

CULTURA DE TECIDOS NUCELARES, ISOLAMENTO E RADIOSENSITIVIDADE  
DE PROTOPLASTOS DE Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pera

MARIA HELENA DE SOUZA GOLDMAN

BIOLOGA

ORIENTADOR : Prof. Dr. AKIHIKO ANDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Piracicaba

Estado de São Paulo

Novembro - 1988

Goldman, Maria Helena de Souza  
G619c      Cultura de tecidos nucelares, isolamento e radios  
sensitividade de protoplastos de Citrus sinensis (L.)  
Osbeck cv. Pera.      Piracicaba, 1988.  
127p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ  
Bibliografia.

1. Laranja pera - Cultura de tecido 2. Laranja pera -  
Melhoramento 3. Laranja pera - Protoplasto 4. Protoplas-  
to em laranja pera I. Escola Superior de Agricultura Luiz  
de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.31

CULTURA DE TECIDOS NUCELARES, ISOLAMENTO E RADIOSSENSITIVIDADE  
DE PROTOPLASTOS DE Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pera

MARIA HELENA DE SOUZA GOLDMAN

Aprovado em : 28.11.1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Akihiko Ando

ESALQ/USP

Prof. Dr. Rolf Dieter Illg

UNICAMP

Dr. Marcos Antônio Machado

BIOPLANTA



Prof. Dr. Akihiko Ando

Orientador

Aos meus pais José Carlos e Mara,  
minha irmã Cláudia e a  
minha avó Maria

OFEREÇO

Ao Gustavo querido

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

As seguintes Instituições, pela oportunidade do curso e facilidades no desenvolvimento do trabalho de tese:

- Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP).
- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).
- Estação Experimental de Limeira/Instituto Agronômico de Campinas (IAC).
- Departamento de Botânica da ESALQ-USP.
- Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI-USP).

Pela amizade, incentivo, apoio e colaboração, agradeço imensamente a:

- Dr. Akihiko Ando
- Dr. Rolf Dieter Illg
- Dr. Gerhard Bandel
- Dr. Augusto Tulmann Neto
- Dr. Darcy Martins da Silva
- Professora Beatriz Appezzato
- Pesquisador Luís Pedro Barreto Cid
- Eberson Sanches Calvo
- Gustavo Henrique Goldman
- Claudete de Fátima Ruas
- José Sebastião Cunha Fernandes

- Antônio Costa de Oliveira
- Dr. Maurício Benevides dos Guaranys
- Benedita Inês Possignolo Rodrigues
- Terezinha de Jesus Lodovico Barrete
- Magali Aparecida Rodrigues Machado
- Luis Anselmo Lopes
- Elisabete Aparecida Leoni Rodrigues
- Paulo Cassieri Neto
- José Benedito Alves
- Wlamir de Aguiar Godoy
- Lúcia Cristina Aparecida dos Santos

Ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao João Geraldo Brancalion pelos gráficos e desenhos.

Ao Dr. Toshio Murashige pelas sugestões valiosas.

As funcionárias das bibliotecas do Depto de Genética e do CENA.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XII
RESUMO .....	XIII
SUMMARY .....	XVI
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Melhoramento Genético das Espécies Cítricas .....	4
2.1.1. Métodos Convencionais .....	4
2.1.2. A Importância das Mutações .....	7
2.2. A Cultura de Tecidos nos Citros .....	9
2.2.1. Embriogênese Somática .....	9
2.2.2. Os Sistemas de Protoplastos .....	16
2.2.3. A Mutagênese Associada à Cultura "In Vitro" .....	23
2.2.4. A Seleção "In Vitro" .....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
3.1. Espécie Utilizada .....	32
3.2. Meios de Cultura e Soluções .....	32
3.2.1. Meio MS .....	32
3.2.2. Meio 2MS .....	33
3.2.3. Meio MT .....	33

3.2.4. Meio ZMT .....	34
3.2.5. Meio de Maceração (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984) ..	34
3.2.6. Meio de Lavagem dos Protoplastos (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984) .....	35
3.2.7. Soluções para os Cortes Histológicos .....	35
3.2.7.1. Fixador Carnoy .....	35
3.2.7.2. Série Etanólica .....	35
3.2.7.3. Série Progressiva de Xilol .....	36
3.2.7.4. Adesivo de Haupt .....	36
3.2.7.5. Hematoxilina Férrica de Heidenhein .....	37
3.2.7.6. Corante Safranina .....	37
3.2.7.7. Corante "Fast-green" .....	37
3.2.8. Soluções para a Coloração de Núcleos (KAD, 1982) .....	38
3.2.8.1. Fixador para Protoplastos .....	38
3.2.8.2. Fucsina Carbólica .....	38
3.2.8.3. Fucsina Carbólica Modificada .....	39
3.3. Esterilização .....	39
3.4. Armazenamento dos Frutos .....	39
3.5. Assepsia dos Frutos .....	40
3.6. Preparação dos Explantes .....	40
3.7. Condições de Cultivo .....	40
3.8. Obtenção de Calos Embrionários .....	41
3.9. Verificação dos Efeitos do 2,4-D .....	41
3.10. Cortes Histológicos .....	42



	Página
3.11. O Isolamento de Protoplastos .....	44
3.12. Purificação dos Protoplastos .....	44
3.13. O Uso do Método "Simplex" (LONG, 1969) na Otimização do Isolamento de Protoplastos .....	45
3.14. Avaliação dos Experimentos de Isolamento de Protoplastos .....	47
3.14.1. Rendimento (MURAYAMA, 1987) .....	47
3.14.2. Viabilidade .....	48
3.14.3. Verificação do Número de Núcleos (KAO, 1982) ..	48
3.15. Determinação da Radiossensitividade dos Protoplastos .....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1. Obtenção de Calos Embriogênicos .....	51
4.1.1. O Cultivo de Ovulos .....	54
4.1.2. Cultivo de Nucelos Isolados .....	69
4.1.3. Formação de Calos Embriogênicos e Embriões Secundários .....	71
4.2. Verificação dos Efeitos do 2,4-D .....	78
4.3. Cortes Histológicos .....	82
4.4. Isolamento de Protoplastos .....	88
4.5. Determinação da Radiossensitividade dos Protoplastos .....	101
5. CONCLUSÕES .....	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Calos surgidos nos óvulos, em cultivo por doze semanas, em meio de cultura sem reguladores de crescimento ( x 10 ) .....	73
2 - Embriões nucelares, formados no cultivo de óvulo, rompendo os tegumentos ( x 16 ) .....	73
3 - Pseudobulbilho originando embriões ( x 12 ) ...	74
4 - Plântula gerando embrião na região do hipocótilo e transição para raiz ( x 8 ) ..	74
5 - Proliferação de calos embriogênicos, com formação de embriões (a. x 8 e b. x 12 ) ...	76
6 - Diagrama do desenvolvimento de óvulos e nucelos e da proliferação dos calos embriogênicos ....	79
7 - Sequência de desenvolvimento "in vitro" de plântulas normais de <i>C. sinensis</i> cv. Pera .....	80
8 - Calos formados em meio com 0,5 mg/l de 2,4-D ( x 8 ) .....	80
9 - Corte longitudinal em óvulo recém extraído de fruto de 8 semanas ( x 40 ).....	84
10 - Corte longitudinal em óvulo de fruto de 8 semanas, cultivado por seis semanas. Presença de dois tipos de calos no mesmo óvulo ( x 40 ) ...	84

Figura	Página
11 - Corte longitudinal mostrando a estrutura do calo rígido e seco ( x 100 ) .....	85
12 - Corte longitudinal mostrando a estrutura do calo friável ( x 100 ) .....	85
13 - Corte em calo embriogênico de C.sinensis cv. Pera ( x 100 ) .....	87
14 - Calo embriogênico do cultivar Pera mostrando um aglomerado de proembriões ( x 200 ) .....	87
15 - Liberação de um protoplasto a partir de calos embriogênicos de C.sinensis cv.Pera ( x 1000 ) ..	89
16 - Otimização das condições para a obtenção de protoplastos viáveis de C.sinensis cv. Pera. Evolução do "Simplex" .....	91
17 - Protoplastos isolados em condições otimizadas pelo método "Simplex" ( x 400 ) .....	94
18 - Verificação da viabilidade dos protoplastos com o corante azul de metileno; à esquerda encontra-se o protoplasto viável ( x 400 ) ....	100
19 - Protoplasto uninucleado de C.sinensis cv. Pera ( x 1000 ) .....	100
20 - Curva de sobrevivência de protoplastos de C.sinensis cv. Pera à radiação gama (valores médios de três repetições) .....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 - O isolamento de protoplastos das espécies cítricas .....	20
2 - Valores iniciais das variáveis testadas e os passos correspondentes empregados na construção do "Simplex" .....	46
3 - Medidas dos frutos de <i>Citrus sinensis</i> cv. Pera em diferentes idades .....	52
4 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 6 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo .....	55
5 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 8 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo .....	55
6 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 10 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo .....	56
7 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 12 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo .....	56

## Tabela

## Página

8	- Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 6 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	57
9	- Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 8 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	57
10	- Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 10 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	58
11	- Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 12 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	58
12	- Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de nucelos de frutos de 10 a 12 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo .....	59
13	- Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de nucelos de frutos de 10 a 12 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	59

Tabela	Página
14 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos. Avaliação após quatro semanas de cultivo .....	60
15 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	61
16 - Média dos resultados, expressos em percentagem, encontrados para a presença de embriões. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	62
17 - Média dos resultados, expressos em percentagem, encontrados para a presença de calos embriogênicos. Avaliação após sete meses de cultivo .....	63
18 - Média dos resultados, expressos em percentagem, encontrados para o cultivo de óvulos em meio com 2,4-D. Avaliação após doze semanas de cultivo .....	81
19 - Evolução do "Simplex" para a otimização do isolamento de protoplastos viáveis de <i>C. sinensis</i> cv. Pera .....	90
20 - Valores médios das respostas encontradas para o isolamento de protoplastos com as variáveis otimizadas pelo "Simplex" .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

