

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

Fusão de protoplastos visando a reconstrução da laranja azeda

Dayse Cristina de Carvalho

**Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de Concentração:
Fitotecnia.**

**Piracicaba
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Dayse Cristina de Carvalho
Engenheiro Agrônomo**

Fusão de protoplastos visando a reconstrução da laranja azeda

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

**Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de Concentração:
Fitotecnia.**

**Piracicaba
2006**

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

Carvalho, Dayse Cristina de
Fusão de protoplastos visando a reconstrução da laranja azeda / Dayse
Cristina de Carvalho. - - Piracicaba, 2006.
91 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Citricultura 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Hibridação vegetal
4. Melhoramento genético vegetal 5. Porta-enxertos 6. Protoplastos vegetais
I. Título

CDD 634.31

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

Minha querida filha Clarice

“Você chegou em minha vida transformando-a profunda e definitivamente: com seu olhar meigo, doce e mágico, iluminou meus caminhos, com sua graciosidade transbordou meu coração de ternura e com seu sorriso e carinho me encheu de forças para ir avante e lutar. Você é tudo para mim e para você desejo toda a felicidade que o mundo pode proporcionar”

Dedico

Mamãe,

“Um belo dia abandonarei este corpo que outrora prestimosamente abrigou minha alma... E neste dia vislumbrarei em breves instantes toda a trajetória percorrida... Poderei até concluir que tudo o que fiz foi em vão... Tudo em que acreditei não passaram de tolices... E ainda assim serei feliz, pois só pelo fato de ter conhecido tão nobre pessoa esta existência já terá valido à pena”.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, tempo cedido e auxílio na redação deste trabalho.

À Prof^a Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela co-orientação, pelas valiosas sugestões, pela amizade e pelas palavras de conforto e estímulo.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal por permitir a realização do curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de formação profissional e por permitir o uso de sua estrutura para geração de mais conhecimento para a humanidade.

À Luciane Lopes pelo apoio e amizade durante todo o curso e à bibliotecária Sílvia pela gentileza e profissionalismo.

À Alexandra Pavan, pela amizade incondicional e por ser uma menina de bom coração, sempre disposta a ensinar, ouvir, ajudar e a sorrir.

Aos colegas da Pós-graduação: Evandro, Fernando, Gustavo, Leandro, Suane, Rosely, Juliana, Amâncio e Monita pelo agradável convívio durante o curso e pelas experiências compartilhadas.

Ao amigo Luiz Antônio Biasi por ter me incentivado a buscar mais conhecimentos e ingressar neste curso de doutorado.

Obrigada pai e mãe, por terem me dado todo o apoio no momento em que tudo parecia impossível, com amor e serenidade.

Obrigada mamãe, por estar constantemente me incentivando a abraçar o trabalho com afinco e dedicação e por ter deixado boa parte de seus sonhos e desejos de lado para que eu pudesse realizar os meus.

À maninha Lucrecia, pelo amor, paciência, por estar sempre torcendo pelo meu sucesso e por ser um exemplo de luta pelos seus ideais.

Ao maninho Júlio, por ter aguçado meus olhos rumo à pesquisa científica, pelas palavras de estímulo e por ser um exemplo como professor e pesquisador.

Aos organismos vegetais, por permitirem tão generosamente serem estudados, manipulados e multiplicados pelas mãos humanas.

Finalmente a todos que, de algum modo, tenham contribuído para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Aspectos filogenéticos do gênero <i>Citrus</i>	13
2.2 Importância econômica do gênero <i>Citrus</i>	14
2.3 Importância da utilização de porta-enxertos na citricultura	15
2.4 Melhoramento de porta-enxertos de citros	16
2.4.1 Objetivos e dificuldades do melhoramento tradicional	17
2.5 Gomose de <i>Phytophthora</i> na cultura do citros	19
2.6 Tristeza dos citros	21
2.7 Uso da biotecnologia no melhoramento dos citros	23
2.8 Hibridação somática	24
2.8.1 Utilização da hibridação somática no melhoramento de citros	25
2.8.1.1 Melhoramento de copas de citros via hibridação somática	32
2.8.1.2 Melhoramento de porta-enxertos de citros via hibridação somática	33
2.8.1.2.1 Reconstrução da laranja azeda	35
2.8.1.3 Híbridos somáticos assimétricos e cíbridos	38
2.8.2 Isolamento e fusão de protoplastos	40
2.8.3 Regeneração de plantas e confirmação da hibridação	42
2.8.4 Variação somaclonal.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Fonte de protoplastos	47
3.1.1 Estabelecimento e cultivo de calos embriogênicos	47
3.1.2 Fonte de protoplastos não embriogênicos	48
3.2 Hibridação somática	48
3.2.1 Isolamento de protoplastos	48
3.2.2 Purificação, fusão e plaqueamento dos protoplastos	49
3.2.3 Cultura dos protoplastos, indução à embriogênese, regeneração e	

aclimatização de plantas	50
3.3 Análise das plantas regeneradas	51
3.3.1 Análise morfológica	51
3.3.2 Determinação da ploidia	52
3.3.2.2 Citometria de fluxo	52
3.3.4 Análise de DNA através de marcadores moleculares “DNA polimórfico amplificado ao acaso” (RAPD)	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Estabelecimento e cultivo de calos embriogênicos	54
4.2 Hibridação somática	56
4.2.1 Plantas obtidas pela fusão de protoplastos	60
5 CONCLUSÕES	69
ANEXO	70
REFERÊNCIAS	76

RESUMO

FUSÃO DE PROTOPLASTOS VISANDO A RECONSTRUÇÃO DA LARANJA AZEDA

O objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de fusão química de protoplastos para desenvolver híbridos somáticos interespecíficos entre tangerinas (*Citrus reticulata*) e toranjas (*Citrus grandis*), visando a obtenção de porta-enxertos semelhantes à laranja azeda (*Citrus aurantium*). Como fonte de protoplastos foram utilizadas suspensões celulares embriogênicas de tangelo 'Page' (*C. reticulata* x *C. paradisi*) e tangor 'Murcote' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e folhas jovens de *seedlings* de toranjas 'Lau Tau' e 'Ogami' (*Citrus grandis*). Após a fusão os protoplastos foram cultivados sob ausência de luz, até a formação de microcolônias, que foram então cultivadas em meio de cultura EME em dupla-fase, suplementado com 13,33 g/L de maltose para a indução da embriogênese. Os embriões globulares formados foram transferidos para meio EME com 25 g/L de sacarose e quando em estágio cotiledonar foram transferidos para meio de cultura suplementado com 1,5 g/L de extrato de malte. As brotações obtidas foram enxertadas *in vitro* sobre laranja 'Hamlin' e 'Valência'. As plantas obtidas foram levadas para casa de vegetação e cultivadas em substrato comercial. As 17 plantas regeneradas de tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' apresentaram conformação fenotípica adversa aos genitores, com folhas de tamanho reduzido, ápice arredondado, coloração verde escura, mesófilo enrugado e ausência de pecíolo alado. A análise de citometria de fluxo confirmou o caráter diplóide das plantas regeneradas. Marcadores moleculares RAPD apresentaram padrão de bandas similar entre a planta regenerada e o genitor tangelo 'Page'. O protocolo utilizado para isolamento, fusão e cultura de protoplastos, bem como para a regeneração e aclimatização de plantas permitiram a obtenção 17 plantas da combinação entre tangelo 'Page' e toranja 'Lau Tau' com conformação fenotípica diferente dos genitores, duas plantas da combinação entre tangor 'Murcote' e toranja 'Ogami' e uma planta da combinação entre tangor 'Murcote' e toranja 'Lau Tau'.

Palavras-chave: citros, cultura de tecidos, hibridação somática, porta-enxerto, melhoramento genético

ABSTRACT

PROTOPLAST FUSION AIMING THE RECONSTRUCTION OF SOUR ORANGE

The aim of this work was to apply the technique of chemical fusion of protoplasts, in order to develop interspecific somatic hybrids between mandarins (*Citrus reticulata*) and pummelos (*Citrus grandis*), in order to produce similar to sour orange (*Citrus aurantium*). The sources for protoplasts were embryogenic suspension cultures of 'Page' tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*) and 'Murcott' tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) and young leaves from seedlings of 'Lau Tau' and 'Ogami' pummelos (*Citrus grandis*). After the fusion, the protoplasts were cultivated in the absence of light, until the formation of microcolonies, and were then cultivated in double-phase EME medium, supplemented with 13.33 g/L of maltose for embryogenesis induction. The globular embryos thus formed were transferred to EME medium with 25 g/L of sucrose and, when in cotyledonal stage, were transferred to a culture medium supplemented with 1.5 g/L of malt extract. The shoots obtained were grafted *in vitro* onto 'Hamlin' and 'Valencia' sweet oranges. The regenerated plants were cultivated in a greenhouse, over commercial substrate. In this process, 17 plants were obtained. These plants presented phenotypic conformation different from the genitors, with leaves with reduced size, round apex, dark green coloration, rough leaf blade and absence of developed petiole. The analysis by flow cytometry confirmed the diploid character of the regenerated plants. RAPD molecular markers presented a similar band pattern between the regenerated specimen and the genitor 'Page' tangelo. The protocol used for isolation, hybridization and cultivation of protoplasts, as well as for the regeneration and acclimatization of the plants allowed the obtainment of 17 plants from the combination of 'Page' tangelo + 'Lau Tau' pummelo, with phenotypic conformation different from the genitors, two plants from the combination of 'Murcott' tangor + 'Ogami' pummelo and one plant from the combination of Murcote' tangor + 'Lau Tau' pummelo.

Key words: citrus, tissue culture, somatic hybridization, rootstock, genetic improvement

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera 34 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange 2,3 milhões de hectares, gerando seis milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 12,3 bilhões. Este setor demanda mão-de-obra intensiva e qualificada, fixando o homem no campo, permitindo um faturamento bruto de R\$ 1.000 a R\$ 20.000 por hectare. Além disso, para cada 10.000 dólares investidos em fruticultura, geram-se três empregos diretos permanentes e dois empregos indiretos (IBRAF, 2006).

Neste contexto, a citricultura constitui importante segmento na estrutura sócio-econômica do Brasil, podendo ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agro-industriais do país, movimentando mais de um bilhão de dólares por ano. A produção brasileira de laranjas, em 2005, foi de aproximadamente 20 milhões de toneladas (FAO, 2006), tendo o Estado de São Paulo participado com mais de 2/3 da produção do país, o que correspondeu a 79,5% da produção total de laranja (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005).

Embora a citricultura brasileira seja líder no ranking mundial, a produtividade dos pomares é considerada baixa em comparação com outros países. Isto se deve principalmente à ocorrência de problemas fitossanitários e à ausência de maior número de variedades copa e porta-enxerto com características hortícolas desejáveis, incluindo a resistência a doenças. Dentre os vários fatores que afetam a produtividade, aqueles relacionados a doenças como o cancro cítrico, *Phytophthora*, clorose variegada do citros (CVC) e tristeza (CTV) são os mais relevantes. Outros problemas que afetam o rendimento dos pomares não só no Brasil, mas também em vários outros países incluem o declínio (CB) e fatores abióticos como o estresse hídrico (COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003).

A incidência e a severidade das doenças em citros causadas por *Phytophthora spp.* têm aumentado muito nos últimos anos, constituindo-se em um dos principais problemas da cultura não só no Brasil como em vários outros países produtores (MEDINA FILHO *et al.*, 2003). Devido à importância econômica e ocorrência

praticamente universal da gomose e da podridão das raízes, muitas investigações têm sido conduzidas no sentido de avaliar porta-enxertos quanto à resistência a *Phytophthora* spp. O uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes constitui-se na principal forma de controle da doença (MEDINA FILHO *et al.*, 2003).

Durante os últimos 70 anos, o vírus da tristeza tem sido o fator biótico mais severo que afetou a citricultura, destruindo muitos pomares cítricos estabelecidos com porta-enxertos intolerantes, como a laranja azeda [*Citrus aurantium* (L.)] (OLIVARES-FUSTER *et al.*, 2003; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005). O CTV encontra-se disseminado por quase todas as regiões citrícolas do globo, causando sintomas típicos como diminuição do crescimento, declínio na produção, colapso do floema, podridão das radículas e, em muitos casos, a subsequente morte da planta (BORDIGNON *et al.*, 2003). A complexidade das inter-relações porta-enxerto/enxerto, a variabilidade genética do vírus (CTV), a severidade dos sintomas e os prejuízos econômicos relacionados à sua ocorrência demandam intensa investigação científica (LI *et al.*, 1990).

Diversos estudos indicam que muitas características importantes da combinação copa/porta-enxerto são influenciadas pelo porta-enxerto (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a). O primeiro e mais importante porta-enxerto de citrus no mundo foi a laranja azeda, devido à sua habilidade de produzir frutos de elevada qualidade, apresentar boa afinidade com a maioria das variedades copa, apresentar maior longevidade, resistência à gomose, tolerância a baixas temperaturas e à salinidade e aos viróides do exocorte e xiliporose, tolerância ao declínio dos citros, além de apresentar desenvolvimento adequado em solos variados (GROSSER; CHANDLER, 2003; GROSSER *et al.*, 2004; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005; HUTCHISON, 1977). Porém, devido a sua intolerância ao CTV, foi substituída pelo limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), constituindo-se atualmente no principal porta-enxerto da citricultura brasileira, representando cerca de 80% dos plantios (MEDINA FILHO *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2001).

Atualmente, os porta-enxertos alternativos testados como substitutos da laranja azeda tem provado ser inadequados por várias razões incluindo a falta de adaptação, baixa qualidade dos frutos, problemas hortícolas ou suscetibilidade a outras

doenças. Com base no exposto, o desenvolvimento de um porta-enxerto alternativo que tenha uma performance similar à laranja azeda, mas que seja tolerante ao CTV é imperativo (GROSSER *et al.*, 2004).

Análises com marcadores moleculares mostraram que a laranja azeda é provavelmente um híbrido de toranja com tangerina (NICOLOSI *et al.*, 2000). Considerando a genética do porta-enxerto, é improvável que a laranja azeda original tenha sido sintetizada a partir dos melhores parentais (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005). Com base no exposto, pode-se hipotetizar que híbridos de porta-enxertos superiores podem ser produzidos pela combinação de parentais de toranjas (*Citrus grandis*) e tangerinas (*Citrus reticulata*).

Híbridos interespecíficos de citros podem ser obtidos via cruzamentos controlados, mas com limitações, devido a aspectos da biologia reprodutiva do gênero, como o longo período de juvenilidade, presença de embriões nucleares (poliembrionia), incompatibilidade e esterilidade sexual, alta heterozigose, além do pouco conhecimento sobre a herança de muitas características de interesse agrônomo (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990). Neste sentido, um caminho alternativo é a utilização de ferramentas biotecnológicas que auxiliem a superação destas barreiras do melhoramento genético convencional, contribuindo assim, para o desenvolvimento de variedades melhoradas, aproveitando a grande variabilidade genética disponível (MOURÃO FILHO, 1996). Uma destas técnicas é a hibridação somática, a partir da qual podem ser produzidos híbridos interespecíficos, cujo objetivo é combinar características desejáveis dos genitores em uma mesma planta. (GROSSER, 1993; GROSSER *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de fusão química de protoplastos para desenvolver híbridos somáticos interespecíficos entre tangerinas (*Citrus reticulata*) e toranjas (*Citrus grandis*), visando a obtenção de porta-enxertos semelhantes à laranja azeda.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos filogenéticos do gênero *Citrus*

A família Rutaceae compreende 33 gêneros, três deles com importância comercial: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, sendo nativos do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967). O gênero *Citrus* pertence à tribo Citreae, subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, e é originário das regiões tropicais e subtropicais do sudeste asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão, e do leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SOOST; CAMERON, 1975; SWINGLE; REECE, 1967; CALABRESE, 1992). A taxonomia e filogenia dos *Citrus* é considerada complexa, devido à compatibilidade sexual entre o gênero *Citrus* e gêneros correlatos, à elevada frequência de mutações de gemas e à extensa história de cultivo e ampla dispersão (NICOLOSI *et al.*, 2000).

Estudos anteriores sobre a relação entre gêneros e espécies eram baseados apenas em características morfológicas. Numerosos sistemas de classificação foram formulados, dentre os quais o de SWINGLE (1943) e TANAKA (1977), que apesar de serem os mais aceitos atualmente, apresentam muitos conceitos discordantes, dentre eles o número de espécies, onde o último descreve 169, enquanto que o primeiro apenas 16.

Análises filogenéticas posteriores sugeriram que existam apenas três espécies verdadeiras dentro das espécies cultivadas de *Citrus*: as tangerinas (*C. reticulata*), as toranjas (*C. grandis*) e a cidra (*C. medica*). Os demais genótipos teriam sido derivados de hibridações entre estas espécies (BARRETT; RHODES, 1976; SCORA, 1975). Mais recentemente, este conceito tem ganhado suporte de alguns estudos utilizando marcadores moleculares e bioquímicos, incluindo isoenzimas, análise do genoma de organelas e microssatélites (NICOLOSI *et al.*, 2000)

O gênero *Citrus* é representado por plantas de porte médio (arbustivo/arbóreo), com flores brancas e aromáticas e frutos contendo vesículas preenchidas por suco de grande interesse comercial (ARAÚJO *et al.*, 2005). O número básico de cromossomos é $x = 9$, sendo que a condição mais freqüente do gênero *Citrus* é a diploidia ($2n = 2x =$

18), mas também podem ocorrer casos de poliplóides, como a lima ácida Tahiti ($2n = 3x = 27$). As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e polinização cruzada, e assexuadamente, por apomixia nucelar (MACHADO *et al.*, 2005).

2.2 Importância econômica do gênero *Citrus*

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. A laranja representa 49% de toda a produção brasileira de frutas, sendo que a área plantada está ao redor de um milhão de hectares e a produção de frutas supera 20 milhões de toneladas, a maior no mundo há alguns anos. O país é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais. O setor citrícola brasileiro somente no Estado de São Paulo, onde se concentram 77% dos pomares, gera mais de 500 mil empregos diretos e indiretos. Se constitui na segunda atividade rural em importância nesse estado, sendo superada apenas pela cana-de-açúcar. (AZEVEDO, 2003; FAO, 2006; FUNDECITRUS, 2006).

Apesar da importância econômica e da extensa área cultivada, a produtividade média dos pomares Paulistas ainda é muito baixa, ao redor de 20 toneladas por hectare. Vários fatores explicam os motivos da baixa produtividade, como a existência de pomares que ainda não atingiram plena produção ou encontram-se com produção marginal, espaçamento muito largo, falta de tratamentos fitossanitários, adubação e correção de acidez do solo impróprias, incidência de doenças e práticas culturais inadequadas (TERSI; RIGOLIN, 2000).

Além da baixa produtividade, a vulnerabilidade da citricultura paulista se deve também à predominância da combinação laranja 'Pêra' sobre limão 'Cravo' na formação dos pomares, indicando a necessidade de um programa de diversificação de variedades. Além disso, as variedades utilizadas não são as mais adaptadas às condições de cultivo existentes, conforme se constata pelo período de vida útil relativamente baixo dos pomares, em torno de 15 a 18 anos, enquanto que em regiões

produtoras como o Mediterrâneo e Japão, esse período pode ultrapassar os 60 anos (SOARES FILHO, 2000).

