

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

**Isolamento, cultura de protoplastos e regeneração de plantas de  
laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

**Lívia Mendes de Castro**

Dissertação apresentada para obtenção do título  
de Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Lívia Mendes de Castro  
Engenheira Agrônoma

**Isolamento, cultura de protoplastos e regeneração de plantas de  
laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

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

Dissertação apresentada para obtenção do título  
de Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Fitotecnia

Piracicaba  
2009

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

Castro, Livia Mendes de

Isolamento, cultura de protoplastos e regeneração de plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) / Livia Mendes de Castro. - - Piracicaba, 2009.  
87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.  
Bibliografia.

1. Cultura de tecidos vegetais 2. Embriogênese somática 3. Laranja 4. Protoplastos  
Título

CDD 634.31  
C355i

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

Aos meus queridos pais Maria Cristina e Nelson,  
por todo o apoio e compreensão,  
e aos meus avós Martha e Wilson (*in memorian*),  
Dalvina (*in memorian*) e Cícero (*in memorian*).

## **OFEREÇO**

Ao meu namorado Patrick, por todo o carinho  
e incentivo; às minhas irmãs Letícia e Luiza  
pelo companheirismo.

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus queridos pais pelo apoio, força e compreensão. Às minhas irmãs pelo companheirismo.

Ao meu namorado Patrick Marques Dourado pelo carinho e incentivo.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, pelo crédito, pela oportunidade concedida para a realização do estágio de prática profissionalizante e do mestrado e pelos ensinamentos.

À professora Dr<sup>a</sup> Beatriz Januzzi Mendes pela colaboração e sugestões.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Paulo Hercilio Viegas Rodrigues pelas idéias, apoio e amizade.

Aos professores da dos Programas de Pós-Graduação da ESALQ pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) pelo apoio financeiro a este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas: Liliane, Leonardo, Lísia, Rafaella, Marina, Flávia, Felipe, Pâmela, Meire, Fabiana pelo apoio, momentos de descontração e um ótimo convívio, e em especial à Luzia, pela sinceridade, amizade, palavras de conforto e auxílio nas horas difíceis.

Aos colegas que já passaram pelo Laboratório, Suane, Rosely, Gustavo, Amâncio, Waner Júnior e Jannayna pela convivência.

Ao colega Maurel, que foi de grande ajuda na estatística do trabalho.

À colega Carolina Façanha Wendel pela convivência, companheirismo e apoio apesar das diferenças durante minha estadia em Piracicaba.

Aos colegas durante todos esses anos pelos momentos de descontração e diversão: Taísa, Tiago Carletti, Bruno, César, Miguel, Murilo, Petra, e em especial à querida amiga Ju (Juliana Galvão), um exemplo de força, coragem e auto-estima.

À bibliotecária Sílvia Maria Zinsly pelo auxílio na revisão da dissertação.

E a todos, que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Citrus</i> e da citricultura brasileira.....	21
2.2 Genética, melhoramento e biotecnologia .....	23
2.3 Protoplastos.....	26
2.4 Embriogênese Somática .....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Local.....	47
3.2 Material Vegetal .....	47
3.3 Eficiência de isolamento de protoplastos em função de diferentes soluções enzimáticas .....	47
3.4 Densidades de plaqueamento no cultivo de protoplastos.....	50
3.5 Embriogênese somática .....	50
3.6 Análises estatísticas.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Avaliação da eficiência de isolamento de protoplastos em função de diferentes soluções enzimáticas.....	53
4.2 Avaliação das densidades de plaqueamento no cultivo de protoplastos.....	56
4.3 Avaliação da embriogênese somática em função de seis fontes de carboidratos e cinco diferentes concentrações.....	62
5 CONCLUSÕES.....	71
6 REFERÊNCIAS .....	73



## RESUMO

**Isolamento, cultura de protoplastos e regeneração de plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

A regeneração de plantas, por organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro* é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento. Realizaram-se estudos com cinco cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), 'Pêra', 'Natal', 'Lima Verde', 'Hamlin' e 'Westin'. Este trabalho objetivou a avaliação da eficiência de isolamento de protoplastos das cultivares de laranja doce; o estudo da eficiência de plaqueamento em função de cinco densidades de protoplastos e diferentes meios de cultura e avaliação da embriogênese somática em função da composição dos meios de cultura e concentração da fonte de carboidrato. As soluções enzimáticas testadas para o isolamento de protoplastos foram: 1. Grosser e Chandler (1987), composta de 1% de celulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha) e 0,2% de pectoliase Y-23 (Seishin); 2. Grosser e Chandler (1987) modificado, composta de 1% de celulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha); 3. Solução enzimática composta de 4% de celulase Onozuka R-10 (Yakult), 1% macerase R-10. O plaqueamento dos protoplastos foi realizado em cinco densidades,  $2 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  protoplastos . mL<sup>-1</sup>, nos meios de cultura EME 0,7M, BH<sub>3</sub> 0,7M e BH<sub>3</sub> + EME 0,7M em ausência de luz, a  $25 \pm 1$  °C. A solução enzimática 2 proporcionou um maior rendimento no isolamento de protoplastos das cultivares 'Hamlin', 'Natal' e 'Pera' e solução enzimática 1 foi melhor para a cultivar 'Westin'. A eficiência final de plaqueamento avaliada aos 90 dias foi superior nas densidades de  $3 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  protoplastos. mL<sup>-1</sup> para as cultivares 'Hamlin', 'Natal' e 'Lima Verde', e na densidade de  $2 \times 10^5$  e  $10^5$  protoplastos. mL<sup>-1</sup> para a cultivar 'Westin'. A indução da embriogênese somática ocorreu em meio de cultura MT modificado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, acrescido de sacarose, galactose, glicose, sorbitol, lactose e maltose, nas concentrações de 18, 37, 75, 110 e 150 mM à temperatura de 27 °C. A formação de embriões somáticos variou com o genótipo, sendo a cultivar 'Lima Verde' e 'Westin' apresentaram menor número de embriões somáticos. As melhores fontes de carboidratos foram a maltose, seguida pela lactose nas concentrações de 37 e 75 mM para a cultivar 'Pêra', 37 mM para a cultivar 'Natal' e 37, 75 e 110 mM para a cultivar 'Hamlin'.

Palavras – chaves: *Citrus sinensis*; Cultura de tecidos vegetais; Protoplastos; embriogênese somática



## ABSTRACT

**Isolation, protoplast culture and regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

Plant regeneration, by organogenesis or somatic embryogenesis from cell cultures and *in vitro* plant tissue culture is the basis for the use of biotechnology in plant breeding. Studies were conducted with five cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), 'Pêra', 'Natal', 'Lima Verde', 'Hamlin' and 'Westin'. This work aimed to evaluate the isolation efficiency of protoplasts, to evaluate plating efficiency of protoplasts based on five densities of cells and different culture media and to evaluate somatic embryogenesis based on culture medium composition and concentration. The enzymatic solutions tested were: 1. Grosser and Chandler (1987): 1% de cellulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha) and 0,2% de pectoliase Y-23 (Seishin); 2. Grosser and Chandler (1987) modified: 1% de cellulase Onozuka RS (Yakult) and 1% macerase R-10 (Yakult Honsha); 3. Enzimatic solution containing 4% cellulase Onozuka R-10 (Yakult) and 1% macerase R-10. Protoplasts were cultured at densities of  $2 \times 10^4$ ;  $5 \times 10^4$ ;  $10^5$ ;  $2 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  protoplasts.mL<sup>-1</sup> in EME 0,7M, BH<sub>3</sub> 0,7M and BH<sub>3</sub> + EME 0,7M, in the dark, at  $25 \pm 1$  °C. The enzymatic solution 2 provided higher yield for the cultivars 'Hamlin', 'Natal' and 'Pêra', and enzymatic solution 1 resulted in better protoplast isolation for cultivar 'Westin'. Final plating efficiency, evaluated 90 days after culture, was higher at the densities of  $3 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  protoplasts.mL<sup>-1</sup> for 'Hamlin', 'Natal' and 'Lima Verde', and at the density of  $2 \times 10^5$  e  $10^5$  protoplasts.mL<sup>-1</sup> for 'Westin'. Somatic embryogenesis stimulation occurred in cultured medium MT (MURASHIGE AND TUCKER, 1969) modified with 500 mg. L<sup>-1</sup> of malt extract, supplemented with sucrose, galactose, glucose, maltose, lactose and sorbitol at concentrations of 18, 37, 75, 110 and 150 mM, at  $27 \pm 1$  °C. Somatic embryos produced varied with the genotype, the smaller number of somatic embryos was observed in cultivars 'Lima Verde' and 'Westin'. The best source of carbohydrate were maltose, followed by lactose at concentrations of 37 and 75 mM for cultivar 'Pêra', 37 mM for cultivar 'Natal', and 37, 75 and 110 mM for cultivar 'Hamlin'.

Key words: *Citrus sinensis*; Plant tissue culture, Protoplast; Somatic embryogenesis



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Isolamento de protoplastos de laranja doce ( <i>Citrus sinensis</i> ).....	49
Figura 2	Eficiência de isolamento de protoplastos de laranja doce ( <i>Citrus sinensis</i> ).....	54
Figura 3	Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta do número de microcalos formados de laranja ‘Hamlin’ às densidades e meio de cultura no plaqueamento.....	60
Figura 4	Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta do número de microcalos formados de laranja ‘Natal’ às densidades e meio de cultura no plaqueamento.....	61
Figura 5	Embriões somáticos de laranja ‘Hamlin’ obtidos em meio de cultura suplementados com diferentes fontes de carboidratos.....	64
Figura 6	Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta embriogênica de laranja ‘Hamlin’ aos carboidratos lactose e maltose.	69
Figura 7	Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta embriogênica de laranja ‘Pêra’ aos carboidratos lactose e maltose.	70





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Desenvolvimento de protoplastos de laranja doce ( <i>Citrus sinensis</i> ) em função da densidade de plaqueamento (protoplastos.mL <sup>-1</sup> ) e da composição do meio de cultura.....	58
Tabela 2	Embriogênese somática em cinco cultivares de laranja doce ( <i>Citrus sinensis</i> ) em função de diferentes fontes e concentrações de carboidratos.....	65



## 1 INTRODUÇÃO

Em um período de 10 anos analisados, de 1993/95 a 2003/2005, a receita mundial com exportações de frutas cresceu 62%. Esse aumento se deve também à abertura de novos mercados consumidores, maior rapidez nos meios de distribuição, permitindo a entrega de um produto de qualidade e sem danos, e preços cada vez mais atrativos e acessíveis (VITTI, 2007).

O Brasil está inserido dentro deste contexto, cuja participação no mercado externo tem aumentado consideravelmente, resultado da combinação entre avanços tecnológicos do setor produtivo e novos mercados consumidores. Mesmo com a crise financeira que afetou a economia norte-americana e europeia, e as incertezas que tal crise poderia trazer para o setor, o Brasil manteve em 2008 uma rentabilidade positiva. As exportações de frutas em 2008 mantiveram-se entre US\$ 650 a US\$ 700 milhões de dólares, representando um crescimento por volta de 5% em relação ao montante de 2007, porém inferior ao avanço observado em 2007, que foi de 35% frente a 2006 (BOTEON, 2008).

As frutas cítricas estão entre as principais categorias responsáveis pelo crescimento da fruticultura nacional. A citricultura constitui importante segmento na estrutura sócio-econômica do Brasil, podendo ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agroindustriais do país. A importância brasileira como produtor de citros está embasada principalmente na laranja. O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo e o maior produtor e exportador mundial de suco concentrado de laranja (FAO, 2009; IBGE, 2009). O cultivo de frutas cítricas é feito em todas as regiões do país, com destaque para os estados de São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais (IBGE, 2009). A citricultura brasileira, sobretudo a paulista, é expressiva por apresentar alguns pontos fortes como um custo de produção competitivo e um parque industrial desenvolvido e atuante.

Apesar da alta posição da citricultura brasileira em relação à produção, e do constante incremento da área cultivada de citros no Brasil, a cultura ainda apresenta baixa produtividade quando comparada com outros países produtores (MACHADO et al., 2005). A produtividade dessa cultura tem sido afetada por problemas fitossanitários

e a ausência de um maior número de variedades de copa e porta-enxerto com características hortícolas desejáveis incluindo resistência a doenças. A obtenção de variedades melhoradas quanto à tolerância a problemas fitossanitários auxiliaria no desenvolvimento da citricultura. Dentre os vários fatores que afetam a produtividade, aqueles relacionados a doenças como o cancro cítrico, gomose de *Phytophthora*, clorose variegada dos citros (CVC) e tristeza (CTV) são os mais relevantes. Outros problemas que afetam o rendimento de pomares não somente no Brasil, mas também em vários outros países, incluem o declínio e fatores abióticos, como estresse por deficiência hídrica (COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003). Mais recentemente, outra doença se tornou uma grande ameaça aos pomares paulistas o huanglongbing (HLB), também conhecida por *greening*, cujo agente causal é a bactéria *Candidatus Liberibacter spp.* que se desenvolve no floema, obstruindo-o e impedindo a distribuição da seiva. Em São Paulo, foram constatadas duas formas da bactéria, a *Candidatus Liberibacter asiaticus* e a *Candidatus Liberibacter americanus* (FUNDECITRUS, 2009).

Muitas pesquisas de melhoramento genético das variedades têm sido desenvolvidas e a maioria delas busca novas fontes de resistência e tolerância a pragas e doenças. No entanto, existem dificuldades para os programas de melhoramento tradicional para obtenção destas variedades devido a aspectos da biologia reprodutiva do gênero *Citrus*, tais como, o longo período de juvenilidade, a presença de embriões nucleares (poliembrião), incompatibilidade, esterilidade sexual, e alta heterozigose (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; OLIVARES-FUSTER et al., 2005).

A necessidade de ampliação da base genética atual dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente, impõe a necessidade de desenvolver programas de melhoramento, e a biotecnologia pode contribuir no ganho ou melhoria de características desejáveis (MACHADO et al. 2005). O melhoramento clássico recebeu como ferramentas auxiliares diversas técnicas baseadas no cultivo de tecidos vegetais *in vitro* e biologia molecular.

Os instrumentos da biologia celular e molecular de plantas têm permitido a manipulação da célula vegetal, controlando a sua morfogênese e desenvolvimento *in vitro*, regenerando plantas com diferentes características, incluindo aquelas para as

quais foram transferidos genes específicos, as plantas transgênicas (CROCOMO, 2003).

Dentre as ferramentas biotecnológicas, destacam-se a hibridação somática via fusão de protoplastos, transformação genética, cultura de tecidos e a biologia molecular (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). A regeneração de plantas, por organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro*, é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento (GMITTER JUNIOR et al., 1992).

As pesquisas sobre protoplastos abriram amplas possibilidades para o melhoramento genético das espécies cítricas (CRISTOFANI, 1991; MOURÃO FILHO et al., 1996). Protoplastos são células desprovidas de parede celular. A ausência de parede faz dos protoplastos um sistema útil para diversos estudos. Os protoplastos vêm sendo utilizados no melhoramento de espécies de interesse agrônômico para obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos e de mutantes ou variantes somaclonais (CARNEIRO et al., 1998).

Os tecidos vegetais cultivados *in vitro* possuem capacidade para formar gemas, raízes ou embriões somáticos. Essa habilidade de regeneração das células e tecidos vegetais é chamada de totipotência, ou seja, as células são autônomas e têm capacidade de regenerar plantas quando submetidas a tratamentos adequados, o que é fundamental para manipulação genética e programas de melhoramento.

Um processo que constitui um exemplo da totipotencialidade das células vegetais é a embriogênese somática. A embriogênese somática consiste na regeneração de plantas no cultivo *in vitro*, na qual células somáticas ou haplóides desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem que haja fusão de gametas.

Dessa maneira, este trabalho apresenta os seguintes objetivos: 1) Avaliar a eficiência de isolamento de protoplastos de diferentes cultivares de laranja doce; 2) Estudar a eficiência de plaqueamento em função de diferentes concentrações de protoplastos e diferentes meios de cultura; e 3) Avaliar a embriogênese somática em função da composição dos meios de cultura e concentrações das fontes de carboidratos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais do gênero *Citrus* e da citricultura brasileira

As espécies cítricas pertencem à família Rutaceae; subfamília Aurantioideae; tribo Citreae; com 28 gêneros, incluindo o gênero *Citrus* e seus gêneros relacionados, como *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* e *Clymenia*; e subtribo Citrinae (NICOLOSI, 2007).

Tal subtribo apresenta 13 gêneros e 65 espécies, com as principais espécies de interesse comercial, como as do gênero *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*. A classificação das espécies quanto ao gênero *Citrus* é motivo de divergências entre os estudiosos do assunto, porém, o sistema de classificação mais utilizado foi proposto por Swingle (1943), que reconhece 16 espécies, dentre as quais estão as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex. Tan., *C. tangerina* hort. ex. Tan ) e limões (*C. limon* L. Burm, f.) (SWINGLE; REECE, 1967). As espécies desse gênero possuem um conjunto básico cromossômico  $x = 9$ , sendo que a condição mais freqüente do gênero é a diploidia ( $2n = 2x = 18$ ), embora haja relatos que existam alguns indivíduos triploides e tetraploides (ARAÚJO; ROQUE, 2005).