No decorrer do presente trabalho foram usadas abreviaturas, cujo significado é dado a seguir:

- MS = meio de cultura descrito por MURASHIGE & SKOOG  
(1962)
- ZMS = meio de cultura com o dobro das concentrações  
das vitaminas do meio MS
- MT = meio de cultura descrito por MURASHIGE & TUCKER  
(1969)
- ZMT = meio de cultura com o dobro das concentrações  
das vitaminas do meio MT
- EM = extrato de malte
- NAA = ácido naftaleno acético
- IAA = ácido indol-acético
- 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- GA = ácido giberélico
- <sup>3</sup>  
BAP = benzil aminopurina
- Zip = 2-isopentenil-adenina
- PEG = polietileno glicol
- Gy = Gray (1 Gy = 100 rad)
- LD<sub>50</sub> = dose que causa 50 % de letalidade

CULTURA DE TECIDOS NUCELARES, ISOLAMENTO E  
RADIOSENSITIVIDADE DE PROTOPLASTOS DE  
*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera

Autora: Maria Helena de Souza Goldman

Orientador: Prof.Dr. Akihiko Ando

RESUMO

O longo período de juvenilidade, a alta heterozigosidade, a escassez de conhecimentos sobre o modo de herança de muitas características de interesse, a auto-incompatibilidade, a esterilidade e a embrionia nucelar são sérios obstáculos para os programas de melhoramento das espécies cítricas. Uma abordagem recente para o melhoramento genético é baseada na cultura de tecidos, incluindo o uso de protoplastos, a mutagênese "in vitro" e a seleção "in vitro" de características desejadas.

No presente trabalho, foram estudados os fatores envolvidos na obtenção de calos embriogênicos de *Citrus sinensis* cv. Pera. Foram cultivados nucelos e óvulos extraídos de frutos de diferentes idades após a antese, em quatro diferentes meios de cultura e nas condições de escuro e de luminosidade. Os explantes desenvolveram embrióides e



plântulas, os quais originaram calos embriogênicos a partir da região do hipocótilo. Os núcelos apresentaram as maiores percentagens de formação de calos embriogênicos nas diversas condições de cultivo testadas. O aparecimento e a proliferação dos calos embriogênicos ocorreram em meios de cultura sem hormônios vegetais. O uso do 2,4-D nos meios de cultura resultou na inibição da embriogênese nucelar "in vitro".

Houve o surgimento de calos, sem características embriogênicas, a partir dos tegumentos dos óvulos. Esta observação foi confirmada através de análises histológicas.

Visando determinar as condições ideais para o isolamento de protoplastos viáveis, a partir dos calos embriogênicos, foi utilizado o método "Simplex" de otimização. Este método foi bastante eficaz, tendo aumentado cerca de 15 vezes a produção de protoplastos viáveis. As melhores condições experimentais para o isolamento foram: digestão enzimática por 5 horas, em meio com as enzimas cellulase 307,6 mg/10 ml e macerozyme 30,3 mg/10 ml, e os estabilizadores osmóticos manitol 328,0 mM e sacarose 336,2 mM. A eficiência de isolamento ( $1,2 \times 10^6$  protoplastos viáveis/g), alcançada com as condições experimentais otimizadas, possibilita que os protoplastos venham a ser empregados em programas de melhoramento do cultivar Pera.

Os protoplastos foram submetidos a várias doses de radiação gama 42 horas após o isolamento, para uma

verificação da sensibilidade dos mesmos, tendo sido o valor de LD<sub>50</sub> estimado em torno de 37,5 Gy.

NUCELLAR TISSUE CULTURE, ISOLATION AND RADIOSENSITIVITY OF  
PROTOPLASTS IN *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera

Author: Maria Helena de Souza Goldman

Adviser: Prof. Dr. Akihiko Ando

SUMMARY

There are serious obstacles to the breeding programmes in citrus: prolonged juvenile period, high heterozygosity, scarcity of information about the inheritance of many important characters, self-incompatibility, sterility, and nucellar embryony. A recent approach to the genetic improvement is based on tissue culture, including the use of protoplasts, "in vitro" mutagenesis and "in vitro" selection of desired characters.

In the present work, the factors involved in obtaining embryogenic callus in *Citrus sinensis* cv. Pera were studied. Ovules and nucelli extracted from fruitlets of different ages after anthesis were cultured on four different nutrient media including dark and light conditions. The explants developed embryoids and plantlets, which originated embryogenic callus from the hypocotyl region. Nucelli showed the highest percentages of embryogenic callus formation in all culture conditions tested. Emergence and proliferation of embryogenic callus occurred on nutrient media without hormones. The use of

2,4-D on nutrient media resulted in the inhibition of "in vitro" nucellar embryogenesis.

There was non-embryogenic callus formation from the ovules integuments. This observation was confirmed through histological analysis.

Aiming to determine the ideal conditions to isolate viable protoplasts from embryogenic callus, the "Simplex" optimization method was used. This method was very efficient and increased the production of viable protoplasts about 15 times. The best experimental conditions for the isolation were: enzymatic digestion during 5 hours, on medium containing 307.6 mg/10 ml cellulase and 30.3 mg/10 ml macerozyme, and the osmotic stabilizers 328.0 mM mannitol and 336.2 mM sucrose. The isolation efficiency ( $1.2 \times 10^6$  viable protoplasts/g), reached with the optimized experimental conditions, enables protoplasts utilization in breeding programmes of the cultivar Pera.

In order to verify the radiosensitivity, protoplasts were submitted to several gamma radiation doses 42 hours after isolation and the LD<sub>50</sub> value was estimated around 37.5 Gy.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura de citros é de grande importância econômica para o Brasil, já que o país é o maior produtor mundial e ocupa o primeiro lugar em exportação (FAO, 1987). A laranja é o citros de maior relevância no comércio mundial, tanto para consumo do fruto fresco, como para produtos derivados dos frutos. Os principais cultivares de laranja no mundo são: Navel, Shamouti, Valencia, Hamlin, Pera, Tarocco e Moro (SPIEGEL--ROY & VARDI, 1984), sendo que o cultivar Pera abrange mais de 50 % da área cultivada com citros no Brasil (SALIBE & CEREDA, 1984).

O longo período de juvenilidade, a alta heterozigosidade, a escassez de conhecimentos sobre o modo de herança de muitas características de interesse, a auto-incompatibilidade, a esterilidade e a embrionia nucelar são sérios obstáculos para os programas de melhoramento através dos métodos convencionais (BUTTON & KOCHBA, 1977 e SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984). Uma abordagem recente para o melhoramento genético é baseada na cultura de tecidos, incluindo o uso de protoplastos, a mutagênese "in vitro" e a seleção "in vitro" de características desejadas (EARLE & GRACEN, 1981; EVANS, 1983; NEGRUTIU et alii, 1984; GRIMELIUS, 1988 e DUDITS, 1988).

O termo protoplasto é usado para descrever células livres de parede celular. A ausência de parede celular faz com que os protoplastos sejam úteis para uma variedade de manipulações experimentais e de grande relevância em diversos aspectos da cultura de tecidos vegetais, incluindo pesquisas básicas na área de biologia vegetal (ERIKSSON, 1985). Em adição, o estabelecimento do "sistema de protoplastos" (regeneração de plantas funcionais a partir de protoplastos isolados) possibilita a aplicação de tratamentos mutagênicos em células individualizadas, evitando o quimerismo; a seleção em grande escala, de diversas características desejadas, com economia de espaço, tempo e de recursos; a fusão de protoplastos entre espécies incompatíveis; a transferência de organelas celulares; e o uso das técnicas de engenharia genética.

Apesar dos esforços consideráveis destinados ao desenvolvimento de "sistemas de protoplastos" vegetais, estes só foram bem sucedidos com um número reduzido de gêneros. Entretanto, o gênero Citrus é um dos poucos entre as plantas lenhosas a estar incluído entre os "sistemas de protoplastos" conhecidos (VASIL & VASIL, 1980; OKA & OHYAMA, 1985 e RAD & OSIAS-AKINS, 1985). A sequência completa, desde o isolamento de protoplastos até a regeneração de plantas, já foi obtida para os cultivares Shamouti, Nucellar Shamouti, Shamouti Landau, Trovita e Washington Navel de Citrus sinensis e para outras espécies de Citrus e de gêneros relacionados (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984; OHGAWARA et

alii, 1985; VARDI et alii, 1986b; GROSSER et alii, 1988 e HIDAHA & KAJIURA, 1988). Em todas estas espécies, a regeneração de plantas somente foi conseguida quando os protoplastos foram isolados diretamente de calos embriogênicos ou fusionados com protoplastos derivados dos mesmos.

Considerando os fatos acima expostos, os objetivos do presente trabalho são:

- 1) estudar os fatores envolvidos na obtenção de calos embriogênicos de *Citrus sinensis* cv. Pera ;
- 2) determinar a metodologia para o isolamento de protoplastos viáveis a partir dos calos embriogênicos, e
- 3) verificar a sensibilidade dos protoplastos à radiação gama.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Melhoramento Genético das Espécies Cítricas

#### 2.1.1. Métodos Convencionais

O melhoramento genético vegetal tem como objetivo final o aumento de produção e é realizado através do controle da reprodução, e portanto, da herança. Envolve a seleção dos progenitores e, geralmente, a seleção entre as progêniês resultantes. O melhoramento e a genética estão intimamente relacionados, sendo que uma área pode facilitar o desenvolvimento da outra. A simples seleção para as características desejadas, sem um conhecimento genético ou um controle dos progenitores, pode ser considerada uma forma de melhoramento, embora a auto-polinização e/ou os cruzamentos controlados sejam básicos nestes programas (CAMERON & FROST, 1968).