2.3 Importância da utilização de porta-enxertos na citricultura

O caráter perene da cultura do citros coloca fundamental importância na escolha da muda, que se constitui no insumo mais importante na formação de um pomar. As principais características da muda cítrica são a origem do enxerto e do porta-enxerto, a qualidade do sistema radicular e a sua sanidade. Os porta-enxertos são capazes de influenciar várias características hortícolas e sanitárias às variedades copa, tais como a concentração de sólidos solúveis totais, tamanho da copa e do fruto, precocidade de produção, produtividade, época de maturação e peso dos frutos, coloração da casca, resistência a moléstias e ao frio, distribuição do sistema radicular, dentre outras (WUTSCHER, 1991; POMPEU JÚNIOR, 1991; SCHAFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001; ANDRADE; MARTINS, 2003).

A utilização de porta-enxertos de citros no Brasil começou no início do século XX, quando a citricultura brasileira alcançou expressão comercial, tendo como porta-enxerto mais utilizado a laranja 'Caipira' (*Citrus sinensis*). Por ser pouco resistente à gomose e à seca, entretanto, a laranja 'Caipira' foi sendo substituída pela laranja azeda (*Citrus aurantium*), que passou a ser o porta-enxerto mais utilizado no mundo (POMPEU JÚNIOR, 1991), dada a sua excelente performance agrônoma, com produção de frutos de alta qualidade, elevada produtividade e resistência ao declínio e à *Phytophthora sp.* Todavia, a intolerância deste porta-enxerto ao vírus da tristeza praticamente dizimou a citricultura brasileira na década de 40, forçando sua substituição por outro, com características hortícolas menos desejáveis, mas com maior tolerância ao CTV (POMPEU JÚNIOR, 1991; OLIVARES-FUSTER *et al.*, 2003; GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005). Após a década de 60, o limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) passou a liderar a preferência dos citricultores, atingindo cerca de 80% das mudas produzidas. Embora possua características favoráveis, como a tolerância ao vírus da tristeza e à seca, este porta-enxerto apresenta algumas limitações ao seu uso, como a susceptibilidade ao 'declínio dos citros', à gomose e, mais recentemente, à

Morte Súbita do citros. Essa situação favoreceu, a partir da década de 70, a utilização de porta-enxertos alternativos como a tangerina 'Cleópatra', tangerina 'Sunki', limão 'Volkameriano', Trifoliata e seus híbridos (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a; CARLOS; STUCHI; DONADIO, 1997; GROSSER *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2001; POMPEU JÚNIOR, 2002; FUNDECITRUS, 2006).

A história da citricultura vem mostrando a importância da diversificação de porta-enxertos, além da necessidade de cultivares porta-enxerto melhorados. A utilização generalizada de um único porta-enxerto para todos as cultivares copa provavelmente não atende às características peculiares de cada cultivar, impedindo que a planta, mesmo recebendo os tratamentos culturais adequados, manifeste todo seu potencial produtivo (POMPEU JÚNIOR *et al.*, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O conhecimento das peculiaridades inerentes a cada variedade porta-enxerto e a racional utilização destas características permite incrementos na produtividade. A escolha do porta-enxerto a ser utilizado é uma fase de grande importância no planejamento de um pomar de citros. Essa escolha deverá levar em conta também o local de instalação do pomar, clima, solo, cultivar copa e o manejo a ser adotado, já que não existe um porta-enxerto considerado completo em suas características hortícolas (MOURÃO FILHO; MENDES; DONADIO, 2002).

2.4 Melhoria de porta-enxertos de citros

Diversos estudos indicam que muitas características importantes da combinação copa/porta-enxerto são influenciadas exclusivamente pelo porta-enxerto (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a). Os programas de melhoria de cultivares porta-enxerto dão ênfase à tolerância ou resistência a doenças como gomose de *Phytophthora*, CTV, declínio e nematóides, a fatores abióticos tais como baixa temperatura, salinidade, estresse hídrico e encharcamento, além de características hortícolas como vigor e tamanho de copa, qualidade dos frutos e produtividade (MOURÃO FILHO, 1996).

No entanto, não há um porta-enxerto cítrico usado atualmente que não apresente alguma limitação quanto a suas características hortícolas, incluindo a

resistência a doenças. O emprego da diversificação de porta-enxertos na citricultura permite a obtenção de inúmeros ganhos, sendo necessárias novas pesquisas com ênfase no melhoramento genético (MENDES *et al.*, 2001; PIO *et al.*, 2002; FORNER; FORNER-GINER, 2002; GROSSER; CHANDLER, 2003).

Porta-enxertos com características desejáveis devem ser de fácil propagação, compatíveis com a variedade copa sobre ele enxertada e induzir boa produção e qualidade de frutos, bem como conferir vigor reduzido às plantas para facilitar o planejamento e condução dos pomares adensados. Deve apresentar resistência a pragas e doenças das raízes, adaptação às condições de solo e clima da área onde será empregado, grande quantidade de sementes e alta taxa de poliembrionia (POMPEU JÚNIOR, 1991; CARLOS; STUCHI, DONADIO, 1997).

O objetivo da maioria dos programas de melhoramento de porta-enxertos é agrupar as características de resistência a fatores adversos, sejam eles bióticos ou abióticos combinados com uma ampla adaptação e elevada produtividade (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005).

2.4.1 Objetivos e dificuldades do melhoramento tradicional

Inicialmente, a seleção de novas variedades de citros era realizada por cruzamentos controlados entre plantas compatíveis, de acordo com as técnicas de melhoramento tradicionais. Entretanto, estas técnicas têm apresentado limitações na 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, poliembrionia nucelar (apomixia), elevada heterozigose, auto e interincompatibilidade e poliploidia. Como consequência, as variedades desenvolvidas para a citricultura mundial, neste último século, têm sido originadas a partir de seleção de *seedlings* obtidos por cruzamentos naturais e por mutantes espontâneos de gemas originados de cultivares já existentes (SOOST; CAMERON, 1975; SPIEGEL-ROY; VARDI, 1984; GROSSER; GMITTER JÚNIOR; HU, 1990; GMITTER JÚNIOR; GROSSER; MOORE, 1992; MENDES *et al.*, 2002; NAVARRO *et al.*, 2004).

A apomixia ou embrionia nucelar representa um dos maiores obstáculos para programas de melhoramento via hibridização 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. Além disso, há dificuldade na identificação de embriões zigóticos, que precisam ser identificados e separados dos clones oriundos dos embriões nucleares, pois esses últimos representam clones maternos (MEDINA FILHO *et al.*, 1991; CRISTOFANI; MACHADO; GRATTAPAGLIA, 1999).

Os programas de melhoramento em citros são prejudicados também pelo longo período juvenil, onde muitas espécies podem levar mais de cinco anos até a primeira produção (SOOST; CAMERON, 1975). Esta característica implica ainda na presença de plantas com grande quantidade de espinhos, crescimento vigoroso, resultando em plantas com porte excessivo, dificultando a avaliação das progênies híbridas (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a).

A poliploidia é bastante comum em citros e é um dos fatores que interferem na 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 (CRISTOFANI; MACHADO; GRATTAPAGLIA, 1999).

Um outro problema que dificulta os trabalhos de melhoramento é a alta heterozigose, assim como o desconhecimento do modo de herança de características desejadas. Conseqüentemente, cruzamentos realizados entre parentais com características complementares freqüentemente resultam em progênies com produção e qualidade aquém da esperada. Além disso, muitas características importantes dos parentais são segregadas e perdidas nas progênies. Em outros casos, a progênie resultante apresenta grande perda de vigor por endogamia (BARRET; RHODES, 1976; SWINGLE; REECE, 1967). Algumas características de importância econômica para o melhoramento dos citros, que podem ser herdadas como características determinadas por um único gene, são a resistência ao vírus da tristeza dos citros, resistência aos nematóides dos citros, embrionia nucelar e o caráter folha trilobada de *Poncirus trifoliata* (CRISTOFANI; MACHADO; GRATTAPAGLIA, 1999.).

Os programas de melhoramento de variedades porta-enxerto dão ênfase à tolerância ou resistência a fatores bióticos (doenças e pragas), como: gomose, tristeza dos citros, declínio, nematóides e a fatores abióticos tais como baixa temperatura, salinidade, estresse hídrico e encharcamento, alumínio e alcalinidade, combinados com uma ampla adaptação e elevada produtividade (MOURÃO FILHO, 1996; GROSSER *et al.*, 2000; POMPEU JÚNIOR, LARANJEIRA, BLUMER, 2002; GROSSER; CHANDLER, 2003; GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005). O sucesso dos programas tradicionais de melhoramento de porta-enxertos é limitado pelas características genéticas e reprodutivas peculiares dos citros, como citado anteriormente. Dentro deste contexto, a biotecnologia oferece ferramentas alternativas que podem superar muitas destas limitações (NAVARRO *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de técnicas como a cultura de células e tecidos e a biologia molecular têm auxiliado os melhoristas a superarem essas dificuldades. Adicionalmente, a hibridação somática através da fusão de protoplastos e a transformação genética, em associação com os métodos tradicionais de melhoramento, podem contribuir significativamente na produção de novas variedades com características desejáveis (GILL *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003).

2.5 Gomose de *Phytophthora* na cultura do citros

Entre as principais doenças fúngicas dos citros estão as causadas pelo gênero *Phytophthora*, responsável pela mais severa doença de solo nas plantas cítricas brasileiras (ROSSETI, 2001). A gomose de *Phytophthora* está amplamente distribuída no parque citrícola mundial, causando de 10 a 30% de perda da produção anual, desde regiões áridas até subtropicais (ERWIN; RIBEIRO, 1996; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). No Brasil, os fungos agentes causais desta doença são *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan; sinônimo: *P. parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* R.E. Smith e E.H. Smith, sendo *P. parasitica* a espécie predominante nas principais regiões produtoras (FEICHTENBERGER, 2001; SIVEIRO *et al.*, 2002). A doença continua em expansão no Estado de São Paulo devido à utilização de mudas

produzidas em viveiros contaminados por esses fungos (FUNDECITRUS, 2006). Nos Estados Unidos, as perdas por incidência de gomose nos pomares tem gerado grandes perdas na produção, da ordem de 76 milhões de dólares anuais (STEDDOM *et al.*, 2002).

A laranja azeda, considerada resistente à *Phytophthora* spp., era o porta-enxerto mais utilizado no Brasil até a década de quarenta quando, devido a sua intolerância ao CTV, foi substituída pelo limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), constituindo-se no principal porta-enxerto da citricultura brasileira. O limão 'Cravo' é menos tolerante à infecção de *Phytophthora* spp., o que tem causado um aumento considerável na incidência e na severidade dos danos causados por esses patógenos (MEDINA FILHO *et al.*, 2003).

A gomose geralmente se manifesta no colo da planta. Os sintomas da infecção são lesões na casca da base, raízes e nos galhos baixos, com exsudação de goma pelo fendilhamento da casca. A doença pode expandir-se para as raízes principais até 20 ou 30cm abaixo do solo e para cima do troco. Pode-se observar ainda, na parte interna da casca, uma coloração pardacenta. Com o progresso da doença, os tecidos apodrecem e quando a lesão envolve toda a circunferência do tronco, a planta morre rapidamente por estrangulamento devido ao ataque do câmbio ou floema, o que interrompe o fluxo descendente de seiva. Na sementeira, esses fungos causam o "tombamento" ou "damping off", atacando as plântulas e afetando os tecidos da região do colo, onde surgem lesões deprimidas e de coloração escura, que crescem e provocam a morte das plantas (DAVIES, 1988; SANTOS FILHO, 1991; PRATES; PELEGRINETTI, 1995; FUNDECITRUS, 2006).

Devido à importância econômica e ocorrência praticamente universal da gomose e da podridão das raízes, muitas investigações têm sido conduzidas no sentido de avaliar porta-enxertos de citros quanto à resistência a *Phytophthora* spp. O uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes constitui-se na principal forma de controle das doenças causadas por *Phytophthora* spp., uma vez que os patógenos são endêmicos no solo de pomares de citros na maioria das áreas citrícolas do mundo (MATHERON; WRIGHT; PORCHAS, 1998; MEDINA FILHO *et al.*, 2004; CALIXTO *et al.*, 2004). Em programas de melhoramento de porta-enxertos, onde se busca associar em híbridos

diversas características de interesse agrônomo como adaptabilidade edafoclimática e resistência a doenças, um dos primeiros critérios de seleção é o nível de resistência à *Phytophthora* spp. (MEDINA FILHO *et al.*, 2003).

2.6 Tristeza dos citros

O *Citrus tristeza virus* (CTV) é um patógeno de grande importância econômica, infectando praticamente todas as espécies, cultivares e híbridos e muitos gêneros relacionados de citros. O vírus é limitado ao floema e pertence ao gênero Closterovirus, com partículas de 10-12 nm de diâmetro por 2000 nm de comprimento. Isolados do CTV são compostos geralmente denominados haplótipos, podendo ou não desenvolver sintomas em função das variedades copa e porta-enxerto (SOUZA *et al.*, 2002).

Este vírus, aparentemente originado na Ásia, tem sido disseminado pela movimentação de material contaminado, pela enxertia de borbulha e pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida*), principal vetor do vírus (AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2003). Segundo KOIZUMI (2001), a probabilidade que o vírus seja transmitido pelo afídeo após ter picado uma planta infectada chega a 70%.

No Brasil, a doença praticamente dizimou os pomares paulistas na década de 40, quando nove milhões de plantas cítricas cultivadas sobre porta-enxerto laranja azeda foram perdidas, devido à intolerância desta última ao CTV (MOREIRA; MOREIRA, 1991; FUNDECITRUS, 2006). Os sintomas na planta são variados, dependendo da estirpe do vírus e da combinação copa/porta-enxerto, apresentando-se com amarelecimento das mudas, declínio rápido, declínio moderado, caneluras e mesmo ausência de sintomas visíveis; nesse caso, manifestam-se, em certas condições, apenas como uma interrupção ou diminuição na taxa de crescimento. Tais sintomas podem variar conforme o ambiente, sobretudo devido à temperatura, havendo também influência da constituição genética da copa, do porta-enxerto e da interação de ambos (ROCHA-PENA *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1997; KARASEV *et al.*, 1998; OLIVARES-FUSTER *et al.*, 2003).

Os sintomas típicos de tristeza, induzidos em combinações de citros enxertados em laranja azeda, são caracterizados por folhas ligeiramente bronzeadas, de aspecto

coriáceo e quebradiças. Em alguns casos, ocorre o amarelecimento da nervura principal, ou então, amarelecimento total das folhas velhas, declínio rápido das plantas, seca gradativa dos galhos a partir das extremidades, necrose dos tubos crivados do porta-enxerto e podridão das radículas. Caneluras invertidas também podem ocorrer na face interna da casca do cavalo. Algumas vezes as plantas morrem rapidamente; outras ficam atrofiadas e cloróticas (BENNETT; COSTA, 1949). Atualmente estes sintomas não são encontrados no Brasil devido ao desuso da laranja azeda como porta-enxerto (BORDIGNON *et al.*, 2003)

O uso de porta-enxertos tolerantes para cultivares copa suscetíveis e a certificação de borbulhas são condições primárias para o controle da doença e para a existência de pomares viáveis, especialmente em regiões onde a doença é endêmica e existam eficientes vetores associados, como ocorre em todas as regiões do Brasil (CARLOS; STUCHI; DONADIO, 1997; KOIZUMI, 2001), portanto, verifica-se também para esta doença, a importância da copa na escolha do porta-enxerto em função de seu nível de tolerância à tristeza (SCHAFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001).

Na ausência de programas de erradicação da infecção e de período de quarentena, não existem estratégias satisfatórias de controle da CTV. Uma das formas mais efetivas de controle desta doença tem sido através do uso de variedades porta-enxerto tolerantes, todavia, existem poucas variedades com características de resistência genética ao CTV dentro do gênero *Citrus* e variedades copa resistentes ao CTV são desconhecidas. Existem variedades pertencentes à mesma família dos citros, incluindo *Poncirus trifoliata* (L.) que são geralmente resistentes à infecção pela maioria das estirpes de CTV e que representam um potencial para provimento de genes de resistência que podem ser utilizados em programas de melhoramento no desenvolvimento de variedades híbridas de porta-enxerto, resistentes ao CTV (ALBIACH-MARTI *et al.*, 2004).

A elevada suscetibilidade de laranjas doces e grapefruits economicamente importantes à infecção pelo CTV, associada à rápida dispersão do vetor afídeo, tem conduzido pesquisadores a focar o problema de duas diferentes formas, uma baseada no melhoramento em longo prazo para tolerância de porta-enxertos pelo uso da hibridação sexual e somática e a outra, objetivando a obtenção da resistência ao

CTV pela transformação genética de variedades cítricas (OLIVARES-FUSTER *et al.*, 2003).

2.7 Uso da biotecnologia no melhoramento dos citros

A Biotecnologia refere-se a um conjunto amplo de tecnologias habilitadoras e potencializadoras envolvendo a utilização, alteração controlada e a otimização de organismos vivos ou suas partes funcionais, células e moléculas para a geração de produtos, processos e serviços, sendo seus resultados aplicáveis e utilizados por diversos setores, como saúde, agroindústria e meio ambiente, e envolvem varias áreas do conhecimento, como a biologia molecular, genética, fisiologia, microbiologia, química, dentre outras (CTNBio, 2002).

O melhoramento de plantas tem como propósito o desenvolvimento de novas cultivares que, adaptadas às condições de cultivo, sejam capazes de promover uma estável e elevada produtividade, assim como a qualidade desejada do produto. Até meados da década de 80, os métodos tradicionais de melhoramento foram os grandes responsáveis pelo desenvolvimento de novas cultivares. Porém, nos últimos anos, o melhoramento clássico recebeu como ferramentas auxiliares diversas técnicas baseadas no cultivo de tecidos vegetais e biologia molecular, que ampliaram os horizontes na busca da diversidade alélica necessária em um programa de melhoramento (BINSFELD, 1999).

O desenvolvimento e a incorporação de novas biotecnologias tais como a transformação genética e a fusão de protoplastos no melhoramento de espécies cítricas, permitem a transposição das barreiras impostas pelas características genéticas e reprodutivas inerentes ao citros, bem como a exploração de germoplasma disponível para a obtenção de novas variedades, combinando características complementares sem ocorrência de segregação gênica (GROSSER, GMITTER JÚNIOR, 1990; GROSSER *et al.*, 1996; MOURÃO FILHO, GMITTER JÚNIOR; GROSSER, 1996; MACHADO, 1997; SILVA *et al.*, 2005). A manipulação genética dos citros utilizando métodos biotecnológicos tem sido desenvolvida desde a década de 80, após o relato do primeiro híbrido somático intergênerico *Citrus sinensis* + *Poncirus trifoliata*

(OHGAWARA *et al.*, 1985) e com a primeira tentativa de produzir plantas transgênicas de citros (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989).