Diferentes hipóteses têm sido formuladas sobre a origem histórica e geográfica dos citros. Porém, parece que todas as espécies pertencentes ao gênero *Citrus* e demais gêneros relacionados originaram-se nas regiões tropicais e subtropicais do sudeste da Ásia – noroeste da Índia, sudeste da China, península Indochinesa – e arquipélago Malaio, e assim, distribuíram-se por outros continentes (WEBBER, 1967; CHAPOT, 1975; NICOLOSI, 2007).

As plantas cítricas são cultivadas em diferentes regiões do mundo, sendo que a exploração comercial concentra-se, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes de  $20^{\circ}$  e  $40^{\circ}$  dos hemisférios norte e sul, onde os regimes térmicos e hídricos são mais satisfatórios (SENTELHAS, 2005).

As plantas cítricas chegaram ao Brasil durante a primeira metade do século XVI, trazidas pelos portugueses nas expedições colonizadoras, e se espalharam por todo o

país devido às boas condições de cultivo (SWINGLE; REECE, 1967; SOOST; CAMERON, 1975; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

Dentre os produtos da fruticultura brasileira, as frutas cítricas ocupam o primeiro lugar. A citricultura constitui importante segmento na estrutura sócio-econômica do Brasil, podendo ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agroindustriais do país. A importância do Brasil como produtor de citros está embasada principalmente na laranja. O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo e o maior produtor e exportador mundial de suco concentrado de laranja (FAO, 2009; IBGE, 2009).

A produção brasileira na safra de 2008 foi de 18.394.719 toneladas, enquanto que na safra de 2009 é esperada uma produção de 18.544.357 toneladas, havendo uma variação positiva de 0,8 %. A área colhida de laranja no Brasil na safra de 2008 foi de 833.409 ha, e na safra de 2009 estima-se ser colhida uma área de 841.878 ha, com variação positiva de 1,0 % (IBGE, 2009). De acordo com o Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia - IBGE (2008), após um levantamento sistemático da produção agrícola em setembro de 2009, o rendimento médio da produção de laranja na safra de 2008 foi de 22.072 Kg/ha, e na safra de 2009 foi de 22.022 Kg/ha.

O cultivo de frutas cítricas é feito em todas as regiões do país, no entanto o estado de São Paulo é responsável por cerca de 81% da produção nacional de citros, dominando a produção de laranjas, lima ácida 'Tahiti' e tangerinas. Os demais estados produtores que se destacam são Bahia, Sergipe, Minas Gerais e Paraná (BOTEON, NEVES; 2005). A citricultura brasileira, sobretudo a paulista, se destaca por apresentar alguns pontos fortes como um custo de produção competitivo e um parque industrial desenvolvido e atuante.

A cadeia citrícola brasileira, principalmente a paulista, tem como foco principal a produção e comercialização industrial da laranja, voltada principalmente para a exportação de suco concentrado e congelado (FCOJ – *Frozen Concentrated Orange Juice*), como é conhecido no mercado internacional. Na produção de suco, 98% do volume são vendidos ao mercado internacional, com a maior parte sendo engarrafada pelas empresas européias e norte-americanas (BOTEON; NEVES, 2005). O suco de laranja é exportado principalmente para os Estados Unidos e países da União Européia, além do Japão e outros 45 países (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).



Deste modo, apesar da cadeia produtiva da citricultura em todo o mundo ser uma das mais dinâmicas e rentáveis atividades, fica claro que é uma das cadeias produtivas que têm mais enfrentado problemas para garantir uma boa produtividade e preços satisfatórios. A produtividade dessa cultura tem sido afetada por problemas fitossanitários e pela ausência de maior número de variedades de copa e porta-enxerto com características hortícolas desejáveis incluindo resistência a doenças. A obtenção de variedades melhoradas quanto à tolerância a problemas fitossanitários auxiliaria no desenvolvimento da citricultura. Dentre os vários fatores que afetam a produtividade, aqueles relacionados a doenças como o cancro cítrico, gomose de *Phytophthora*, clorose variegada dos citros (CVC) e tristeza (CTV) são os mais relevantes. Outros problemas que afetam o rendimento de pomares não somente no Brasil, mas também em vários outros países, incluem o declínio e fatores abióticos, como estresse ocasionado por deficiência hídrica (COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003). Mais recentemente, outra doença que se tornou uma grande ameaça aos pomares paulistas é o HLB ou *greening*, cujo agente causal é a bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, que se desenvolve no floema, obstruindo-o e impedindo a distribuição da seiva (FUNDECITRUS, 2009).

## **2.2 Genética, melhoramento e biotecnologia**

O Brasil possui posição destacada nas pesquisas com citros, e têm contribuído de forma significativa nos estudos de algumas doenças como a tristeza dos citros, cancro cítrico, leprose, declínio, gomose e clorose variegada dos citros (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Mais recentemente, os esforços nas pesquisas e estudo estão voltados para o huanglongbing ou *greening*.

O melhoramento genético em citros é dividido em duas categorias: o melhoramento para variedades copa e o melhoramento para variedades de porta-enxerto, cada uma com objetivos específicos (POMPEU JUNIOR, 1991).

No melhoramento para variedades copa, o destaque deve ser dado para características como produtividade, adaptações a condições climáticas adversas e condições de solo, características dos frutos (aparência externa, tamanho e forma,

qualidade e quantidade do suco, como sabor, cor, relação entre sólidos solúveis e acidez desejável), qualidade pós-colheita, resistências a pragas e doenças, e produção de frutos sem sementes ou com baixo número de sementes (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1978, KHAN E KENDER, 2007).

Para o melhoramento de variedades porta-enxerto enfoca-se além da resistência a pragas e doenças, a tolerância a adversidades climáticas e edáficas (GROSSER et al., 1998). Além dessas características, é objetivo também do melhoramento de porta-enxerto a apomixia, aumento na produtividade, redução do tamanho das árvores, resolução de problemas entre união de copa/porta-enxerto, melhoramento na qualidade de frutos e grande produção de sementes (KHAN E KENDER, 2007).

Muitas pesquisas de melhoramento genético de variedades têm sido desenvolvidas, buscando a maioria delas certa tolerância a pragas e doenças (TOZATTI, 2006). Entretanto, existem dificuldades para os programas de melhoramento tradicional para obtenção destas variedades devido a aspectos da biologia reprodutiva do gênero *Citrus*, tais como, o longo período de juvenilidade, a presença de embriões nucelares (poliembrionia), incompatibilidade, esterilidade sexual, e alta heterozigiosidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; OLIVARES-FURTER et al., 2005).

A embrionia nucelar ou apomixia, processo em que os embriões são originados a partir de células do tecido do óvulo, sem que haja fusão de gametas, é vista como um dos maiores problemas no melhoramento genético via hibridação sexual em citros, já que os embriões nucelares competem com os embriões zigóticos por espaço e nutrientes nas sementes. A consequência direta da apomixia é a poliembrionia, que consiste na presença de mais de um embrião nas sementes. O efeito mais marcante da poliembrionia está na ausência ou na produção de poucas plantas híbridas em cruzamentos controlados (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

A alta heterozigiosidade presente na maioria das formas de citros é devido aos seguintes fatores: mutação gênica freqüente, polinização cruzada e embrionia nucelar (MACHADO et al., 2005). A embrionia nucelar preserva a heterozigose, originada por hibridação e mutação, favorecendo o acúmulo de genes mutantes recessivos e

deletérios, diminuindo assim, o sucesso da reprodução por hibridação sexual (MACHADO et al., 2005).

A partenocarpia, desenvolvimento de frutos sem que haja a fertilização levando a formação de frutos sem sementes, ocorre em citros devido à esterilidade gamética ou auto-incompatibilidade que têm sido, juntamente com a triploidia, as principais causas do aparecimento de frutos sem sementes (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

O longo período juvenil na maioria das espécies de citros leva de 5 ou mais anos para a primeira floração e de 10 a 15 anos para avaliação das características de produção e qualidade dos frutos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Isso torna o melhoramento de citros atividade de longo prazo e caro, além de exigir grandes extensões de terra (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Para que o país se mantenha numa posição de destaque, torna-se necessária a obtenção de plantas com elevado potencial genético e livre de patógenos, possibilitando o aumento da produtividade. A necessidade de ampliação da base genética atual dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente, impõe a necessidade de desenvolver programas de melhoramento, e a biotecnologia pode contribuir no ganho ou melhoria de características desejáveis (MACHADO et al. 2005). O melhoramento clássico recebeu como ferramentas auxiliares diversas técnicas baseadas no cultivo de tecidos vegetais e biologia molecular.

A cultura de tecidos e células surgiu como uma técnica auxiliar no processo de melhoramento genético das espécies cítricas. A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia em meio de cultura, sendo o princípio básico a totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (PASQUAL, 2001).

Os primeiros trabalhos de cultura de tecidos em citros iniciaram-se na década de 50. O enfoque era principalmente na produção de embriões nucelares *in vitro* a partir de espécies monoembriônicas com o objetivo de produzir plantas isentas de viroses. Em seguida, a obtenção de calos nucelares foi intensificada com a finalidade de conseguir embriões somáticos em grandes quantidades a partir desses calos (CRITOFANI, 1991).

Os instrumentos da biologia celular e molecular de plantas têm permitido a manipulação da célula vegetal, controlando a sua morfogênese e desenvolvimento *in vitro*, regenerando plantas com diferentes características, incluindo aquelas para as quais foram transferidos genes específicos, as plantas transgênicas (CROCOMO, 2003). Surge então o conceito de Biotecnologia Vegetal, que se refere 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 ou 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 várias áreas do conhecimento, como a biologia molecular, genética, fisiologia, microbiologia, química, dentre outras (CTNBio, 2002).

Dentre as ferramentas biotecnológicas destacam-se a hibridação somática via fusão de protoplastos, transformação genética, cultura de tecidos e a biologia molecular (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). A regeneração de plantas, por organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro*, é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento de espécies cítricas (GMITTER JUNIOR et al., 1992).

As pesquisas sobre protoplastos abriram amplas possibilidades para o melhoramento genético das espécies cítricas (CRISTOFANI, 1991; MOURÃO FILHO et al., 1996).

### **2.3 Protoplastos**

Protoplastos são células vegetais desprovidas de parede celular. As células vegetais nessa condição podem ser manipuladas à semelhança de células animais e microorganismos. É um estado transitório da célula obtido em laboratório, conservando-se ainda as potencialidades de células vegetais completas (CARNEIRO et al., 1998).

A ausência de parede faz dos protoplastos um sistema útil para diversos estudos, tais como, extração de organelas celulares, transferência gênica por transformação genética e produção de novos genótipos por hibridação somática (FUNGARO E VIEIRA, 1989). Os protoplastos vêm sendo utilizados no melhoramento

de espécies de interesse agrônômico para obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos e de mutantes ou variantes somaclonais (CARNEIRO et al., 1998).

Protoplastos de plantas são obtidos tanto de tecidos intactos (ponta de raiz, epiderme, coleótilo, e mesófilo foliar) quanto de culturas de calos e suspensões celulares, e são isolados tanto por meios mecânicos, através de corte fino de tecidos plasmolisados; quanto por meios químicos (VASIL, 1979). Os tecidos do mesófilo foliar serviram como fonte de células para o primeiro “sistema de protoplastos” no qual culturas *in vitro* de protoplastos resultaram em plantas funcionais (TAKEBE et al., 1971). A maioria dos “sistemas de protoplastos” reportados subseqüentemente foi derivada do mesófilo foliar ou de outros tecidos totalmente diferenciados (VASIL, 1979).

Normalmente, um contato íntimo é mantido entre a membrana plasmática e a parede celular, desde que essa membrana esteja envolvida na síntese da parede celular vegetal. Entretanto, em soluções hipertônicas, a membrana das células se contrai, separando-se de suas paredes celulares. Subseqüentemente, há a remoção dessas estruturas, liberando grandes populações de protoplastos esféricos e frágeis osmoticamente (células “nuas”), em que a membrana plasmática é a única barreira entre o citoplasma e o ambiente externo (DAVEY et al., 2005). Quando fornece um estímulo físico e químico ao protoplasto, teoricamente são capazes de regenerar uma nova parede celular e ocorrer sucessivas divisões mitóticas para produzir células filhas através das quais plantas serão regeneradas (DAVEY et al., 2005).

As primeiras pesquisas envolvendo o estudo da regeneração de plantas cítricas a partir de protoplastos foram realizadas no início da década de 70, quando Kochba et al. (1972) relataram a produção de calos embriogênicos de laranja a partir da cultura de óvulos. O primeiro isolamento de protoplastos de citros foi relatado por Vardi et al. (1975) com a utilização de laranja ‘Shamouti’ (*Citrus sinensis*). Os autores isolaram protoplastos totipotentes, os quais, cultivados em meios de cultura apropriados, permitiram a obtenção de calos e a recuperação de embriões. A partir disso, foram vários os protocolos propostos para isolamento de protoplastos de citros. Embora algumas generalizações para obtenção de protoplastos possam ser feitas, as condições necessárias para isolamento podem variar de espécie para espécie e até mesmo de variedade para variedade (COSTA, 2002). Os principais fatores que determinam a

eficiência de isolamento de protoplastos estão relacionados ao genótipo, estado fisiológico das células, tipo e concentração de enzimas e estabilizadores osmóticos, tempo de incubação na solução enzimática, agitação, luminosidade e temperatura (CARNEIRO et al., 1998). Vários parâmetros, particularmente a fonte de tecidos, meio de cultura, e fatores ambientais, influenciam a viabilidade dos protoplastos e células derivadas de protoplastos expressarem sua totipotência e se desenvolverem em plantas férteis (DAVEY et al., 2005).

O estado fisiológico da fonte de tecidos influencia a liberação de protoplastos viáveis. Ademais, variações sazonais, as quais afetam a reprodutibilidade do isolamento de protoplastos de plantas cultivadas em estufas ou casas de vegetação, podem ser efetivamente eliminadas usando brotações crescidas *in vitro*, plântulas e suspensões celulares embriogênicas (DAVEY et al., 2005).

Procedimentos mecânicos de isolamento de protoplastos que envolvem o fino corte de tecidos plasmolisados são raramente empregados atualmente para o isolamento de protoplastos, mas são úteis com células grandes e quando requer um número limitado de protoplastos (DAVEY et al., 2005). Porém, o que é mais usual é a digestão enzimática da parede celular, principalmente, quando são requeridas grandes populações de protoplastos.

A parede celular de vegetais é constituída basicamente de celulose, unidas em microfibrilas. Essa organização de moléculas de celulose é preenchida por uma matriz de moléculas não celulósicas, que são a hemicelulose e a pectina (RAVEN et al., 2001). Enquanto as fibras de celulose e hemicelulose dão rigidez à parede celular, limitando sua extensibilidade, as fibras de pectina mantêm juntas as células adjacentes, além de conferir propriedades plásticas ou de flexibilidade à parede celular, condição necessária à sua expansão (RAVEN et al., 2001).

Embora os constituintes básicos sejam os mesmos, a composição da parede celular vegetal varia muito entre as espécies vegetais, e até mesmo entre os tecidos da mesma planta, o que requer a definição de um sistema específico para a digestão da parede (CARNEIRO et al., 1998). No processo de obtenção de protoplastos, a seleção das enzimas que serão usadas para a digestão da parede celular e a adequação de

suas concentrações são muito importantes para se obter uma quantidade elevada de protoplastos viáveis.

Foi com a liberação de protoplastos a partir da degradação enzimática natural da parede celular durante o amadurecimento de frutos, que estimularam investigações, há mais de quatro décadas (COCKING, 1960).

Com o aperfeiçoamento da técnica de digestão enzimática da parede celular, tornou-se possível o isolamento de protoplastos viáveis, virtualmente de qualquer tecido vegetal (COCKING, 1960). Soluções enzimáticas constituídas de celulases e pectoliasas é o método mais usado para degradação da parede celular (CARNEIRO et al., 1998).

As enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectocelulolíticas são isoladas de microorganismos simbióticos, parasitas ou saprofiticos que degradam naturalmente a parede celular vegetal. As preparações comerciais das enzimas constituem-se de frações parcialmente purificadas de extratos destes microrganismos.

As enzimas mais usadas nos protocolos de isolamento de protoplastos, principalmente de *Citrus*, são as seguintes: celulase Onozuka R10 ou RS, extraída de *Trichoderma viridae*, que possui duas importantes atividades celulolíticas, descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; a pectinase Macerozyme R10, isolada de *Rhizopus sp.*, que tem uma atividade endo-poligalacturonase, desdobrando assim a pectina; a celulase driselase, do fungo *Irpex lacteus*, que possui atividade pectinolítica e celulolítica e a pectinase Pectolyase Y-23 (CARNEIRO et al., 1998).

Takebe et al. (1968) isolaram protoplastos a partir de folhas de tabaco em duas etapas de digestão. Primeiramente, as células foram submetidas à digestão com Macerozyme R-10, que separa as células, seguido de celulase para remover suas paredes. Tal procedimento foi simplificado posteriormente por Power e Cocking (1970), que reduziram o tempo de digestão utilizando uma combinação de celulase e pectinase em uma única etapa.