Os problemas particulares associados ao melhoramento das espécies cítricas são um reflexo da genética e do comportamento reprodutivo das mesmas. A embrionia nucelar, presente em muitas destas espécies, é um mecanismo que limita ou essencialmente impede o cruzamento e a autofecundação. Quando a progênie da primeira geração é obtida, o grau de embrionia nucelar pode ser maior ou menor do que nos progenitores, dependendo do cruzamento. Em adição, diversos cultivares e híbridos em citros possuem



alta esterilidade do pólen e a auto-incompatibilidade, assim como a incompatibilidade cruzada são bastante comuns (CAMERON & FROST, 1968). Por outro lado, a grande diversidade genética, as frequentes variações nos brotos e as amplas relações compatíveis entre as espécies providenciam grande variedade de material para os propósitos de melhoramento (CAMERON & FROST, 1968).

É esperado que a autofecundação e cruzamentos entre indivíduos geneticamente próximos produzam progênes algo similares aos progenitores; entretanto, nas espécies cítricas estas progênes geralmente são fracas ou inferiores. A autofecundação de híbridos F1 com maior heterozigosidade pode ser mais vantajosa no melhoramento, mas não tem sido adequadamente investigada. Por outro lado, indivíduos mostrando características interessantes são comumente usados como progenitores, mas não existe nenhuma garantia que tais características irão aparecer regularmente nos híbridos (CAMERON & FROST, 1968).

As espécies cítricas são alógamas, altamente heterozigotas, e os cultivares têm se mantido inalterados por gerações, pois têm sido propagados vegetativamente. Estas espécies são também caracterizadas por um período juvenil mais ou menos prolongado. A juvenilidade torna-se ainda mais prolongada quando elas são propagadas a partir de sementes - um procedimento necessário quando a hibridação é o método de melhoramento adotado (BUTTON & KOCHBA, 1977).

Em Citrus, a hibridação controlada, assim como

a seleção massal de plântulas de polinização aberta são complicadas e quase impraticáveis pela existência de embriões nucelares nas sementes de muitos cultivares. O melhoramento por hibridação é, portanto, efetivo somente quando o progenitor feminino é monoembriônico ou quando marcadores genéticos estão disponíveis. Por estas razões, muitos cultivares com características desejadas, progenitores em potencial, são inadequados para hibridação (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977a). Outros cultivares possuem um pequeno número ou mesmo nenhuma semente viável em seus frutos, devido ao aborto precoce da semente ou do óvulo, o que impede o seu uso como progenitores de híbridos (BUTTON & KOCHBA, 1977).

Apesar da embrião nucelar em *Citrus* ser um importante obstáculo para a hibridação, é de grande valor na produção de porta-enxertos vigorosos, uniformes e livres de vírus. Neste tipo de melhoramento, o objetivo principal é a produção de porta-enxertos resistentes às doenças, nematóides e possíveis estresses ambientais, como frio, salinidade e seca. Um porta-enxerto bem sucedido deve resultar em longevidade, alta produção e boa qualidade dos frutos nos enxertos. A espécie *Poncirus trifoliata* tem sido empregada nos mais recentes programas de melhoramento de porta-enxertos, pois além de possuir um marcador genético, também possui fatores de resistência a doenças e nematóides, além de tolerância ao frio. A hibridação intergenérica oferece a possibilidade de incorporação de múltiplas

características desejadas, encontradas em gêneros diferentes, no germoplasma de novos porta-enxertos (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984).

A diploidia é a regra geral em Citrus e nos gêneros relacionados, sendo que o número de cromossomos nas células somáticas é  $2n = 18$ . Tetraplóides e triplóides naturais ocorrem em pequenas frequências. Os tetraplóides não têm nenhum valor econômico, crescem lentamente e em geral surgem espontaneamente como plântulas nucelares em todos os cultivares (CAMERON & FROST, 1968 e SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984). Por outro lado, os triplóides aparecem regularmente como plântulas produzidas sexualmente. Podem ser obtidos, de forma sistemática, pelo cruzamento controlado de tetraplóides com diplóides. Apesar do baixo conteúdo, ou mesmo a completa ausência de sementes, somente poucos triplóides adquiriram significância comercial (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984).

### 2.1.2. A Importância das Mutações

Em Citrus, alguns cultivares de laranja, "grapefruit" e limão já tiveram sua variabilidade muito explorada nos programas de melhoramento, e provavelmente estão se aproximando, se é que realmente ainda não alcançaram o limite de seleção. Respostas adicionais à

seleção irá depender em grande parte da indução de variabilidade genética por mutação (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973a).

Muitos dos cultivares mundiais mais importantes de Citrus tiveram origem como mutações espontâneas. Isto justifica a esperança de que novos cultivares possam ser obtidos pelo aumento na incidência de mutações, com agentes mutagênicos tais como radiações ionizantes ou mutagênicos químicos. Entretanto, a mutação é um evento que ocorre em uma célula única. Assim, se esta célula mutada é meristemática, dará origem a uma linhagem celular mutada, enquanto que as células adjacentes permanecerão inalteradas. A mistura de células mutadas e não mutadas (uma quimera) raramente pode ser evitada, quando órgãos multicelulares como sementes ou gemas são submetidos ao tratamento mutagênico. Dependendo do tamanho e da proporção da linhagem celular mutada em um órgão, a expressão fenotípica do caráter mutante é propensa à instabilidade. Além do mais, devido à perda do vigor causada pela mutação, a linhagem celular mutada tende a ser superada pelo tecido normal ou então, nunca vir a se expressar, um fenômeno denominado seleção diplôntica. Processos de seleção recorrente de gemas têm sido destinados a solucionar o quimerismo e a superar a perda de mutações por seleção diplôntica. Estes processos, embora efetivos, são demorados e trabalhosos (BUTTON & KOCHBA, 1977).

Provavelmente, pelas razões expostas, poucos

trabalhos têm sido feitos na indução artificial de alterações genéticas nas espécies cítricas (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973a e SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984). Pode ser citada a obtenção do cultivar Star Ruby, um "grapefruit" altamente colorido e sem sementes, através de irradiação de sementes do cultivar Hudson Red com nêutrons térmicos (HENSZ, 1971). Nos últimos anos, foram publicados alguns trabalhos usando radiação gama para a obtenção de cultivares de citros sem sementes, com resultados positivos (SPIEGEL-ROY et alii, 1985; HEARN, 1986 e WU et alii, 1986); assim como, o uso da radiação gama na regulação da poliembrionia, para favorecer o desenvolvimento do embrião zigótico (WATANABE, 1985). Alguns outros trabalhos também foram realizados na União Soviética, utilizando a radiação gama para o melhoramento de cultivares de Citrus (GOLIADZE, 1985 e KERKADZE, 1985a e b).

## 2.2. A Cultura de Tecidos nos Citros

### 2.2.1. Embriogênese Somática

O cultivo "in vitro" de nucelos isolados, óvulos fertilizados e óvulos não desenvolvidos (não fertilizados ou abortivos) tem sido amplamente realizado, com objetivos diversos, nas espécies cítricas. Estes explantes são os preferidos para os cultivos "in vitro", pois os tecidos nucelares em citros possuem a tendência natural de formação de embriões, além de serem livres de

vírus.

O sucesso no cultivo de embriões isolados, desenvolvendo-se estes em plântulas, foi conseguido pela primeira vez por MAHESHWARI & RANGASWAMY (1958). Neste mesmo ano, RANGASWAMY (1958) relatou o cultivo de tecidos nucelares, de um cultivar poliembriônico, e a obtenção de plântulas. Entretanto, na época da extração, os tecidos nucelares já apresentavam proembriões iniciados "in vivo".

RANGAN et alii (1968 e 1969) foram os primeiros a induzir embriogênese adventícia diretamente de tecidos nucelares extraídos de frutos jovens (100 a 120 dias após a polinização). RANGAN et alii (1969) estudaram o desenvolvimento "in vitro" do embrião zigótico de uma espécie poliembriônica (*Citrus aurantium*), a obtenção de embriões nucelares em espécies monoembriônicas e a influência de alguns complementos do meio de cultura na embriogênese. Estes autores também realizaram estudos histológicos para confirmar a origem nucelar dos embriões das espécies monoembriônicas.

MAHESHWARI & RANGASWAMY (1958) assumiram que somente óvulos fertilizados podiam responder às condições de cultivo. Entretanto, a embriogênese foi induzida em óvulos abortivos (BITTERS et alii, 1970) e em óvulos não fertilizados (BUTTON & BORNMAN, 1971) de um cultivar de laranja sem sementes. BITTERS et alii (1970) verificaram que o período de extração do nucelo poderia ser estendido além

dos 100 a 120 dias após a polinização, e que o período adequado para a extração dependia do cultivar. Observaram também que melhores resultados poderiam ser conseguidos com incrementos, tais como o extrato de malte, no meio de cultura.

KOCHBA et alii (1972) e MITRA & CHATUVERDI (1972) relataram a ocorrência de embriogênese nucelar com o cultivo de óvulos não fertilizados de cultivares com sementes poliembriônicas. KOCHBA et alii (1972) compararam a formação de embriões, a partir do cultivo de óvulos e nucelos extraídos de frutos de diversas idades após a antese. Estes autores (KOCHBA et alii, 1972) realizaram exames histológicos para mostrar que não havia embriões formados nos materiais usados como explantes.

A maioria dos cultivos acima relatados foi feita no meio MS (MURASHIGE & SKODG, 1962) modificado, principalmente no meio MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969). O meio básico MS parece conter os elementos fundamentais para a embriogênese. O extrato de malte (EM) invariavelmente promoveu a embriogênese adventícia em nucelos extraídos de óvulos fertilizados (RANGAN et alii, 1968, 1969 e BITTERS et alii, 1970) e óvulos não fertilizados (BUTTON & BORNMAN, 1971; KOCHBA et alii, 1972 e MITRA & CHATUVERDI, 1972). Existem ainda outras substâncias que promovem a embriogênese em tecidos nucleares. Podem ser citados: a adenina (BUTTON & BORNMAN, 1971); combinações de sulfato de adenina e cinetina (MITRA & CHATUVERDI, 1972); e uma combinação de suco de

Laranja, ácido naftaleno acético (NAA) e sulfato de adenina (RANGAN et alii, 1968 e 1969).