Das estratégias biotecnológicas disponíveis para transferência gênica entre espécies, a transformação genética é vantajosa quando se trata da transferência de caracteres monogênicos, isto é, características gênicas controladas por um único gene e quando esse gene de interesse está disponível e clonado em um vetor (normalmente plasmídeo), que se encarregará de transferi-lo ao genoma da planta. Entretanto, até o momento, somente um limitado número de genes identificados e clonados estão disponíveis para serem transferidos. Porém, a grande maioria dos caracteres de interesse econômico (produtividade, resistência a pragas e moléstias, tolerância a stresses) são características controladas por poligenes ou genes que tenham mecanismos moleculares desconhecidos, não podendo ser transferidos por meio da técnica da transformação. Nesse caso, a estratégia da hibridação somática apresenta-se como uma alternativa apropriada (BINSFELD, 1999).

2.8 Hibridação somática

A possibilidade de geração de variabilidade pela superação da incompatibilidade sexual entre plantas e introdução de características agrônômicas desejáveis em materiais melhorados é a principal aplicação da técnica de hibridação somática de protoplastos, sendo utilizada na citricultura tanto para o melhoramento de variedades copa quanto porta-enxerto (MIRANDA *et al.*, 1997). Comparada à transformação genética, a fusão de protoplastos não é específica em relação ao resultado buscado, pois a introgressão ou a transferência gênica não são precisamente controladas. Porém, ao contrário dos genes introduzidos por meio das técnicas de DNA recombinante, essa ferramenta biotecnológica torna possível a transferência de características gênicas controladas principalmente por poligenes (VIEIRA, 1997; BINSFELD, 1999; MATSUMOTO, 2001; DAVEY *et al.*, 2005).

A hibridação somática é uma técnica que permite modificar células vegetais mediante fusões nucleares ou citoplasmáticas, se constituindo numa ferramenta muito

útil para o melhoramento genético, servindo como alternativa complementar para os programas tradicionais de melhoramento, pois permite não só a transposição da barreira de incompatibilidade sexual, quanto a manipulação de características extra-cromossômicas como a macho-esterilidade. Híbridos somáticos intra e intergenéricos e interespecíficos podem ser obtidos via fusão simétrica, assimétrica e microfusão (CARNEIRO *et al.*, 1998; MENDES-DA-GLORIA *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 2004; LIU; XU; DENG, 2005). A hibridação somática oferece também a oportunidade de se combinar citoplasmas diferentes na mesma célula, sendo produzidos cíbridos. Essas combinações não podem ser produzidas por hibridação sexual, onde o citoplasma materno é herdado (VIEIRA, 1997; POLCI; FRIEDRICH, 2004; LIU; XU; DENG, 2005).

2.8.1 Utilização da hibridação somática no melhoramento de citros

A hibridação somática oferece uma alternativa viável ou auxiliar aos programas de melhoramento convencionais de citros com aplicação no desenvolvimento de copas e porta-enxertos, transpondo barreiras como a incompatibilidade sexual, longo período juvenil e baixa produção de sementes (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990; MOURÃO FILHO; GMITTER JÚNIOR; GROSSER, 1996; GUO *et al.*, 2004; KHAN; GROSSER, 2004; XU; LIU; DENG, 2004). A produção de híbridos somáticos intergenéricos entre *Citrus* e espécies/gêneros relacionados e sexualmente incompatíveis, aumentando o germoplasma através da inserção de características desejáveis, se constitui em outra aplicação da técnica no melhoramento (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, CHANDLER, 1990; GROSSER *et al.*, 1996; MIRANDA *et al.*, 1997). Adicionalmente, a fusão de protoplastos tem possibilitado combinar características citoplasmáticas em várias espécies de plantas nas quais cloroplastos e mitocôndrias são maternalmente bloqueadas na hibridação sexual (CHENG *et al.*, 2003). A nova combinação núcleo/citoplasma (cíbridos) podem revelar o papel citoplasmático no fenótipo e seu potencial para o melhoramento dos citros (OLIVARES-FUSTER; DURAN-VILA; NAVARRO, 2005). Acredita-se que o genoma citoplasmático controla algumas características agrônômicas valiosas. Por exemplo, o DNA citoplasmático (cp DNA) pode desenvolver um papel na herança de resistência a

doenças e o mitocondrial (mt DNA) está diretamente relacionado à macho-esterilidade. O genoma de organelas de híbridos somáticos de citros e cíbridos tem sido intensivamente estudados durante os últimos anos (GUO; CHENG; DENG, 2002; MOREIRA *et al.*, 2000b).

Desde que o primeiro híbrido somático de citros foi obtido por OHGAWARA *et al.* (1985), entre laranja 'Trovita' (*Citrus sinensis*) e Trifoliata (*Poncirus trifoliata*), mais de 250 diferentes híbridos somáticos interespecíficos e intergenéricos foram produzidos no mundo (CHEN *et al.*, 2004; XU; LIU; DENG, 2005; GUO *et al.*, 2006) para a utilização direta como porta-enxertos ou para o uso em programas de melhoramento de copa a partir de material cultivado em diferentes países (MENDES *et al.*, 2001), incluindo Estados Unidos (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005), China (GUO *et al.*, 2004), Espanha (OLIVARES-FUSTER, DURAN-VILA; NAVARRO, 2005), França (CABASSON *et al.*, 2001), Nova Zelândia (WU; FERGUSON; MOONEY, 2005) e Japão (TAKAMI *et al.*, 2004).

Por outro lado, embora a hibridação somática tenha sido mencionada na década de 80 como a biotécnica que poderia revolucionar a agricultura e as pesquisas de melhoramento de plantas, esta predição nunca se materializou e esforços na pesquisa têm mudado em direção às estratégias da biologia molecular. Razões para que a técnica não tenha tido o impacto esperado incluem dificuldades no isolamento de protoplastos, cultivo e regeneração de plantas e elevados níveis de ploidia (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000).

O modelo de fusão aditiva entre protoplastos diplóides derivados de calos embriogênicos e protoplastos diplóides derivados de mesófilo foliar tem sido extensivamente utilizado (LIU *et al.*, 2002; GUO; GROSSER, 2005), estando a técnica bem estabelecida para *Citrus* (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2000) e considerada uma ferramenta adicional para o melhoramento genético do gênero. Estas combinações híbridas incluem fusões entre genitores interespecíficos e intergenéricos, como mostram os dados apresentados nos Quadros 1, 2 e 3.

Genitores	Referências
laranja 'Trovita' + P. trifoliata	Ohgawara et al., 1985
laranja 'Washington Navel'+ tangor 'Murcote'	Kobayashi et al., 1988a
laranja 'Washington Navel'+ tangerina 'Satsuma'	Kobayashi et al., 1988b
laranja 'Hamlin' + P. trifoliata 'Flying Dragon'	Grosser et al., 1988a
Lima ácida 'Key' + laranja 'Valência'	Grosser et al., 1989
laranja 'Bahia'+ pomelo 'Marsh seedless'	Ohgawara et al., 1989
laranja 'Valência'+ limão 'Femminello'	Tusa et al., 1990
C. sudachi + lima ácida	Saito et al., 1991
laranja 'Hamlin'+ limão 'Rugoso' laranja 'Valência' + limão 'Rugoso' pomelo 'Thompson' + tangor 'Murcote' tangerina 'Cleópatra' + P. trifoliata 'Flying Dragon' tangerina 'Cleópatra' + citrumelo 'Swingle'	Grosser et al., 1992b
laranja 'Valência' + kinquat 'Meiwa'	Deng et al., 1992
tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda tangerina 'Cleópatra' + limão 'Rugoso' tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' tangerina 'Cleópatra' + limão 'Cravo' laranja 'Hamlin' + limão 'Cravo' laranja azeda + limão 'Volkameriano' laranja 'Valência' + citrange 'Carrizo' laranja 'Valência' + citrange 'Carrizo'	Louzada et al., 1992
limão Milam híbrido + limão 'Femminello'	Tusa et al., 1992
laranja azeda + limão 'Cravo' (C. jambhiri x C. sinensis) + tangerina 'Sun Chu Sha' laranja 'Succari' + P. trifoliata 'Argentine' tangerina 'Cleópatra' + P. trifoliata 'Argentine' laranja azeda + P. trifoliata 'Flying Dragon'	Grosser, 1994

tangerina 'Ponkan' + limão 'Rugoso'	Moriguchi et al., 1996
<p> pomelo 'Red Marsh' + P. trifoliata 'Argentine' pomelo 'Red Marsh' + P. trifoliata 'Flying Dragon' laranja 'Succari' + kunquat 'Meiwa' kunquat 'Meiwa' + tangerina 'Dancy' kunquat 'Meiwa' + tangerina 'Cleópatra' laranja 'Succari' + Microcitrus papuana laranja 'Hamlin' + Microcitrus papuana </p>	Grosser et al., 1996b
<p> laranja 'Succari' + tangerina 'Dancy' laranja 'Succari' + tangelo 'Minneola' laranja 'Succari' + tangor 'Murcote' laranja 'Succari' + tangelo 'Page' laranja 'Succari' + tangerina 'Ponkan' </p>	Mourão Filho et al., 1996
<p> laranja 'Valência' + tangelo 'Minneola' laranja 'Valência' + tangor 'Murcote' laranja 'Valência' + tangelo 'Page' laranja 'Valência' + híbrido 3 USDA-CJH laranja 'Valência' Rhode Red + tangerina 'Dancy' laranja 'Valência' Rhode Red + híbrido 1 USDA-CJH tangor 'Murcote' + LB8-9 tangor 'Murcote' + híbrido 1 USDA-CJH tangor 'Murcote' + híbrido 2 USDA-CJH pomelo 'Redblush' + LB8-9 laranja 'Succari' + toranja 'Hirado Buntan' laranja 'Succari' + híbrido 1 USDA-CJH tangelo 'Nova' + toranja 'Hirado Buntan' laranja 'Hamlin' + tangerina 'Ponkan' laranja 'Hamlin' + LB8-9 </p>	Grosser et al., 1998a
<p> limão 'Milam' híbrido + C. obovoidea limão 'Milam' híbrido + citrumelo 'Swingle' limão 'Milam' híbrido + citrange 'Carrizo' </p>	

<p>tangerina 'Cleópatra' + citrange 'Carrizo' laranja azeda + citrange 'Carrizo' laranja 'Succari' + laranja azeda laranja 'Succari' + C. obovoidea laranja 'Succari' + limão 'Rugoso' 8166 tangerina 'Cleópatra' + limão 'Rugoso' 8166 pomelo 'Redblush' + limão 'Rugoso' 8166 [C. reticulata x (C. paradisi x C. reticulata)] + lima da Pérsia laranja 'Valência'+ tangelo 'Minneola' laranja 'Valência'+ tangor 'Murcote' laranja 'Valência'+ tangelo 'Page' laranja 'Valência'+ híbrido 3 USDA-CJH laranja 'Valência' Rhode Red + tangerina 'Dancy' laranja 'Valência' Rhode Red + híbrido 1 USDA-CJH tangor 'Murcote' + LB8-9 tangor 'Murcote' + híbrido 1 USDA-CJH tangor 'Murcote' + híbrido 2 USDA-CJH pomelo 'Redblush' + LB8-9 laranja 'Succari' + toranja 'Hirado Buntan' laranja 'Succari' + híbrido 1 USDA-CJH tangelo 'Nova' + toranja 'Hirado Buntan' laranja 'Hamlin' + tangerina 'Ponkan' laranja 'Hamlin' + LB8-9</p>	<p>Grosser et al., 1998</p>
<p>pomelo 'Star Ruby' + cidra 'Corse' limão 'LAC' + limão 'Ereka'</p>	<p>Ollitrault et al., 2000a</p>
<p>tangerina 'Hongju'+ limão 'Rugoso' tangerina 'Kinnow' + tangerina 'Bendizao'</p>	<p>Deng et al., 2000</p>
<p>tangor 'Murcote'+ tangerina 'Dancy' tangelo 'Page'+ tangor 'Murcote' tangelo 'Page' + tangor 'Ortanique'</p>	<p>Guo et al., 2004</p>

Limão 'Rugoso' + <i>Citrus obovoideae</i> Laranja azeda + citrange 'Benton' Tangerina 'Amblycarpa' + citrange 'C-35' Tangerina 'Amblycarpa' + citrange 'Benton' Tangerina 'Amblycarpa' + citrange 'Carrizo' Tangerina 'Amblycarpa' + limão 'Volkameriano' Tangerina 'Amblycarpa' + <i>Citrus alemow</i>	Grosser; Gmitter Júnior, 2005
tangerina 'Encore' + laranja 'Valência' tangerina 'Encore' + tangerina 'Caffin'	Wu et al., 2005
Tangelo 'Page' + limão 'Rugoso'	Guo et al., 2006

Quadro 1 - Híbridos somáticos interespecíficos de *Citrus*

Genitores	Referências
laranja 'Hamlin' + <i>Severinia disticha</i>	Grosser et al., 1988b
laranja 'Hamlin' + <i>Citropsis gilletiana</i> tangerina 'Cleópatra' + <i>Citropsis gilletiana</i>	Grosser; Gmitter Junior, Chandler, 1990
laranja 'Hamlin' + <i>Severinia buxifolia</i>	Grosser et al., 1992b
tangerina 'Ponkan' + <i>Citropsis gabunensis</i>	Ling; Iwamasa, 1994
tangelo 'Seminole' + <i>Atalantia monophylla</i> tangelo 'Seminole' + <i>Severinia buxifolia</i>	Motomura et al., 1995
laranja 'Succari' + <i>Severinia buxifolia</i> laranja 'Hamlin' + <i>Severinia disticha</i> laranja 'Valência' + <i>Severinia disticha</i> tangerina 'Cleópatra' + <i>Severinia disticha</i> tangelo 'Nova' + <i>Severinia disticha</i> laranja 'Succari' + <i>Citropsis gilletiana</i> tangelo 'Nova' + <i>Citropsis gilletiana</i> laranja 'Succari' + <i>Atalantia ceylanica</i> laranja 'Succari' + <i>Feronia limonia</i>	Grosser et al., 1996b

tangelo 'Nova' + <i>C. ichangensis</i>	
kunquat 'Mame' + <i>P. trifoliata</i>	Miranda et al., 1997
tangelo 'Page' + <i>Murraya paniculata</i>	Guo; Deng, 1998
Tangerina 'Red' + <i>Poncirus trifoliata</i>	Guo et al., 2002
Laranja 'Newhall' + <i>Clauseana lansium</i>	Fu et al., 2003
Kunquat 'Round' + laranja 'Morita navel'	Takami et al., 2004
Kunquat 'Changshou' + tangerina 'Dancy'	Xu et al., 2005
Tangerina 'Changsha' + <i>Poncirus trifoliata</i> 50-7 White grapefruit + <i>Poncirus trifoliata</i> 50-7 Laranja azeda + <i>Poncirus trifoliata</i> 50-7 Tangerina 'Amblycarpa' + <i>Poncirus trifoliata</i> 'Flying Dragon' Tangerina 'Amblycarpa' + <i>Poncirus trifoliata</i> 'Rubidoux' Tangor 'Murcott' + <i>Poncirus trifoliata</i> 'Rubidoux'	Grosser, Gmitter Júnior, 2005

Quadro 2 – Híbridos somáticos intergenéricos de *Citrus*

Genitores	Referências
<i>C. sudachi</i> + limão 'Galego' <i>C. sudachi</i> + limão 'Eureka'	Saito et al., 1993
<i>C. unshiu</i> + laranja 'Washington Navel'	Yamamoto; Kobayashi, 1995
<i>C. microcarpa</i> + laranja azeda tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda laranja 'Valência' + limão 'Femminello'	Grosser et al., 1996a
tangelo 'Seminole' + limão 'Lisboa'	Moriguchi et al., 1996
tangelo 'Seminole' + limão 'Rugoso'	Moriguchi et al., 1997
Pomelo 'Star Ruby' + limão cv. LAC	Ollitrault et al., 2000b
<i>Microcitrus papuana</i> + laranja azeda <i>Microcitrus papuana</i> + limão 'Rugoso'	Xu et al., 2004

Quadro 3 – Cíbridos somáticos de *Citrus*.

O Brasil vem contribuindo no melhoramento genético de citros com a produção de híbridos somáticos desde 1996, nos Laboratórios de Biotecnologia da USP/ESALQ e USP/CENA, onde já foram produzidos os híbridos de tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda (BENEDITO *et al.*, 1999), limão 'Cravo' + tangerina 'Cleópatra' (LATADO *et al.*, 2002), laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' (MENDES-DA-GLÓRIA *et al.*, 2000), 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; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003), laranja 'Hamlin' + pomelo 'Indian red' e laranja 'Hamlin' + pomelo 'Singapura' (CALIXTO *et al.*, 2004).

2.8.1.1 Melhoramento de copas de citros via hibridação somática

As principais exigências para o mercado de frutas frescas de citros, principalmente de tangerinas, incluem a ausência de sementes e a facilidade de descascar os frutos. Com base no exposto, a maioria dos programas de melhoramento de copas de citros tem concentrado seus esforços no desenvolvimento de variedades com estas características e a hibridação somática desempenha um papel chave dentre as estratégias para desenvolver estas cultivares (GUO *et al.*, 2004; VILORIA; GROSSER, 2005; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005; WU; FERGUSON; MOONEY, 2005).

Frutos de plantas triplóides são desprovidos de sementes devido ao conjunto ímpar de cromossomos e *Citrus* não é exceção. Triplóides podem ser produzidos diretamente a partir da hibridação somática entre genitores haplóides e diplóides, comprovando a habilidade da conservação do balanço genético do genitor diplóide no híbrido triplóide (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005). Entretanto, esta técnica é limitada pela disponibilidade de linhagens de calos haplóides, as quais podem ser

obtidas com dificuldade pela cultura de anteras ou indução de ginogênese (OLLITRAULT *et al.*, 2000; GERMANÀ, 2006).

Híbridos somáticos produzidos nos programas de melhoramento de copa provavelmente não poderão ser utilizados diretamente como novos cultivares, já que os frutos apresentam características indesejáveis ao consumo, como casca grossa e formato irregular, podendo ser incorporados ao melhoramento como parental tetraplóide ($2n=4x=36$ cromossomos), em cruzamentos com variedades diplóides ($2n=2x=18$ cromossomos) monoembriônicas, gerando progênie triplóide ($2n=3x=27$ cromossomos), potencialmente sem sementes, devido à ausência de complementos cromossômicos não balanceados durante a segregação meiótica (GMITTER JUNIOR; GROSSER; MOORE, 1992; MOURÃO FILHO, GMITTER JÚNIOR, GROSSER, 1996; GROSSER *et al.*, 2000) resultando, neste caso, na falta de endosperma e conseqüente abortamento do embrião, que pode ser resgatado, recuperando-se eficientemente os híbridos triplóides (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005).

Outras estratégias praticadas pelos programas de melhoramento de copa envolvem a aplicação da hibridação somática no aumento da resistência/tolerância a fatores bióticos como pragas e doenças e a fatores abióticos como tolerância a baixas temperaturas a fim de aumentar a produtividade e longevidade das árvores (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000).