Benedito et al. (2000), estudando a calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce, afirmaram que calos de citros são muitas vezes recalcitrantes à digestão da parede celular o que dificulta o

isolamento de protoplastos. Dessa maneira, diversos fatores estão envolvidos neste processo, como tipo e concentração das enzimas digestivas utilizadas, o potencial osmótico da solução de isolamento e a estrutura física da parede das células dos calos em estudo. A maximização do isolamento é uma etapa fundamental na adequação das técnicas que utilizam os protoplastos como a hibridação somática.

Uchimiya e Murashige (1974) verificaram que 0,2% (p/v) de Macerozyme é a concentração ótima, em combinação com 1% (p/v) de Celulase Onozuka R-10, para obtenção de protoplastos de cultura de células de fumo. Em feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram obtidos protoplastos de mesófilo foliar utilizando-se as enzimas: celulase 0,2%, driselase 0,05% e macerozyme 0,02% (CREPY et al. 1986).

Vasil et al. (1983) isolaram protoplastos de suspensão celular originadas a partir de calos embriogênicos de inflorescências de capim elefante, sendo o tratamento 2,5% de celulase R-10 o mais eficiente. Timbó (2007) submeteu três tipos de fontes de material vegetativo de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) a oito tratamentos com soluções enzimáticas diferentes para obtenção de protoplastos, e demonstrou que as soluções enzimáticas compostas de 1% celulase R-10, 0,2% Macerozyme e 0,1% Driselase e 2% Celulase R-10, 2% Macerozyme e 0,1% Driselase foram as que isolaram maiores números de protoplastos viáveis.

Para citros, Costa et al. (2002) avaliaram o efeito de três soluções enzimáticas no isolamento de protoplastos para diversas espécies e cultivares cítricas, verificando a influência das espécies e cultivares e da solução enzimática no isolamento de protoplastos. Os resultados demonstraram que a solução enzimática composta de 1% de celulase Onozuka RS, 1% de macerose R-10, e 0,2% de pectoliase Y-23 possibilitou maior rendimento no isolamento de protoplastos da maioria das variedades testadas, exceto para o limão 'Cravo' em que o melhor rendimento foi obtido na solução enzimática composta de 1% de celulase Onozuka R-10, 0,2% de macerose R-10, e 0,1% de driselase, e para as laranjas 'Valência' e 'Succari', que apresentaram maiores rendimentos na solução enzimática composta de 0,2% de celulase Onozuka R-10, 0,3% de macerose R-10, e 0,1% de driselase.

A mesma conclusão de que as cultivares e a composição da solução enzimática influenciam no rendimento no isolamento de protoplastos foi comprovada por Benedito



et al. (2000) ao testar também três soluções enzimáticas no isolamento de protoplastos a partir de calos embriogênicos de seis cultivares de laranja doce. A solução enzimática composta de celulase 1%, macerase 1% e de pectoliase 0,2%, proposta por Grosser e Gmitter Junior (1990) foi a mais adequada para o isolamento de protoplastos a partir de calos embriogênicos das cultivares de laranja doce estudadas.

Nas soluções enzimáticas também são adicionados estabilizadores osmóticos do meio de cultura e de membranas para manter os protoplastos íntegros e tampões para evitar alterações de pH (COSTA, 2001). Os principais estabilizadores osmóticos utilizados são o manitol, sorbitol, sacarose, glicose, galactose e celobiose (EVANS & BRAVO, 1983; ERICKSON, 1985; COSTA, 2001). O uso de estabilizadores osmóticos metabolicamente ativos como a glicose, sorbitol e sacarose em combinação com estabilizadores inertes, como manitol, são recomendados por promover redução gradual na pressão osmótica do meio de cultura, proporcionando condições favoráveis à formação de colônias de células (ERICKSON, 1985; CARNEIRO et al., 1998; COSTA, 2001). Com relação aos estabilizadores de membrana, a adição de cálcio e fósforo na solução enzimática, confere estabilidade aos protoplastos recém isolados (CARNEIRO et al., 1998).

Yang et al. (2007) estudando a regeneração de plantas via embriogênese somática a partir de protoplastos do algodão selvagem *Gossypium davidsonii*, testaram três métodos para regular o potencial de pressão osmótica. Os resultados demonstraram que 0,5 M de glicose e a combinação entre 0,5 M de manitol + 0,1 M de glicose como fonte de açúcar e estabilizador osmótico não apresentaram diferença significativa na divisão e eficiência de plaqueamento, sendo aceitáveis para a cultura de protoplastos da espécie de algodão selvagem, enquanto que a combinação entre 0,1 M de glicose + 0,45 M de sacarose não mostrou nenhuma eficiência.

A composição da solução enzimática proposta, muitas vezes, pode resultar em suspensão de protoplastos com muitas impurezas e com baixo rendimento. O rompimento da membrana plasmática permite a liberação de compostos fenólicos que promovem a síntese anormal da parede celular, atraso nas divisões e morte das células, prejudicando, portanto, o cultivo de protoplastos íntegros (EVANS E BRAVO, 1983).

Os protoplastos de citros podem ser isolados a partir de calos embriogênicos e de células em suspensão (GROSSER E GMITTER JUNIOR, 1990). No entanto, segundo Carneiro et al. (1998), apesar de ser possível o isolamento de protoplastos de vários tecidos, em geral as suspensões celulares são mais utilizadas pela facilidade de manipulação e alta eficiência no isolamento.

Por muitos anos, suspensões celulares têm sido a fonte preferencial de protoplastos viáveis de cereais, especialmente em arroz (TANG et al., 2000; DAVEY et al., 2005). Da mesma maneira, em centeio, Ma et al. (2003) usaram calos friáveis iniciados a partir de inflorescências para estabelecer suspensões celulares embriogênicas como fonte de protoplastos totipotentes. Similarmente, em outras monocotiledôneas, como banana, suspensões celulares foram, preferencialmente, a fonte de material para isolamento de protoplastos devido a sua totipotencialidade, uma vez que os protoplastos provenientes do mesófilo foliar e de calos embriogênicos são recalcitrantes na cultura (ASSANI et al., 2002).

Protoplastos também têm sido isolados de folhas, que apesar de não serem embriogênicos, são úteis em experimentos de fusão com protoplastos de calos ou células em suspensão, permitindo o monitoramento visual da ocorrência de heterocariontes e a utilização de genótipos dos quais não foi possível a obtenção de calos embriogênicos (GROSSER E CHANDLER, 1987). No caso de capim-elefante, Timbó (2007) submeteu três tipos de fontes de material vegetativo; mesófilo foliar de plântulas *in vivo* e *in vitro* e calos embriogênicos a tratamentos com soluções enzimáticas diferentes, para obtenção de protoplastos. Os resultados demonstraram que as folhas de plântulas cultivadas *in vitro* foram as melhores fontes para obtenção de protoplastos devido as folhas se mostrarem mais tenras, menores e mais finas, o que facilitou a ação das enzimas. No mesmo trabalho, a autora verificou que os calos embriogênicos não se mostraram bom material vegetativo para obtenção de protoplastos de capim-elefante, sugerindo um estudo no qual seja considerado a idade dos calos e as diferentes soluções enzimáticas para viabilizar a obtenção dos protoplastos.

A necessidade de desenvolver um sistema protoplasto-planta para espécies de importância econômica demanda um grande investimento. Tipicamente, protoplastos

isolados reiniciam a formação da parede celular vegetal dentro de um curto período de tempo (muitas vezes minutos), seguida de introdução em meio de cultura. Contudo, requerem proteção osmótica até as formações primárias da parede celular que podem neutralizar a pressão de turgor exercida pelo citoplasma. Em alguns casos, a redução da pressão osmótica através da diluição do meio de cultura com soluções de composições similares é essencial para sustentar a divisão mitótica, levando a formação de células filhas e tecidos (DAVEY et al., 2005).

No que se refere ao cultivo de protoplastos, a densidade de plaqueamento bem como a molaridade do meio de cultivo constituem-se os principais fatores da eficiência final de plaqueamento, definida como a porcentagem de protoplastos que se dividiram e formaram microcalos com 1-2 mm de diâmetro com potencial de regeneração de plantas (OCHATT E POWER, 1992).

A densidade final de protoplastos no meio de cultura (densidade de plaqueamento) é crucial para maximizar a regeneração da parede celular vegetal e concomitantemente a formação de células filhas. Em trabalhos com protoplastos de citros, a eficiência de plaqueamento tem sido de 3,6% a 9,0% (VARDI et al., 1975) e de 0 a 35% (GROSSER E GMITTER JUNIOR, 1990).

Costa et al. (2002) avaliaram o efeito de diferentes densidades de cultivo na eficiência final de plaqueamento para diversas variedades cítricas e verificaram a formação de um maior número de microcolônias nas densidades de  $10^5$  e  $2 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>, e eficiência de plaqueamento muito baixa nas densidades de plaqueamento de  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>. Estas diferenças estão relacionadas com características inerentes à parede celular, que, embora seus constituintes básicos sejam os mesmos, sua composição pode variar muito entre as espécies (CARNEIRO et al., 1998).

Segundo Evans e Bravo (1983), para cada espécie, há uma densidade mínima de plaqueamento na qual não ocorre divisão celular. Em altas densidades, fenômenos de absorção e excreção de protoplastos podem modificar profundamente o meio de cultura (CARNEIRO et al., 1998). Uma excessiva densidade de plaqueamento rapidamente consome nutrientes, e as células derivadas de protoplastos podem falhar quando submetidas à divisão celular. As células estimulam divisão mitótica de células

adjacentes liberando fatores de crescimento, incluindo aminoácidos, no meio ao seu redor. Conseqüentemente, protoplastos falham ao serem submetidos à divisão quando cultivados abaixo da densidade mínima limiar (DAVEY et al., 2005).

Protoplastos de diferentes espécies e provenientes de diferentes tecidos da mesma espécie podem variar no seu requerimento nutricional. Os protoplastos, sendo células isoladas devido à ausência de parede celular, tendem a ser mais eficientes na absorção de nutrientes. A otimização do meio de cultura e a utilização do meio de cultura ideal é um fator primordial para uso da tecnologia. Meios nutritivos contendo macro e microelementos, vitaminas do grupo B, mio-inositol e sacarose servem de referência para o estabelecimento da cultura de protoplastos (CARNEIRO et al., 1998). Muitos meios de cultura para protoplastos são baseados nas formulações dos meios MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) e B5 (GAMBORG et al., 1968). Vardi et al. (1982) recomendam o meio de cultura MT (MURASHIGE E TUCKER, 1969) e Grosser e Gmitter Junior (1990) o meio BH3 para cultivo de protoplastos de citros, o qual ao contrário do meio MT, apresenta uma composição bastante complexa, contendo um grande número de vitaminas e açúcares (COSTA, 2001).

É adicionado aos meios de cultura de protoplastos um osmoregulador, geralmente um açúcar-álcool não metabolizável, como manitol, ou alguns mais solúveis, como sorbitol. A maioria dos reguladores de crescimento, auxinas e citocininas, são normalmente essenciais para sustentar o crescimento de protoplastos, embora existam exceções em que apenas auxina é requerida, como em cenoura e *Arabidopsis thaliana* (DOVZHENKO et al., 2003). Em contraste, auxinas e citocininas são prejudiciais no crescimento de protoplastos de citros (VARDI et al., 1982).

Uma das principais aplicações dos protoplastos é a hibridação somática via fusão de protoplastos para gerar novas plantas. Tal técnica é aplicada no gênero *Citrus* para melhoramento de espécies cítricas, tanto para cultivares copa, quanto para porta-enxerto.

Protoplastos são induzidos a se fundirem através do emprego de métodos químicos ou físicos. O método químico consiste no uso de polietilenoglicol (PEG), como agente aglutinador e indutor. O método físico consiste em submeter os protoplastos a um campo de corrente alternada, de baixa voltagem e a subsequente aplicação de um

ou mais pulsos de corrente contínua de alta intensidade. Este tipo de tratamento gera poros temporários nas membranas, permitindo a fusão dos protoplastos que estiverem próximos (CARNEIRO et al., 1998; COSTA, 2001). Olivares-Fuster et al. (2005) desenvolveram um novo procedimento chamado de fusão de protoplastos eletroquímica, na qual é baseada na agregação de protoplastos induzidos quimicamente, usando baixa concentração de PEG e pulsos de corrente elétrica para promover a fusão de membranas.

Vários progressos têm sido alcançados na manipulação de protoplastos citros, porém informações relativas na duplicação de cromossomos de protoplastos de citros *in vitro* são escassas (GMITTER et al., 1991, GMITTER E LING, 1991). Zeng et al. (2006) trataram protoplastos purificados de kunquat 'Meiwa' (*Fortunella crassifolia*) com colchicina. Os resultados mostraram que a viabilidade dos protoplastos tratados com colchicina decresceu, demonstrando a toxicidade da mesma aos protoplastos.

Outra aplicação dos protoplastos é a obtenção de plantas transgênicas. O método de transformação de protoplastos é vantajoso, pois a planta transgênica obtida não apresenta o fenômeno de quimeras, pois é oriunda de um único protoplasto transformado. A utilização de marcadores não destrutíveis, como a proteína fluorescente GFP facilita o desenvolvimento e/ou melhoramento de fusão de protoplasto e regeneração de híbridos somáticos, pois, permite a escolha dos protoplastos viáveis (OLIVARES-FUSTER, 2002). Para introdução do DNA exógeno, a membrana celular dos protoplastos sofre uma desestabilização por tratamento com PEG (polietilenoglicol) ou aplicação de um choque elétrico (eletroporação). A *Agrobacterium tumefaciens* é cultivada juntamente com os protoplastos por algumas horas em meio de cultivo (CARNEIRO et al., 1998). A técnica de eletroporação foi utilizada por Niedz et al. (2003) ao otimizar a eficiência de eletroporação de protoplastos derivados de laranja 'Hamlin'. Os autores usaram a eletroporação de protoplastos na presença de construções contendo o gene GFP designado para produzir plantas fluorescentes transformadas. Em seguida, identificaram e selecionaram os protoplastos fluorescentes GFP-positivos, e subseqüentemente regeneraram esses calos derivados dos protoplastos selecionados em plantas completas.

## 2.4 Embriogênese Somática

Os tecidos vegetais cultivados *in vitro* possuem capacidade para formar gemas, raízes ou embriões somáticos. Essa habilidade de regeneração é chamada de totipotência, ou seja, as células são autônomas e têm capacidade de regenerar plantas quando submetidas a tratamentos adequados.

Um exemplo da totipotencialidade das células vegetais é a embriogênese somática, que consiste no processo de regeneração de plantas no cultivo *in vitro*, na qual células somáticas ou haplóides desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem que haja fusão de gametas.

A embriogênese somática forma a base da totipotência celular, que é única nas plantas superiores (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006). Diferentemente dos embriões zigóticos, os embriões somáticos são facilmente tratáveis, as condições de cultura podem ser controladas e a falta de material não é um fator limitante para a experimentação (KAWAHARA E KOMAMINE, 1995). A embriogênese somática é um sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o desenvolvimento da embriogênese nas plantas superiores, e também possui aplicações biotecnológicas potenciais como sementes sintéticas, micropropagação e transformação genética (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

Culturas embriogênicas foram descritas pela primeira vez em calo e suspensões celulares de cenoura cultivadas em meio contendo água de coco por Reinert (1958) e Stewart et al. (1958), respectivamente. Com o crescente entendimento da regulação fisiológica e genética do zigoto e da embriogênese somática, culturas embriogênicas de diversas espécies podem agora ser obtidas a partir de um meio de cultura quimicamente definido (HORPE, 1995; RAGHAVAN, 1997, BRAYBROOK et al., 2006).

O estabelecimento de culturas embriogênicas eficientes tem se tornado uma parte integral da biotecnologia de plantas, já que a regeneração de plantas transgênicas de muitas culturas importantes – canola, mandioca, cereais, algodão, soja, espécies lenhosas, etc. – é dependente da formação de embriões somáticos (VASIL, 2007).

A embriogênese somática apresenta várias vantagens sobre as técnicas de micropropagação, destacando-se entre elas a capacidade de produzir um grande número de embriões num espaço limitado e os embriões são individualizados e se desenvolvem diretamente em plantas (LAWRENCE, 1981). Embriões somáticos podem ser facilmente manipulados, desde que eles sejam relativamente pequenos e tamanhos uniforme (CERVELLI E SENARATNA, 1995; IBARAKI E KURATA, 2001). Em vista disso, embriões somáticos possuem um grande potencial para serem estocados por longos períodos de tempo através da criopreservação ou dessecação o que proporciona uma flexibilidade no planejamento da produção e transporte (CERVELLI E SENARATNA, 1995; IBARAKI E KURATA, 2001) e promove uma produção em larga escala (IBARAKI E KURATA, 2001).

A micropropagação de culturas de alto valor comercial, tais como ornamentais (HOLDGATE, 1977), *Citrus* (SPIEGEL-ROY E VARDI, 1984), abacaxi (RAGAN, 1984), morangueiro (BOXUS et al., 1984) tem a vantagem de produzir plantas, em geral, geneticamente uniformes; no entanto, este sistema se limita à propagação em pequena escala, pois a taxa de multiplicação dos propágulos é relativamente baixa e as plantas precisam ser aclimatizadas antes do plantio, resultando em um preço relativamente elevado antes do plantio (SCHULTEIS et al., 1990).