Além da embriogênese adventícia induzida diretamente nos tecidos nucelares, os citros também apresentam embriogênese adventícia indireta, ou seja, o aparecimento de embriões adicionais a partir dos embriões já formados. Muitos dos embriões adicionais surgem na região do hipocótilo dos embriões existentes, e outros se desenvolvem a partir dos pseudobulbilhos ou dos calos associados aos embriões iniciais (MAHESHWARI & RANGASWAMY, 1958; RANGASWAMY, 1958, 1961; SABHARWAL, 1963 e KOCHBA et alii, 1972). O termo pseudobulbilho foi usado, pela primeira vez na cultura "in vitro" de citros, por RANGASWAMY (1958), para designar os corpos esféricos brancos ou amarelados que surgiam a partir dos explantes.

KOCHBA et alii (1972) obtiveram calos com capacidade embriogênica a partir de óvulos e nucelos isolados de *C. sinensis* cv. Shamouti. Calos similares derivados de óvulos de *C. aurantifolia* foram produzidos por MITRA & CHATUVERDI (1972). Estes últimos autores notaram um decréscimo na formação de embriões após subcultivos repetidos dos calos em meio com sulfato de adenina, cinetina e NAA. Entretanto, nos calos embriogênicos do cultivar Shamouti, KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1973) observaram uma capacidade embriogênica contínua, a qual era promovida com extrato de malte, assim como com pequenas quantidades de adenina. Verificaram também que certas proporções de



cinetina/IAA e grandes quantidades de adenina suprimiam a formação de embriões. Os mesmos autores obtiveram plantas normais formadas a partir dos embriões subcultivados em meio básico com ácido giberélico (GA).

A formação de embriões em calos com baixo potencial embriogênico foi fortemente estimulada com o envelhecimento dos calos antes do subcultivo. Uma resposta similar foi observada quando os calos foram mantidos em meio de cultura sem sacarose durante um subcultivo (KOCHBA & BUTTON, 1974). Um estímulo na diferenciação de embriões foi constatado quando os calos foram submetidos à radiação gama (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973b), sendo que em meios de cultura contendo adenina houve uma reversão deste efeito, com a radiação inibindo o crescimento dos calos e a formação de embriões.

As células nucleares em Citrus possuem uma capacidade embriogênica natural e geralmente não necessitam de hormônios para a indução de embriogênese somática. Já foi verificado que a aplicação exógena de auxinas como o ácido indol-acético (IAA), o ácido naftaleno acético (NAA) e o ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D), assim como a de citocininas, tais como cinetina, benzil aminopurina (BAP) e 2-isopentenil-adenina (Zip), suprimem a embriogênese (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977c e SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1980). Por outro lado, a embriogênese somática é estimulada por inibidores da síntese de auxinas (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977c) e por inibidores da síntese de GA (KOCHBA et alii,

1978).

O hábito de crescimento autônomo dos calos de *Citrus* indica que estes possuem um nível adequado de auxina e possivelmente de outros reguladores de crescimento. De uma forma geral, os explantes nucelares ou ovulares de vários cultivares e espécies de *Citrus* tem originado calos embriogênicos no cultivo no meio MS ou MT, sem hormônios, mas com a adição de 500 mg/l de EM (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1973 e VARDI et alii, 1982). Entretanto, em alguns outros cultivares e espécies, para que haja a formação de calos embriogênicos, é necessária a aplicação de hormônios como o 2,4-D (VARDI et alii, 1982).

Os calos embriogênicos convertem rapidamente uma grande quantidade de IAA em aspartato-IAA, considerado como um conjugado estável, enquanto os calos não embriogênicos formam muito pouco aspartato-IAA. Esta capacidade de formar o conjugado provavelmente reduz o nível de auxina, contribuindo para a embriogênese (EPSTEIN et alii, 1977).

KOCHBA et alii (1982a) estudaram o efeito de diversos carboidratos (sacarose, galactose, lactose, glicose e frutose) no crescimento e na embriogênese de calos nucelares de cinco cultivares de *Citrus*. Verificaram que a galactose e a lactose estimularam a embriogênese em todos os calos estudados, enquanto que a sacarose sustentou a embriogênese somente quando em baixas concentrações (8-32 mM). A glicose e a frutose foram muito menos

eficientes no estímulo da embriogênese.

Os efeitos do genótipo e de aditivos de crescimento, na indução da embriogênese em óvulos não desenvolvidos de 17 cultivares poliembrionicos e 5 cultivares monoembrionicos, foram examinados por MOORE (1985). Foram verificadas diferenças quanto à resposta embriogênica, devido ao genótipo, sendo que embriões foram produzidos em 15 dos cultivares poliembrionicos, mas não foram produzidos nos cultivares monoembrionicos. A indução de embriões foi aumentada com a presença de ácido abscísico, baixas concentrações de daminozida (inibidor da síntese de GA) ou altas concentrações de EM (1000 mg/l) (MOORE, 1985).<sup>3</sup> Foram observadas diferenças na percentagem de óvulos responsivos e no número de embriões produzidos entre os cultivares e as condições de cultivo "in vitro". O tratamento mais eficiente na formação de embriões variou entre os cultivares testados (GMITTER & MOORE, 1986).

Estudos de microscopia ótica e eletrônica em calos do cultivar Shamouti mostraram que este tecido compreende pequenos proembriões globulares ou meristemóides em vários estágios de desenvolvimento, sendo carente de tecido parenquimatoso desorganizado. A embriogênese ocorre em células individuais na periferia dos calos e entre os proembriões existentes (BUTTON et alii, 1974). Os proembriões podem aumentar em tamanho, originando os pseudobulbilhos, que raramente se desenvolvem em plântulas, ou podem se desenvolver em embriões maduros e

posteriormente em plântulas.

### 2.2.2. Os Sistemas de Protoplastos

Em 1975, BUTTON & BOTHA mostraram o sucesso na obtenção de embriogênese e regeneração de plantas em células isoladas enzimaticamente a partir de calos embriogênicos de *Citrus sinensis* cv. Shamouti. No mesmo ano, VARDI et alii (1975) relataram o isolamento de protoplastos, e a regeneração de embriões, a partir de calos deste mesmo cultivar. Ambos os trabalhos visavam o desenvolvimento de técnicas que facilitassem o melhoramento genético desta espécie, assim como a produção de mutantes sólidos, ou seja, plantas nas quais todas as células possuem o mesmo genótipo mutante. A regeneração de plantas, a partir dos protoplastos do cultivar Shamouti, foi conseguida e relatada por GALUN et alii (1977) e VARDI (1977). Foram os primeiros relatos de regeneração de plantas a partir de células isoladas e protoplastos em plantas lenhosas.

Uma metodologia para a liberação de protoplastos viáveis a partir de cotilédones, folhas de plântulas e folhas maduras de citros foi desenvolvida por BURGER & HACKETT (1981). Destes, somente os protoplastos derivados dos cotilédones realizaram algumas divisões celulares (BURGER & HACKETT, 1982).

VARDI et alii (1982) estabeleceram o sistema de protoplastos para dois cultivares de laranja (*C. sinensis*

cv. Nucellar Shamouti e cv. Shamouti Landau), três cultivares de *C. reticulata* (cv. Murcott, cv. Dancy e cv. Ponkan), um cultivar de *C. paradisi* (cv. Duncan), um cultivar de limão (*C. limon* cv. Villafranca) e um exemplar de *C. aurantium*. Em todos estes sistemas, os protoplastos foram isolados de calos embriogênicos, sendo que foi verificada uma variabilidade nos requisitos metodológicos entre os diversos cultivares e espécies, principalmente com relação às enzimas de maceração e aos açúcares usados como estabilizadores osmóticos. Assim, foi aberto definitivamente o caminho para os estudos genéticos celulares e para novas abordagens no melhoramento genético das espécies cítricas.

Em 1983, KOBAYASHI et alii relataram a regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de calos embriogênicos de *C. sinensis* cv. Trovita. Posteriormente, estes mesmos autores (KOBAYASHI et alii, 1985) estudaram os efeitos da densidade de protoplastos e da concentração de manitol (estabilizador osmótico) na frequência de embriogênese dos protoplastos deste cultivar.

OHGAWARA et alii (1985) conseguiram obter plantas híbridas pela fusão de protoplastos de *C. sinensis* cv. Trovita e *Poncirus trifoliata*. Neste trabalho, os protoplastos do cultivar Trovita foram isolados de calos embriogênicos, enquanto que os protoplastos de *P. trifoliata* foram isolados de folhas, sendo a fusão realizada através do polietileno glicol (PEG). O caráter híbrido das plantas obtidas foi confirmado através da observação de

características morfológicas, da contagem dos cromossomos e da análise dos fragmentos de DNA ribossômico (restrição com a enzima Eco RI).

VARDI et alii (1986b) estabeleceram o sistema de protoplastos para *Microcitrus*. Este sistema difere dos demais sistemas estabelecidos para *Citrus*, pois os cultivares de *Citrus* eram poliembriônicos e os calos embriogênicos eram derivados do nucelo, enquanto que *Microcitrus* é monoembriônico e os calos embriogênicos usados foram induzidos com hormônios a partir dos embriões zigóticos. Estes autores realizaram fusões entre os protoplastos de *Microcitrus*, usados como doadores, e os protoplastos de diversos cultivares de *Citrus*, usados como receptores, sendo que os presumíveis híbridos estão sendo caracterizados.