2.8.1.2 Melhoramento de porta-enxertos de citros via hibridação somática

A utilização de porta-enxertos é inerente à citricultura em todo o mundo. Genótipos de porta-enxertos são geralmente mais amplamente adaptados e oferecem melhor resistência a doenças do que a maioria das variedades copa desenvolvidas sobre suas raízes. Borbulhas selecionadas de indivíduos adultos, enxertadas sobre porta-enxertos provenientes de sementes tem a juvenilidade superada e mantêm a integridade da cultivar. Conseqüentemente essas árvores entram em produção mais rapidamente e produzem frutas com maior qualidade do que se crescessem sob pés francos (GROSSER, OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000).

Muitas das características desejáveis estão presentes em espécies filogeneticamente distantes que são incompatíveis com as variedades copa tanto na enxertia quanto na hibridação sexual (LIU; XU; DENG, 2005). Sabe-se que a tolerância a baixas temperaturas, poliembrionia, resistência a podridão do pé causada por *Phytophthora parasitica*, tolerância a tristeza dos citros (CTV) e aos nematóides são características controladas por genes dominantes. Deste modo, como a hibridação somática é um processo aditivo no qual não ocorre segregação, características que são controladas por genes dominantes ou co-dominantes em um dos genitores tem grande probabilidade de continuar se expressando no híbrido amfidiplóide. Além disso, genes deletérios que estão mascarados sob uma condição recessiva nos genitores não se manifestam nos híbridos somáticos (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990; GMITTER JÚNIOR; GROSSER; MOORE, 1992; GROSSER *et al.*, 1998a).

No melhoramento de porta-enxertos, a fusão de protoplastos é empregada no intuito de combinar características complementares em indivíduos alotetraplóides, que apresentam a vantagem de utilização direta no campo, sem necessidade de realizar retrocruzamentos (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990; GROSSER, OLLITRAUT; OLIVARES-FUSTER, 2000; GROSSER *et al.*, 1998b). Outra vantagem da técnica para porta-enxertos é a possibilidade de produção de híbridos somáticos intergenéricos entre *Citrus* e espécies/gêneros relacionados, sexualmente incompatíveis que possuam características de interesse agrônomo (GROSSER, GMITTER JÚNIOR, CHANDLER, 2000; LATADO *et al.*, 2002).

Os porta-enxertos oriundos da hibridação somática tem demonstrado ganhos significativos na qualidade dos frutos e na produção de sementes, além de redução do porte das plantas, uma vez que híbridos tetraplóides são menores do que porta-enxertos diplóides (GROSSER *et al.*, 1998c; GROSSER; CHANDLER, 2003). Quanto à resistência a doenças, verificou-se que híbridos de laranja azeda + limão 'Cravo' têm demonstrado tolerância ao CTV, uma vez que o parental laranja azeda é intolerante ao vírus, quando utilizado como porta-enxerto (GROSSER; CHANDLER, 2000).

Uma avaliação completa dos novos possíveis porta-enxertos é um processo de longo prazo e alto custo, o qual requer a cooperação dos horticulturistas, patologistas, nematologistas e citricultores, além da necessidade de propagação de algumas

centenas de plantas uniformes de cada híbrido para a condução dos experimentos (GROSSER, OLLITRAUT; OLIVARES-FUSTER, 2000).

2.8.1.2.1 Reconstrução da laranja azeda

Atualmente os esforços na pesquisa de híbridos somáticos estão voltados aos recentes avanços da biologia molecular de *Citrus*. Estas técnicas têm dado suporte adicional às estratégias de melhoramento de cultivares, permitindo avanços no desenvolvimento de frutos sem sementes através da cibridização direcionada, melhoramento e seleção de novos porta-enxertos tetraplóides provenientes da fusão de protoplastos de híbridos somáticos e reconstrução da laranja azeda artificial com potencial utilização como porta-enxerto (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005).

A laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) foi o primeiro e mais importante porta-enxerto de *Citrus* no mundo, devido à sua habilidade de produzir frutos de elevada qualidade, apresentar boa afinidade com a maioria das variedades copa e apresentar maior longevidade do que os porta-enxertos comuns de citros. Apresenta também resistência à gomose e podridão da base causada por *Phytophthora*, tolerância a baixas temperaturas e à salinidade e aos viróides do exocorte e xiliporose, tolerância ao declínio do citros e cresce bem em solos variados (GROSSER; CHANDLER, 2003; GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005). Cultivares enxertados em laranja azeda produzem árvores com vigor e porte moderado (HUTCHISON, 1977). Porém, este porta-enxerto que foi muito importante desde a década de 50 em todas as principais regiões produtoras, não é mais comercialmente cultivado, devido à sua intolerância ao CTV (MENDES *et al.*, 2001).

Os porta-enxertos híbridos entre laranja doce e pomelo (citranges) avaliados como alternativa para substituição da laranja azeda têm provado ser inadequados devido à pouca adaptação, baixa qualidade dos frutos, suscetibilidade a doenças e problemas hortícolas como safras tardias, tamanho pequeno do fruto e porte inadequado da árvore. Este fato sugere claramente que o desenvolvimento de um porta-enxerto alternativo que tenha um desempenho similar à laranja azeda, mas que seja tolerante ao CTV é imperativo (GROSSER; CHANDLER, 2003).

Recentes análises com marcadores moleculares têm mostrado que a laranja azeda é provavelmente um híbrido de toranja (*Citrus grandis* L. Osbeck) e tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) (NICOLOSI *et al.*, 2000). Considerando a genética do porta-enxerto, é improvável que a laranja azeda original tenha sido sintetizada a partir dos melhores genitores (GROSSER *et al.*, 2004; GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005). Com base no exposto, pode-se hipotetizar que híbridos de porta-enxertos superiores podem ser produzidos pela combinação de parentais de toranjas (*Citrus grandis*) e tangerinas (*Citrus reticulata*).

Híbridos diplóides entre tangerinas e toranjas são conhecidos por serem tolerantes ao CTV quando utilizados como porta-enxerto, incluindo a laranja doce (*Citrus sinensis*), *Citrus obovoideae* (Kinkoji) e Smooth Flat Seville (SFS), variedades consideradas como híbridos complexos envolvendo possivelmente toranjas, laranja azeda e/ou laranja doce (CASTLE *et al.*, 1992). Cada um destes porta-enxertos alternativos tem uso limitado devido a várias razões: a laranja doce é suscetível a *Phytophthora*, Kinkoji produz poucas sementes, dificultando sua propagação e SFS produz uma elevada porcentagem de seedlings zigóticos, muitos dos quais são intolerantes ao CTV e/ou produzem árvores de tamanho desuniforme (GROSSER *et al.*, 2004).

Porta-enxertos comumente utilizados na citricultura mundial apresentam a cidra como ancestral (NICOLOSI *et al.*, 2000). Alguns deles, como o limão rugoso (*C. jambhiri*, Lush), limão 'Volkameriano' (*C. volkameriana* Pasq.), limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) e lima doce 'Palestina' (*C. limettioides* Tan.) mostram-se altamente suscetíveis ao declínio, intolerantes a baixas temperaturas e produzem frutas de baixa qualidade. Este fato sugere que a toranja pode ser um genitor melhor do que a cidra para maximizar a heterose na produção de híbridos de porta-enxertos (CASTLE, 1987). Toranjas têm sido extensivamente ignoradas pelos melhoristas de porta-enxerto devido ao fato de serem monoembriônicas e todas as sementes produzidas serem híbridas, uma vez que porta-enxertos de citros são tradicionalmente propagados por sementes poliembriônicas que produzem *seedlings* nucelares (GROSSER *et al.*, 2004).

Alguns híbridos somáticos entre tangerinas e toranjas já foram obtidos e estão mostrando tolerância ao CTV em experimentos em casa de vegetação (GROSSER *et*

al., 1996) e também têm resultado num bom desempenho horticultural e controle do porte das árvores (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, CASTLE, 1995; GROSSER, CHANDLER, 2002). Dezesete híbridos envolvendo tangerinas e toranjas já foram produzidos (Quadro 4), vários deles apresentando excelente vigor na casa de vegetação. Estes híbridos promissores devem ser testados para confirmar a incorporação da tolerância ao CTV.

tangor 'Murcott'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink'
tangor 'Murcott'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-JL1
tangor 'Murcott'	+ toranja 'Chandler'sdl-#80
tangor 'Murcott'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-#SN3
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink'
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Chandler'
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Chandler'sdl-#69
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-5-1-99-1B
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-HBJL2B
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Ling Ping Yau' sdl-8-1-99-4A
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Large Pink'sdl-7-2-99-5
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-#SN3
tangerina 'Amblycarpa'	+ toranja 'Ling Ping Yau' sdl-#SN7
tangerina 'Shekwasha'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink'
tangerina 'Shekwasha'	+ toranja 'Chandler'
tangerina 'Shekwasha'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-HBJL2B
tangerina 'Shekwasha'	+ toranja 'Hirado Buntan Pink' sdl-#SN3

Quadro 4 – Híbridos somáticos entre tangerinas/tangores e toranjas (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005)

2.8.1.3 Híbridos somáticos assimétricos e cíbridos

Decorrente do processo de fusão de protoplastos, três resultados são possíveis: se ocorrer a fusão dos núcleos de ambos genitores (cariogamia), tem-se um híbrido completo ou simétrico. Se houver perda cromossômica de um ou de ambos os núcleos, tem-se um híbrido assimétrico e se a totalidade do núcleo de um dos parentais é perdido, resta apenas um núcleo na mistura de dois citoplasmas, formando um cíbrido (BENGOCHEA; DODDS, 1986).

A incorporação total do genoma de ambos os genitores, especialmente o nuclear, em um híbrido simétrico apresenta duas desvantagens: a introdução de grande quantidade de material genético exógeno acompanhando o gene de interesse e o desbalanço gênico, levando à incompatibilidade somática. Estas limitações podem resultar em híbridos somáticos com desenvolvimento anormal e com baixa fertilidade. A fusão assimétrica permite a transferência parcial de genoma da espécie doadora para a espécie receptora, reduzindo a entrada de genoma nuclear (LIU; XU; DENG, 2005).

Durante o processo de regeneração de híbridos somáticos é comum a ocorrência da eliminação gradual de cromossomos provenientes de um dos genitores produzindo-se, deste modo, híbridos assimétricos e cíbridos. A prática da hibridação somática tem demonstrado que, em geral, os híbridos assimétricos e cíbridos são mais valiosos do que os híbridos simétricos nos programas de melhoramento de plantas (POLCI; FRIEDRICH, 2004). Por esta razão, a produção de híbridos somáticos diplóides contendo o genoma de um genitor e genoma citoplasmático do outro genitor ou a mistura de ambos (cíbridos), tem sido comumente buscada no melhoramento de plantas (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000), já que na hibridação sexual, novas combinações de organelas não são possíveis, uma vez que a herança do genoma mitocondrial e cloroplastidial é de origem materna (LIU; XU; DENG, 2005).

A caracterização de cada cíbrido pode determinar a herança citoplasmática de muitas características agrônômicas. Quando comparado com o sucesso relatado para as hibridações somáticas simétricas em todo o mundo, poucas referências podem ser encontradas sobre a produção de cíbridos via hibridação somática assimétrica (VARDI; BREIMAN; GALUN, 1987). A mudança na metodologia envolvendo o princípio doador-

receptor e a escassa informação concernente às características citoplasmáticas dificultaram o desenvolvimento da cibridização em *Citrus*. Atualmente, a técnica tem sido utilizada para a produção de linhagens aloplásmicas que participam dos programas de hibridação somática de citros como produtos intermediários (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000).

Até poucos anos atrás, o valor agrônomo dos cíbridos de citros era pouco conhecido, pois características hortícolas importantes associadas com genomas de organelas de citros ainda não haviam sido identificadas (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000). No entanto, a macho esterilidade citoplasmática (CMS) foi identificada na tangerina 'Satsuma', característica responsável pela ausência de sementes que pode ser controlada pelo genoma mitocondrial (mt DNA). A fusão de protoplastos desempenha um papel importante na transferência desta característica para variedades comerciais diplóides com sementes, uma vez que pelo melhoramento convencional, seriam necessários anos de retrocruzamentos repetitivos (GUO *et al.*, 2004; GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005).

A avaliação de cíbridos de tangerinas e laranjas doces no campo estão mostrando variação significativa em características agrônomicas importantes, incluindo a época de maturação do fruto e conteúdo de sementes, indicando que a cibridização é uma fonte potencial de variação genética para o melhoramento de variedades de citros. Esforços estão sendo feitos para determinar se os genes responsáveis pela ausência de sementes na tangerina 'Satsuma' e da laranja 'Navel' podem ser transferidos para outras cultivares com sementes via cibridização (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000; GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 2005).

Protoplastos derivados de folhas de citros não têm potencial embriogênico e não sofrem morfogênese nas condições padrão de cultivo (GROSSER; GMITTERJÚNIOR, 1990). Entretanto, muitas plantas diplóides morfologicamente idênticas ao genitor foliar foram regeneradas após fusões simétricas interespecíficas entre espécies diplóides. Análises subsequentes destas plantas, baseadas em marcadores moleculares, têm indicado que elas são híbridos aloplásmicos ou cíbridos e que possuem o genoma nuclear do genitor não embriogênico e o mt DNA do genitor embriogênico (SAITO *et al.*, 1994; MOREIRA *et al.*, 2000b; LIU *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2004).

A segregação de organelas nos híbridos somáticos e cíbridos constitui-se em importante fonte de variabilidade, oferecendo a possibilidade de manipulação de genoma mitocondrial e de cloroplastos e avaliação de seu papel nas qualidades das cultivares de citros (CABASSON *et al.*, 2001; POLCI; FRIEDRICH, 2004; OLIVARES-FUSTER; DURAN-VILA; NAVARRO, 2005). Estudos genéticos de cíbridos regenerados de citros demonstraram a eliminação específica do genoma nuclear do parental embriogênico em todos os indivíduos, a não segregação do genoma mitocondrial e a segregação do genoma cloroplastidial, resultando num cíbrido com o genoma cloroplastidial de ambos genitores (MORIGUCHI *et al.*, 1996; MOTOMURA, *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 2000a). A presença única do genoma mitocondrial derivado do genitor embriogênico em todos os cíbridos regenerados sugere um papel importante destas organelas na regeneração de plantas via embriogênese somática (MOREIRA *et al.*, 2000a; GUO; DENG, 2001; GUO; CHENG; DENG, 2002; XU; LIU; DENG, 2004).

2.8.2 Isolamento e fusão de protoplastos

Protoplastos são células vegetais desprovidas da parede celular, o que permite a realização de diversas manipulações experimentais, tais como a extração de organelas celulares, a produção de híbridos somáticos e a transferência gênica via transformação genética (HIDAKA; KAJIURA, 1988; CARNEIRO *et al.*, 1998). A fonte utilizada para o isolamento de protoplastos é variável e tem influência na sua obtenção, no processo de regeneração da parede e na frequência das divisões celulares que se sucedem. A protoplastização pode ser obtida a partir de tecidos vegetais como o mesófilo foliar, tecido cotiledonar ou hipocotiledonar, raízes e também de calos e suspensões celulares. A escolha da fonte baseia-se na capacidade regenerativa destes tecidos, em geral avaliada em experimentos preliminares (VIEIRA, 1997; DAVEY *et al.*, 2005).

A fonte de protoplastos mais utilizada em *Citrus* são calos nucelares ou suspensões celulares derivadas de calos nucelares, os quais são obtidos a partir do cultivo de óvulos abortados e óvulos não fertilizados (LATADO; VAZ; TULMANN NETO,

1999; COSTA; MOURÃO FILHO; MENDES, 2002; RICCI *et al.*, 2002), que proliferam independentemente de suprimento exógeno de reguladores de crescimento (TOMAZ *et al.*, 2001).

A remoção da parede celular se faz mediante digestão enzimática que, em geral, reúne uma mistura de enzimas capazes de degradar individualmente a celulose, a pectina, a hemicelulose ou outros polissacarídeos componentes (FUNGARO; VIEIRA, 1989; BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000). As preparações comerciais das enzimas constituem-se de frações parcialmente purificadas de extratos de microrganismos simbióticos, parasitas ou saprofitos, 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 *Irpex lacteus* (CARNEIRO *et al.*, 1998).

A condição fisiológica da planta doadora é também importante. Antes do isolamento, o tecido vegetal é cortado em fatias e plasmolisado em solução salina. Esta solução, assim como a mistura enzimática, deve ser preparada contendo um estabilizador osmótico. Este estabilizador - à base de açúcares como o manitol e a sacarose - impede o rompimento da membrana plasmática ou, inversamente, a saída excessiva de água da célula. Após o tratamento enzimático, a mistura sofre lavagens sucessivas na mesma solução salina, seguidas de centrifugações brandas. Após o isolamento, procede-se à contagem e à avaliação da viabilidade dos protoplastos (POWER; CHAPMAN, 1995).

A obtenção de híbridos somáticos depende fundamentalmente de mecanismos eficientes que promovam a fusão celular (VIEIRA, 1997). Os métodos mais usados para induzir a fusão de protoplastos incluem o tratamento com polietilenoglicol (PEG) em condições salinas e a aplicação de corrente elétrica (eletrofusão). O método recomendado para citros é a fusão induzida por polietilenoglicol (PEG), por ser uma técnica simples, eficiente, barata e que parece não influenciar a viabilidade dos protoplastos (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990; GROSSER *et al.*, 1996; GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000). Além disso, permite fácil

determinação da eficiência da fusão, já que heterocariontes podem ser facilmente identificados pela presença de marcadores distintos de ambas fontes de parentais (corpos amiláceos dos protoplastos derivados de culturas embriogênicas e cloroplastos de protoplastos derivados de folhas) (CARNEIRO *et al.*, 1998; KHAN; GROSSER, 2004).

Estas técnicas têm como princípio favorecer a agregação de protoplastos, que se repelem devido à presença de cargas negativas na membrana plasmática, e induzir a instabilidade das membranas (BENGOCHEA; DODDS, 1986). Na eletrofusão, os protoplastos são submetidos a um campo de corrente alternada de baixa voltagem e, subseqüentemente, à aplicação de um ou mais pulsos de corrente contínua de alta intensidade, alinhando os protoplastos e gerando poros temporários nas membranas, possibilitando a fusão dos protoplastos que estiverem mais próximos (CARNEIRO *et al.*, 1998). Este é o mais reproduzível, mais extensivamente aplicado e também o que permite a obtenção de maior número de células envolvidas na fusão, tendo sido adaptado para citros por diferentes grupos de pesquisa (MORIGUSHI *et al.*, 1996; GUO; DENG, 1998; OLLITRAULT *et al.*, 1996; GUO; CHENG; DENG, 2002; LIU; DENG, 2002; XU; LIU; DENG, 2004; GUO *et al.*, 2006). Um método alternativo que incorpora as vantagens dos dois processos baseado na agregação química de células com uma baixa concentração de PEG e a subseqüente aplicação de pulsos de corrente contínua foi proposto recentemente para *Citrus* (OLIVARES-FUSTER; DURAN-VILA; NAVARRO, 2005).