Na aplicabilidade de um método de propagação *in vitro* a espécies normalmente utilizadas em plantios de grandes extensões deve preencher o requisito de produção rápida de milhões de propágulos a custo competitivo com aquele dos métodos convencionais de propagação (MURASHIGE, 1977). A embriogênese somática é um destes métodos de propagação *in vitro* com viabilidade de ser utilizado para clonagem de grande número de espécies, em pequena área de laboratório e em menor espaço de tempo do que o requerido para produção normal de sementes ou propagação vegetativa de estoques (SCHULTEIS et al., 1990).

Outra característica atrativa de culturas embriogênicas é que as plantas derivadas delas são predominantemente normais e desprovidas de qualquer variação fenotípica ou genotípica, possivelmente porque são derivadas de células únicas e há uma seleção rigorosa durante a embriogênese a favor das células normais (VASIL, 1999).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresenta características semelhantes ao embrião zigótico, sendo ambos caracterizados por uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular e passando pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônários e embriônários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1999). As estruturas internas do embrião somático globular e cordiforme são semelhantes aos equivalentes zigóticos; no estágio cordiforme a protoderme é evidente, assim como a polaridade e a simetria bilateral (GUERRA et al., 1999; SMITH, 1985). Os embriões somáticos se desenvolvem livres de qualquer correlação física, genética e fisiológica, as quais ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (ZIMMERMAN, 1993). Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (GUERRA et al., 1999). Os embriões somáticos não possuem endosperma, o que pode acarretar em um desenvolvimento anormal.

A embriogênese somática pode ser natural ou *in vitro*. No primeiro caso, as células dos tecidos embriônários podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento, como acontece com o sistema de embriogenia adventícia ou nucelar em *Citrus spp.*, em que os embriões apomíticos originam-se por gemação a partir de células do nucelo (SPIEGEL-ROY; VARDI, 1984). Na embriogênese somática *in vitro* ou induzida, células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas adquirem novas competências morfogenéticas (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática *in vitro* de citros não é bem caracterizada, já que desde os primeiros trabalhos, como o de Rangan *et al.* (1968), a taxa de sucesso de desenvolvimento dos embriões era baixa, chegando a 20-30% em alguns tratamentos. Esse tipo de problema foi também mencionado por Gmitter Junior e Moore (1986), que relatam o aparecimento de grande número de embriões somáticos obtidos *in vitro* com anormalidades de desenvolvimento, os quais, em função do grau de má formação, não eram convertidos em plantas. Com o objetivo de otimizar protocolos de embriogênese somática em várias espécies, tem sido cada vez mais comum a comparação entre o desenvolvimento dos embriões zigóticos e dos embriões somáticos. Em citros, a



possibilidade de se comparar o processo de embriogênese somática nucelar e a embriogênese somática induzida *in vitro* parece satisfatória, já que estão sendo comparadas morfologias de embriões obtidos a partir de células somáticas. Dessa maneira, Mendes-da-Glória et al. (2001) avaliaram características anatômicas de morfologias distintas de embriões nucleares de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), a fim de gerar informações a serem utilizadas na otimização de protocolos de embriogênese somática de citros, através da seleção de tipos morfológicos passíveis de conversão em plantas. Dos embriões avaliados, apenas um apresentou a morfologia característica de um embrião zigótico normal, enquanto que os demais apresentaram cotilédones com angulações e formatos distintos. Foram observados também embriões mal formados com a não diferenciação de ápice caulinar e/ou ápice radicular, o não desenvolvimento de um dos cotilédones, além de eixo embrionário colapsado. Os dados obtidos visam auxiliar na interpretação dos tipos morfológicos de embriões somáticos obtidos *in vitro* e sua capacidade de conversão em plantas, de modo a contribuir para a eficiência de obtenção de plantas melhoradas via hibridação somática e via transformação genética, já que esta última depende de um protocolo altamente eficiente de regeneração de plantas *in vitro*.

Estudos envolvendo a regeneração de plantas através da embriogênese somática *in vitro* em diferentes culturas têm apontado o surgimento de embriões somáticos anormais em seu desenvolvimento e más-formações, que variam bastante em função do gênero e espécie estudados, além da influência exercida também pelo tratamento *in vitro*. Dentre as alterações observadas, os embriões somáticos diferem principalmente em relação à morfologia do meristema apical caulinar e dos cotilédones (MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2001). Trabalhos envolvendo o cultivo e conversão de embriões somáticos em plantas em diferentes culturas (PASSOS et al. 1999; FERNANDO, 1999) têm relacionado a baixa taxa de conversão com as anormalidades presentes no meristema apical caulinar dos embriões.

Existem dois caminhos diferentes na formação dos embriões somáticos: a embriogênese somática direta e a embriogênese somática indireta. Porém a grande maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pela via indireta.

A embriogênese somática direta ocorre quando uma mínima proliferação de um tecido ou explante precede a formação do embrião; enquanto que a embriogênese somática indireta há proliferação de calos antes da formação do embrião. Na embriogênese somática direta, há presença de células programadas para a diferenciação e formação dos embriões somáticos, denominadas de “pre-embryogenic determined cells” (PEDC), que necessitam apenas de estímulos externos para desencadear o processo, enquanto que na embriogênese somática indireta, é necessário desdiferenciação celular, sendo suas células chamadas de “induced embryogenic determined cells” (IEDC) (SHARP, 1980; WILLIAMS E MAHESWARAM, 1986; TOMAZ, 2000; QUIROZ-FIQUEROA et al., 2006). Na embriogênese somática direta células proembriogênicas competentes já estão presentes e a expressão da embriogênese meramente depende de condições favoráveis (QUIROZ-FIQUEROA et al., 2006).

A embriogênese somática direta é obtida em uma única etapa (REZENDE, 2008) e tem a vantagem de produzir embriões somáticos mais rapidamente e com alta taxa de germinação. A embriogênese somática indireta permite a produção em larga escala mediante a cultura de explante em dois meios sucessivos: “meio de acondicionamento” e “meio de indução” de calos embriogênicos friáveis (SONDAHL E SHARP, 1977; REZENDE, 2008).

As células embriogênicas pré-determinadas (PEDCs) necessitam de pequena indução exógena de reguladores de crescimento para a divisão celular e expressão da embriogênese. As células induzidas à determinação embriogênica (IEDCs) precisam de reguladores de crescimento para reentrar em mitose e determinar o estado embriogênico dos calos (SHARP et al., 1980).

Calos são definidos como massas de células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, os quais podem ser induzidos por estímulos ambientais ou químicos, e reprogramados, adquirindo novas competências morfogenéticas (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática em citros tem sido observada a partir de calos embriogênicos cuja produção pode ocorrer a partir de nucelos, óvulos abortados, óvulos não desenvolvidos, anteras, estigmas; assim como folhas, epicótilos, cotilédones e

segmentos de raízes. Apesar do potencial embriogenético de *Citrus* variar com o genótipo e com o tipo de explante, melhores resultados foram obtidos de protocolos de regeneração envolvendo o uso de explantes de origem ovular, como o nucelo (FIORE et al., 2002).

Os fatores que têm maior influência sobre a indução de calos nucleares embriogênicos são as condições do ambiente em que as plantas se desenvolveram, o genótipo, a idade dos explantes, os componentes do meio de cultura e as condições de cultura (SPIEGEL-ROY E KOCHBA, 1980; MOORE, 1985; MORAES, 2003).

Para a calogênese de espécies cítricas em cultivo *in vitro*, o meio de cultura mais utilizado é o MT (MURASHIGE E TUCKER, 1969) suplementado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de malte (LORENZO et al., 1994). A adição de reguladores vegetais, como benziladenina (BA), cinetina, ácido indolacético (IAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) pode beneficiar o processo (CRISTOFANI, 2001). Vários outros fatores influenciam a calogênese. Benedito et al. (2000) observaram que a calogênese em laranja doce é altamente influenciada pelo genótipo, destacando a variedade 'Rubi', que apresentou calogênese em 12,5% e 15% dos óvulos introduzidos em meio de cultura com ou sem beziladenina (BA), respectivamente. Tao et al. (2002) obtiveram melhores resultados na obtenção de calos de toranja (*Citrus grandis*) com 2,4-D (2,4-diclorofenóxiacético) havendo formação de brotos.

A embriogênese somática é altamente dependente da composição do meio de cultura, principalmente das fontes de carboidratos e reguladores de crescimento. Dos componentes do meio de cultura, os carboidratos têm papel fundamental para indução da embriogênese somática e cultivo dos embriões, sendo a sacarose o carboidrato mais comumente utilizado. Ao contrário de outras espécies, a presença de auxinas, citocininas ou giberelinas inibem a embriogênese somática em citros, devido aos elevados índices de reguladores de crescimento endógenos (GOSAL et al., 1995; MORAES, 2003).

Diferentes tratamentos com várias substâncias têm sido empregados no meio de cultura para induzir a embriogênese somática. Em citros, a embriogênese somática é induzida tanto pela falta de reguladores de crescimento como pela redução da

concentração de sacarose no meio de cultura em contraste com outras espécies de plantas (KOCHBA E BUTON, 1974; KAYIM E KOC, 2006).

Tomaz et al. (2001) avaliaram meios de cultura com diferentes fontes de carboidrato: galactose, glicose, lactose, maltose e sacarose em diversas concentrações, e glicerol. Para todas as combinações testadas (cultivar, fontes de carboidratos e concentração), a sacarose não estimulou a embriogênese somática, enquanto que a galactose, lactose e maltose foram as melhores fontes de carboidratos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Kayim e Koc (2006) ao testarem os efeitos de vários carboidratos como o glicerol, sorbitol, manitol, lactose, glicose e galactose em diferentes taxas de concentrações na embriogênese de óvulos derivados de calos de três espécies e quatro variedades de citros; mexerica 'Clementina' (*Citrus clementina*), laranja 'Washington Navel' (*C. sinensis*), limão 'Kutdiken' e 'Zagara Bianca' (*C. limon*). Os melhores resultados na formação de embriões a partir de calos das diferentes variedades de citros foram obtidos nas concentrações de 4 a 5% de glicerol. A embriogênese também foi estimulada por outros carboidratos como a lactose e o sorbitol em várias concentrações em todos os calos de citros utilizados no estudo, porém em menores taxas.

Ricci et al. (2002) estudando os efeitos de vários carboidratos na embriogênese somática de *Citrus sinensis*, *C. reticulata* e *C. nobilis* x *C. deliciosa* observaram que entre os diversos carboidratos, a galactose e a lactose induziram o maior número de embriões. Esses resultados são similares àqueles encontrados por Kochba et al. (1982), que concluíram que a galactose ou lactose foram muito eficientes na indução da formação do embrião. Segundo estes autores, a galactose induz a produção de etileno, e o alto nível de etileno inibe a biossíntese de auxinas, o que favorece a formação dos embriões somáticos nos calos embriogênicos.

Blanc et al. (1999) estudando o efeito da adição de carboidratos na indução da embriogênese somática em seringueira (*Hevea brasiliensis*) concluíram que entre os quatro açúcares testados (glicose, sacarose, maltose e frutose), apenas a maltose induziu a uma significativa produção de embriões somáticos, quando comparado à sacarose.

Além das fontes de carboidratos, as auxinas e citocininas têm papel fundamental na embriogênese somática de várias espécies de plantas. As auxinas estão envolvidas nos processos de indução e iniciação de embriões somáticos. Segundo Pasqual et al. (1998), a adição das auxinas IAA, ANA e 2,4-D ao meio de cultura, suprimiu significativamente ou completamente a embriogênese somática nucelar em laranja 'Valência'. Fiore et al. (2002) testando o efeito da auxina 2,4-D na embriogênese somática de *Citrus limon* e na laranja doce *C. sinensis* (L.) Osb. cv. 'Washington Navel' constataram também que o 2,4-D não foi efetivo na formação de embriões somáticos. Esses estudos comprovam que a presença de auxinas, citocininas ou giberelinas suprimem a embriogênese somática em citros. Já em outras espécies de frutíferas como em abacaxi (*Ananas comosus* L.) constata-se a necessidade de adição, tanto de auxina, como de citocininas nos meios de cultura, para induzir a embriogênese e favorecer a regeneração, com a auxina 2,4-D sendo crítica para deduzir respostas morfogenéticas (SRIPAORAYA et al., 2003).

As citocininas promovem a divisão celular e a diferenciação, e regula uma série de atividades biológicas em plantas inteiras e em cultura de tecidos vegetais. A atividade da citocinina ocorre em derivados sintéticos de feniluréia, como a difeniluréia (DPU). Carra et al. (2006) estudaram a possibilidade de três derivados de difeniluréia estimular a embriogênese somática em três espécies de *Citrus*. Segundo os autores, os derivados de feniluréia mostraram um grande potencial embriogênico quando comparado com o BAP (6-benzilaminapurina), uma clássica adenina-citocinina.

O extrato de malte foi relatado como sendo benéfico à cultura de óvulos e nucelos de citros (KOCHBA et al., 1972). Em vários outros trabalhos, essa substância foi adicionada ao meio de cultura na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> para estimular a indução da embriogênese somática de citros (NAVARRO E JUAREZ, 1977; RICCI, 2001). O efeito positivo do extrato de malte na indução à embriogênese somática de calos nucleares de citros também foi relatado por Vardi et al. (1982). Sabe-se que o extrato de malte é fundamental para indução da embriogênese somática em nucelos extraídos de óvulos não fertilizados e também é importante para obtenção de embriões somáticos de citros por via direta (KOCHBA et al., 1972; GMITTER E MOORE, 1986).

A fase final da embriogênese somática compreende o estímulo a maturação e germinação dos embriões, para posterior regeneração em plantas. Durante o estágio de maturação, os embriões somáticos sofrem mudanças morfológicas e bioquímicas. Vários fatores como níveis de etileno, pressão osmótica, pH e fotoperíodo podem influenciar na maturação dos embriões somáticos em diferentes espécies (Von ARNOLD, 2008). A estratégia a ser empregada consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade, aptos a se converterem em plantas (GUERRA et al., 1999). No estágio de maturação do embrião, o meio de cultura deve promover ao embrião um stress hídrico, para que o embrião possa acumular reservas, como proteínas e aminoácidos, para induzir sua germinação (RICCI et al., 2002).

Os primeiros trabalhos com embriogênese somática em citros não descreveram tratamentos que favorecessem a maturação dos embriões, sendo estes transferidos do meio de cultura de indução da embriogênese somática diretamente para meio de cultura de germinação, contendo ácido giberélico ( $GA_3$ ). Ricci et al. (2002) estudaram o efeito da sacarose em diferentes concentrações, ácido giberélico e carvão ativado no meio de cultura para maturação dos embriões de variedades de tangerinas e laranjas doces. Os autores constataram que os meios de cultura contendo as maiores concentrações de sacarose foram os que geraram um maior número de plantas em tangerina 'Ponkan' e em laranja 'Valência', e nenhuma diferença significativa foi observada na presença ou não de carvão ativado. O carvão ativado absorve componentes tóxicos liberados no meio de cultura pelos explantes, ágar, sacarose e sais. O mesmo estudo revelou que a presença de  $GA_3$  no meio de cultura não teve nenhum efeito na maturação dos embriões para todas as variedades de citros analisadas, e a sacarose foi uma importante fonte de carbono para a germinação dos embriões e formação das plântulas para as variedades cítricas estudadas.

Mendes-da-Glória et al. (2000), após obterem uma embriogênese somática espontânea depois de dois subcultivos em meio de cultura MT suplementado com 500 mg/L de extrato de malte, transferiram os embriões bem desenvolvidos para meio MT

modificado com adição de GA<sub>3</sub> e extrato de malte, observando a germinação dos mesmos. A regeneração de plantas também foi obtida por organogênese direta, com a formação de ápices caulinares em meio MT suplementado com extrato de malte, BAP e água de coco.

A embriogênese somática a partir de calos tem se mostrado, muitas vezes, limitante ao processo do melhoramento genético de citros e tem sido alvo de intensas pesquisas, com o intuito de maximizar a produção de plantas oriundas ou não de fusão de protoplastos.





### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba, São Paulo.

#### 3.2 Material Vegetal

Linhagens de calos embriogênicos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Figura 1a) das cultivares ‘Hamlin’, ‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Lima Verde’ e ‘Westin’ foram cultivados em meio de cultura sólido EME 0,146M e H+H (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Para manutenção, os calos embriogênicos foram subcultivados em meio fresco a cada quatro semanas. Os calos foram utilizados no isolamento de protoplastos.