Um protocolo eficiente, para o isolamento asséptico de protoplastos foliares de *Citrus* e cultivares ou espécies relacionados, foi desenvolvido por GROSSER & CHANDLER (1987). O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de uma metodologia para a obtenção de protoplastos viáveis, particularmente para cultivares e espécies nos quais ainda não foram conseguidos calos embriogênicos. A fusão de protoplastos foliares, com protoplastos derivados de calos embriogênicos, e a posterior regeneração de plantas ampliam as possibilidades na obtenção de híbridos desejados.

GROSSER et alii (1988), da mesma forma que

OHGAWARA et alii (1985), relataram a produção de híbridos intergenéricos por fusão de protoplastos. Foram usados protoplastos de *C.sinensis* cv. Hamlin, derivados de uma cultura em suspensão de calos embriogênicos, e protoplastos foliares de *P.trifoliata* cv. Flying Dragon. Também neste trabalho, a fusão foi feita com o uso do PEG, sendo que a natureza híbrida das plantas regeneradas foi avaliada pelas características morfológicas, pela contagem dos cromossomos e pelos padrões isoenzimáticos da malato desidrogenase (MDH). A análise através dos padrões isoenzimáticos (GROSSER et alii, 1988) mostrou-se mais simples e tão eficiente quanto a análise dos fragmentos de restrição (OHGAWARA et alii, 1985). Neste trabalho mais recente, os autores realizaram a multiplicação "in vitro" dos híbridos obtidos.

HIDAKA & KAJIURA (1988) conseguiram o isolamento de protoplastos de calos embriogênicos e a regeneração de plantas de *C.yuko*, de *C.reticulata*, e do cultivar Washington Navel de *C.sinensis*. Estudaram os efeitos da densidade de protoplastos, do uso de reguladores de crescimento e do uso de meio de cultura líquido ou sólido na formação de colônias celulares e embriões.

A Tabela 1 apresenta um resumo comparativo das principais condições experimentais do isolamento de protoplastos dos cultivares e/ou espécies cítricas para os quais a regeneração de plantas foi conseguida. Algumas outras condições experimentais foram muito semelhantes na

Tabela 1 - O isolamento de protoplastos das espécies citricas

Espécie e/ou Cultivar	Fonte de Protoplastos	Enzimas Usadas	Estabilizadores Osmóticos	Tempo de Tratamento	Com agitação	Eficiência de Isolamento	Referência
<i>C. sinensis</i> cv. Shamouti	calos embriogênicos	pectinase 1,0 % cellulase R-10 1,0 %	0,14 M sacarose 0,28 M manitol 0,28 M sorbitol	90 a 180 minutos	sim	6-7 10-10 protoplastos.g-1	VARDI et alii, 1975
<i>C. sinensis</i> cv. Nucellar Shamouti e cv. Shamouti Landau	calos embriogênicos	macerozyme 0,3 % ou pectinase 0,3 % cellulase R-10 0,2 % driselase 0,1 %	0,14 M sacarose 0,56 M manitol	durante à noite	não relatada	não relatada	VARDI et alii, 1982
<i>C. reticulata</i> cv. Murcott, cv. Dancy e cv. Ponkan	calos embriogênicos	driselase 0,1 %	0,56 M manitol				
<i>C. paradisi</i> cv. Duncan	calos embriogênicos	macerozyme 0,3 % cellulase R-10 0,2 % driselase 0,1 %	0,70 M Manitol	16 horas	sim	não relatada	KOBAYASHI et alii (1983)
<i>C. limon</i> cv. Villafranca	calos embriogênicos	macerozyme 0,3 % cellulase R-10 0,2 % driselase 0,1 %	0,14 M sacarose 0,56 M manitol	durante à noite	não relatada	não relatada	OHGAWARA et alii (1985)
<i>C. aurantium</i>	folhas de plântulas	macerozyme 0,3 % cellulase R-10 3,0 %	0,60 M manitol	16 horas	sim	não relatada	
<i>Microcitrus</i> sp	calos embriogênicos	macerozyme 0,2 % cellulase R-10 0,3 % driselase 0,1 %	0,35 M sacarose 0,35 M manitol	durante à noite	não relatada	não relatada	VARDI et alii (1986)



Continuação da Tabela 1

Espécie e/ou Cultivar	Fonte de Protoplastos	Enzimas Usadas	Estabilizadores Osmóticos	Tempo de Tratamento	Com agitação	Eficiência de Isolamento	Referência
<b>C. aurantium</b>						3 x 10 <sup>7</sup>	
<b>C. paradisi</b>		macerase 0,4 %	0,55 M manitol			protoplastos . 9-1	
<b>P. trifoliata</b>	folhas	cellulase RS 0,4 % pectolyase Y23 0,08 %	0,09 M sacarose	10-15 horas	sim	5 x 10 <sup>7</sup> protoplastos . 9-1	GROSSER & CHANDLER (1987)
<b>C. sinensis</b>						6 x 10 <sup>7</sup>	
<b>P. trifoliata</b>						protoplastos . 9-1	
<b>P. trifoliata</b>						3 x 10 <sup>7</sup>	
<b>P. trifoliata</b>						protoplastos . 9-1	
<b>Severinia buxifolia</b>	folhas	macerase 0,4 % cellulase RS pectolyase Y23 0,08 %	0,60 manitol 0,09 M sacarose	10-15 horas	sim	4 x 10 <sup>7</sup> protoplastos . 9-1	GROSSER & CHANDLER (1987)
<b>C. sinensis</b>							
cv. Washington Navel	calos embriogênicos	pectolyase Y23 0,01 % cellulase RS 0,33 %	0,09 M sacarose 0,33 M manitol	15 horas	sim	2-8 x 10 <sup>6</sup> protoplastos . 9-1	HIDAKA & KAJIURA (1988)
C. yuko			0,18 M glicose				
<b>C. reticulata</b>							
<b>C. sinensis</b>							
cv. Hamlin	calos embriogênicos em suspensão	macerase 0,22 % cellulase RS 0,22 % pectolyase Y23 0,04 %	0,39 M manitol 0,07 M sacarose	6-16 horas	sim	não relatada	GROSSER et alii (1988)
<b>P. trifoliata</b>							
cv. Flying Dragon	folhas	macerase 0,4 % cellulase RS 0,4 % pectolyase Y23 0,08 %	0,55 M manitol 0,09 M sacarose	10-15 horas	sim	não relatada	

maioria dos trabalhos, como o meio de maceração contendo metade dos macronutrientes do meio MT, o pH dos meios entre 5,6 e 5,8 e a temperatura durante o tratamento enzimático de 25° a 27° C.

Embora diversos autores (VARDI et alii, 1975; BURGER & HACKETT, 1981 e GROSSER & CHANDLER, 1987) tenham feito uso de expressões como protoplastos viáveis, somente BUTTON & BOTHA (1975) apresentaram a aplicação de um método para a avaliação da viabilidade. Estes últimos autores verificaram a viabilidade das células isoladas com o corante azul de metileno.

VARDI et alii (1975) estabeleceram que a molaridade do meio tem um efeito apreciável na viabilidade dos protoplastos e na subsequente capacidade de divisão, sendo que o isolamento foi ótimo a 0,7 M, enquanto que o cultivo foi melhor a 0,6 M.

VARDI et alii (1982) compararam a eficiência de plaqueamento dos protoplastos (número de colônias por placa dividido pelo número de protoplastos viáveis por placa) de diversos cultivares, quando a fonte de enzimas pectinolíticas era a pectinase ou macerozyme. Verificaram que, para a maioria dos cultivares, as melhores eficiências de plaqueamento foram obtidas com o uso de macerozyme.

O estudo do efeito das combinações e concentrações dos estabilizadores osmóticos (sacarose, manitol e sorbitol) usados nos meios de cultivo, sobre a eficiência de plaqueamento dos protoplastos, revelou que alguns cultivares

são muito sensíveis ao sorbitol, apresentando pequenas percentagens de formação de colônias (VARDI et alii, 1982).

Tanto KOBAYASHI et alii (1985), como HIDAKA & KAJIURA (1988), constataram que as maiores frequências de embriogênese são obtidas quando os protoplastos são cultivados em densidades entre  $1,0 \times 10^4$  e  $4,0 \times 10^4$  protoplastos . ml<sup>-1</sup>.

Em todos os sistemas de protoplastos desenvolvidos para as espécies cítricas, os protoplastos isolados foram capazes de se dividir em meios de cultivo sem auxinas, e a regeneração ocorreu via embriogênese somática.

### 2.2.3. A Mutagênese Associada à Cultura "In Vitro"

A mutagênese experimental em plantas de propagação vegetativa é potencialmente útil para os seguintes objetivos: 1) melhorar cultivares selecionados em uma ou poucas características, sem alterar o restante do genótipo; e 2) induzir variabilidade onde esta inexistente ou é difícil de introduzir, como por exemplo em cultivares sexualmente estéreis ou apomíticos (CONSTANTIN, 1984). Entretanto, a perda de mutações, devido a formação de quimeras e a seleção diplôntica, dificulta o uso potencial desta técnica. A aplicação do tratamento mutagênico à célula destinada a originar uma planta pode efetivamente solucionar o problema do quimerismo. Neste sentido, a

mutagênese associada à cultura "in vitro" poderá trazer grandes contribuições. Uma outra vantagem desta associação de técnicas, é o fato de que grandes populações de indivíduos podem ser tratadas com mutagênicos e sujeitas à pressão de seleção sob condições uniformes (CONSTANTIN, 1984). Em adição, por permitir o trabalho com grandes populações, a mutagênese "in vitro" aumenta a probabilidade de se obter mutações dominantes, que são um evento relativamente raro (IAEA, 1985).