2.8.3 Regeneração de plantas e confirmação da hibridação

A habilidade para regenerar plantas a partir de células e tecidos em cultivo é um componente essencial na biotecnologia para a manipulação genética e melhoramento vegetal (POLCI; FRIEDRICH, 2004). A regeneração de plantas a partir de protoplastos via embriogênese somática tem sido obtida em numerosos genótipos de citros, pois calos nucelares e suspensões celulares se constituem numa excelente fonte de protoplastos totipotentes (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990), demonstrando

competência para regenerar plantas que conservam a identidade genética da planta mãe, expressando pouca variabilidade (JIMÉNEZ, 1996).

Após a fusão, os protoplastos são cultivados em meio nutritivo para a estimulação da neoformação da parede celular e divisão de células (CARNEIRO *et al.*, 1998). Protoplastos provenientes de um dos genitores deve apresentar potencial embriogênico como requerimento para a regeneração de plantas, permitindo que a formação de embriões seja um processo espontâneo após a fusão de protoplastos (MENDES-DA-GLORIA; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000). Entretanto, a adição de reguladores de crescimento, açúcares como a galactose e lactose e compostos orgânicos como água de côco também provou ser eficiente na indução de embriões somáticos (LING *et al.*, 1990; JUMIN; NITO, 1996).

Os híbridos somáticos apresentam constituição morfológica característica, podendo apresentar fenótipo intermediário aos genitores ou terem aspecto completamente novo. A análise do cariótipo permite avaliar se o híbrido possui o número total de cromossomos de cada genitor, se ocorreu a fusão de mais de dois protoplastos, o grau de aneuploidia e possíveis translocações intergenômicas. A confirmação da poliploidia se dá pela contagem do número de cromossomos das células meristemáticas dos ápices radiculares mitoticamente ativas das plantas regeneradas, devendo ser $2n = 4x = 36$. (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a; GROSSER, 1993). A demonstração da presença de DNA de ambos genitores é a prova mais direta da hibridação, podendo ser revelada através de vários marcadores moleculares (POLCI; FRIEDRICH, 2004; LIU; XU; DENG, 2005). Todavia, nenhum método utilizado isoladamente é suficiente para confirmar a hibridação, pois cada um está sujeito a limitações e pode informar erroneamente um falso positivo. É a natureza aditiva destas formas de verificação que resulta na confirmação de que os heterocários regenerados tratam-se de híbridos somáticos (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a).

É mais difícil utilizar diferenças morfológicas para identificar híbridos somáticos interespecíficos, pois as diferenças são sutis, tais como o tamanho do pecíolo alado e da lâmina foliar, que geralmente são intermediários aos genitores. Além disso, o acréscimo do nível de ploidia pode resultar no aumento da grossura da espessura do

limbo foliar e numa coloração verde mais intensa (GROSSER, GMITTER JÚNIOR, 1990).

Como a hibridação somática é um processo de recombinação genômica aleatória e a composição genômica dos híbridos somáticos não é bem conhecida, marcadores RAPD são necessários para a estimativa da hibridação (BINSFELD; SCHNABL, 2002). O RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) consiste em um dos marcadores moleculares mais utilizados, por se tratar de uma técnica simples, de baixo custo e que necessita de pequenas quantidades de DNA genômico (OLIVEIRA; CRISTOFANI; MACHADO, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). O polimorfismo de RAPD é detectado pela amplificação, de forma arbitrária, de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, pela reação de polimerase em cadeia (PCR), na presença da enzima termoestável DNA polimerase (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A citometria de fluxo tem sido largamente utilizada para a determinação do número total de cromossomos ou nível de ploidia de híbridos (LIU; XU; DENG, 2005), pois quando as espécies parentais diferem o suficiente no conteúdo de DNA nuclear, a citometria de fluxo consegue detectar os híbridos de acordo com valores intermediários de DNA (SEKER; TUZCU; OLLITRAULT, 2003). É uma técnica que envolve a análise da dispersão da luz e fluorescência de partículas que fluem numa suspensão líquida. A medição em fluxo permite análises em alta velocidade (10^2 a 10^3 partículas por segundo) e garante grande acuidade estatística. A análise da intensidade de fluorescência relativa de núcleos isolados de folhas jovens produz um histograma com um pico dominante que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G1 do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G2. Para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 de um histograma é comparado com o pico de uma planta padrão com uma ploidia conhecida (DOLEZEL, 1997).

2.8.4 Variação somaclonal

A variação somaclonal é manifestada como anormalidades citológicas, mutações fenotípicas quantitativas e qualitativas, mudanças na seqüência gênica e ativação ou silenciamento de genes. Exemplos de fenótipos aberrantes nas plantas regeneradas

incluem estrutura foliar anormal e morfologia floral variante (KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000). Segundo LARKIN & SCOWCROFT (1981), a variação somaclonal está presente na maioria das espécies estudadas e tem gerado efeito sobre inúmeras características, sendo as principais: alterações de padrão morfológico, de pigmentação, de crescimento, produção de alcalóides e mudanças na produção e habituação a auxinas e citocininas.

Muitas causas têm sido identificadas ou propostas para cada tipo de variação; estas, todavia, podem variar de espécie para espécie e determinar a natureza genética da variação observada é difícil (MARASCHIN *et al.*, 2002). Acredita-se que estas variações sejam provenientes de perturbações no ciclo celular, gerando mudanças na estrutura e/ou número de cromossomos, mutações pontuais, mudanças na expressão do gene como resultado de mudanças estruturais no cromossomo ou ativação de elementos genéticos transponíveis, amplificação do DNA e mudanças estruturais no DNA de organelas citoplasmáticas. Existem também anomalias como o intercâmbio entre cromátides irmãs e “crossing over” somático, que podem resultar em anomalias fenotípicas (KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000; CARDONE; OLMOS; ECHENIQUE, 2004).

A correlação entre o longo tempo de cultivo e o acúmulo de variações cromossômicas foi documentada pela primeira vez em cenoura (SMITH; STREET, 1974). CHATUVERDI *et al.* (2001) também relatam alterações no padrão de diferenciação morfogênica de embriões de *Citrus grandis* regenerados de calos cultivados durante longo período. OCHATT; CASO (1986) verificaram que pereiras regeneradas a partir de protoplastos diferiram de plantas modelo micropropagadas, tanto na morfologia das folhas como na capacidade de enraizamento.

A ocorrência de variação somaclonal depende de vários fatores, entre os quais o genótipo, o tipo de explante utilizado, a via de regeneração, a composição do meio de cultivo, os reguladores de crescimento empregados e a duração do período de cultivo. A maior parte da variação obtida *in vitro* parece provir da fase de calo (CARDONE; OLMOS; ECHENIQUE, 2004). A iniciação de um calo pode ser análoga à resposta das plantas a herbicidas, os quais levam à ativação de elementos transponíveis e estimulam a indução de enzimas e produtos específicos que são induzidos também em

situações de estresse. Quando é iniciada a divisão celular a partir de tecidos diferenciados, que darão origem a um calo é instalado o risco de instabilidade cromossômica (ABKENAR *et al.*, 2004). A variação no número cromossômico que ocorre no início da indução do calo seria resultado da fragmentação nuclear seguida por mitoses dos fragmentos nucleares, combinada com a mitose normal dos núcleos intactos (KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000).

Alterações fenotípicas podem resultar de rearranjos cromossômicos advindos da perda do controle do ciclo celular em calos em processo de desdiferenciação. Em regenerantes de banana (*Musa* sp.) observou-se que nem todas as plantas de fenótipo anormal apresentavam o mesmo padrão de bandas na análise RAPD, enquanto que polimorfismo foram detectados em plantas micropropagadas de fenótipo normal, indicando que a variação molecular nem sempre se expressa ao nível fenotípico e vice-versa (ROUX *et al.*, 2004). Durante a avaliação do conteúdo de DNA de 35 genótipos de calos embriogênicos de citros pela citometria de fluxo, ao longo de quatro anos, foi observado que em mais de 70% desses genótipos houve progressivo aumento de células com variação na ploidia, enquanto que tangelo 'Page', laranja 'Shamouti', laranja 'Russ Navel' e tangerina 'Cleópatra' apresentaram redução na ocorrência de variação da ploidia (ZANG; GUO; DENG, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (LBPH) do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba, SP.

3.1 Fonte de protoplastos

3.1.1 Estabelecimento e cultivo de calos embriogênicos

Óvulos abortados foram extraídos de frutos maduros de tangerinas ‘Cravo’, ‘Dancy’, ‘Sunchushakat’, ‘Caçula’, ‘Havana’ (*C. reticulata* Blanco), ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort.), ‘Mexerica Rio’, (*C. deliciosa* Ten.), ‘Sunki’ (*C. sunki* Hort. ex Tanaka), ‘Amblycarpa’ (*C. amblycarpa* Ochse) e ‘Shekwasha’ (*C. depressa*); tangores ‘Ellendale’ e ‘Fortune’ (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e tangelo ‘Orlando’ (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macfad) coletados de plantas matrizes da coleção de cultivares do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, do Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, em Cordeirópolis, SP e do Banco de Matrizes da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, SP.

Após a assepsia, realizada pela imersão em hipoclorito de sódio na concentração 3:1 (v/v) por 20 minutos, seguida por três lavagens em água deionizada e autoclavada, introduziram-se 20 óvulos por placa de Petri (15 x 100 mm) contendo meio de cultura MT semi-sólido (MURASHIGE & TUCKER, 1969), modificado pela adição de 500 mg.L⁻¹ de extrato de malte e 5 mg. L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), para indução à formação de calos embriogênicos, tendo sido incubados no escuro, a 27°C. Os calos embriogênicos originados, assim como os calos de tangor ‘Murcote’ (*C. reticulata* x *C. sinensis*), tangelo ‘Page’ (*C. reticulata* x *C. paradisi*) e tangerinas ‘Amblycarpa’ (*C. amblycarpa* Ochse), ‘Shekwasha’ (*C. depressa* Hay.) e ‘Sunki’ (*C. sunki* Hort. ex Tanaka), já cultivados *in vitro*, foram transferidos para os meios de cultura EME 0,146 M e H+H (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a), acrescidos de

500 mg.L⁻¹ de carvão ativado, isentos de regulador vegetal. Para manutenção, os calos foram subcultivados em meio fresco a cada quatro semanas.

Para o estabelecimento e cultivo de células em suspensão, pequenas porções dos calos de cada variedade (cerca de 500 mg) foram introduzidas em Erlenmeyers contendo o meio de cultura EME 0,146M ou H+H na fase líquida, incubados no escuro, à temperatura média de 27 °C, sob agitação orbital a 100 rpm.

Tais suspensões foram utilizadas como fonte de protoplastos somente após oito semanas de cultivo. Para a manutenção das células em suspensão, as culturas foram subcultivadas a cada 14 dias, nos meios EME 0,146 M ou H+H, sem a adição de regulador de crescimento.

3.1.2 Fonte de protoplastos não embriogênicos

Como fonte de protoplastos de mesófilo foliar foram utilizadas folhas jovens de *seedlings* de toranja (*Citrus grandis* L. Osbeck) selecionados para a resistência a *Phytophthora sp.* (CALIXTO *et al.*, 2003), pertencentes à coleção de cultivares do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP. As variedades empregadas nos trabalhos de hibridação foram 'Kao Panne', 'Zamboá', 'Vermelha', 'Indochina', '151-427', 'Lau Tau', 'Siamesa', 'Hawaiian', 'Melancia', 'Sunshine', 'Indian Red', 'Singapura', 'Doce', 'Ogami', 'Inerme' e 'Periforme'.

3.2 Hibridação somática

3.2.1 Isolamento de protoplastos

Para o isolamento de protoplastos de calos embriogênicos e células em suspensão, cerca de 500 mg de calo foram colocados em placas de Petri (15 x 58 mm), contendo 2 ml do meio BH3 0,7M e 2 ml da solução enzimática composta por 1% de Cellulase Onozuca R.S. (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.), 1% de Macerase R10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.) e 0,2% de Pectoliase Y-23 (Seishin) (GROSSER;

CHANDLER, 1987). Os protoplastos foram incubados no escuro por 14-16 horas, em mesa agitadora orbital a 40 rpm.

Para o isolamento de protoplastos de mesófilo foliar, folhas jovens dos 'seedlings' de toranja foram coletadas e desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio na proporção de 2:1 (v/v) e três gotas de detergente, por 20 minutos, seguido de três lavagens em água deionizada e autoclavada. Com o auxílio de um bisturi, retirou-se a nervura central e foram feitos finos cortes no sentido transversal em toda a extensão da folha, objetivando o aumento da área de contato com a solução enzimática e a maximização da liberação de protoplastos. As folhas finamente fatiadas foram introduzidas em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 5 ml do meio BH3 0,7M e 2 ml de solução enzimática. Os protoplastos foram incubados no escuro por 14-16 horas, em mesa agitadora orbital a 40 rpm.

3.2.2 Purificação, fusão e plaqueamento dos protoplastos

Após a observação do isolamento de protoplastos em microscópio invertido, procedeu-se à etapa de purificação, a qual foi realizada pela passagem da solução de isolamento por peneira de nylon de 45 μm para a retirada de pedaços de mesófilo não digeridos e centrifugação do líquido resultante por 5 minutos a 700 rpm (100g).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 5 ml do meio CPW 25 M (FREASON *et al*, 1973), sobre o qual se adicionaram, delicadamente, 3 ml do meio CPW 13 M (FREASON *et al*, 1973), formando um gradiente de densidade. Os tubos sofreram nova centrifugação a 700 rpm (100g), por oito minutos. Como resultado obteve-se a formação de uma banda na interface dos dois meios, contendo protoplastos purificados e um pellet contendo restos celulares não digeridos. Os protoplastos purificados de ambos os genitores foram coletados com pipeta de Pasteur e transferidos para um novo tubo contendo 5 ml do meio BH3 0,7 M. Após nova centrifugação a 700 rpm (100g) durante cinco minutos, houve a formação de novo pellet, o qual foi diluído em meio BH3 0,7 na densidade de 2×10^5 protoplastos por mL.

Para a fusão pelo método químico, foram distribuídas duas gotas da solução de protoplastos no centro de cada placa de Petri (58 x 15 mm), sobre as quais adicionaram-se duas gotas da solução 26,6 mM de polietilenoglicol (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). Após 8 minutos de incubação, foram adicionadas duas gotas da solução de eluição, formada por 2 ml da solução de lavagem “A” para cada quatro gotas da solução de lavagem “B” (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a), sendo mantida por 12 minutos. Em seguida, procedeu-se à tríplice lavagem dos protoplastos, em 15 a 20 gotas do meio de cultura BH3 0,7 M, por 10 minutos. Os protoplastos foram então plaqueados em meio de cultura BH3 0,7M, EME 0,7 M e BH3 0,7M + EME 0,7 M líquido e incubados no escuro, a 27°C.

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

Após 15 a 20 dias de cultivo, quando as células iniciaram o processo de divisão celular e formação de microcolônias, foram acrescentadas 10 a 12 gotas do meio de cultura 1:1:1 (v:v:v), composto por uma parte do meio BH3 0,7 M, uma parte do meio EME 0,6 M e uma parte do meio EME 0,146 M, com o objetivo de iniciar a redução do potencial osmótico. Em subcultivos posteriores, quando se iniciou a formação de microcalos, a redução do potencial osmótico foi complementada pela adição do meio de cultura 1:2 (v:v), composto por duas partes do meio BH3 0,7 M e uma parte do meio EME 0,146 M (GROSSER; GMITTER JÚNIOR, 1990a).

Os microcalos originados foram então transferidos para placas de Petri (15 x 100 mm), contendo meio EME 0,146 M, modificado pela adição de 13 g.L^{-1} (37 mM) de maltose (BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000), para a indução da embriogênese somática, tendo sido mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a 27°C. Após 20 dias de cultivo os calos originaram embrióides que foram transferidos para meio de cultura EME contendo 25 g.L^{-1} de sacarose. Este meio de cultura foi renovado a cada 15 dias.

Os embriões formados foram então transferidos para o meio 1500 (meio EME modificado pela adição de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de malte) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a), sendo subcultivados a cada 15 dias. Neste meio de cultura os embriões completaram as fases de sua ontogenia e germinaram, alongaram e emitiram as primeiras folhas.

As plântulas originadas foram enxertadas *in vitro* por garfagem (HARTMANN *et al.*, 1997) em porta-enxerto 'Hamlin' e 'Valência' (*C. sinensis*) obtidos pela germinação *in vitro*. Após 120 dias de cultivo, as plantas foram aclimatizadas primeiramente em sala-de-crescimento, em fotoperíodo de 16 horas, a 27°C . As plantas foram transferidas para vasos contendo substrato comercial Plantmax[®] 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 minutos, 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 Citrus[®].

3.3 Análise das plantas regeneradas

3.3.1 Análise morfológica

Características como forma da folha e do pecíolo alado, espessura e coloração foram consideradas na análise morfológica foliar das plantas obtidas após a fusão de protoplastos em comparação com os genitores.

3.3.2 Determinação da ploidia

3.3.2.2 Citometria de fluxo

Amostras das plantas a serem analisadas foram analisadas por citometria de fluxo. Amostras de folhas jovens verdes e vigorosas das plantas regeneradas e o padrão de genoma diplóide foram acondicionadas em isopor com gelo e enviadas em sacos plásticos para análises da ploidia por citometria de fluxo no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Utilizou-se um citômetro PAS II-III Partec[®] 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[®]. As suspensões nucleares foram isoladas e coradas com o tampão do kit CyStain UV precise T-DAPI (Partec[®]), seguindo as recomendações do fabricante. O material foi processado com três repetições e analisadas pelo software FlowMax[®] v 2.6 (Partec[®]). 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.

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

O DNA genômico das plantas regeneradas e de seus genitores foi extraído de folhas, utilizando-se a metodologia de HOISINGTON *et al.* (1994). A quantificação foi realizada através da eletroforese de alíquotas DNA de cada amostra, comparando-se com uma série de concentrações de DNA do fago λ . 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 (Operon 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 seguinte programa: 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 se repetem por 45 ciclos.

Para proceder à amplificação, cada amostra utilizada foi constituída por TRIS-HCl (pH 8,0), 100 mM; KCl, 500 mM; 10x Buffer, 2,5 µl; MgCl₂, 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 20 µl.

A análise do padrão de bandas de DNA foi realizada em gel de agarose a 1,0% (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 5 V.cm⁻¹, por quatro horas. 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento e cultivo de calos embriogênicos

Linhagens embriogênicas derivadas de tecido nucelar se constituem no ponto de partida para a manipulação genética do citros pela hibridação somática (GROSSER *et al.*, 2000; NIEDZ, 2006), sendo necessária a obtenção de pelo menos uma fonte de protoplastos totipotentes para que se consiga regenerar plantas (GROSSER, 1994). As fontes de protoplastos embriogênicos mais utilizadas são calos nucleares ou suspensões celulares derivadas de calos nucleares (PEREZ *et al.*, 1998). Muitos genótipos de citros foram regenerados pela embriogênese somática a partir de explantes derivados de diversos tecidos da planta, existindo, todavia, diferença considerável no potencial de cada uma (CARIMI; PASQUALE; CRESCIMANNO, 1999). Entretanto, não são encontrados protocolos eficientes para a indução e cultivo de calos embriogênicos nucleares para todas as variedades de citros (RICCI *et al.*, 2002), já que a capacidade regenerativa de calos embriogênicos é genótipo-dependente (TOMAZ *et al.*, 2001).