#### 3.3 Eficiência de isolamento de protoplastos em função de diferentes soluções enzimáticas

Foram utilizadas para o isolamento de protoplastos a partir de calos embriogênicos três soluções enzimáticas: 1. Grosser e Chandler (1987), composta de 1% de celulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha) e 0,2% de pectoliase Y-23 (Seishin); dissolvidas em solução de 0,7M de manitol, 24,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,92 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 6,15 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), pH 5,7 utilizando 2 mL desta solução por aproximadamente 500 mg de calo, diluído em 2mL de meio de cultura BH<sub>3</sub> 0,7 M, segundo metodologia proposta por Mourão Filho (1995); 2. Grosser e Chandler (1987) modificado, composta de 1% de celulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha); dissolvidas em solução de 0,7M de manitol, 24,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,92 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 6,15 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), pH 5,7 utilizando 2 mL desta solução por aproximadamente 500

mg de calo, diluído em 2mL de meio de cultura BH3 0,7 M ; 3. Solução enzimática composta de 4% de celulase Onozuka R-10 (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha; dissolvidas em solução de 0,7 M de manitol, 24,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,92 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 6,15 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), pH 5,7 utilizando 2 mL desta solução por aproximadamente 500 mg de calo, diluído em 2mL de meio de cultura BH3 0,7 M (Figura 1b). Os calos para isolamento de protoplastos foram provenientes daqueles cultivados em meio sólido.

As soluções enzimáticas foram esterilizadas por meio de filtro-esterilização (0,22 mm). Os calos de cada variedade foram colocados em placas de Petri (58 x 15 mm, Corning™ , não tratadas), juntamente com as soluções enzimáticas (Figura 1c). A incubação foi realizada por um período de 15 horas, sob agitação orbital (40 rpm), em ausência de luz, à temperatura de 27 °C.

Após incubação nas soluções enzimáticas, os protoplastos foram purificados em gradiente de sacarose-manitol. Os protoplastos foram filtrados em peneira de nylon com malha de 45  $\mu\text{m}$  (Figura 1d, e) e centrifugados por 10 minutos a 100g. O sobrenadante foi removido com pipeta de Pasteur e o pellet ressuscitado em 5 mL de meio CPW contendo sacarose a 25%. Dois mL de meio CPW com manitol a 13% foram cuidadosamente colocados na parte superior da solução ressuscitada a fim de formar um gradiente de densidade (Figura 1f). Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 100g. Após formação do gradiente sacarose/manitol (Figura 1g), os protoplastos foram removidos e diluídos em 5 mL de solução BH3 0,7 M e reservadas para posteriores manipulações. A avaliação dos resultados foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer, em que foi determinado o rendimento dos protoplastos viáveis (Figura 1h) por peso fresco de calo embriogênico. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 5 x 3 com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo 500 mg de calo embriogênico.

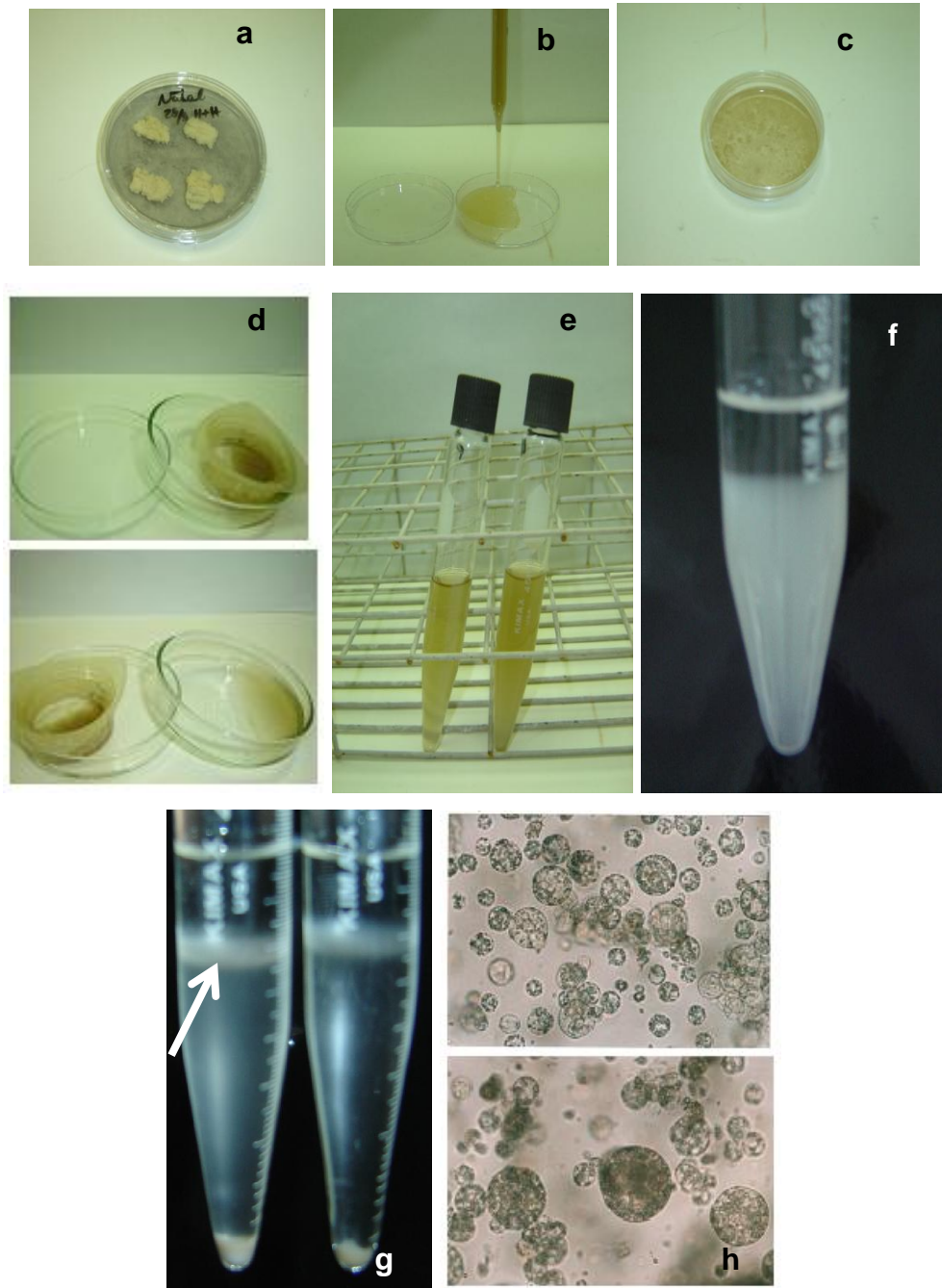


Figura 1 – Isolamento de protoplastos de laranja doce (*Citrus sinensis*). a) Calos embriogênicos de laranja 'Natal' cultivados em meio sólido H + H. b - c) Digestão enzimática. d - e) Protoplastos filtrados em peneira de nylon com malha de 45  $\mu\text{m}$ . f) Gradiente de densidade sacarose/manitol. g) Gradiente de densidade sacarose/manitol após centrifugação (seta indica as bandas com protoplastos). h) Protoplastos viáveis

### 3.4 Densidades de plaqueamento no cultivo de protoplastos

Foi avaliada a influência de diferentes densidades na eficiência final de cultivo de protoplastos. Os protoplastos purificados foram cultivados em cinco densidades,  $2 \times 10^4$ ;  $5 \times 10^4$ ;  $10^5$ ;  $2 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>, nos meios de cultura EME 0,7 M (GROSSER E GMITTER JUNIOR,1990), BH3 0,7 M e a combinação desenvolvida BH3 + EME 0,7M em ausência de luz, a  $25 \pm 1$  °C.

Aos 30 dias de cultivo, foram adicionadas às microcolônias 10 a 12 gotas do meio de cultura de 1:1:1 (v:v:v), com o objetivo de reduzir o potencial osmótico do meio, composto de uma parte de meio BH3 0,7 M, uma parte de EME 0,7 M e uma parte de EME 0,146 M. Em subcultivos posteriores, quando as culturas se apresentaram mais vigorosas, e os calos maiores, foi adicionado o meio de cultura 1:2 (v:v), composto por uma parte do meio de cultura BH3 0,7 M e duas partes do meio de cultura EME 0,146 M.

Em torno de 90 dias de cultivo, foram avaliados o número de microcalos com 1-2 mm de diâmetro, os quais foram transferidos para placa de Petri (100 x 15 mm), com meio de cultura semi-sólido EME. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial de 4 x 3 x 3 com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa (60 x 15 mm) de isolamento.

### 3.5 Embriogênese somática

A indução da embriogênese somática ocorreu em meio de cultura MT (MURASHIGE E TUCKER, 1969) modificado com 500 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de malte. Foram avaliadas cinco fontes de carboidratos na indução da embriogênese somática: sacarose, galactose, glicose, sorbitol, lactose e maltose, nas concentrações de 18, 37, 75, 110 e 150 mM, à temperatura de 27 °C. Foram utilizados 50 mg de calos embriogênicos em placas de Petri de plástico descartáveis (100 x 15 mm). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 5 x 5 x 6 com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri de plástico descartável (100 x 15 mm). A avaliação foi feita com auxílio de microscópio

esterioscópico aos 30 dias de cultivo e 45 dias de cultivo para as cultivares não responsivas. Cada cultivar foi analisada independentemente.

### **3.6 Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado nos três experimentos foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ), com o auxílio do software SAS (SAS INSTITUTE, 1997).



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação da eficiência de isolamento de protoplastos em função de diferentes soluções enzimáticas**

A maximização do isolamento e obtenção de protoplastos viáveis é uma etapa fundamental na adequação das técnicas que utilizam os protoplastos, como a hibridação somática. Os calos de citros são, muitas vezes, recalcitrantes à digestão da parede celular, dificultando o isolamento dos protoplastos.

Diversos fatores estão envolvidos no processo de isolamento de protoplastos, como tipo e concentração de enzimas digestivas, o potencial osmótico da solução de isolamento e a estrutura física da parede das células dos calos embriogênicos em estudo (BENEDITO, 1999).

Ao comparar as cinco cultivares estudadas constata-se o contraste das três soluções enzimáticas na eficiência de isolamento de protoplastos de laranja doce (Figura 2).

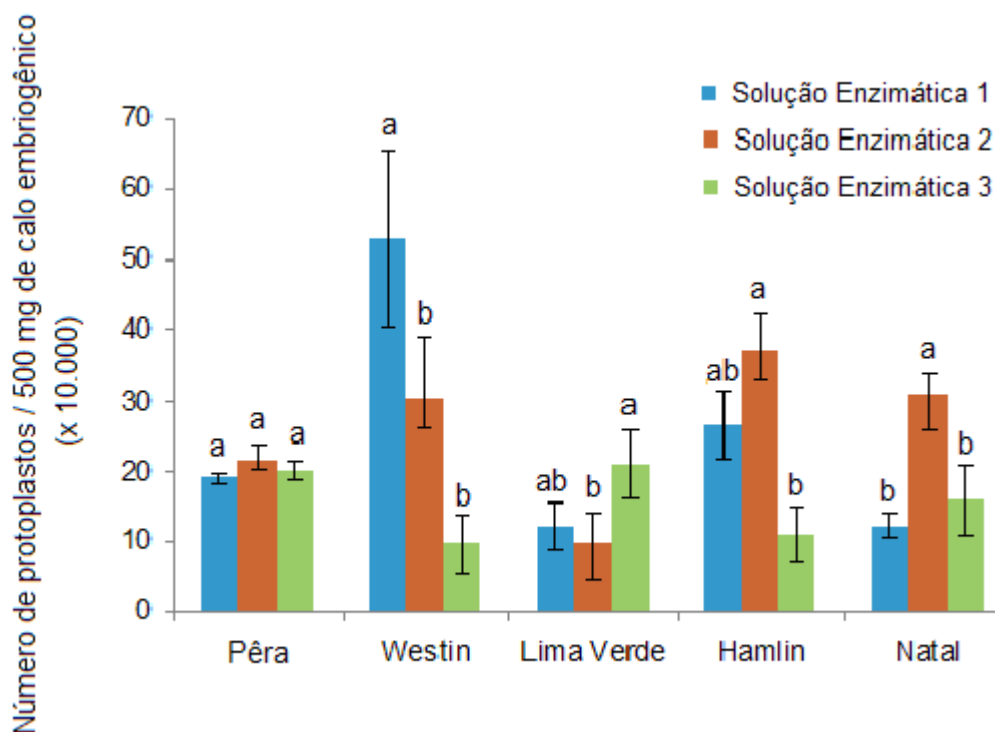


Figura 2 – Eficiência de isolamento de protoplastos de laranja doce (*Citrus sinensis*). Solução enzimática 1: Grosser e Chandler (1987), 1% de celulase Onozuka RS, 1% macerase R-10 e 0,2% de pectoliase Y-23; Solução enzimática 2: Grosser e Chandler (1987) modificada, composta de 1% de celulase Onozuka RS e 1% macerase R-10; Solução enzimática 3: 4% de celulase Onozuka R-10 e 1% macerase R-10. (Barra =  $\pm$  erro padrão)

Observa-se que a solução enzimática 2, de Grosser e Chandler (1987) modificada apresentou melhor rendimento para as cultivares ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Pêra’, se destacando a cultivar ‘Hamlin’ que apresentou uma média de  $37,10 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> em 500 mg de calo embriogênico, em seguida pelas cultivares ‘Natal’ e ‘Pêra’, com rendimento médio de  $30,81 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> e  $21,60 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

A solução enzimática 3, para as cultivares ‘Westin’ e ‘Hamlin’ apresentou baixo rendimento no isolamento de protoplastos, provavelmente, por ser composta por uma enzima celulase mais fraca, celulase Onozuka R-10, o que não foi suficiente para degradar a parede celular. No entanto, para a cultivar ‘Lima Verde’, a solução enzimática 3 foi a mais eficiente, apresentando um rendimento médio de  $16,76 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> em 500 mg de calos embriogênicos. A mesma cultivar apresentou os menores rendimentos no isolamento para as soluções enzimáticas 1 e 2, com



rendimento médio de  $7,34 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> e  $4,89 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 2). Essa baixa eficiência de isolamento também foi observada em trabalhos envolvendo isolamento de protoplastos com objetivo de hibridação somática (dados não apresentados). Já para a cultivar 'Westin' a solução enzimática 1 foi a melhor entre as três soluções testadas, apresentando um rendimento médio de  $33,15 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> em 500 mg de calos embriogênicos.

Tais resultados contrastam-se com aqueles apresentados por Benedito (1999), em que a solução enzimática de Grosser e Chandler (1987), composta de 1% de celulase, 1% macerase e 0,2% de pectoliase (denominada de solução enzimática 1 no presente trabalho) foi considerada a melhor para as cultivares de laranja doce estudadas.

Essa influência da cultivar e da solução enzimática no isolamento de protoplastos já foi constatada anteriormente por Oliveira et al. (1994), Latado (1998), Mendes-da-Glória (1998) e Costa et al. (2002). Estas diferenças estão relacionadas com características inerentes à parede celular, que, embora seus constituintes básicos sejam os mesmos, sua composição pode variar muito entre as espécies (CARNEIRO et al., 1998).

Levando em consideração a cultivar, Cristofani (1991) e Goldman (1988), trabalhando com a cultivar 'Pêra' obtiveram rendimento de  $1,43 \times 10^6$  ( $71,5 \times 10^4$  protoplastos por 500 mg de calo embriogênico) e  $1,37 \times 10^6$  ( $68,5 \times 10^4$  protoplastos por 500 mg de calo embriogênico), respectivamente. Em contraste com estes resultados, no presente experimento, a cultivar 'Pêra' apresentou um maior rendimento na solução enzimática 2, solução de Grosser e Chandler (1987) modificada, com número médio de  $21,60 \times 10^4$  protoplastos por 500 mg de calo embriogênico.

Os resultados deste experimento reforçam a hipótese de que as espécies de citros e as variedades dentro de uma mesma espécie mostram grande variação na eficiência de isolamento perante as diversas soluções enzimáticas empregadas, concluindo que uma combinação enzimática apropriada deve ser determinada para cada calo especificamente (VARDI E GALUN, 1988; 1989).

Além destes fatores, outros devem ser estudados para a maximização do isolamento das cultivares estudadas, tais como o subcultivo de calos em meio de

cultura com menor quantidade de carboidrato, pré-tratamento enzimático e idade dos calos embriogênicos (OLIVEIRA et al., 1995).

Os protoplastos são mantidos em soluções concentradas. Devido à semi-permeabilidade da membrana plasmática, ocorre uma desidratação parcial do protoplasto. Deve ser notado que o stress osmótico, a remoção da parede celular, e ambiente com novos solutos não são as barreiras mais difíceis encontradas durante o isolamento; os protoplastos são também removidos de seu ambiente original, e importantes proteínas situadas entre a membrana plasmática e a parede celular podem ser removidas com a parede celular. Além disso, a célula pode ser severamente danificada pelos contaminantes presentes nas soluções enzimáticas usadas para a degradação da parede celular, pois raramente essas enzimas são celulases e pectinases puras (DAVEY et al., 2005).

#### **4.2 Avaliação das densidades de plaqueamento no cultivo de protoplastos**

Cada etapa da cultura dos protoplastos até a regeneração de plantas (protoplastos, colônias e calos) possui uma densidade ótima de cultura. A densidade inicial colocada na cultura afeta diretamente a eficiência final de plaqueamento. No entanto, é difícil correlacionar a densidade inicial ótima com parâmetros como tamanho dos protoplastos ou condições de cultura (CARNEIRO et al., 1998).