Em Citrus, as culturas de óvulos e nucelos isolados podem ter grande importância no melhoramento por mutagênese, pois nestas culturas os embriões se originam de uma única célula, e são capazes de se desenvolver em plantas normais (KOCHBA et alii, 1972 e MITRA & CHATUVERDI, 1972). Neste sentido, PASQUAL et alii (1986) determinaram a radiosensitividade de nucelos de *C. sinensis* cv. Valencia aos raios-gama, visando a obtenção de mutantes não quiméricos.

Contudo, a cultura de óvulos e nucelos contendo embriões parcialmente formados é de pouca utilidade para a mutagênese (BUTTON & KOCHBA, 1977). A irradiação de nucelos indiferenciados foi realizada por SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1973a), mas o baixo número de plantas formadas, combinado com o procedimento tedioso de extração do nucelo, mostrou ser esta abordagem pouco praticável para experimentos em grande escala (BUTTON & KOCHBA, 1977). Por outro lado, de acordo com o esquema de formação dos embriões

nucleares proposto por KOBAYASHI et alii (1978), a indução de mutação teria que ser realizada até 50 dias após a antese. Depois deste período, a célula primordial já teria iniciado suas divisões para originar o embrião nucelar. Este fato limita bastante o fornecimento de material vegetal para a mutagênese.

Uma outra abordagem possível em Citrus é a indução de mutação nos calos embriogênicos. Estes calos podem ser obtidos pelo cultivo de óvulos ou nucelos (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1980) e possuem muitos dos pré-requisitos necessários para o uso na mutagênese. Os embriões que se desenvolvem nestes calos são de origem unicelular (BUTTON et alii, 1974). Os calos são independentes de auxinas e citocininas (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977c) e podem ser mantidos por longos períodos de tempo sem perder a capacidade embriogênica (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1980 e RANGAN, 1984). O estabelecimento de plantas, a partir dos embriões derivados dos calos embriogênicos, pode ser conseguido com a adição de ácido giberélico e sulfato de adenina ao meio de cultura (KOCHBA et alii, 1974 e GMITTER & MOORE, 1986).

No intuito de estabelecer metodologias para a obtenção de mutantes "in vitro", diversos estudos sobre os efeitos de doses e de intensidades de radiação nos calos embriogênicos foram realizados (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973a e b; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1976 e 1977b). Também foram estudados os efeitos, sobre os calos, da irradiação do meio

de cultura com e sem cinetina, ácido indol-acético (IAA) e adenina, assim como os efeitos da irradiação em calos de diferentes idades (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973a e b; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1976 e 1977a). Foi verificado que a embriogênese é estimulada nos calos irradiados com doses entre 120 e 160 Gy de raios-gama (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973b). A idade dos calos modificou a resposta à irradiação com respeito à radiosensitividade e a dose ótima para a embriogênese (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b). A radiação parece diminuir o nível de auxina endógena, sendo que com doses muito altas (300 Gy), as culturas de Citrus sobreviveram após a adição de IAA (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b).

Pelas razões acima expostas, os calos embriogênicos estão sendo bastante usados no melhoramento por mutação. A radiação gama tem sido aplicada a calos embriogênicos para um aumento da variabilidade, com a posterior seleção "in vitro" para tolerância à salinidade (KOCHBA et alii, 1980; BEN-HAYYIM & KOCHBA, 1982; KOCHBA et alii, 1982b) e para tolerância ao herbicida 2,4-D (KOCHBA et alii, 1980 e SPIEGEL-ROY et alii, 1983).

Entretanto, é preciso considerar que os calos embriogênicos contêm, ao mesmo tempo, vários estágios de desenvolvimento, desde células individuais até proembriões (BUTTON et alii, 1974) e que diferentes estágios podem responder diferentemente à irradiação (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b). A composição dos calos muda com a idade dos mesmos

e uma composição menos uniforme é esperada com o aumento da idade. Desta forma, ao se induzir mutação em calos embriogênicos, vários subcultivos de seleção recorrente são necessários, além da análise das plantas regeneradas quanto ao quimerismo.

O uso no melhoramento, de protoplastos submetidos à mutagênese, tem sido sugerido por diversos autores (CAILLLOUX, 1984; CONSTANTIN, 1984; IAEA, 1984, 1985 e 1986). Em *C. sinensis* cv. Shamouti, VARDI et alii (1975) estudaram a sobrevivência de protoplastos ao tratamento com etil metanossulfonato (EMS) e ao tratamento com raios-X, verificando que a embriogênese foi promovida nos calos derivados de protoplastos irradiados. Contudo, trabalhos adicionais fazendo uso da mutagênese em protoplastos de *Citrus* não foram relatados.

A mutagênese em protoplastos constitui o único sistema em que o tratamento mutagênico pode ser aplicado em uma população, relativamente sincronizada, de células isoladas e geneticamente homogêneas, onde existem altas probabilidades na obtenção de mutantes não quiméricos (NEGRUTIU et alii, 1984).

#### 2.2.4. A Seleção "In Vitro"

As condições de cultivo "in vitro" podem ser bastante adequadas para a seleção de diversas

características, e têm sido usadas na seleção para: eficiência na absorção e utilização de nutrientes essenciais; eficiência na fixação e utilização de carbono; resistência aos estresses de temperatura, hídrico e de salinidade; resistência a metais tóxicos, poluentes, herbicidas; e resistência a doenças (INGRAM & MacDONALD, 1986).

A seleção, realizada "in vitro", possibilita a economia de espaço, tempo e de recursos, tanto humanos como financeiros, pois somente as plantas, com chances de possuir a característica desejada, são selecionadas e levadas ao campo. Além disso, as técnicas "in vitro" permitem uma escala de seleção que seria difícil, senão impossível, de alcançar de outras formas. Por exemplo, um melhorista de batata pode selecionar na casa de vegetação ou no campo, perto de 50000 a 100000 plantas por ano para resistência à doença. Por outro lado, 20 milhões de protoplastos, obtidos de apenas 1,0 grama de tecido foliar, podem ser cultivados em um laboratório. Se uma mutação benéfica, tal como resistência à doença, tem uma probabilidade de  $10^{-5}$ , então um mutante poderia ocorrer entre as 100000 plantas. Portanto, teoricamente 200 plantas mutantes poderiam ser obtidas a partir da seleção na cultura de protoplastos de 1,0 grama de tecido (IAER, 1985).

Em Citrus, a seleção "in vitro" tem sido realizada em calos embriogênicos para o isolamento de linhagens celulares tolerantes ao cloreto de sódio (NaCl)



(KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1982). KOCHBA et alii (1980) conseguiram obter calos que mantinham a capacidade embriogênica, mesmo quando cultivados em meios com NaCl 0,2 M. BEN-HAYYIM & KOCHBA (1982) estudaram as características de crescimento e estabilidade da tolerância à salinidade em calos selecionados "in vitro". Observaram que a tolerância ao NaCl se mantinha após transferências consecutivas em meio de cultura sem o agente seletivo, e que portanto, o procedimento de seleção "in vitro" havia isolado variantes genéticas verdadeiros. KOCHBA et alii (1982b) obtiveram diversas linhagens celulares de *C. sinensis* cv. Shamouti e uma linhagem de *C. aurantium* capazes de crescer em NaCl 0,17 M. Estes autores verificaram a estabilidade da característica nas linhagens selecionadas e regeneraram embriões a partir destas, sendo que os mesmos também eram tolerantes à salinidade (KOCHBA et alii, 1982b). Por outro lado, VARDI & SHANI (1984) estabeleceram a correspondência na tolerância à salinidade entre diversos cultivares e espécies de Citrus, e os respectivos protoplastos. Neste caso, os protoplastos derivados de plantas com maior tolerância à salinidade mostraram maiores eficiências de plaqueamento em meios com NaCl, do que os protoplastos de plantas menos tolerantes.

Trabalhos de seleção "in vitro", para a tolerância ao herbicida 2,4-D, têm sido realizados em calos embriogênicos de *C. sinensis* cv. Shamouti (KOCHBA et alii, 1980; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1982 e SPIEGEL-ROY et alii,

1983). Foram selecionadas três linhagens celulares que toleravam concentrações de  $2 \times 10^{-4}$  M de 2,4-D, sendo que uma das linhagens se tornou 2,4-D dependente, ou seja, mantinha sua capacidade embriogênica somente quando cultivada em 2,4-D. A estabilidade da tolerância a este herbicida foi demonstrada (SPIEGEL-ROY et alii, 1983), sendo que destas linhagens tolerantes, foram regenerados embriões que também apresentavam a tolerância.

A seleção "in vitro" para tolerância à estreptomicina já foi efetuada em calos embriogênicos de *C. sinensis*, sendo que a estabilidade da característica nas linhagens celulares selecionadas foi claramente demonstrada (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1982).

Estudos sobre a confiabilidade de um sistema de seleção "in vitro", usando filtrados da cultura de *Phytophthora citrophthora*, foram feitos por VARDI et alii (1986a). Estes autores testaram a seleção, com o filtrado, em calos embriogênicos e em protoplastos de quatro cultivares de diferentes espécies de Citrus. Concluíram que o filtrado do referido patógeno não pode ser usado como agente seletivo, pois não houve correlação entre as respostas das culturas "in vitro" e a susceptibilidade dos respectivos cultivares no campo.

Embora a seleção "in vitro" apresente muitas vantagens em relação à seleção no campo, deve ficar claro que algumas características não podem ser avaliadas "in vitro", como por exemplo, seleção para aumento de produção.

Além disso, a seleção "in vitro" nunca elimina a necessidade da posterior avaliação no campo, mas acarreta uma grande diminuição no número de plantas a serem testadas no campo, aumentando a probabilidade na obtenção de plantas com as características desejadas.

Outro fato que deve ser levado em consideração é que não são sempre os mesmos genes que se expressam em todas as fases do desenvolvimento. Portanto, algumas características que se expressam "in vivo" podem não se expressar "in vitro" e vice-versa, fazendo necessários os estudos de correlação de expressão "in vivo" e "in vitro".