A produção de calos embriogênicos de coloração branca, friáveis e de rápida proliferação se constitui no pré-requisito para o eficiente isolamento de protoplastos e regeneração de plantas após a fusão, pois calos compactos, de coloração amarelada e aparência aquosa não apresentam capacidade de diferenciação (HIDAKA; KAJIURA, 1988).

A formação de calos embriogênicos ocorreu após 120 dias de cultivo (Tabela 1). Das 13 variedades introduzidas, 10 formaram calos friáveis, porém, de crescimento muito lento, dificultando os trabalhos de isolamento de protoplastos. Calos com crescimento rápido como os de tangor 'Murcote', dobram ou até triplicam seu volume durante os subcultivos de 30 dias. A multiplicação e o crescimento dos calos foram mais intensos em tangerina 'Cravo', 'Mexerica Rio' e tangerina 'Cleópatra'. As tangerinas 'Sunki', 'Havana' e 'Dancy' mostraram crescimento lento, não sendo observado incremento significativo no volume de calo aos 30 dias de cultivo. A tangerina 'Sunchushakat' demonstrou crescimento intermediário, porém, durante todo o

cultivo deste calo houve a ocorrência de oxidação, a qual não pôde ser eficientemente eliminada com cultivo em meio suplementado com 500 mg/L de carvão ativado, bem como em meio suplementado com 500 mg/L de PVP (polivinilpirrolidone). Crescimento vigoroso foi observado para tangelo ‘Orlando, porém, a elevada conversão das células embriogênicas em embriões somáticos praticamente impossibilitou o isolamento de protoplastos desta variedade.

As culturas em suspensão celular que apresentaram crescimento mais vigoroso foram as das tangerinas ‘Cravo’, ‘Mexerica Rio’ e ‘Cleópatra’, obtidas em 2004; das tangerinas ‘Amblycarpa’, ‘Shekwasha’ e ‘Sunki’, o tangelo ‘Page’ e o tangor ‘Murcote’, obtidos em 2003, sendo os mais utilizados como fonte de protoplastos para a hibridação somática.

Tabela 1 – Calos embriogênicos obtidos a partir de óvulos abortados em meio de cultura EME suplementado com 5mg.L⁻¹ de BAP, Piracicaba, 2004

Variedades	Calos friáveis	Crescimento em suspensão
Tangerina ‘Cravo’	Sim	Sim
Tangerina ‘Dancy’	Sim	Sim
Tangerina ‘Mexerica Rio’	Sim	Sim
Tangerina ‘Sunchushakat’	Sim	Sim
Tangerina ‘Caçula’	Não	Não
Tangerina ‘Havana’	Sim	Não
Tangerina ‘Cleópatra’	Sim	Sim
Tangerina ‘Sunki’	Sim	Sim
Tangerina ‘Shekwasha’	Sim	Não
Tangerina ‘Amblycarpa’	Sim	Não
Tangor ‘Ellendale’	Não	Não
Tangor ‘Fortune’	Não	Não
Tangelo ‘Orlando’	Sim	Não

Foram utilizadas 30 placas para cada variedade, com 20 óvulos abortados por placa, totalizando 600 explantes por variedade.

Embriões de citros obtidos a partir de calos embriogênicos conservam a identidade genética da planta mãe e expressam pouca variabilidade (JIMÉNEZ, 1996). Calos de laranja 'Jincheng' (*Citrus sinensis*) cultivados por 15 anos mantiveram níveis de ploidia praticamente estáveis e produziram plantas com a mesma identidade genética de seus genitores. A variação do número de cromossomos em calos embriogênicos de *Citrus* ocorre em maior frequência durante o primeiro ano de cultivo, tendo sido encontrado valores superiores a 10% de variação em calos de laranja 'Newhall' (*Citrus sinensis*). Calos embriogênicos de tangor 'Murcote' cultivados durante dez anos demonstraram índices de variação inferiores aos de calos recém estabelecidos (HAO; DENG, 2002). A ocorrência de células variantes tetraplóides nos calos é freqüente, mas estas células são mitoticamente inibidas e eliminadas através do processo de morte celular programada, restaurando a diploidia da população celular, resultando na estabilidade do nível de ploidia (HAO; DENG, 2003). Com base neste fenômeno, calos de citros podem ser mantidos em cultivo por um longo período, desde que subcultivados a cada mês, já que as condições de cultivo interferem na regulação celular e induzem instabilidade genômica nas células, produzindo variação no número de cromossomos (HAO; YOU; DENG, 2004).

4.2 Hibridação somática

Foram realizados 73 eventos de fusão de protoplastos no período de janeiro de 2004 a março de 2005 envolvendo combinações de tangerinas (genitor embriogênico) e toranjas (genitor não embriogênico). As primeiras divisões celulares foram observadas em sete dias após a fusão, originando microcolônias e posteriormente microcalos. Os microcalos foram cultivados em meio EME, resultando na rápida proliferação de calos embriogênicos em 15 combinações após 60 dias do evento de fusão dos protoplastos, como evidenciado na Tabela 2.

Tabela 2 – Fusões de protoplastos realizadas e desenvolvimento observado (janeiro de 2004 a março de 2005)

Genitores Embriogênicos	Genitores não embriogênicos	Desenvolvimento Observado
Tangelo 'Orlando'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangelo 'Page'	Toranja 'Sunshine'	Não
Tangelo 'Page'	Toranja 'Lau Tau'	Microcolônias
Tangelo 'Page'	Toranja 'Lau Tau'	Microcalos
Tangelo 'Page'	Toranja 'Lau Tau'	Plantas regeneradas
Tangelo 'Page'	Toranja 'Doce'	Não
Tangelo 'Page'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Melancia'	Não
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Kao Panne'	Embriões
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Ogami'	Microcalos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Kao Panne'	Microcalos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Lau Tau'	Microcalos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Zamboá'	Microcalos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Ogami'	Microcalos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Inerme'	Calos embriogênicos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Kao Panne'	Microcolônias
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Kao Panne'	Microcolônias
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja '151-427'	Microcolônias
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Zamboá'	Microcalos
Tangerina 'Amblycarpa'	Toranja 'Vermelha'	Microcalos
Tangerina 'Cleópatra'	Toranja 'Lau Tau'	Não
Tangerina 'Cravo'	Toranja 'Sunshine'	Não
Tangerina 'Cravo'	Toranja 'Periforme'	Microcalos
Tangerina 'Cravo'	Toranja '151-427'	Microcolônias
Tangerina 'Cravo'	Toranja Zamboá'	Não
Tangerina 'Cravo'	Toranja 'Kao Panne'	Calos embriogênicos
Tangerina 'Cravo'	Toranja 'Indochina'	Calos embriogênicos
Tangerina 'Dancy'	Toranja '151-427'	Não
Tangerina 'Dancy'	Toranja Zamboá'	Não
Tangerina 'Dancy'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangerina 'Dancy'	Toranja 'Indochina'	Não

Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Zamboa'	Não
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Vermelha'	Não
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Kao Panne'	Microcolônias
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja '151-427'	Microcolônias
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Lau Tau'	Não
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Siamesa'	Microcolônias
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Zamboa'	Microcolônias
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Siamesa'	Não
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Kao Panne'	Microcolônias
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Hawaiian'	Calos embriogênicos
Tangerina 'Mexerica Rio'	Toranja 'Kao Panne'	Calos embriogênicos
Tangerina 'Shekwasha'	Toranja 'Indian Red'	Embriões
Tangerina 'Shekwasha'	Toranja 'Indochina'	Não
Tangerina 'Shekwasha'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangerina 'Shekwasha'	Toranja 'Zamboa'	Microcalos
Tangerina 'Shekwasha'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangerina 'Sunchushakat'	Toranja 'Indian Red'	Não
Tangerina 'Sunchushakat'	Toranja 'Zamboa'	Microcolônias
Tangerina 'Sunchushakat'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Kao Panne'	Microcolônias
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Sunshine'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Kao Panne'	Microcolônias
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Indian Red'	Calos embriogênicos
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Singapura'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Zamboa'	Microcolônias
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Doce'	Microcolônias
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Zamboa'	Microcolônias
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Vermelha'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Lau Tau'	Microcalos
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Ogami'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Hawaiian'	Microcalos
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Kao Panne'	Não
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Indochina'	Microcalos
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Indochina'	Calos embriogênicos
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Lau Tau'	Plantas regeneradas

Tangor 'Murcote'	Toranja 'Hawaiian'	Embriões
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Ogami'	Plantas regeneradas
Tangor 'Murcote'	Toranja Vermelha'	Calos embriogênicos
Tangor 'Murcote'	Toranja 'Singapura'	Calos embriogênicos

De todos os eventos de fusão, apenas cinco combinações resultaram na formação de embriões globulares (Tabela 2), os quais foram introduzidos em meio EME contendo 25 g. L⁻¹ de sacarose para a histodiferenciação e germinação. Após 60 dias de cultivo, esses embriões aumentaram consideravelmente seu tamanho, apresentando, porém, alterações morfológicas como cotilédones fusionados, perda do eixo bipolar, folhas bífidias e despigmentadas, e a ocorrência de embriogênese somática secundária também foi constantemente observada. Anormalidades similares foram relatadas por PEREZ *et al* (1998), RICCI *et al.* (2002) e NIEDZ *et al.* (2002), os quais associaram a ocorrência destas anormalidades à ausência de sincronismo celular durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *Citrus*. TOMAZ *et al.* (2001) citam que as anormalidades no desenvolvimento de embriões somáticos são descritas em muitos outros sistemas e estas se devem provavelmente às condições inadequadas de cultivo, sendo freqüentemente genótipo-específicas.

A combinação tangerina 'Amblycarpa' + toranja 'Kao Panne' demonstrou elevado potencial para a formação de massas pró-embriogênicas, recobrando a placa de Petri com densos calos 30 dias após a introdução de microcalos em meio EME maltose, porém a capacidade de formação de pró-embriões foi extremamente baixa. Entretanto, GROSSER *et al.* (2004) obtiveram a regeneração de 274 plantas como produto da hibridação de tangerina 'Amblycarpa' com outras variedades de citros, já que, segundo os autores, híbridos envolvendo este genitor demonstram maior vigor em cultivo e geralmente produzem múltiplas brotações por embrião. A eficiência regenerativa pode também ser devida ao fato de se tratarem de calos embriogênicos jovens, com elevado potencial regenerativo e/ou devido à combinação de genótipos.

Para obter embriões da combinação tangerina 'Amblycarpa' + toranja 'Kao Panne', uma pequena quantidade de calos (50 mg) foi colocada em placas de Petri com meio de cultura EME suplementado com diferentes fontes de carboidratos para a

indução da embriogênese: sacarose, galactose, glicose, lactose e maltose (75 mM). Sobre os calos, foi colocado 1 mL do meio EME líquido, suplementado com a mesma fonte de carboidrato do meio sólido, formando uma dupla-fase, permitindo o espalhamento da massa pró-embriogênica uniformemente pela placa. Após 30 dias, houve a formação de cinco embriões globulares em meio suplementado com galactose. KOCHBA *et al.* (1982), associou a galactose à indução da produção de etileno, o qual atua inibindo a biosíntese de auxina, favorecendo a formação de embriões somáticos a partir de calos embriogênicos. TOMAZ *et al.* (2001) recuperou um elevado número de embriões somáticos derivados de calos de laranja 'Caipira' quando cultivados em meio suplementado com 110 mM de galactose. BENEDITO; MOURÃO FILHO, MENDES (2000) encontraram resultado semelhante, evidenciando que a galactose foi a melhor fonte de carbono dentre todas testadas, resultando no maior número de embriões formados em quatro variedades de laranja doce.

Embriões globulares provenientes da combinação tangerina 'Shekwasha' + toranja 'Indian Red' apresentaram anormalidades no desenvolvimento, não evoluindo para estágios mais avançados de sua ontogenia, como cordiforme, torpedo e cotiledonar. GROSSER *et al.* (2004) citam que geralmente poucas plantas são recuperadas a partir de fusões envolvendo os genitores tangor 'Murcote' e tangerina 'Shekwasha' devido à reduzida eficiência de indução de embriões somáticos. Na tentativa de induzir a formação de gemas adventícias a partir destes embriões, procedeu-se ao corte de segmentos dos mesmos e introdução em meio de cultura EME suplementado com 5 mg.L⁻¹ de BAP. Após dois subcultivos com intervalos de 20 dias, o material introduzido demonstrou forte oxidação e foi descartado. A organogênese a partir de embriões somáticos anormais foi também citada por MENDES-DA-GLORIA; MOURÃO FILHO; MENDES (2000) para a obtenção de gemas adventícias em meio suplementado com BAP, NAA e água de côco.

4.2.1 Plantas obtidas pela fusão de protoplastos

O evento de fusão de protoplastos envolvendo tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' resultou na regeneração de 17 plantas que foram enxertadas *in vitro* sobre porta-

enxerto laranja 'Hamlin', devido ao fato de não terem desenvolvido sistema radicular ou, quando desenvolveram, a conexão da parte aérea com o sistema radicular foi prejudicada pela formação de calo na região do colo da planta, resultando no amarelecimento da parte aérea. FU *et al.* (2003) também encontraram dificuldade em regenerar raízes na combinação intergenérica entre *Citrus sinensis* e *Clausena lansium* mesmo depois da introdução das plantas em meio RMAN e associaram a recalcitrância para formação de raízes à assimetria cromossômica, assim como à dupla carga cromossômica ou mesmo eliminação cromossômica.

Foram também obtidas duas plantas da combinação entre tangor 'Murcote' e toranja 'Ogami' e uma planta de tangor 'Murcote' e toranja 'Lau Tau', todas enxertadas *in vitro* sobre porta-enxerto laranja 'Valência'. Estas plantas estão na fase de aclimatização em sala de crescimento e as análises para confirmação da hibridação ainda não foram realizadas (Figura 1).



Figura 1 - Plantas regeneradas em aclimatização. a) tangor 'Murcote' + toranja 'Ogami' (planta 1); b) tangor 'Murcote' + toranja 'Ogami' (planta 2); c) tangor 'Murcote' + toranja 'Lau Tau'

A morfologia dos híbridos simétricos interespecíficos e intergenéricos é, geralmente, intermediária à dos genitores. Características como folhas mais espessas, arredondadas, normalmente mais escuras e com pecíolo alado maior ou intermediário aos parentais e glândulas de óleo aparentes na face abaxial podem ser comparadas com os genitores para a comprovação da hibridação (TAKAMI *et al.*, 2004). Estas características são esperadas em plantas tetraplóides ($2n = 2x = 36$), uma vez que possuem maior número de cromossomos e, conseqüentemente, maior volume celular e

nuclear (GROSSER, GMITTER JÚNIOR, 1990a). Todavia, plantas com morfologia intermediária têm também sido derivadas de fusões assimétricas e a regeneração de plantas híbridas somáticas com morfologia idêntica a um dos genitores tem sido relatada em algumas fusões simétricas. A morfologia de plantas regeneradas a partir do mesmo evento de fusão pode ser diversa, isto é, cada indivíduo gerado pode ser morfológicamente distinto do outro (LIU, XU, DENG, 2005).

A análise morfológica da planta tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' resultou em características completamente diferentes dos genitores, com o ápice da folha arredondado e com tamanho reduzido, além da coloração verde escura, mesófilo enrugado e ausência de pecíolo alado, característica presente em ambos os genitores (Figura 2).



Figura 2 – Planta regenerada tangerelo ‘Page’ + toranja ‘Lau Tau’ (planta 8) a) Planta mantida em casa de vegetação, b) Análise de RAPD: Colunas 1 a 3 = ‘primer’ OPA1; colunas 4 a 6 = ‘primer’ OPA2, colunas 7 a 9 = ‘primer’ OPA3; colunas 10 a 12 = ‘primer’ OPA7, colunas 13 a 15 = ‘primer’ OPA8; colunas 16 a 18 = ‘primer’ OPA9. Colunas 1, 4, 7, 10 e 13 = tangerelo ‘Page’; colunas 2, 5, 8, 11 e 16 = Planta regenerada ‘Page’ + ‘Lau Tau’. Colunas 3, 6, 9, 12 e 15 = toranja ‘Lau Tau’. L = Ladder 1 kb, c) Morfologia foliar: tangerelo ‘Page’ (esquerda), planta regenerada ‘Page’ + ‘Lau Tau’ (centro) e toranja ‘Lau Tau’ (direita)

Em *Citrus*, a seleção de células híbridas pode ser feita pelo cultivo em elevada concentração de sacarose (0,6 M), como o citado por OHGAWARA *et al.* (1985), em concordância com a metodologia empregada neste trabalho. GUO; GROSSER (2005) descrevem que a maioria das plantas regeneradas de experimentos de fusão somática são híbridos somáticos tetraplóides, e quando as plantas regeneradas incluem plantas diplóides semelhantes a um ou a ambos os genitores, as que primeiro regeneram são

usualmente híbridos somáticos. Isto sugere que híbridos somáticos são mais vigorosos e têm uma maior capacidade para a embriogênese comparada com regenerantes do genitor calo embriogênico.

Na análise de citometria de fluxo das suspensões nucleares obtidas das folhas, os picos de leitura da quantidade de DNA em G₁, após a coloração com DAPI, resultaram histogramas com resolução suficiente para confirmar a ploidia, revelando que as plantas regeneradas 'tangelo 'Page'+ toranja 'Lau Tau' (plantas 1, 8, 13 e 17), tratam-se de indivíduos diplóides (2x) (Figura 3). Os dados comparativos estão resumidos na Tabela 3.

