, 2000.

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

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. p. 190-430.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; FIGUEIREDO, J.O.; BARBIN, D. Melhoramento de clones de laranja 'Pêra' no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., 1978, Salvador,. **Anais...** Salvador: SBF, 1978. p. 111-116.

- TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminelo' lemon and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 6, p. 1043-1046, 1990.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L. Quant-A software to quantify plant disease severity. In: INTERNACIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8, 2001, Ouro Preto. **Proceeding...** Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, 2001. 160 p.
- VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of citrus protoplasts. In: BAJAJ, P.S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering I**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. cap. 2, p. 147-159. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 8).
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 4, p. 31-36, 1975.
- VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P.S.M. A cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia**, Tokyo, v. 58, p. 305-311, 1993.
- VILORIA, Z.; DROUILLARD, D.L.; GRAHAM, J.H.; GROSSER, J.W. Screening triploid hybrids of 'Lakeland' Limequat for Resistance to Citrus Canker. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, p. 1056-1060, 2004.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER D. *Xylella fastidiosa* gen., nov., sp. Nov: Gram-negative, xylella-limited fastidious plant bacterial related to *xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, n.2, p. 136-143, 1987.
- WU, JIN-HU; FERGUSON A.R.; MOONEY, P.A. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 141, p. 229-235, 2005.
- ZIMMERMAN, V. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 694, p. 227-228, 1982.

**ANEXOS**

## Anexo A

### Composição dos meios de cultura para calos, protoplastos, embriões e plântulas de citros

<b>1. Soluções estoque de macronutrientes do meio MT (50x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5
KNO <sub>3</sub>	95,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobásico)	7,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (dibásico)	1,0
<b>2. Soluções estoque de micronutrientes do meio MT (100x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,68
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,86
KI	0,083
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025
<b>3. Soluções estoque de ferro do meio MT (50x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Na <sub>2</sub> EDTA	1,862
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,372
<b>4. Soluções estoque de vitaminas do meio MT (100x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Mio-inositol	10,0
Tiamina-HCl	1,0
Piridoxina-HCl	1,0
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2

<b>5. Solução estoque de cálcio do meio MT (66x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	29,33
<b>6. Soluções estoque de macronutrientes do meio BH<sub>3</sub> (100x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
MgSO <sub>4</sub>	37,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobásico)	15,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (dibásico)	2,0
KCl	150,0
<b>7. Soluções estoque de A multivitaminas do meio BH<sub>3</sub> (100x)</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Pantotenato de cálcio	0,05
Ácido ascórbico	0,1
Cloreto de colina	0,05
Ácido p-aminobenzóico	0,001
Ácido fólico	0,02
Riboflavina	0,01
Biotina	0,001
<b>8. Soluções estoque de B multivitaminas do meio BH<sub>3</sub> (100x)</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Retinol (vitamina A)	0,001
Colecalciferol (vitamina D <sub>3</sub> )	0,001
Vitamina B <sub>12</sub>	0,002
<b>9. Solução estoque de KI do meio BH<sub>3</sub> (100x)</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
KI	0,075
<b>10. Soluções estoque de ácidos orgânicos do meio BH<sub>3</sub> (50x)</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Piruvato de sódio	0,1
Ácido cítrico	0,2
Ácido málico	0,2
Ácido fumárico	0,2

<b>11. Soluções estoque de açúcares do meio BH<sub>3</sub> (100x)</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Frutose	2,5
Ribose	2,5
Xilose	2,5
Manose	2,5
Ramose	2,5
Celobiose	2,5
Galactose	2,5
Manitol	2,5
<b>12. Soluções estoque 1 de sais de CPW</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2720
KNO <sub>3</sub>	1,0000
MgSO <sub>4</sub>	2,5000
KI	0,0016
CuSO <sub>4</sub>	0,000025
<b>13. Solução estoque 2 de sais de CPW</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5



## Anexo B

### Meios de cultura para calos, protoplastos, embriões e plântulas de citros

#### 1. EME Regular (0,146M)

S.E. de macronutrientes de MT (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de vitaminas de MT (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
Sacarose*	50 g.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte	0,5 g.L <sup>-1</sup>
Ágar	8 g.L <sup>-1</sup>

Ajustar o pH para 5.8 com KOH

- Para cultura de calos e células em suspensão, autoclavar por 20 minutos a 15 psi.