Quanto à densidade de plaqueamento no presente trabalho, verificou-se a formação de um maior número de microcalos (1 a 2 mm de diâmetro) para todas as cultivares testadas, de forma geral, nas densidades de  $3 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1). Tais resultados discordam de Costa et al. (2002), que testando também cinco densidades de plaqueamento de protoplastos, verificaram formação de um maior número de microcolônias nas densidades de  $2 \times 10^5$  e  $10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>, o que foi constatado pela eficiência de plaqueamento tanto para as tangerinas testadas (tangerina 'Cleópatra', eficiência de 9,8% na densidade de  $2 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>), quanto para as laranjas ('Ruby Blood' e 'Valência' com eficiência de 9,0% e 8,5%, respectivamente na densidade de  $2 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>). Para os mesmos autores, o incremento na densidade de  $3 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> não

demonstrou comportamento linear, e as poucas colônias desenvolvidas cessaram o crescimento e morreram 90 dias após o início do cultivo. Em altas densidades fenômenos de absorção e excreção de protoplastos podem modificar profundamente o meio de cultura (CARNEIRO et al., 1998). Uma excessiva densidade de plaqueamento rapidamente consome nutriente, e as células derivadas de protoplastos podem falhar quando submetidas à divisão celular.

A eficiência de plaqueamento foi relativamente baixa quando comparadas às demais densidades para as cultivares 'Hamlin', 'Lima Verde' e 'Westin' nas densidades de  $5 \times 10^4$  e  $2 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>. Para essas duas densidades de plaqueamento, a cultivar 'Lima Verde' não apresentou nenhum microcalo, e as cultivares 'Hamlin' e 'Westin' não apresentaram nenhuma formação de microcalo na densidade de  $2 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1). Costa et al. (2002) também observaram uma baixa eficiência de plaqueamento nessas duas densidades para todas as espécies cítricas e cultivares estudadas. Protoplastos falham ao serem submetidos à divisão quando cultivados abaixo da densidade mínima limiar (DAVEY et al., 2005).

A densidade ideal varia entre espécies e, como constou neste trabalho, variou entre as cultivares de laranja doce. Em cultura de protoplastos de feijão (CREPY et al., 1986) e batata doce (SIHACHAKR E DUCREUX, 1987), a densidade inicial ótima encontrada foi de  $2 \times 10^4$  e  $3 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Para espécies de plantas monocotiledôneas, as densidades são mais altas,  $3 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> e até  $2 \times 10^6$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> para milho (PRIOLI E SONDAHL, 1989; SHILITO et al., 1989),  $5 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> para arroz (KYOZUKA et al., 1987),  $1 \times 10^6$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> em banana (PANIS et al., 1993).

Segundo Evans e Bravo (1983), para cada espécie há uma densidade mínima de plaqueamento a qual não existe divisão celular. Isso justifica o fato de que no presente experimento, para a cultivar 'Natal', a mais responsiva das quatro cultivares avaliadas, mesmo nas baixas densidades de plaqueamento, apresentou um número médio de 538 microcalos/placa de Petri na densidade de  $5 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> plaqueados em meio BH3 0,7 M e 124 microcalos/placa de Petri na densidade de  $2 \times 10^4$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> plaqueados em meio BH3 0,7 M (Tabela 1).

Tabela 1 – Desenvolvimento de protoplastos de laranja doce (*Citrus sinensis*) em função da densidade de plaqueamento (protoplastos.mL<sup>-1</sup>) e da composição do meio de cultura

Meio de Cultura	BH3	BH3/EME	EME
Densidades de Plaqueamento (protoplastos.mL <sup>-1</sup> )	Número de microcalos (1 - 2 mm de diâmetro).placa de Petri <sup>-1</sup>		
	Lima Verde		
3 x 10 <sup>5</sup>	0	502 ± 31	0
2 x 10 <sup>5</sup>	0	699 ± 138	0
1 x 10 <sup>5</sup>	0	408 ± 113	0
5 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0
2 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0
	Natal		
3 x 10 <sup>5</sup>	926 ± 139	1372 ± 86	0
2 x 10 <sup>5</sup>	932 ± 9	576 ± 16	528 ± 38
1 x 10 <sup>5</sup>	576 ± 23	509 ± 54	0
5 x 10 <sup>4</sup>	538 ± 83	366 ± 57	0
2 x 10 <sup>4</sup>	124 ± 14	0	0
	Hamlin		
3 x 10 <sup>5</sup>	662 ± 136	629 ± 75	416 ± 10
2 x 10 <sup>5</sup>	574 ± 67	453 ± 8	532 ± 75
1 x 10 <sup>5</sup>	370 ± 15	453 ± 11	108 ± 16
5 x 10 <sup>4</sup>	0	148 ± 37	0
2 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0
	Westin		
3 x 10 <sup>5</sup>	0	0	0
2 x 10 <sup>5</sup>	0	1133 ± 61	1323 ± 204
1 x 10 <sup>5</sup>	0	581 ± 53	0
5 x 10 <sup>4</sup>	0	396 ± 85	0
2 x 10 <sup>4</sup>	0	0	0

Não só a densidade de plaqueamento, mas outros fatores como composição do meio de cultura utilizado no plaqueamento, a pressão osmótica, fonte de enzimas e combinações das mesmas usadas para isolamento de protoplastos, afetam o rendimento e a capacidade de divisão celular para formação de microcalos (VARDI E

GALUN, 1988). Os açúcares e os açúcares-álcool usados como fonte de carboidratos e estabilizadores osmóticos adicionados nos meios de cultura para plaqueamento afetam fortemente a capacidade de divisão dos protoplastos (VARDI et al., 1975; VARDI, 1981).

De forma geral, em relação ao meio de cultura em que os protoplastos foram plaqueados, as cultivares apresentaram maiores números de microcalos quando os protoplastos foram plaqueados na combinação dos meios BH3 + EME 0,7 M, seguidos do meio de cultura BH3 0,7 M para as cultivares 'Natal' e 'Hamlin'.

A cultivar 'Natal' foi a mais responsiva na densidade de  $3 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> em meios de cultura BH3 + EME 0,7 M, com número médio de 1372 microcalos (Tabela 1). A cultivar 'Hamlin' obteve maior número médio de microcalos (662 microcalos/placa de Petri) na densidade de  $3 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> em meio de cultura BH3 0,7 M. Já a cultivar 'Westin' apresentou maior número médio de microcalos (1323 microcalos/placa de Petri) na densidade de  $2 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>, plaqueados no meios de cultura EME 0,7 M (GROSSER E GMITTER JUNIOR,1990).

A cultivar 'Lima Verde' foi a menos responsiva quando comparadas às demais cultivares, apresentando microcalos nas densidades de  $3 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  e  $10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup> apenas quando os protoplastos foram plaqueados nos meios de cultura BH3 + EME 0,7 M (Tabela 1). Essa resposta inferior de tal variedade condiz com a menor eficiência de isolamento de protoplastos apresentada pela mesma no experimento anterior, quando apresentou a menor média de isolamento de protoplastos para todas as soluções enzimáticas testadas quando comparadas às outras cultivares.

Para a cultivar 'Hamlin' à medida que aumentou a densidade de plaqueamento para os três meios de cultura, o número de microcalos aumentou (Figura 3). Para a cultivar 'Natal', nos meios de plaqueamento BH3 (0,7M) e BH3 + EME (0,7 M), à medida que aumentou as densidades de plaqueamento, o número de microcalos também aumentou, sendo o ponto ótimo para o meio BH3 a partir da densidade de  $10^5$  ( $10 \times 10^4$ ) protoplastos.mL<sup>-1</sup>. Para o meio BH3 + EME (0,7 M) o ponto ótimo foi na densidade de  $3 \times 10^5$  ( $30 \times 10^4$ ) protoplastos.mL<sup>-1</sup>. Já o meio de cultura EME (0,7 M) apresentou ponto ótimo na densidade de  $2 \times 10^5$  ( $20 \times 10^4$ ) protoplastos.mL<sup>-1</sup> (Figura 4).

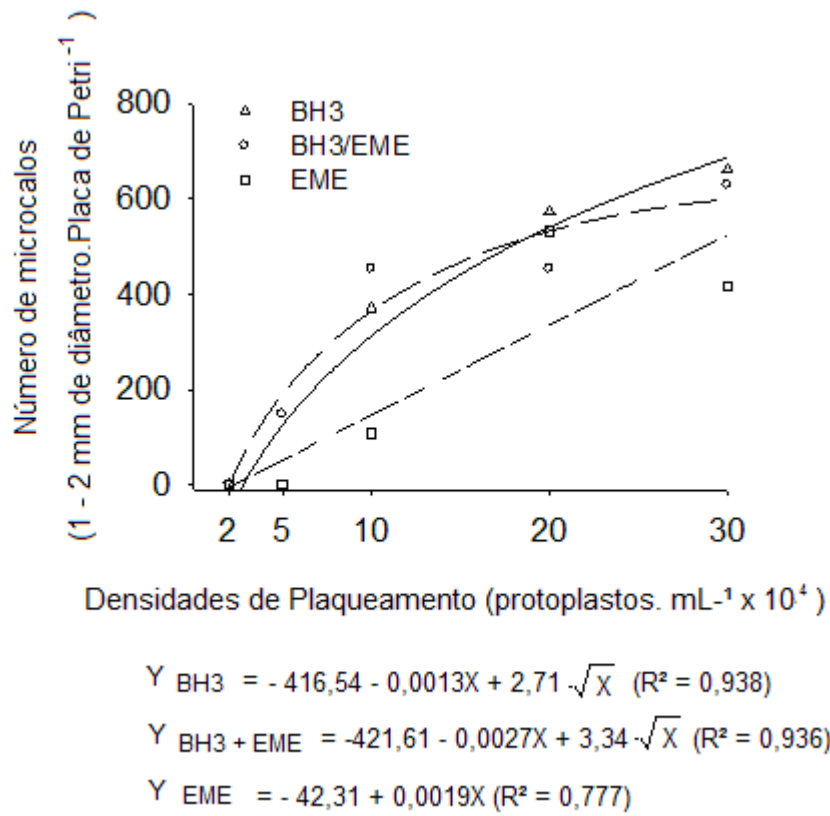
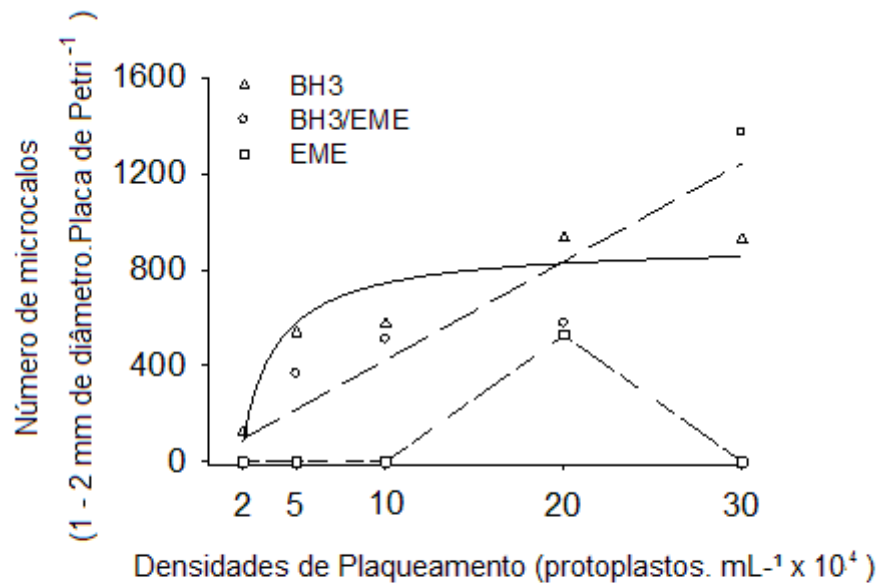


Figura 3 – Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta do número de microcalos formados de laranja ‘Hamlin’ às densidades e meio de cultura no plaqueamento.



$$Y_{BH3} = 909,30 + \left( -\frac{1,642 \times 10^4}{X} \right) \quad (R^2 = 0,893)$$

$$Y_{BH3 + EME} = 15,46 + 0,0041X \quad (R^2 = 0,881)$$

Figura 4 – Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta do número de microcalos formados de laranja 'Natal' às densidades e meio de cultura no plaqueamento

### **4.3 Avaliação da embriogênese somática em função de seis fontes de carboidratos e cinco concentrações diferentes**

De 4 a 6 semanas após o plaqueamento de 50 mg de calos embriogênicos nos meios de indução à embriogênese somática, constatou-se a formação de embriões somáticos. As cultivares diferenciaram entre si tanto no número de embriões, quanto no tempo de formação desses embriões somáticos. Foram observados embriões somáticos nos diferentes estádios em todas as cultivares: globular, cordiforme e cotiledonar (Figura 5). A presença de embriões somáticos em vários estádios de desenvolvimento nas placas foi reportado também por Peres et al. (1998), que observaram a presença de embriões no estágio globular e proliferação de calos ao mesmo tempo, o que indicou a ausência de sincronismo celular durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de citros.

Das seis fontes de carbono avaliadas, a maltose foi a que resultou em maiores produções de embriões somáticos nas cinco cultivares quando comparada as outras fontes de açúcar, principalmente em 'Hamlin', 'Natal' e 'Pêra', seguidos pela lactose para as cultivares 'Hamlin' e 'Pêra', e sacarose apenas para a cultivar 'Natal' (Tabela 2). De modo geral, as cultivares apresentaram comportamentos diferenciados para as fontes de carbono e concentrações. Um exemplo são as cultivares 'Lima Verde' e 'Natal', que, mesmo para a lactose, não formaram nenhum embrião. As cultivares 'Lima Verde' e 'Westin', mesmo para a maltose, apresentaram baixa média de formação de embriões quando comparadas às demais cultivares (Tabela 2).

Os resultados concordaram com os de TOMAZ (2000), que observou também que a maltose foi o carboidrato que estimulou produção de maior número de embriões somáticos para a laranja 'Valência' e segundo maior para a laranja 'Caipira'. Esse efeito positivo da maltose no estímulo à embriogênese somática também foi observado em trabalhos envolvendo fusão de protoplastos (MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2000), em que a substituição da sacarose por maltose (73 mM) no cultivo de calos cítricos oriundos de fusão de protoplastos, a produção de embriões aumentou significativamente. O efeito positivo da maltose na concentração de 75 mM também foi



observado por Ricci (2001) na indução de embriões somáticos a partir de calos de laranja 'Itaboraí'.

A maltose possui papel tanto como fonte de carbono, como também regulador osmótico (Von ARNOLD, 2008). Em várias espécies, a maltose aumenta o número de embriões somáticos e melhora sua morfologia e viabilidade (STRICKLAND et al., 1987; ROBERT-OEHLISCHLAGER et al., 1990; KUNITAKE et al., 1997; BLANC et al., 2000). Blanc et al. (2000) testando três fontes de carboidratos observaram que a maltose também se mostrou eficiente na produção de embriões somáticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*).

A sacarose, carboidrato muito usado na composição de meios de cultura para manutenção e cultivo de calos de citros, também não apresentou resultados satisfatórios no estímulo da produção de embriões somáticos para as cinco cultivares testadas (Tabela 2). Tais resultados concordam com os estudos realizados por Tomaz (2000), que mostrou que ocorreu formação de apenas alguns embriões nas laranjas 'Valência', 'Caipira' e tangerina 'Cleópatra1', e nenhum embrião na tangerina 'Cleópatra 2' e limão 'Cravo' quando a sacarose foi usada como fonte de carbono. Essa ineficiência da sacarose na formação de embriões somáticos também foi observada por Kochba et al. (1982), em que foi demonstrado que níveis superiores a 32 mM de sacarose suprimiram a embriogênese somática nos calos de citros testados.

A sacarose também mostrou pouca ou nenhuma eficiência no estímulo da embriogênese somática das cultivares estudadas por Ricci (2001), em que não houve formação de nenhum embrião para as tangerinas 'Ponkan', 'Cravo' e 'Kinnow' e laranja 'Valência'. Apenas para a laranja 'Itaboraí' a sacarose induziu a formação de embriões, embora muito poucos quando comparados com as demais fontes de carboidratos utilizadas. A concentração de sacarose parece afetar a assimilação de nitrogênio do meio de cultura pelas células, e o efeito da citocinina na divisão celular pode depender da disponibilidade deste carboidrato no meio de cultura. A taxa de consumo de sacarose presente no meio de cultura estaria relacionada com o nível e com a natureza da fonte de nitrogênio (GREY, 1987). Muitos estudos concentram-se na otimização da embriogênese somática, não levando em conta a importância da incorporação do nitrogênio no meio de cultura (RICCI, 2001).