Atualmente, grande ênfase está sendo dada aos testes com as plantas regeneradas, a partir das linhagens celulares selecionadas citadas acima. Entretanto, estes testes são demorados em Citrus, devido principalmente ao longo ciclo de vida destas espécies.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Espécie utilizada:

Os explantes foram retirados de frutos jovens do cultivar Pera premunizada de *Citrus sinensis*, obtidos junto à Estação Experimental de Limeira, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, São Paulo.

#### 3.2. Meios de Cultura e Soluções:

##### 3.2.1. Meio MS

O meio MS, modificado a partir do meio descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962), foi composto de:

##### Macronutrientes:

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	1650 mg/l
KNO <sub>3</sub> .....	1900 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	170 mg/l
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	440 mg/l
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	370 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA .....	37,3 mg/l
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	27,8 mg/l

##### Micronutrientes:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	6,2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O .....	22,3 mg/l

ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O .....	8,6 mg/l
KI .....	0,83 mg/l
Na MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	0,25 mg/l
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O .....	0,025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O .....	0,025 mg/l

Complementos:

Meso-inositol .....	100 mg/l
Ácido nicotínico .....	0,5 mg/l
Piridoxina-HCl .....	0,5 mg/l
Tiamina-HCl .....	0,1 mg/l
Extrato de malte .....	500 mg/l
Sacarose .....	51,34 g/l (0,15 M)
Agar .....	10 g/l

O pH foi ajustado para 5,7 com KOH 0,1 M.

### 3.2.2. Meio ZMS

Foi preparado segundo o item 3.2.1., sendo que foi utilizado o dobro das concentrações dos complementos meso-inositol, ácido nicotínico, piridoxina-HCl e tiamina-HCl. O pH foi ajustado para 5,7 com KOH 0,1 M.

### 3.2.3. Meio MT

Este meio, modificado a partir do meio descrito por MURASHIGE & TUCKER (1969), foi composto pelos mesmos macro e micronutrientes do item 3.2.1., acrescido dos

seguintes complementos:

Meso-inositol .....	100 mg/l
Ácido nicotínico .....	5 mg/l
Piridoxina-HCl .....	10 mg/l
Tiamina-HCl .....	10 mg/l
Extrato de Malte .....	500 mg/l
Sacarose .....	51,34 g/l (0,15 M)
Agar .....	10 g/l

O pH foi ajustado para 5,7 com KOH 0,1 M.

#### 3.2.4. Meio 2MT

Foi preparado segundo o item 3.2.3., sendo que foi utilizado o dobro das concentrações dos complementos meso-inositol, ácido nicotínico, piridoxina HCl e tiamina-HCl. O pH foi ajustado para 5,7 com KOH 0,1 M.

#### 3.2.5. Meio de Maceração (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984)

Este meio consistiu da metade dos macronutrientes descritos no item 3.2.1., os estabilizadores osmóticos sacarose e manitol e as enzimas cellulase ("Dnozuka R-10") e macerozyme ("R-10"). As concentrações dos estabilizadores osmóticos, assim como as concentrações das enzimas usadas em cada experimento foram definidas através do método "Simplex" (item 3.13.).

O pH foi ajustado para 5,7 com KOH 0,1 M e a esterilização foi feita com filtros Sartorius (0,2 micrômetros).

### 3.2.6. Meio de Lavagem dos Protoplastos (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984)

Este meio continha os macro e micronutrientes descritos no item 3.2.1., os complementos meso-inositol, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, tiamina-HCl e extrato de malte nas quantidades do item 3.2.3., e sacarose e manitol, nas mesmas concentrações do meio de maceração de cada experimento.

O pH foi ajustado para 5,7 com KOH 0,1 M.

### 3.2.7. Soluções para os Cortes Histológicos

#### 3.2.7.1. Fixador Carnoy

Este fixador foi preparado, momentos antes do seu uso, com a seguinte proporção:

Alcool etílico .....	3 partes
Ácido acético glacial .....	1 parte

#### 3.2.7.2. Série Etanólica

Tendo como objetivos a desidratação ou a hidratação do material, foi preparada a seguinte série etanólica:

Alcool etílico a 10 %  
 Alcool etílico a 30 %  
 Alcool etílico a 50 %  
 Alcool etílico a 70 %  
 Alcool etílico a 80 %  
 Alcool etílico a 95 %  
 Alcool etílico absoluto

### 3.2.7.3. Série Progressiva de Xilol

A seguinte série de soluções foi preparada a fim de permitir a penetração ou a retirada de parafina dos tecidos:

3 partes de álcool absoluto e 1 parte de xilol  
 2 partes de álcool absoluto e 2 partes de xilol  
 1 parte de álcool absoluto e 3 partes de xilol  
 xilol puro

### 3.2.7.4. Adesivo de Haupt

O adesivo foi usado para manter os cortes aderidos às lâminas, tendo sido preparado como descrito a seguir:

Gelatina em folha .....	1 g
Glicerina .....	15 ml
Fenol .....	2 g
Água destilada .....	100 ml



### 3.2.7.5. Hematoxilina Férrica de Heidenhein

As soluções descritas abaixo foram usadas para promover a coloração das células e permitir as observações ao microscópio:

Mordente:

Sulfato de ferro amoniacal ..... 2 g  
 Agua destilada ..... 100 ml

Corante:

Hematoxilina ..... 1g  
 Alcool absoluto ..... 10 ml  
 Agua destilada ..... até completar  
 200 ml

Esta última solução foi envelhecida por uma semana, antes de ser usada.

### 3.2.7.6. Corante Safranina

O corante safranina foi preparado nas seguintes proporções:

Safranina ..... 2,25 g  
 Alcool 95 % ..... 225 ml  
 Agua destilada ..... 225 ml

### 3.2.7.7. Corante "Fast-green"

Este corante, geralmente usado como complemento do corante safranina, tem a seguinte composição:

"Fast-green" ..... 1 g  
 Alcool etílico 95 % ..... 100 ml

### 3.2.8. Soluções para a Coloração de Núcleos (KAD, 1982)

#### 3.2.8.1. Fixador para Protoplastos

Como os protoplastos vegetais são muito frágeis, foi necessária a preparação do fixador especial apresentado abaixo:

Alcool etílico ..... 56,25 ml  
 Acido acético glacial ..... 18,75 ml  
 Agua destilada ..... 25 ml  
 Sorbitol ..... 3,6 g

#### 3.2.8.2. Fucsina Carbólica

O corante descrito a seguir é adequado para a coloração de núcleos e cromossomos e foi usado para preparar a fucsina carbólica modificada (item 3.2.8.3.):

Solução estoque A:

Fucsina Básica ..... 3 g  
 Alcool etílico ..... 100 ml

Solução Estoque B:

Solução estoque A ..... 10 ml  
 Fenol 5 % em água destilada ..... 90 ml

Solução Corante:

Solução estoque B ..... 45 ml

Acido acético glacial .....	6 ml
Formaldeido 37 % .....	6 ml

A solução corante deve ser envelhecida para permitir uma melhor coloração.

As soluções foram armazenadas em vidros escuros e mantidas a 4 ° C.

### 3.2.8.3. Fucsina Carbólica Modificada

Solução corante (item 3.2.8.2.) .....	2 ml
Acido acético glacial .....	44 ml
Água destilada .....	54 ml
Sorbitol .....	1,8 g

### 3.3. Esterilização

Os meios de cultura, a água destilada, os instrumentos e materiais usados nos experimentos foram esterilizados em autoclave por 17 minutos a 121 ° C, enquanto que as placas de Petri foram esterilizadas em estufa, durante 4 horas a 150 ° C.

### 3.4. Armazenamento dos Frutos

Os frutos coletados foram armazenados em sacos plásticos umedecidos e mantidos a uma temperatura de 10 ° C. Os frutos utilizados nos experimentos permaneceram armazenados por um período máximo de um mês, sem que fosse

afetado o potencial de sobrevivência e embriogênese dos explantes (NAVARRO et alii, 1979).

### 3.5. Assepsia dos Frutos

A assepsia foi realizada a partir da retirada da casca externa dos frutos, inclusive do albedo, e posterior colocação dos mesmos em uma solução composta de uma parte de água sanitária comercial ("Q-BOA" - hipoclorito de sódio 2 %) e de duas partes de água destilada, durante vinte minutos. Em seguida, em condições assépticas, foram feitas três lavagens com água destilada estéril.

### 3.6. Preparação dos Explantes

Os frutos jovens, após a assepsia, foram cortados em condições assépticas, e os óvulos removidos foram colocados em placas de Petri estéreis. Com auxílio de pinça e bisturi e sob estereomicroscópio, através de corte longitudinal no óvulo, foi feita a remoção do nucelo. Tanto os óvulos inteiros como os núclos isolados foram usados para os cultivos.

### 3.7. Condições de Cultivo

Os cultivos foram feitos à temperatura de  $26 \pm 2^{\circ} \text{C}$ , em condição de luminosidade (aproximadamente 1500 lux) e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de

escuro ou em condição de 24 horas de escuro (Incubadora BOD).

As transferências dos explantes para meios frescos (subcultivos) foram realizadas a cada 3-6 semanas.

### 3.8. Obtenção de Calos Embriogênicos

Os frutos jovens, usados para a retirada de explantes, eram de diferentes idades após a antese - 6, 8, 10 e 12 semanas. O cultivo dos dois tipos de explantes (óvulos e nucelos) foi feito nos quatro diferentes meios de cultura descritos nos itens 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3. e 3.2.4., e nas duas condições de luminosidade descritas no item 3.7.

Os experimentos foram montados em esquema fatorial, sendo que para cada combinação dos fatores acima citados foram feitas no mínimo três repetições. Cada repetição foi composta de uma placa de Petri contendo inicialmente 10 explantes.

A primeira avaliação foi realizada quatro semanas após o início do cultivo e, as avaliações posteriores, a cada duas semanas.