\* Para cultura de protoplastos, adicionar a sacarose nas seguintes proporções:

para EME 0,6M = usar 205,38 g.L<sup>-1</sup>

para EME 0,7M = usar 239,61 g.L<sup>-1</sup>

para EME 0,8M = usar 273,84 g.L<sup>-1</sup>, e esterilizar em filtro de 0,2 µm.

#### 2. H + H

S.E. de macronutrientes de MT (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de macronutrientes de BH <sub>3</sub> (100x)	5 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de vitaminas de MT (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
Sacarose	50 g.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte	0,5 g.L <sup>-1</sup>
Glutamina	1,55 g.L <sup>-1</sup>
Ágar	8 g.L <sup>-1</sup>

Ajustar o pH para 5.8 com KOH

Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

**3. BH<sub>3</sub>**

S.E. de macronutrientes de BH <sub>3</sub> (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de vitaminas de MT (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de A multivitaminas de BH <sub>3</sub> (100x)	2 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de B multivitaminas de BH <sub>3</sub> (100x)	1 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de KI de BH <sub>3</sub> (100x)	1 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de açúcares de BH <sub>3</sub> (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de ácidos orgânicos de BH <sub>3</sub> (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
Água de coco	20 mL.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte	1 g.L <sup>-1</sup>
Sacarose*	
Manitol	81,99 g.L <sup>-1</sup>
Glutamina	3,1 g.L <sup>-1</sup>
Caseína hidrolisada	0,25 g.L <sup>-1</sup>
Ajustar o pH para 5.7 com KOH	
γ. Adicionar a sacarose nas seguintes proporções:	
para BH <sub>3</sub> 0,6M = usar 51,35 g.L <sup>-1</sup>	
para BH <sub>3</sub> 0,7M = usar 85,56 g.L <sup>-1</sup>	
para BH <sub>3</sub> 0,8M = usar 119,77 g.L <sup>-1</sup> , e esterilizar em filtro de 0,2 μm.	

**4. CPW**

	<b>mL.100mL<sup>-1</sup></b>
S.E. 1 de sais de CPW	1,0
S.E. 2 de sais de CPW	1,0
- Para CPW 13M, adicionar 13 g.100 mL <sup>-1</sup> de manitol	
- Para CPW 25M, adicionar 25 g.100mL <sup>-1</sup> de sacarose	
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

<b>5. Solução Enzimática</b>	<b>g.40mL<sup>-1</sup></b>
Manitol (0,7M)	5,12
CaCl <sub>2</sub> (24,5mM)	0,144
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,92mM)	0,0044
MES (6,15mM)	0,048
Celulase a 1% (Onozuka RS)	0,4
Macerase a 1%(R 10)	0,4
Pectolyase Y-23 a 0,2%	0,08
Ajustar o pH para 5.6 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	
<b>6. Solução de PEG</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Poli(etilenoglicol) (PM = 1450)	40,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,97
Glicose	5,41
Ajustar o pH para 6.0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	
<b>7. Solução de lavagem "A"</b>	
Glicose	7,2 g.100mL <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,97 g.100mL <sup>-1</sup>
DMSO	10 ml.100mL <sup>-1</sup>
Ajustar o pH para 6.0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	
<b>8. Solução de lavagem "B"</b>	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Glicina	2,25
Ajustar o pH para 10.5 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

## Anexo C

### Meios de cultura para protoplastos de citros

#### 1. Meio 1:1:1

- 1 parte de BH<sub>3</sub> 0,6M
- 1 parte de EME 0,6M
- 1 parte de EME regular (0,146M)
- Ajustar o pH para 5.7
- Esterilizar em filtro de 0,2 µm