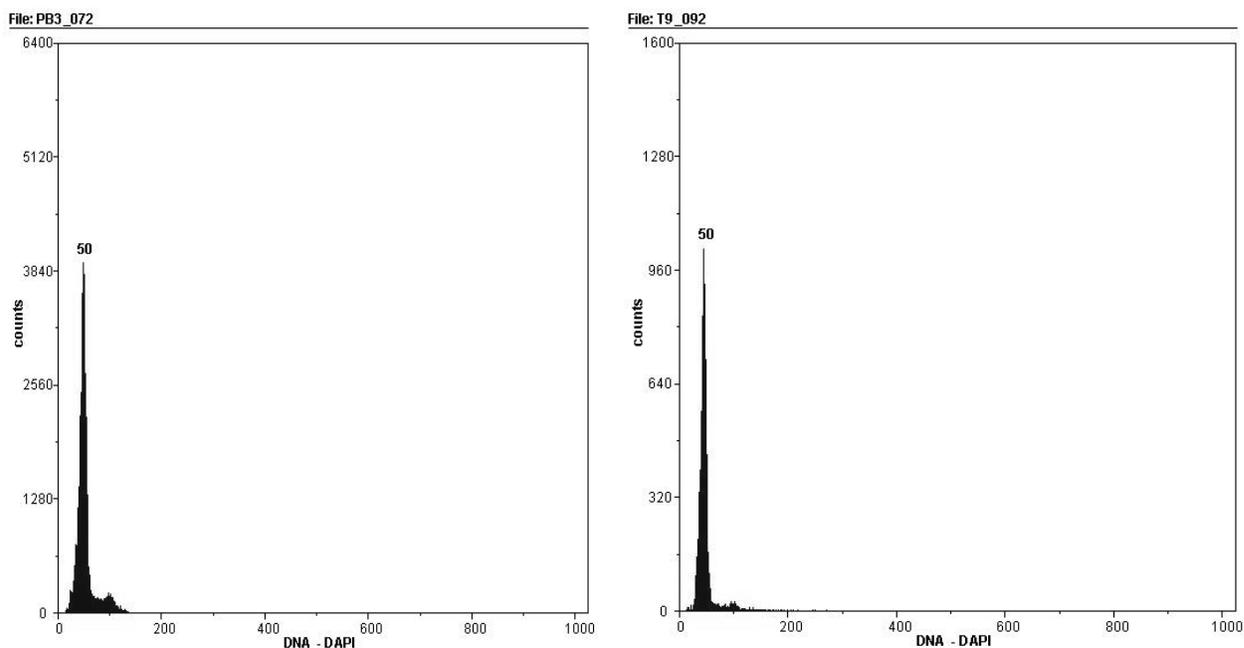


Figura 3 - Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares de tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' (direita) e do padrão diplóide toranja 'Lau Tau' (esquerda)

Tabela 3 - Análises por citometria de fluxo de suspensões nucleares de folhas de tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' e do genitor não embriogênico toranja 'Lau Tau', coradas com o fluorocromo DAPI

Planta	Canal (G ₁ /G ₀)	Index ¹	Ploidia estimada
toranja 'Lau Tau' (PB 3) ²	50	1.00	2x
tangelo 'Page'+ toranja 'Lau Tau' (P T8)	50	1.00	2x
tangelo 'Page'+ toranja 'Lau Tau' (P T9)	50	1.00	2x
tangelo 'Page'+ toranja 'Lau Tau' (P T10)	50	1.00	2x
tangelo 'Page'+ toranja 'Lau Tau' (P T11)	50	1.00	2x

¹ O index 1.00 foi atribuído ao canal de leitura (50) da planta-padrão Lau Tau (PB3)

² Planta-padrão diplóide

Segundo CABASSON *et al.* (2001), a ocorrência de diploidia nas plantas regeneradas e semelhança com um dos genitores pode indicar que se trata de um clone da planta doadora de protoplastos de calo embriogênico, ou de um híbrido aloplásmico (possui o genoma nuclear de um dos genitores e o citoplasma do outro) ou cíbrido.

LIU *et al.* (2002) citam que muitas plantas diplóides foram regeneradas após fusões simétricas entre espécies diplóides. Estas plantas foram denominadas "tipo foliar" porque elas eram morfológicamente idênticas à planta doadora de protoplastos de mesófilo utilizado na fusão. Análises subseqüentes destas plantas, baseadas em marcadores moleculares indicaram que elas eram híbridos aloplásmicos ou cíbridos. A maioria destas plantas surgiram a partir de combinações interespecíficas. Embora GROSSER *et al.* (1996); YAMAMOTO; KOBAYASHI (1995) e MORIGUCHI *et al.* (1996) tenham afirmado que a formação de cíbridos através de hibridação somática padrão em *Citrus* parece ocorrer somente em combinações de espécies dentro do gênero, por outro lado, LIU *et al.* (1999) descrevem a produção híbridos intergenéricos entre *Microcitrus papuana* e *Citrus sinensis*. XU; LIU; DENG (2004) obtiveram plantas cíbridadas da combinação entre *Microcitrus papuana* e *Citrus aurantium*.

A grande maioria dos cíbridos já produzidos são provenientes de falhas na fusão nuclear e perda de material genético (GROSSER *et al.*, 1996a). A produção de cíbridos a partir de experimentos padrão de hibridação somática pode ser devida ao estágio do

ciclo celular em que a maioria dos protoplastos de cada parental se encontra no momento da fusão nuclear. Se eles se encontrarem em estágios comparáveis do ciclo celular, a fusão nuclear pode ser mais eficiente, caso contrário, um núcleo pode ser excluído (MOREIRA *et al.*, 2000).

Durante muito tempo, acreditou-se que protoplastos provenientes de mesófilo foliar não apresentavam capacidade regenerativa, mas em trabalhos recentes foi demonstrado que quando este tipo de protoplasto herda o genoma mitocondrial (mt DNA) de uma célula isolada de calo/suspensão embriogênica, a capacidade regenerativa é restabelecida. Este fato sugere que o DNA mitocondrial pode desempenhar um papel significativo na regeneração das plantas (GROSSER *et al.*, 1996). Adicionalmente, sabe-se que a embriogênese é um processo que necessita de uma grande quantidade de energia. Se a mitocôndria é a fornecedora de energia para a planta, o resgate das mitocôndrias do parental embriogênico pode fornecer a energia necessária para a embriogênese (MOREIRA *et al.*, 2002). MOREIRA *et al.* (2000b) demonstraram que suspensões celulares de células embriogênicas de *Citrus* apresentam quatro vezes mais mitocôndrias do que suspensões de células de mesófilo, o que implica na transmissão preferencial do mt DNA deste tipo celular aos híbridos somáticos, devido à relativa abundância desta organela nas células embriogênicas. Além disso, alguns trabalhos sugerem que quando a fonte de protoplastos embriogênicos são células em suspensão, estas provêm a mais competitiva forma de mitocôndria, sendo preferencialmente herdadas.

Em todos os casos relatados, os cíbridos apresentaram morfologia similar ao parental doador de protoplastos de mesófilo foliar e a análise molecular do genoma nuclear destas plantas revelou um padrão de bandas muito semelhante ao genitor foliar, indicando a herança do genoma nuclear do doador de protoplastos de mesófilo foliar. A análise morfológica também indicou que o híbrido assemelha-se muito ao genitor foliar. A composição do genoma citoplasmático das plantas regeneradas resultou num padrão de bandas completamente idênticas ao parental embriogênico tanto para DNA cloroplastidial (cp DNA) quanto mitocondrial (mt DNA). Nenhuma banda polimórfica proveniente do genitor foliar pôde ser detectada, possibilitando concluir que somente o genitor embriogênico teve contribuição para a composição do citoplasma

(SAITO *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2002; POLCI; FRIEDRICH, 2004; GUO *et al.*, 2004; LIU; XU; DENG, 2005)

Comparando-se com o DNA nuclear, o modelo de herança do DNA mitocondrial e cloroplastidial é relativamente mais complexo. Para cloroplastos a transmissão uniparental tem sido predominantemente detectada em muitas combinações, não importando se são intergenéricas ou interespecíficas. A transmissão ao acaso significa que o DNA cloroplastidial pode ser herdado tanto de protoplastos provenientes de mesófilo foliar, quanto de células provenientes de calos embriogênicos. Um exemplo deste fato é descrito por GUO *et al.* (2004) que obtiveram em três híbridos somáticos tetraplóides de tangelo 'Page' e tangor 'Murcote', e cujas análises moleculares mostraram que duas foram idênticas ao tangor 'Murcote' e uma igual ao tangelo 'Page'.

A análise molecular do genoma total de tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' foi realizada com base em marcadores RAPD. Os padrões de amplificação observados no gel de agarose revelaram identidade entre bandas do genitor embriogênico tangelo 'Page' e a planta regenerada tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' para os primers selecionados. Estes resultados indicam que a planta regenerada tangelo 'Page' + toranja 'Lau Tau' trata-se de um clone de 'Page', porém, o aspecto morfológico distante dos genitores gera margem para discussões. Entretanto, nenhum caso semelhante pôde ser encontrado como referência em trabalhos publicados. Para avaliar se a planta regenerada apresenta o genoma nuclear de toranja 'Lau Tau' e o genoma mitocondrial de tangelo 'Page', análises moleculares mais detalhadas devem ser realizadas utilizando-se marcadores do tipo RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism) que requerem a hibridização com sondas cloroplastidiais e mitocondriais. Da mesma forma, para afirmar que a planta regenerada trata-se de um protoclonal variante, uma nova e detalhada análise de RAPD deve ser realizada envolvendo DNA do tangelo 'Page' e da planta regenerada, verificando se há ocorrência de bandas polimórficas.

5 CONCLUSÕES

Os protocolos utilizados para isolamento, fusão e cultura de protoplastos, bem como para a regeneração e aclimatização de plantas permitiram a obtenção 17 plantas da combinação entre tangelo 'Page' e toranja 'Lau Tau', duas plantas da combinação entre tangor 'Murcote' e toranja 'Ogami' e uma planta de tangor 'Murcote' e toranja 'Lau Tau'.

ANEXO

Composição dos meios de cultura

1. Soluções estoque de macronutrientes do meio MT (50x)	g.L⁻¹
NH ₄ NO ₃	82,5
KNO ₃	95,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	7,5
K ₂ HPO ₄ (dibásico)	1,0
2. Soluções estoque de micronutrientes do meio MT (100x)	g.L⁻¹
H ₃ BO ₃	0,62
MnSO ₄ .H ₂ O	1,68
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
KI	0,083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
3. Soluções estoque de ferro do meio MT (50x)	g.L⁻¹
Na ₂ EDTA	1,862
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,372
4. Soluções estoque de vitaminas do meio MT (100x)	g.L⁻¹
Mio-inositol	10,0
Tiamina-HCl	1,0
Piridoxina-HCl	1,0
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2
5. Solução estoque de cálcio do meio MT (66x)	g.L⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	29,33
6. Soluções estoque de macronutrientes do meio BH₃ (100x)	g.L⁻¹
MgSO ₄	37,0
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	15,0
K ₂ HPO ₄ (dibásico)	2,0
KCl	150,0
7. Soluções estoque de A multivitaminas do meio BH₃ (100x)	g.100mL⁻¹
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

8. Soluções estoque de B multivitaminas do meio BH₃ (100x)	g.100mL⁻¹
Retinol (vitamina A)	0,001
Colecalciferol (vitamina D ₃)	0,001
Vitamina B ₁₂	0,002
9. Solução estoque de KI do meio BH₃ (100x)	g.100mL⁻¹
KI	0,075
10. Soluções estoque de ácidos orgânicos do meio BH₃ (50x)	g.100mL⁻¹
Piruvato de sódio	0,1
Ácido cítrico	0,2
Ácido málico	0,2
Ácido fumárico	0,2
11. Soluções estoque de açúcares do meio BH₃ (100x)	g.100mL⁻¹
Frutose	2,5
Ribose	2,5
Xilose	2,5
Manose	2,5
Ramose	2,5
Celobiose	2,5
Galactose	2,5
Manitol	2,5
12. Soluções estoque 1 de sais de CPW	g.100mL⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,2720
KNO ₃	1,0000
MgSO ₄	2,5000
KI	0,0016
CuSO ₄	0,000025
13. Solução estoque 2 de sais de CPW	g.100mL⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,5

Meios de cultura

1. EME Regular (0,146M)

S.E. de macronutrientes de MT (50x)	20 mL.L ⁻¹
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de vitaminas de MT (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L ⁻¹
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L ⁻¹
Sacarose*	50 g.L ⁻¹
Extrato de malte	0,5 g.L ⁻¹
Agar	8 g.L ⁻¹

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⁻¹

para EME 0,7M = usar 239,61 g.L⁻¹

para EME 0,8M = usar 273,84 g.L⁻¹, e esterilizar em filtro de 0,2 µm.

2. H + H

S.E. de macronutrientes de MT (50x)	20 mL.L ⁻¹
S.E. de macronutrientes de BH ₃ (100x)	5 mL.L ⁻¹
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de vitaminas de MT (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L ⁻¹
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L ⁻¹
Sacarose	50 g.L ⁻¹
Extrato de malte	0,5 g.L ⁻¹
Glutamina	1,55 g.L ⁻¹
Agar	8 g.L ⁻¹

Ajustar o pH para 5,8 com KOH
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

3. BH₃

S.E. de macronutrientes de BH ₃ (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de micronutrientes de MT (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de vitaminas de MT (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de cálcio de MT (66x)	15 mL.L ⁻¹
S.E. de ferro de MT (50x)	20 mL.L ⁻¹
S.E. de A multivitaminas de BH ₃ (100x)	2 mL.L ⁻¹
S.E. de B multivitaminas de BH ₃ (100x)	1 mL.L ⁻¹
S.E. de KI de BH ₃ (100x)	1 mL.L ⁻¹
S.E. de açúcares de BH ₃ (100x)	10 mL.L ⁻¹
S.E. de ácidos orgânicos de BH ₃ (50x)	20 mL.L ⁻¹
Água de coco	20 mL.L ⁻¹

Extrato de malte	1 g.L ⁻¹
Sacarose*	
Manitol	81,99 g.L ⁻¹
Glutamina	3,1 g.L ⁻¹
Caseína hidrolisada	0,25 g.L ⁻¹
Ajustar o pH para 5,7 com KOH	
* Adicionar a sacarose nas seguintes proporções:	
para BH ₃ 0,6M = usar 51,35 g.L ⁻¹	
para BH ₃ 0,7M = usar 85,56 g.L ⁻¹	
para BH ₃ 0,8M = usar 119,77 g.L ⁻¹ , e esterilizar em filtro de 0,2 µm.	
4. CPW	mL.100mL⁻¹
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 ⁻¹ de manitol	
- Para CPW 25M, adicionar 25 g.100mL ⁻¹ de sacarose	
Ajustar o pH para 5,8 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 µm	
5. Solução Enzimática	g.40mL⁻¹
Manitol (0,7M)	5,12
CaCl ₂ (24,5mM)	0,144
NaH ₂ PO ₄ (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	
6. Solução de PEG	g.100mL⁻¹
Polietilenoglicol (PM = 1450)	40,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,97
Glicose	5,41
Ajustar o pH para 6,0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 µm	
7. Solução de lavagem "A"	
Glicose	7,2 g.100mL ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,97 g.100mL ⁻¹
DMSO	10 ml.100mL ⁻¹
Ajustar o pH para 6,0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 µm	
8. Solução de lavagem "B"	g.100mL⁻¹
Glicina	2,25

Ajustar o pH para 10,5 com KOH

Esterilizar em filtro de 0,2 μm

9. Meio 1500

S.E. de macronutrientes de MT (50x)

20 mL.L⁻¹

S.E. de micronutrientes de MT (100x)

10 mL.L⁻¹

S.E. de vitaminas de MT (100x)

10 mL.L⁻¹

S.E. de cálcio de MT (66x)

15 mL.L⁻¹

S.E. de ferro de MT (50x)

20 mL.L⁻¹

Sacarose

50 g.L⁻¹

Extrato de malte

1,5 g.L⁻¹

Agar

8 g.L⁻¹

Ajustar o pH para 5,8 com KOH

Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

Meios de cultura para redução osmótica de protoplastos

1. Meio 1:1:1

1 parte de BH₃ 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 BH₃ 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 em óvulos abortados

Meio EME Regular (0,146M)

BAP

5 mg.L⁻¹

REFERÊNCIAS

ABKENAR, A.A.; ISSHIKI, S.; TASHIRO, Y. Maternal inheritance of chloroplast DNA in intergeneric sexual hybrids of “true citrus fruit trees” revealed by PCR-RFLP analysis. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 70, p. 360-363, 2004.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MULLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; SCHINOR, E.H. Proteção integrada: Doenças. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J.D. de; FIGUEIREDO, J.O. **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. cap. 7, p.113-146.

ALBIACH-MARTI, M.R.; GROSSER, J.W.; GOWDA, S.; MAWASSI, M.; SATYANARAYANA, T.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W. *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.14, p.117-128, 2004.

ALMEIDA, W.A.B; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A. RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.1, p.23-29, 2003.

ANDRADE, R.A.; MARTINS, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.25, n.1, p.134-136, 2003.

ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico : Fundag, 2005, p. 926.

AZEVEDO, C.L.L. Sistema de Produção de Citros para o Nordeste. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Sistemas de Produção**, n.16, 2003. Disponível em:< <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/index.htm>>. Acesso em: 01 ago. 2006.

BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v.1, p.105-106, 1976.

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 Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 33-38, 2000.

BENEDITO, V.A. **Hibridação somática entre tangerina ‘Cleópatra’ e laranja ‘Azeda’ por fusão de protoplastos**. 1999. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

BENGOCHEA, T.; DODDS, J.H.A. **Plant protoplasts**: a biotechnological tool for plant improvement. Cambridge: Capman & Hall, 1986. 90p.

BENNETT, C.W.; COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agriculture Research**, Essex, v.78, p.207-237, 1949.

BINSFELD, P.C. Transferência genômica parcial. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, Taubaté, v. 2, n.8, p. 86-88, 1999.

BINSFELD, P.C.; SCHNABL, H. Molecular and cytogenetic constitution of plants obtained via two different somatic hybridization methods. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.21, p.58-62, 2002.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; MULLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.3, p. 123-129, 2003.

CABASSON, C.M.; LURO, F.; OLLITRAULT, P.; GROSSER, J.W. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in *Citrus* hybrids produced by protoplast fusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, p.604-609, 2001.

CALABRESE, F. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Florida, v.1, p.35-38, 1992.

CALIXTO, M.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A. Seleção de plantas de toranja (*C. grandis* (L.) Osb.) tolerantes a *Phytophthora* sp. para uso na hibridação somática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Cruz das Almas: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. p.1-6.

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.) Osbec. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Campinas, v.39, n.7, p. 721-724, 2004.

CARDONE, S.; OLMOS, S.; ECHENIQUE, V. Parte III: Métodos para generar variabilidad: Variación Somaclonal. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biotecnología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. p.97-108.

CARIMI, F.; PASQUALE, F.; CRESCIMANNO, F.G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of Citrus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, n.11, p. 935-940, 1999

CARLOS, E.F., STUCHI, E.S., DONADIO, L.C. **Porta-enxertos para a citricultura paulista** Jaboticabal : Funep, 1997. 47p. (Boletim citrícola, 1).

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: EMBRAPA1998. p.413-458.

CARVALHO, S.A.; BAPTISTA, C.R.; MÜLLER, G.W.; SILVERIO, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.79-84, 1997.

CASTLE, W.S. Citrus rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. (eds). **Rootstocks for fruit crops**. New York: Wiley, 1987. p. 361-339

CASTLE, W.S.; PELOSI, R.R.; YOUTSEY, C.O.; GMITTER JÚNIOR, F.G.; LEE, R.F.; POWELL, C.A.; HU, X. Rootstocks similar to sour orange for Florida citrus trees. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.105, p. 56-60, 1992.

CHATUVERDI, H.C.; SINGH, S.K.; SHARMA, A.K.; AGNIHOTRI, S. Citrus tissue culture employing vegetative explants. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.39, n.11, p.1080-1095, 2001.

CHEN, C.L.; GUO, W.W.; YI, H.L.; DENG, X.X. Cytogenetic analysis of two interespecific *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. **Plant Breeding**, Berlin, v.123, p.332-337, 2004.

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.

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 combinations with potential for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.43, n.9, p.1151-1156, 2003.

COSTA, M.A.P.C; MOURÃO FILHO, F.A.A; MENDES, B.M.J. Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.472-476, 2002.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Dordrecht, v.109, p.25-32, 1999.

CTNBio. **Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos**. Definição de metas.. Brasília, DF: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. MCT, 2002. 50p.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, New York, v.23, p.131-171, 2005.