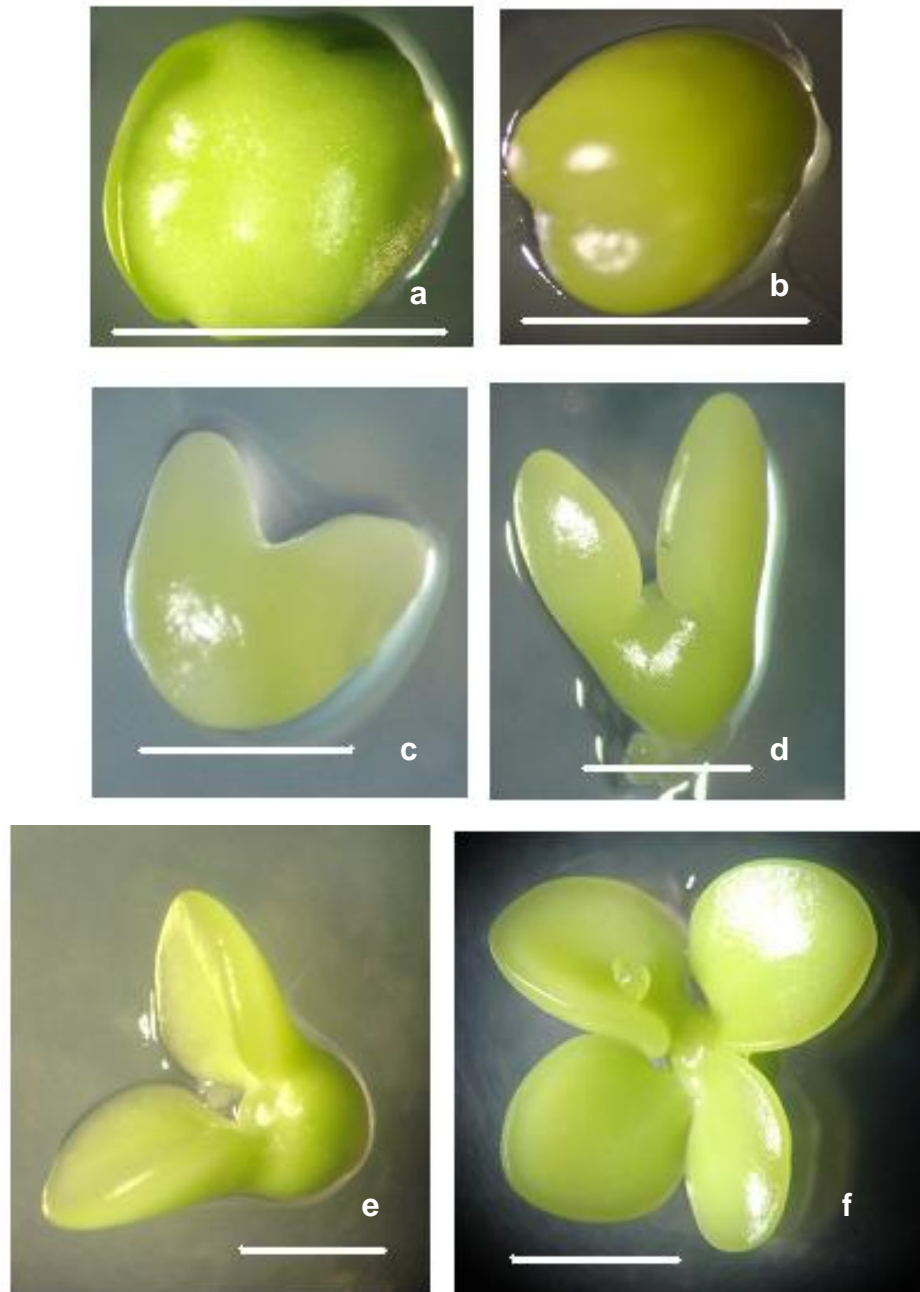


Figura 5 – Embriões somáticos de laranja ‘Hamlin’ obtidos em meio de cultura suplementados com diferentes fontes de carboidratos. a) embrião somático em estágio globular. b - c) Embriões somáticos no estágio cordiforme (coração). d - f) Embriões somáticos no estágio cotiledonar. Barra = 1mm.

Tabela 2 – Embriogênese somática em cinco cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*) em função de diferentes fontes e concentrações de carboidratos

Carboidrato	mM	Cultivares				
		Pêra	Westin	Lima Verde	Hamlin	Natal
Número de embriões 30 a 45 dias após cultivo						
Sacarose	18	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	0
	75	0	0	30 ± 10	0	32 ± 13
	110	0	4 ± 1	0	0	37 ± 25
	150	0	0	0	0	23 ± 16
Maltose	18	0	0	35 ± 17	125 ± 25	0
	37	110 ± 21	2 ± 0	0	465 ± 104	469 ± 148
	75	244 ± 60	3 ± 1	0	507 ± 30	0
	110	64 ± 5	7 ± 2	52 ± 12	432 ± 44	55 ± 15
	150	19 ± 4	5 ± 1	0	262 ± 29	0
Lactose	18	16 ± 6	3 ± 0	0	12 ± 3	0
	37	19 ± 4	0	0	144 ± 21	0
	75	11 ± 3	0	0	336 ± 34	0
	110	17 ± 2	2 ± 2	0	481 ± 27	0
	150	8 ± 3	0	0	56 ± 5	0
Galactose	18	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0	0
	110	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0
Glicose	18	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0	0
	110	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0
Sorbitol	18	0	0	0	0	0
	37	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0	0
	110	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0

A galactose e glicose não induziram a formação de nenhum embrião (Tabela 2), o que contesta os resultados encontrados por Tomaz (2000), em que a galactose foi a segunda fonte de carbono que apresentou maior produção de embriões a partir de linhagens de calos de laranja 'Valência', laranja 'Caipira' e tangerina 'Cleópatra 1'. Os resultados para galactose também discordam dos de Benedito et al. (2000) que, estudando o efeito de carboidratos na embriogênese somática de calos de citros, concluíram que este carboidrato foi responsável pelas melhores respostas, seguida pela glicose.

Os resultados de Ricci et al. (2002) também discordam dos resultados do presente trabalho. Os autores verificaram que a galactose levou à formação de grande número de embriões somáticos para as tangerinas e laranjas estudadas. Os resultados de Ricci et al. (2002) foram similares àqueles apresentados por Kochba et al. (1982), que estudando a embriogênese somática de calos obtidos de várias cultivares de *Citrus*, encontraram que a galactose foi efetiva na formação de embriões.

Entre as hipóteses para explicar o efeito da galactose no estímulo à embriogênese somática e ao desenvolvimento ontogenético do embrião é que esse carboidrato induz a produção de etileno, e o alto nível de etileno poderia inibir a síntese auxina ou o seu transporte (YAMAMOTO et al., 1986), favorecendo assim a embriogênese somática em *Citrus* pela modificação do balanço endógeno da auxina (KOCHBA et al., 1982). Outra hipótese para o efeito positivo da galactose seria que esse carboidrato inibe a síntese de UDP-glicose, um intermediário da síntese da fração celulósica das paredes celulares (MASUDA, 1990) ou inibe a conversão da UDP-glicose a glicose-1-fosfato, pelo acúmulo de galactose-1-fosfato (KOCHBA et al., 1982).

Assim como Ricci (2001), bons resultados com a glicose não foram observados com as cultivares estudadas neste trabalho, confirmando a ocorrência de diferenças nas respostas ao estímulo embriogênico aos diversos carboidratos entre as espécies e cultivares cítricas (RICCI, 2001; VARDI et al., 1982; BENEDITO et al., 2000). Kayim e Koc (2006) ao estudarem o efeito de seis fontes de carboidratos em diferentes concentrações, em laranja 'Washington Navel', tangerina 'Clementina' e limões (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) 'Kutdiken' e 'Zagara Bianca', também observaram que a glicose apresentou pouco ou nenhum rendimento na formação de embriões somáticos das

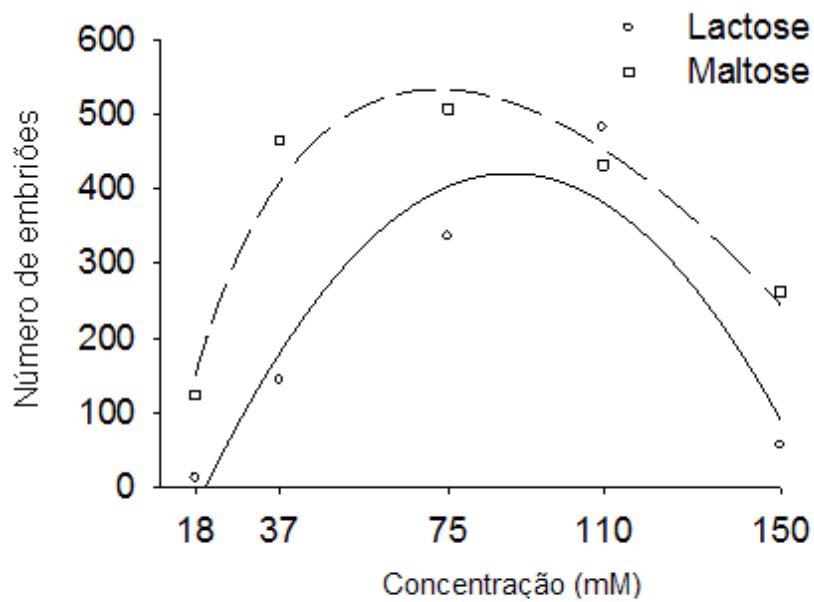
espécies cítricas testadas. Os carboidratos sorbitol e galactose tiveram um grande efeito estimulatório na embriogênese depois do glicerol (KAIYM E KOC, 2006), embora a galactose e lactose mostrassem serem nocivos para muitos tecidos em plantas (KOCHBA, 1978; KAIYM E KOC, 2006). O sorbitol, assim como a galactose e a glicose, apresentou nenhum ou baixíssimo rendimento na formação de embriões das cinco cultivares estudadas.

A cultivar 'Lima Verde', a menos responsiva a todos os tratamentos e concentrações de carboidratos estudadas no estímulo à embriogênese somática, sugere que a densidade de calo utilizada poderia contribuir com o genótipo para a formação dos embriões somáticos. Resultados obtidos por Tomaz (2000) demonstraram que ao estudar diferentes quantidades de calo (6, 12, 25 e 50 mg) para plaqueamento no estímulo à embriogênese somática, a quantidade de 12 mg foi a mais eficiente na formação de embriões somáticos para os genótipos menos responsivos, podendo ser mais um fator a considerar no processo de embriogênese somática na interação com genótipo, fonte e concentração de carboidrato utilizados. Outra hipótese é de que a capacidade embriogênica de algumas espécies é limitada a certos genótipos. Diferentes genótipos não respondem à mesma maneira quando cultivados no mesmo meio de cultura (PREECE, 2008). Tal hipótese é confirmada por Vidal et al. (2009) ao buscarem o desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para oito cultivares de uva (*Vitis vinifera* L.) estudando os efeitos de quatro parâmetros (meio de indução, explante floral, estágio de desenvolvimento e ano) na indução e estabelecimento da embriogênese somática. Uma das conclusões que os autores chegaram foi de que a porcentagem de formação de embriões somáticos foi significativamente dependente do genótipo, já que as mais altas frequências de embriogênese foram observadas nas cultivares 'Sultanina', 'Garnacha', 'Chardonnay' e 'Albarino' e as mais baixas taxas de embriogênese somática ocorreram nas cultivares 'Cabernet Sauvignon', 'Tempranillo', 'Muscat Hamburg' e 'Verdejo', independente do meio de indução e da fonte de explante.

Não só a fonte de carboidrato tem grande influência na indução da embriogênese somática, como também sua concentração efetiva. Levando em consideração a concentração dos carboidratos avaliados, para a maltose, o carboidrato em que foi

observado o maior rendimento na produção de embriões somáticos, verificou-se maior número de embriões na concentração de 75 mM seguida da concentração de 37 mM para as cultivares 'Hamlin' e 'Pêra', e 37 mM para a cultivar 'Natal'. Para a lactose, verificou-se maior produção de embriões na concentração de 75 e 110 mM para a cultivar 'Hamlin' e 37 mM para a cultivar 'Pêra'.

As concentrações ótimas de lactose e maltose, que foram os carboidratos que proporcionaram uma maior formação de embriões para as cultivares 'Hamlin' e 'Pêra' estão representados a seguir (Figuras 6 e 7). Para as duas cultivares, o número de embriões somáticos aumentou com o aumento da concentração de maltose até um ponto ótimo, e em seguida esse número de embriões diminuiu. Para a cultivar 'Hamlin' o mesmo foi observado com o aumento da concentração de lactose. Tomaz et al. (2001) avaliando o efeito de fontes de carboidratos e concentrações no estímulo à embriogênese somática de espécies e cultivares cítricas, observaram efeitos opostos para a laranja 'Caipira', em que o número de embriões somáticos decresceu com o aumento na concentração de maltose.



$$Y_{\text{Hamlin - Lactose}} = -282,32 + 15,79X - 0,089X^2 \quad (R^2 = 0,881)$$

$$Y_{\text{Hamlin - Maltose}} = -987,04 - 20,79X + 354,43\sqrt{X} \quad (R^2 = 0,8)$$

Figura 6 – Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta embriogênica de laranja 'Hamlin' aos carboidratos lactose e maltose

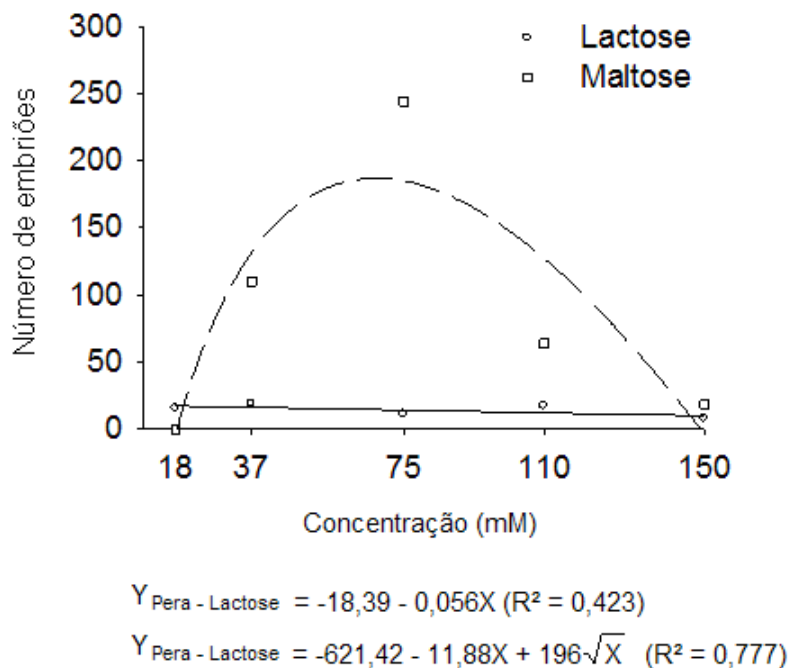


Figura 7 – Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta embriônica de laranja 'Pêra' aos carboidratos lactose e maltose

As demais cultivares, fontes de carboidratos, como a sacarose e concentrações não apresentaram resultados.

O baixo rendimento na formação de embriões, independente das fontes de carboidratos, concentrações e cultivares, pode ser explicado também pela idade do material usado no experimento. Frequentemente essa capacidade embriônica é perdida durante a conservação *in vitro* a longo prazo, o que dificulta aplicações posteriores (PAN et al., 2009). Calos embriogênicos de algumas espécies e de alguns genótipos podem ser subcultivados por longos períodos de tempo em meios de cultura contendo reguladores de crescimento, e ainda podem conservar seu potencial embriogênico, isto é, a capacidade de produzir embriões somáticos maduros capazes de regenerar plantas (Von ARNOLD, 2008). Contudo, quanto mais os calos embriogênicos são subcultivados, maiores são os riscos de aumentar as taxas de variação somaclonal e diminuir o potencial embriogênico acumulado com o prolongamento da cultura é maior (Von ARNOLD, 2008; GEORGE, 2008).



## 5 CONCLUSÕES

A solução enzimática de Grosser e Chandler (1987) modificada, composta de 1% de celulase Onozuka RS e 1% macerase R-10 foi a que proporcionou um maior rendimento no isolamento de protoplastos das cultivares 'Hamlin', 'Natal' e 'Pêra' e a solução enzimática de Grosser e Chandler (1987), composta de 1% de celulase Onozuka RS, 1% macerase R-10 e 0,2% de pectoliase foi a melhor para a cultivar 'Westin'. A cultivar 'Lima Verde' foi a que apresentou menor rendimento no isolamento de protoplastos, demonstrando a influência do genótipo.

A densidade de plaqueamento no cultivo de protoplastos variou entre as cultivares de laranja. Porém para as cultivares 'Hamlin', 'Natal' e 'Lima Verde' verificou-se a formação de um maior número de microcalos (1 a 2 mm de diâmetro) nas densidades de  $3 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>. Para a cultivar 'Westin' um maior número de microcalos foi observado na densidade de  $2 \times 10^5$  e  $10^5$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>. Quanto aos meios de cultura usados no plaqueamento de protoplastos, para as cultivares 'Hamlin' e 'Natal' os meios de cultura BH3 0,7 M e a combinação dos meios BH3 + EME 0,7 M se mostraram eficientes na formação de microcalos, enquanto que para as cultivares 'Lima Verde' e 'Westin', apenas a combinação dos meios de cultura BH3 + EME 0,7 M foram eficientes.

Para a embriogênese somática, a formação de embriões somáticos variou com o genótipo, sendo que as cultivares 'Lima Verde' e 'Westin' apresentaram o menor número de embriões somáticos. As melhores fontes de carboidratos foram a maltose, seguida pela lactose nas concentrações de 37 e 75 mM para a cultivar 'Pêra', 37 mM para a cultivar 'Natal' e 37, 75 e 110 mM para a cultivar 'Hamlin'. O menor rendimento na formação de embriões foi devido à idade dos calos embriogênicos utilizados no experimento.



## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: IAC/Fundag, 2005. p. 127 - 143.
- ASSANI, A.; HAICOUR, R.; WENZEL, G.; FOROUGH-WEHR, B.; BAKRY, F.; COTE, F.X. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration banana and plantain cultivars (*Musa spp*). **Plant Science**, Limerick, v.62, p.162-355, 2002.
- 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.
- 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.
- BINDER, K.A.; WEGNER, L.H.; HEIDECKER, M.; ZIMMERMANN, U. Gating of Cl<sup>-</sup> currents in protoplasts from the marine alga *Valonia utricularis* depends on the transmembrane Cl<sup>-</sup> gradient and is affected by enzymatic cell wall degradation. **Journal of Membrane Biology**, New York, v.191, p.165–178, 2003.
- BLANC, G.; MICHAUX-FERRIÈRE, C.; TEISSON, C.; LARDET, L.; CARRON, M.P. Effects of carbohydrates addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 59, p. 103-112, 1999.
- BOTEON, M. O setor está fortalecendo para enfrentar a crise mundial? Hortifruti Brasil, v.7, n. 75, dez. 2008. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil>. Acesso em: 15 jul. 2009.
- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. 926p.

BOXUS, P.; DAMIANO, C.; BRASSEUR, E. Strawberry. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. v.3, p. 453-486.

BRAYBROOK, S.A.; STONE, S.I.; PARK, S.; BUI, A.Q.; LE, B.H.; FISCHER, R.L.; GOLDBERG, R.B.; HARADA, J.J. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. **Proceedings of National Academy of Science**, Columbia, v.103, p.3468–3473, 2006.

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. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. v. 1, p. 413-458.

CARRA, A.; DE PASQUALE, F.; RICCI, A.; CARIMI, F. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in *Citrus*. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.87, p.41-48, 2006.

CERVELLI, R.; SENARATNA, T. **Economics aspects of somatic embryogenesis**. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Ed.) **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Cultures** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 29–64.

CHAPOT, H. The citrus plant. Citrus Technical Monograph. Ciba-Geigy Agrochemicals, Florida, n. 4, p. 6–13, 1975.

COCKING, E.C. A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles. **Nature**, London, v. 187, p. 927-929, 1960.

COSTA, M.A.P.C. **Hibridação somática em citros com ênfase ao melhoramento de porta-enxertos**. 2001. 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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.

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.

CREPY, L.; BARROS, L.M.G.; VALENTE, V.R.N. Callus production from leaf protoplasts of various cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.5, p.124-126, 1986.

CRISTOFANI, M. **Adaptação de metodologias de cultura de tecidos visando o melhoramento através de indução de mutações em Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pêra.** 1991. 185 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991

CRISTOFANI, M. Uso da cultura de tecidos no melhoramento de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.12, n.2, p.449-453, 1991.

CROCOMO, O. J. Desenvolvimento Histórico e Perspectivas da Cultura de Tecidos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.,; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003. Lavras-MG. **Palestras...**Lavras, 2003. 57p.

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

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

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: IAC/Fundag, 2005, p. 1 – 18.

DOVZHENKO, A.; DAL BOSCO, C.; MEURER, J.; KOOP, H.U. Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in *Arabidopsis thaliana*. **Protoplasma**, Leipzig, v. 222, p.107–111, 2003.

ERIKSON, T.R. Protoplast isolation and culture In: FOWLE, L.C. ; CONSTABEL, F. (Ed.). **Plant protoplasts**. Boca Raton: . CRC Press, 1985. p. 1-20.

EVANS, D.A.; BRAVO, J.E. Protoplast isolation and culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: McMillan Press, 1983.v.1, p.124-176.

FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://faostat.org.br>>. Acesso em: 15 de jul. 2009.

FERNANDO, J. A. **Estudos anatômicos da embriogênese somática *in vitro* em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**.1999. 154p. Dissertação de Mestrado em Agronomia ) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

FIORE, S; DE PASQUALE, F; CARIMI, F.; SAJEVA, M. Effect of 2,4-D e 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and atyle transverse thin cell layers of Citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.68, p.57-63, 2002.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <http://fundecitrus.com.br>.. Acesso em: 16 jul. 2009.

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.

GALUN, E. Plant protoplasts as physiological tools. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford , v. 32, p. 237-266, 1981.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158,1968.

GEORGE, E. J. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E.F.; HALL. M.A.; DE KLERK, G. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008, cap.1, p.1- 28.

GMITTER JUNIOR, F.; MOORE, G. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.6, p.139-147, 1986.

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: Cambridge University Press, 1992. cap, 14, p.335 – 369.

GMITTER, F.G.; LING, X. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped Citrus ovules treated with colchicine. **Journal of American Society of Horticulture Science**, Florida, v.116 p.317–321, 1991.

GMITTER, F.G.; LING, X.B.; CAI, C.Y.; GROSSER, J.W. Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. **Plant Science**, Limerick, v. 74, p.135–141, 1991.

GOLDMAN, M.H.S. **Cultura de tecidos nucleares, isolamento e radiosensitividade de protoplastos *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra**. 127p. 1988. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

GOSAL, S.S.; GILL, M.I.S.; GREWAL, H.S. Somatic embryogenesis in Citrus species. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (Ed.) *Somatic embryogenesis in wood plants*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. v.2, p.1-21.

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

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

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

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. v. 2, p.533-568.

HOLDGATE, D.P. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAY, Y.P.S. (Ed.) **Plant Cell tissue and Organ Culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 18-57.

IBARAKI, Y.; KURATA, K. **Automation of somatic embryo production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 65, p. 179–199, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://ibge.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2009.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: <http://ibraf.org.br>. Acesso em: 21 de jul. 2009.

KAWAHARA, R.; KOMAMINE, A. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**, Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin, 1995. v. 30. p. 30–40,.

KAYIM, M.; KOC, N.K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.109p.29-34, 2006.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999, v. 2, p. 519-531.

KHAN, I.A.; KENDER, W.J. Citrus breeding: introduction and objectives. In: KHAN, I.A (Ed.) **Citrus Genetic, Breeding and Biotechnology**. Oxford: CAB International, 2007, p. 1- 8.

KOCHBA, J.; BUTON, J. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from “Shamounti” orange (*Citrus sisnensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Berlin, v.73, p.415-421, 1974.



KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Stimulation of embryogenesis in citrus tissue culture by galactose. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 65, p. 261–262, 1978.

KOCHBA, J.; SPIEGEL ROY, P. NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis of subcultured nucellar callus of citrus cultivars. **Zeitschrift fur Pflansenphysiologie**, Berlin, v.105, p. 359-368, 1982.

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

KUNITAKE, H.; NAKASHIMA, T.; MORI, K.; TANAKA, M. Normalization of *Asparagus* somatic embryogenesis using a maltose containing medium. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 150, p.458–461, 1997.

KYOZUKA, J., SHIMAMOTO, K.; OGURA, H. Regeneration of plants from rice protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v. 8, p.109-123.

LATADO, R.R. **Hibridação somática entre limão-Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort.)**. 146p. Tese (Doutorado na área de Agronomia ) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

LORENZO, J.C.; GARCÍA, G.; ESCALONA, M.; DAQUINTA, M.A.; CASTILLO, R.; FUNDORA, Z.; BORROTO, C.G. Embriogenesis somatica *in vitro* en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.). **Centro Agrícola**, Valência, v.21, n.3, p.85-91, 1994.

MA, R.; GUO, Y.D.; PULLI, S. Somatic embryogenesis and fertile green plant regeneration from suspension cell-derived protoplasts of rye (*Secale cereale* L). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.22, p.320– 7, 2003.

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. (Ed.) **Citros**. Campinas: IAC/Fundag, 2005. p. 223 – 277.

MASUDA, Y. Auxin-induced cell elongation and cell wall changes. **Botanical Magazine**, London, v.103, p. 345 – 370, 1990.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J. **Hibridação somática entre laranja 'Caipira' e limão-'Cravo'**. 78p. Dissertação (Mestrado na área de Agronomia) – Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.15, n.1, 2001.

MENDES-DA-GLÓRIA, 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.

MOORE, G.A. Factors affecting in vitro embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Florida, v. 110, n.1, p. 66-70, 1985.

MORAES, J.N. **Análise comparativa da embriogênese somática em *Citrus sinensis*, var. Valência, e *Citrus limonia*, var. Limão Cravo**. 2003. 90p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

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

MURASHIGE, T. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, p.17-30, 1977.

NAVARRO, L.; JUAREZ, J. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free Citrus plants. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 78, p.425-434, 1977.

NICOLOSI, E. Origin and taxonomy. In: KHAN, I.A (Ed.) **Citrus genetic, breeding and biotechnology**. Oxford: CAB International, 2007. p. 19- 44.

NIEDZ, R.P.; MCKENDREE, W.I.; SHATTERS JR.; R.G. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and regeneration of transformed plants. **In vitro Cellular Developmental Biology**, New York, v. 39, p. 586-594, 2003.

OCHATT, S.J.; POWER, J.B. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: FOWLER, M.W.; WARREN, G.S.; MOO-YOUNG, M. (Ed.) **Plant Biotechnology**: comprehensive biotechnology. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 99-127.

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

OLIVARES-FUSTER, O.; PENA, L.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. Green fluorescent protein as a visual marker in somatic hybridization. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 491-497, 2002.

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

OLIVEIRA, R.P.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. Determinação de metodologia para isolamento de protoplastos de tangerina 'Cleópatra'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.1, p. 38-42, 1995.

PAN, Z.; GUAN, R.; ZHU, S.; DENG, X. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 28, p.281–289,2009

PANIS, B.; VAN WAVE, A.; SWENNEN, R. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa spp.*). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.12, p. 403-407, 1993.

PASSOS, I.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C. Embryogenic responses of *Vitis* spp: effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. **Vitis**, Geilweilerhof, v. 38, n.2, p. 47-50, 1999.

PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. In: PASQUAL, M. (ed.) **Curso de pós-graduação “lato sensu” (especialização) à distância cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.

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.

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

POWER, J.B.; COCKING, E.C. Isolation of leaf protoplasts : macromolecule uptake and growth substance response. **Journal of Experimental Botany**, Dordrecht , v. 21, p. 64 – 70, 1970.

PREECE, J. Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture.** Dordrecht: Springer, 2008. cap.11, p.403-422.

PRIOLI, L.M.; SONDHAL, M.R. Plant regeneration and recovery of fertile plant from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). **Biotechnology**, Kew ,v. 7, p.589-594, 1989.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.86, p.285-301, 2006.

RAGHAVAN, V. **Molecular embryology of flowering plants.** New York: Cambridge University Press, 1997. p. 452.

RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. **HortScience**, Alexandria, v. 3, n.4, p. 226-227, 1968.

RANGAN, T.; S. Pineapple. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook plant cell culture.**, New York: Macmillan, 1984. v.3 p. 373-382.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. , 900 p.

REINERT, J. Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. **Naturwiss**, Estocolmo, v.45, p. 344–345, 1958.

REZENDE, J.C. **Embriogênese somática indireta em clones de elite de *Coffea arabica* L.** 2008. 103p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

RICCI, A.P. **Embriogênese somática em *Citrus sinensis*, *C. reticulata* e *C. nobilis* x *C. deliciosa*.** Piracicaba, 2001. 59p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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

ROBERTS-OEHLISCHLAGER, S.L.;DUNWELL, J.M.;FAULKS, R. Changes in the sugar content of barley anthers during culture on different carbohydrates. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 22, p. 77–85, 1990.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT: user’s guide. Cary,1997. 1022p.

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES,A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA,1990, 227-249.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: IAC/Fundag, 2005. p. 319 - 341.

SHARP, W.R. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, Westport , v.2, p.268-310,1980.

SHILLITO, R.D.; CARSWELL, G.K.; JOHNSON, C.M.; Di MAIO, J.J.; HARMS, C.T. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. **Biotechnology**, Kew , v. 7, p.581-587, 1989.

SIHACHAKR, D.; DUCREUX, G. Plant regeneration from protoplasts culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 6, p.326-328, 1987.

SONDAHL, M.R.; SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica* L. **Zeitung Pflanzenzuchtung**, Berlin, v. 18, p. 395-408, 1977.

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.

SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Embryogenesis in Citrus tissue culture. In: FIETCHER, A. (Ed.). **Advances en Biochemical Engineering**. Berlin: Springer-Verlang, 1980. p. 27-48.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Citrus. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Mcmillan, 1984. v.3 p. 355-372.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVET, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In vitro Cell, Development Biology**, Amsterdam, v.39, p.450-454, 2003.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; SMITH, J. Growth and organized development of cultured cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, New York, v. 45, p.705–708, 1958.

STRICKLAND, S.G.; NICHOL, J.W.; CALL, C.M.M.; STUART, D.A. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. **Plant Science**, Limerick, v.48, p. 113–121, 1987.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley : University of California Press, 1967. v. 1, p. 190 – 430.

TAKEBE, I.; LABIB, G.; MELCHERS, G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 58, p. 318-320, 1971.

TAKEBE, I.; OTSUKI, Y.; AOKI, S. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 9, p. 115-124, 1968.

TANG, K.; SUN, X.; AN, D.; POWER, J.B.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. A simple and rapid procedure to establish embryogenic cell suspensions as a source of protoplasts for efficient plant regeneration from two Chinese commercial rice cultivars. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, p.149– 153, 2000.

TAO, H.; SHAOLIN, P.; GAOFENG, D.; LANYING, Z.; GENGGUANG, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.69, p.141-146, 2002.

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

THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht :Kluwer, 1995.p. 235.

TIMBÓ, A.L.O. **Obtenção de protoplastos de híbridos triplóides entre capim-elefante e milho**. 2007. 44 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

TOMAZ, M.L. **Embriogênese somática em *Citrus spp.*** 2000. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

TOMAZ, M.L.; MENDES, B.M.J., MOURAO FILHO, F.A.A.; DEMETRIO, C.G.B.; JANSAKUL, N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Somatic embryogenesis in *Citrus spp.*: carbohydrate stimulation and histodifferentiation. **In vitro Cell Development Biology – Plant**, Amsterdam, v.37, p. 446-452, 2001.

TOZATTI, G. Novas tecnologias aperfeiçoam a citricultura. In: FNP Consultoria & Comércio. **Agriannual** 2007: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006.

UCHIMIYA, H.; MURASHIGE, T. Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. **Plant Physiology**, Rockville , v. 57, p. 936-944, 1974.

VARDI, A. Protoplast-derived plants from different *Citrus* species and cultivars. **Proceedings International Society Citriculture**, Florida, v.1, n.1, pp. 149-152, 1981.

VARDI , A.; GALUN, E. Isolation and culture of citrus protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S., (Ed.) **Plant protoplasts and genetic engineering I**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. cap.2/3, p.147-159.

VARDI, A.; GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.37, p.217-230, 1988.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effects of mutagens and regenerations of embryos. **Plant Science Letters**. Limerick, v.4, p.31-36, 1975.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Plant regeneration from Citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 62, p.171–176, 1982.

VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. **Advances in Genetics**, New York, v. 20, p. 127-215, 1979.

VASIL, I.K. Advances in cellular and molecular biology of plants. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Molecular improvement of cereal crops**. Kluwer: Dordrecht, v.5, 1999.

VASIL, I.K. A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Review.*, Amsterdam, v.7, p. 387 – 394, 2007.

VASIL, V.; WANG, D.; VASIL, I.K. Plant regeneration from protoplasts of Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Zeitschrift fur Pflansenphysiologie**, Berlin, v.111, p. 233-239, 1983.



VIDAL, J.R.; RAMA, J.; TABOADA, L.; MARTIN, C.; IBANEZ, M.; SEGURA, A.; GONONZALEZ-BENITO, M.E. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Cult**, cidade, v. 96, p. 85 – 94, 2009.

VITTI, A. Exportações avançam. Hortifruti Brasil, ano 6, n. 63, nov. 2007. disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/hfbrasil>. Acesso em: 14 jul. 2009.

VON ARNOLD, S. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. (Ed.) **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008, cap.9 p.335-354.

WEBBER, H.J. History and development of the Citrus industry. In: Reuther, W.; BATCHELOR, L.D; WEBBER, H.J. (Ed.) **The Citrus Industry**. California: University of California Press, 1967, p. 1–39.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. M. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic groups. **Annals of Botany**, Oxford, v.57, p.443-462, 1986.

YANG, X.; GUO, X.; ZHANG, X.; NIE, Y.; JIN, S. Plant regeneration from *Gossypium davidsonii* protoplasts via somatic embryogenesis. **Biologia Plantarum**, Oxford, v.51, n.3, p.533-537, 2007.

YAMAMOTO, R.; INOUCHE, M.; MASUDA, Y. Galactose inhibition of auxin-induced growth of mono- and dicotyledonous plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.1223 – 1227, 1986.

ZENG, S.H.; CHEN, C.W.; H, L.; L. J.H.; DENG, X.X. In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in Citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, p. 85-93, 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](#)