#### 1. Meio 1:2

- 1 parte de BH<sub>3</sub> 0,6M
- 2 partes de EME Regular (0,146M)
- Ajustar o pH para 5.7
- Esterilizar em filtro de 0,2 µm

### Meio para indução de calos

Meio EME Regular (0,146M)

BAP

5 mg.L<sup>-1</sup>

#### 9. Meio 1500

- |                                      |                       |
|--------------------------------------|-----------------------|
| S.E. de macronutrientes de MT (50x)  | 20 mL.L <sup>-1</sup> |
| S.E. de micronutrientes de MT (100x) | 10 mL.L <sup>-1</sup> |
| S.E. de vitaminas de MT (100x)       | 10 mL.L <sup>-1</sup> |
| S.E. de cálcio de MT (66x)           | 15 mL.L <sup>-1</sup> |
| S.E. de ferro de MT (50x)            | 20 mL.L <sup>-1</sup> |
| Sacarose                             | 50 g.L <sup>-1</sup>  |
| Extrato de malte                     | 1,5 g.L <sup>-1</sup> |
| Ágar                                 | 8 g.L <sup>-1</sup>   |
| Ajustar o pH para 5.8 com KOH        |                       |
| Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi  |                       |

**12. RMAN**

S.E. de macronutrientes de MT (50x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	5 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de vitaminas de MT (100x)	5 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L <sup>-1</sup>
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L <sup>-1</sup>
NAA (S.E. de 279,3 mg.l <sup>-1</sup> )	72 µL.L <sup>-1</sup>
Carvão ativado	0,5 g.L <sup>-1</sup>
Sacarose	25 g.L <sup>-1</sup>
Ágar	8,0 g.L <sup>-1</sup>
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

**Meio de cultura sólido para *Xylella fastidiosa* – PWG**

Água destilada	900 mL.L <sup>-1</sup>
Phytone Peptone	4,0 g.L <sup>-1</sup>
Tryptcase Peptone	1,0 g. L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (Sulfato de Magnésio)	0,4 g. L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3H <sub>2</sub> O (Fosfato de Potássio Dibásico)	1,2 g. L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de Potássio Monobásico)	1,0 g. L <sup>-1</sup>
Phenol Red (solução estoque 0,2%)	10 g. L <sup>-1</sup>
Hemin Chloride (solução estoque)	10 g. L <sup>-1</sup>
Gelrite Gellan Gum	8,0 g. L <sup>-1</sup>
L-glutamina	4,0 g. L <sup>-1</sup> / 50 mL.L <sup>-1</sup>
dH2OBSA (Albumin)	3g/100 mL.L <sup>-1</sup>
dH2O	4,0 g.L <sup>-1</sup>
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

**Tampão SPC para extração de DNA (*Xylella fastidiosa*)**

	<b>g.100mL<sup>-1</sup></b>
Succinato Dissódico	0,1 g.L <sup>-1</sup>
Citrato de Sódio	0,1 g.L <sup>-1</sup>
Potássio Fosfato Dibásico K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,15 g.L <sup>-1</sup>
Fosfato de Potássio Monobásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g.L <sup>-1</sup>

Essa solução, pronta, deve ser armazenada em geladeira!

Apenas no momento da Extração acrescentar:

Ácido Ascórbico 0,1 M	1,76 g.L <sup>-1</sup>
PVPP a 5%	5,0 g.L <sup>-1</sup>

**Meio de cultura sólido para *Xantomonas axonopodis* pv *citri* – Ágar nutrientes (NA)**

Extrato de carne	3,0 g. L <sup>-1</sup>
Peptona	5,0 g. L <sup>-1</sup>
Ágar	20 g. L <sup>-1</sup>
Água destilada	1000 mL <sup>-1</sup>
pH	7.2

Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

# 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](#)