DAVIS, R.M. *Phytophthora*-Induced diseases. In: Whiteside, J.O., Garnsey, S.M. ; Timmer, L.W. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul : APS., 1988. p.22-24.

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.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Amsterdam, v.38, n.3, p. 285-302, 1997.

ERWIN, D.C; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 1996. 562p.

FAO. **FAOSTAT**: STATISTICS DATABASE. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 26 ago. 2006.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E. D.M.N.; Santos, A. F.; Matsuoka, K.; Bezerra, J.L. (Ed). **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas. Livraria e Editora Rural , 2001. p.283-342.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FNP Consultoria & Comércio. **Agrianual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. 520p.

FORNER, J.B.; FORNER-GINER, M.A. Programa de melhoramento de porta-enxertos cítricos na Espanha. In: DONADIO, L.C.; STUCHI, E.S. (Ed.). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, Melhoramento, 7., Bebedouro: **Anais...** Bebedouro: EECB, 2002. p.234-289.

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

FU, C.H.; GUO, W.W.; LIU, J.H.; DENG, X.X. Regeneration of *Citrus sinensis* (+) *Clausena lansium* intergeneric triploid and tetraploid somatic hybrids and their identification by molecular markers. **In Vitro Cellular Developmental Biology- Plant**, London, v.39, p.360-364, 2003.

FUNDECITRUS. **Fundo de defesa da citricultura**. Disponível em: <www.fundecitrus.com.br> Acesso em: 25 jul. 2006.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Protoplastos de Plantas: Isolamento e Regeneração. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.41, n.12, p.1151-1159, 1989.

GERMANÀ, M.A. Doubled haploid production in fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.131-146, 2006.

GILL, M.I.S.; SINGH, Z.; DHILLON, B.S.; GOSAL, S.S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Scientia Horticulturae**, v.63, p.167-174, 1995.

GMITTER JUNIOR, F.G.; HU, X.L. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economic Botany**, Essex, v.44, p. 267-277, 1990.

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, cap.14. p.335-369.

GROSSER, J.M.; OLLITRAUT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Invited review: Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, London, v.36, p.434-449, 2000.

GROSSER, J.W. Citrus scion and rootstock improvement via somatic hybridization. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.336, p.297-305, 1993.

GROSSER, J.W. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion and culture. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.11, p.1241-1243, 1994.

GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. New citrus rootstocks via protoplast fusion. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 622, p. 491-497, 2003.

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, 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- Plant**, London, v. 41, p.220-225, 2005.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CASTLE, W.S. Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: Progress report. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Florida, v.108, p.140-143, 1995.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CHANDLER, J.L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.8, p.656-659, 1990.

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.; SESTO, F.; DENG, X.X.; CHANDLER, J.L. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.117, n.1, p.169-173, 1992b.

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**, Alexandria, v.33, n.6, p.1060-1061, 1998b

GROSSER, J.W.; MEDINA-URRUTIA, V.; ANANTHAKRISHNAN, G.; SERRANO, P. Building a replacement sour orange rootstock: somatic hybridization of selected mandarin + pumello combinations. **Journal of American Horticultural Science**, v.129, n.4, p.530-534, 2004.

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

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**, Berlin, v.92, p.557-582, 1996.

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

GUO, W.W.; CHENG, Y.J.; CHEN, C.L.; DENG, X.X. Molecular analysis revealed autotetraploid, diploid and tetraploid cybrid plants regenerated from an interespecific somatic fusion in *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, p.162-166, 2006.

GUO, W.W.; CHENG, Y.J.; DENG, X.X. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, p. 829-834, 2002.

GUO, W.W.; DENG, X.X. Wide somatic hybrids of *Citrus* with its related genera and their potencial in genetic improvement. **Euphytica**, Wageningen, v.118, p. 175-183, 2001.

GUO, W.W.; GROSSER, J.W. Somatic hybrid vigor in *Citrus*: Direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the GFP gene. **Plant Science**, Limerick, v.168, p.1541-1545, 2005.

GUO, W.W.; PRASSARD, D.; CHENG, Y.J.; SERRANO, P.; DENG, X.X.; GROSSER, J.W. Target cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.22, p.752-758, 2004.

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

HAO, Y.J.; DENG, X.X. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, London, v.38, p.472-476, 2002.

HAO, Y.J.; DENG, X.X. Single-cell-derived sibling lines are established as an experimental system to assess chromosome number variations in embryogenic callus cultures of sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.73, p.275-278, 2003.

HAO, Y.J.; YOU, C.X.; DENG, X.X. Evidences for the control of chromosome number variation by a programmed-cell-death-like pathway in citrus callus. **Euphytica**, Wageningen, v.140, p.205-212, 2004.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES Jr., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs: Simon & Schuster, 1997. 770p.

HIDAKA, T.; KAJIURA, I. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. **Scientia Horticulturae**, Amesterdan, v.34, p.85-92, 1988.

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

HUTCHISON, D. J. Influence of rootstock on the performance of 'Valência' sweet orange. **Proceedings of the Internacional Society of Citriculture**, Florida, n.2, 523-525, 1977.

IBRAF (2006) <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em 21 jun. 2006.

JIMÉNEZ, V.M. El cultivo de protoplastos em cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. **Agronomia Costarricense**, Costa Rica, v.20, n.2, p.187-204, 1996.

JUMIN, H.B.; NITO, N. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six plant species related to *Citrus*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.15, p.332-336, 1996.

KAEPLER, S.M.; KAEPLER, F.H.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.43, p.179-188, 2000

KARASEV, A.V.; DAWSON, W.O.; HILF, M.E.; GARNSEY, S.M. Molecular biology of citrus tristeza virus: implications for disease diagnosis and control. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 472, p.333-337, 1998.

KHAN, I.A.; GROSSER, J.W. Regeneration and characterization of somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus micrantha*, a progenitor species of lime. **Euphytica**, Wageningen, v.137, p.271-278, 2004.

KOBAYASHI, S.; FUJIWARA, K.; OIYAMA, T.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Somatic hybridization between navel orange and 'Murcott' tangor. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988. **Proceedings...** 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**, Dordrecht, v.14, n.2, p.63-69, 1988b.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v.64, p.91-97, 1989.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAM, H. Adventives plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta**, Berlin, v.106, p.237-245, 1972.

KOIZUMI, M. Citrus tristeza virus: symptoms and control. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station**, n.3, 2001 (Nota Técnica).

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.60, p. 197-214, 1981.

LATADO, R.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.; TSAI, S.M.; TULMANN NETO, A. Obtenção de híbridos somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Campinas, v.37, n.12, p. 234-239, 2002.

LATADO, R.R.; VAZ, F.B.D.; TULMANN NETO, A. Obtenção de plantas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort.) a partir do cultivo de protoplastos de suspensão celular. **Scientia Agricola**, Campinas, v.56, n.2, 1999.

LI, K.B.; YONG, S.; WU, R.J.; XU, J.; KE, C. The purification of citrus tristeza virus. **Virologia Sinica**, v.5, n.3, p.312-316, 1990.

LING, J.; IWAMASA, M. Plant regeneration from embryogenic calli of six *Citrus* related genera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.49, p.145-148, 1997.

LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M.; KUNITAKE, H. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of Satsuma. **Hortscience**, Alexandria, v.15, n.8, p.970-972, 1990.

LIU, J.; DENG, X. Regeneration and analysis of citrus interespecific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization. **Euphytica**, Wageningen, v.125, p.13-29, 2002.

LIU, J.; XU, X.; DENG, X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.82, p. 19-44, 2005.

LIU, J.H.; DENG, X.X. Regeneration of hybrid calluses via donor-recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.59, p. 81-87, 1999.

LIU, J.H.; PANG, X.M.; CHENG, Y.J.; MENG, H.J.; DENG, X.X. Molecular characterization of the nuclear and cytoplasmic genomes of intergeneric diploid plants from cell fusion between *Microcitrus papuana* and Rough lemon. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.21, p.327-332, 2002.

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, p. 926.

MACHADO, M.A. Biotecnologia na citricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, p.8-10, 1997.

MARASCHIN, M.; SUGUI, J.A.; WOOD, K.V.; BONHAM, C.; BUCHI, D.F.; CANTAO, M.P.; CAROBREZ, S.G.; ARAUJO, P.S.; PEIXOTO, M.L.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J.D. Somaclonal variation: a morphogenic and biochemical analysis of *Mandevilla velutiana* cultured cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.35, p. 633-634, 2002.

MATHERON, M.E.; WRIGHT, G.C.; PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.11, p.345-456, 1998.

MATSUMOTO, K. Híbridos somáticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.20, p.26-28, 2001.

MEDINA FILHO, H. P., BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T. Tolerance of hybrids and rootstock clones of citrus to root rot

infection caused by *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.169-178, 2004.

MEDINA FILHO, H.P.; BALLVÉ, R.M.L.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, 1991.

MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, p.534-540, 2003.

MENDES, B. J. M.; 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**, London, v.37, n.4, p.256-261, 2001.

MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of ‘Hamlin’ sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.7, p.955-961, 2002.

MENDES-DA-GLORIA, 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.

MENDES-DA-GLORIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CAMARGO, L.E.A.; MENDES, B.M.J. Caipira sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potencial for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.661-665, 2000.

MIRANDA, M.; MOTOMURA, T.; IKEDA, F.; OHGAWARA, T.; SAITO, W.; ENDO, T.; OMURA, M.; MORIGUCHI, T. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p.401-405, 1997.

MOREIRA, C.D.; CHASE, C.D.; GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W. Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. **Molecular Breeding**, v.6, p.401-405, 2000b.

MOREIRA, C.D.; CHASE, C.D.; GMITTER JÚNIOR, F.G.; GROSSER, J.W. Transmission of organelle genomes in citrus somatic hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, p.165-168, 2000a.

MOREIRA, C.D.; GMITTER JÚNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; HUANG, S.; ORTEGA, V.M.; CHASE, C. Inheritance of organelle DNA sequences in a *Citrus-Poncirus* intergeneric cross. **The American Genetic Association**, v.93, p.174-178, 2002.

MOREIRA, C.S. MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F.C.P., POMPEU JÚNIOR, J. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.1-21.

MORIGUCHI, T.; HIDAKA, T.; OMURA, M.; MOTOMURA, T.; AKIHAMA, T. Genotype and parental combination influence efficiency of cybrid induction in Citrus by electrofusion. **Hortscience**, Alexandria, v.31, n.2, p.275-278, 1996.

MOTOMURA, T.; HIDAKA, T.; MORIGUCHI, T.; AKIHAMA, T.; OMURA, M. Intergeneric somatic hybrids between *Citrus* and *Atalantia* or *Severinia* by electrofusion, and recombination of mitochondrial genomes. **Breeding Science**, v.45, p.309-314, 1995.

MOTOMURA, T.; MORIGUCHI, T.; AKIHAMA, T.; HIDAKA, T.; OMURA, M. Analysis of cytoplasmic genome in somatic hybrids between *Citrus reticulata* Blanco and *Microcitrus australis* Swingle. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, v.65, p.497-503, 1996.

MOURÃO FILHO, F.A.A. Produção de híbridos somáticos em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, n.1, p.179-197, 1996.

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**, v.50, n.2, p.76-80, 1996.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; DONADIO, L.C. Citros. In: BRUCKNER, C.H. (Ed). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. cap.6, p.177-224.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CITRUS SYMPOSIUM., 1969, Riverside. **Proceedings....** Riverside: University of California, 1969. p.1155-1161.

NAVARRO, L.; OLIVARES-FUSTER, O.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J.A.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; DURAN-VILA, N.; PEÑA, L. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 632, p. 221-234, 2004.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.1155-1166, 2000.

NIEDZ, R.P. Regeneration of somatic embryos from sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts using semi-permeable membranes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 84, p. 353-357, 2006

NIEDZ, R.P.; HYNDMAN, S.E.; WYNN, E.T.; BAUSHER, M.G. Normalizing sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck) somatic embryogenesis with semi-permeable

membranes. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, London, v.38, p.552-557, 2002.

OCHATT, S.J.; CASO, O.H. Shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of wild pear (*Pyrus comunis* var *pyraster* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.122, p. 243-249, 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**, Berlin, v.71, p.1-4, 1985.

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

OLIVARES-FUSTER, O.; FLEMING, G.H.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O.; GROSSER, J.W. Citrus tristeza virus (CTV) resistance in transgenic citrus based on virus challenge of protoplasts. **In Vitro Cellular Developmental Biology- Plant**, London, v.39, p.567-572, 2003.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p. 477-481 , 2001.

OLIVEIRA, R.P; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VIDOSO, C.A.; MACHADO, C.A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.479-484, 2002.

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

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; VANEL, F.; FROELICHER, Y. Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.535, p.127-136, 2000.

PEREZ, R.M.; GALIANA, A.M.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Embryogenesis in vitro of several citrus species and cultivars. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v.73, p.796-802, 1998.

PIO, R.; RAMOS, J.D.; GONTIJO, T.C.A.; CARRIJO, E.P.; COELHO, J.H.C.; ALVARES, B.F.; MENDONÇA, V. Enraizamento de estacas dos porta-enxertos 'Fly Dragon' e 'Trifoliata'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.3, p.195-198, 2002.

POLCI, P.; FRIEDRICH, P. Parte III: Métodos para generar variabilidad: Hibridação somática. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biocología y mejoramiento vegetal**. Buenos Aires: INTA, 2004. p.97-108.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F.C.P., POMPEU JÚNIOR, J., *et al.* **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas : Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.

POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; JORGE, J.P.N.; JACON, J.R. Competição de clones de limão 'Cravo' e de limão 'Volkameriano' como porta-enxertos para laranja 'Natal'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., 1986. Brasília. **Anais...** Brasília: SBF, 1986. p.147-151.

POMPEU JÚNIOR, J.; LARANJEIRA, F. F.; BLUMER, S. 'Valencia' sweet orange trees grafted on trifoliolate hybrids. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.59, n.1, p.93-97, 2002.

POWER, J.B.; CHAPMAN, J.V. Isolation and genetic manipulation of plant protoplasts. In: DIXON, R.A. (Ed). **Plant cell culture a practical approach**, Oxford: IRL Press, 1985. p.37-66.

PRATES, H.S.; PELEGRINETTI, J.R. **Controle sanitário e cultural: legislação e relação de defensivos para citros**. Campinas: Fundação Cargill, 1995. 40p.

RICCI, A.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PIEDADE, S.M.S. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.41-46, 2002.

ROCHA-PEÑA, M.A.; LEE, R.F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.M.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, K. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.5, p.437-445, 1995.

ROSSETI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: FEALQ/Fundecitrus, 2001. 207p.

ROUX, N.S.; STROSSE, H.; TOLOZA, A.; PANIS, B.; DOLEZEL, J. Detecting ploidy level instability of banana embryogenic cell suspension cultures by flow cytometry. In: MEETING HELD IN LEUVEN, 2004. **Proceedings...** Belgium: Science Publishers, 2004. p.251-262.

SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S. Acid citrus somatic hybrids between sudachi (*Citrus sudachi* Hort) and lime (*C. aurantifolia* Swingle) produced by electrofusion. **Plant Science**, Limerick, v.77, n.11, p.125-130, 1991.

SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; KOBAYASHI, S. Somatic hybridization in *Citrus* using embryogenic cybrid callus. **Plant Science**, Limerick, v.99, p.89-95, 1994.

SANTOS FILHO, H.P. Gomose dos citros. Cruz das Almas, BA. EMBRAPA-CNPMP, 1991.2p. (Citros em Foco, 15). SCHAFFER, G; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L. C.

Porta-enxertos usados na citricultura. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.31, n.4, p. 723-733, 2001.

SCORA, R.W. On the history and origin of Citrus. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.102, p.369-375, 1975.

SEKER, M.; TUZCU, O.; OLLITRAULT, P. Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. **Plant Breeding**, v.122, n.2, p.169-172, 2003.

SILVA, R.P.; COSTA, M.A.P.C., SOUZA, A.S.; ALMEIDA, W.A.B. Regeneration of 'Pera' sweet orange plants through in vitro organogenesis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.12, p. 1153-1159, 2005.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A.; BOAVA, L.P.; Agressividade de isolados de *Phytophthora parasitica* em citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, n.2, p. 232- 239, 2002.

SMITH, S.M.; STREET, H.E.; The decline of embryogenic potencial as callus and suspension cultures os carrot (*Daucus carota L.*) are serially subcultured. **Annals of Botany**, v.38, p. 233-241, 1974.

SOARES FILHO, W.S. Variabilidade genética e melhoramento dos citros. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Embrapa-Semi-Árido, 2000. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/citros.pdf> Acesso em: 25 jul. 2006.

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.

SOUZA, A.A.; MULLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene do capsídeo do *Citrus tristeza vírus* em plantas pré-imunizadas de laranja 'Pêra'. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, p. 154-159, 2002.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Citrus. In: AMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHAM, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan , 1984, cap.13, p.355-372.

STEDDOM, K.; BECKER, O.; MENGE, J.A. Repetitive applications of the biocontrol agent *Pseudomonas* and effects on populations of *Phytophthora parasitica* in citrus orchards. **Phytopathology**, Lancaster, v.92, n.8, p.850-856, 2002.

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

TAKAMI, K.; MATSUMARA, A.; YAHATA, M.; IMAYAMA, T.; KUNITAKE, H.; KOMATSU, H. Production of intergeneric somatic hybrids between round kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) and 'Morita navel' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.23, p. 39-45, 2004.

TERSI, F.E.A.; RIGOLIN, A.T. Impacto da CVC no custo de produção citrícola. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n.1, p. 123-129, 2000.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.M. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 2000. 89p.

TOMAZ, M.L.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; DEMÉTRIO, C.G.B.; JANSAKUL, N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Somatic embryogenesis in *Citrus spp.*, carbohydrate stimulation and histodifferentiation. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, London, v.37, p.446-452, 2001.

TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminele' lemon and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.115, n.6, p.1043-1046, 1990.

VARDI, A.; BREIMAN, A.; GALUN, E. Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplasts fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.75, p.51-58, 1987.

VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n.3, p.36-40, 1997.

VILORIA, Z.; GROSSER, J.W. Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.130, n.3, p.392-402, 2005.

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.

WUTSCHER, H.K. **Citrus rootstocks**. Lake Alfred: University of Florida, 1991. 15p.

XU, X.; LIU, J.; DENG, X.X. FCM, SSR and CAPS analysis of intergeneric somatic hybrid plants between Changshou kumquat and Dancy tangerine. **Botanical Bulletin of Academy Sinica**, Taipei, v.46, p.93-98, 2005

XU, X.; LIU, J.; DENG, X.X. Production and characterization of intergeneric diploid cybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*). **Euphytica**, Wagenigen, v.136, p.115-123, 2004.

YAMAMOTO, M.; KOBAYASHI, S. A cybrid plant produced by eletrofusion between *Citrus unshiu* (Satsuma mandarin) and *C. sinensis* (sweet orange). **Plant Tissue Culture Letters**, v.12, p.131-137, 1995.

ZANG, J.E.; GUO, W.W.; DENG, X.X. Relationship between ploidy variation of citrus calli and competence for somatic embryogenesis. **Acta genetica Sinica**, Pequim, v.33, n.7, p. 647-654, 2006.

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](#)