### 3.9. Verificação dos Efeitos do 2,4-D

Foram cultivados óvulos, extraídos de frutos de 12 semanas após a antese, em meio ZMS (item 3.2.2.) acrescido de 2,4 D e mantidos no escuro. Foram usadas as concentrações de 0, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/l de 2,4-D.

Foram feitas três repetições de cada tratamento, sendo que cada repetição foi composta de uma placa de Petri contendo inicialmente 10 óvulos. As avaliações foram realizadas como o descrito no item 3.8.

### 3.10. Cortes Histológicos

Os materiais destinados aos cortes foram:

- óvulos recém extraídos de frutos de 8 semanas após a antese;
- óvulos de frutos de 8 semanas, cultivados por 42 dias e apresentando calos; e
- calos embriogênicos obtidos através do cultivo de óvulos.

Estes materiais foram fixados em Carnoy (item 3.2.7.1.) por 24 a 36 horas. Posteriormente, foram desidratados pela série etanólica (item 3.2.7.2.) permanecendo 1 hora em cada etapa, exceto no álcool 95 %, onde foram deixados por 12 a 24 horas. Em seguida, foram passados pela série progressiva do xilol (item 3.2.7.3.) ficando 1 hora em cada etapa.

Após, os materiais foram colocados em pequenos recipientes e cobertos com xilol puro, sendo adicionados fragmentos de parafina até a saturação. Em cada recipiente foi então acrescentado parafina derretida por sobre o material. Os recipientes foram mantidos em estufa a 60 ° C por cerca de 3 horas. Passado este tempo, foi realizada a troca da parafina e novamente, os recipientes foram deixados

na estufa por 3 horas. Ainda foi feita mais uma troca da parafina.

Em seguida, os materiais foram emblocados em parafina, usando-se formas de papel apropriadas e untadas com xilol. Com os blocos de parafina prontos, estes foram fixados ao suporte de madeira e cortados no micrótomo. A espessura dos cortes foi de 10 a 12 micrômetros. Estes foram distendidos sobre lâminas, contendo uma camada fina do adesivo de Haupt (item 3.2.7.4.) e algumas gotas de água destilada, mantidas sobre chapa de aquecimento (50 °C). Após a distensão, o excesso de água foi retirado com papel de filtro, e as lâminas foram deixadas na estufa a 40 °C por pelo menos 12 horas.

As lâminas preparadas foram colocadas em frascos apropriados (frascos de Coplin), onde foram deixadas em xilol puro (desparafinador) por 20 minutos. Logo a seguir, foram passadas rapidamente por uma solução de álcool:xilol (1:1) e pela série etanólica em ordem decrescente de concentração.

Os óvulos com e sem calos foram corados com hematoxilina (item 3.2.7.5.), portanto, as lâminas correspondentes foram passadas por água destilada e deixadas no mordente por 15 minutos. Foram lavadas em água por 3 vezes, tratadas com o corante por 10 minutos e novamente lavadas 3 vezes. O excesso de hematoxilina foi removido com o mordente diluído em água (1:1) e as lâminas foram mais uma vez lavadas.

As lâminas dos calos embriogênicos foram coradas com safranina (item 3.2.7.6.) por 30 minutos, passadas rapidamente pela série etanólica em ordem crescente de concentração, pelo corante "fast-green" (item 3.2.7.7.) e pela série progressiva do xilol. Estas permaneceram no máximo 10 minutos no xilol puro.

Todas as lâminas já coradas foram montadas com Bálamo do Canadá e laminulas, passando por um período de secagem antes das observações ao microscópio.

### 3.11. O Isolamento de Protoplastos

Em cada experimento, foram colocados cerca de 0,5 g de calos embriogênicos em uma placa de Petri de 10 cm. Estes calos foram desmanchados mecanicamente e acrescidos de 10 ml do meio de maceração (item 3.2.5.), para uma incubação no escuro a 26<sup>o</sup> C e sem agitação. O tempo de digestão enzimática, assim como as concentrações das enzimas (cellulase e macerozyme) e dos estabilizadores osmóticos (sacarose e manitol) foram definidos através do método "Simplex" (item 3.13.).

### 3.12. Purificação dos Protoplastos

Após a maceração enzimática, a suspensão de protoplastos foi filtrada através de uma tela metálica (TELASTEM Ltda - SP) com poros de 62 micrômetros. Aos calos remanescentes foram adicionados 5,0 ml de meio de lavagem



(item 3.2.6.), sendo os mesmos comprimidos suavemente com a pinça. A suspensão de protoplastos, assim formada, também foi filtrada pela tela de 62 micrômetros e reunida à suspensão já filtrada. A suspensão de protoplastos completa foi então filtrada em uma outra tela metálica (TELASTEM Ltda - SP) com poros de 37 micrômetros. O filtrado de protoplastos foi centrifugado à 1400 rpm (cerca de 250 x g) durante 3 minutos.

O sobrenadante foi descartado e aos protoplastos precipitados, foram acrescentados 5 ml do meio de lavagem. Os protoplastos foram ressuspensos cuidadosamente com pipeta Pasteur e centrifugados novamente. Este procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, os protoplastos foram ressuspensos em um volume final conhecido de meio de lavagem.

### 3.13. O Uso do Método "Simplex" (LDNG, 1969) na Otimização do Isolamento de Protoplastos

A metodologia usada para o isolamento de protoplastos foi a descrita no item 3.11., sendo que as variáveis consideradas fundamentais para um aumento na eficiência da obtenção de protoplastos viáveis foram: a) tempo de digestão enzimática; b) concentração de celulase; c) concentração de macerozyme; d) molaridade de manitol, e, e) molaridade de sacarose. Portanto, estas foram as variáveis usadas na construção do "Simplex".

Algumas outras variáveis foram pré-fixadas, como: a) o pH 5,7 do meio de maceração; b) digestão enzimática no escuro a 26<sup>o</sup> C e sem agitação; c) composição do meio de maceração (item 3.2.5.); d) proporção de 50 mg de calos para 1,0 ml de meio de maceração; e e) uso de calos embriogênicos de no máximo 30 dias após o subcultivo.

O vértice de partida do "Simplex" e os passos (Tabela 2) foram definidos com base nos resultados apresentados pela literatura de protoplastos de Citrus e de experimentos preliminares realizados. Os demais vértices do

Tabela 2 - Valores iniciais das variáveis testadas e os passos correspondentes empregados na construção do "Simplex"

Variáveis	Vértice de partida (valores)	Passos
Tempo (min)	180	50 %
Cellulase (mg/10 ml do meio)	300,0	5 %
Macerozyme (mg/10 ml do meio)	30,0	20 %
Manitol (M)	0,3	15 %
Sacarose (M)	0,3	15 %

"Simplex" foram estabelecidos segundo LONG (1969), sendo que cada vértice ou tratamento foi definido por um conjunto de valores das variáveis a serem testadas e acima citadas. A evolução do "Simplex", ou seja, o deslocamento das condições experimentais em direção ao ponto ótimo foi feita de acordo com as regras providas pelo algoritmo de Nelder & Mead<sup>1</sup> (1965), citado por DEMING & MORGAN (1973).

As restrições impostas às variáveis testadas foram: a) tempo de digestão enzimática de no máximo 20 horas; b) concentração individual das enzimas de no máximo 3,5 %; e c) molaridade total dos estabilizadores osmóticos de no mínimo 0,3 M e no máximo 0,8 M.

### 3.14. Avaliação dos Experimentos de Isolamento de Protoplastos

#### 3.14.1. Rendimento (MURAYAMA, 1987)

A eficiência da digestão enzimática dos calos embriogênicos foi avaliada através de contagens do número de protoplastos obtidos. Para cada tratamento foram retiradas duas amostras, sendo que para cada amostra foram feitas contagens em 8 campos da câmara de Neubauer. Foi calculada

---

<sup>1</sup>

NELDER, J.A. & MEAD, R. Computer Journal, 7: 308, 1965.

a média do número de protoplastos nos 16 campos, e o rendimento foi expresso como o número de protoplastos por grama de calos embriogênicos.

### 3.14.2. Viabilidade

Para a determinação da viabilidade dos protoplastos, a um volume conhecido foi adicionado o corante azul de metileno para a concentração final de 0,01 % (HODLEY & Mc CARTHY, 1980); e novamente foram feitas contagens como as descritas no item 3.14.1. Assim, com a média dos 16 campos para cada tratamento, foi estabelecida a percentagem de viabilidade.

### 3.14.3. Verificação do Número de Núcleos (KAO, 1982)

Inicialmente, foi feita a fixação dos protoplastos, misturando-se um volume da suspensão dos mesmos com nove volumes do fixador (item 3.2.8.1.). A fixação foi realizada a 5 °C por no mínimo 24 horas e no máximo 2 semanas. Após, foram colocadas duas gotas de protoplastos fixados e uma gota de solução de fucsina carbólica modificada (item 3.2.8.3.) em uma lâmina. Permitiu-se o desenvolvimento da coloração com exposição ao ar por mais de uma hora. Em seguida, foram contados 200 protoplastos e determinadas as percentagens de protoplastos uninucleados e binucleados.

A verificação do número de núcleos só foi

realizada nos protoplastos isolados pelo melhor tratamento definido através do método "Simplex".

### 3.15. Determinação da Radiossensitividade dos Protoplastos

Suspensões de protoplastos numa densidade de aproximadamente  $1,5 \times 10^5$  protoplastos por mililitro, obtidas de acordo com o melhor procedimento para o isolamento de protoplastos (item 3.13.), foram usadas para a realização das curvas de sobrevivência.

Os experimentos para a obtenção da curva de sobrevivência à radiação gama foram realizados 42 horas após o isolamento de protoplastos (GALUN & RAVEH, 1975 e VARDI et alii, 1975), sendo que durante este período, os protoplastos foram mantidos no meio de lavagem, no escuro a  $26^\circ \text{C}$ , sem agitação. No momento da irradiação, a suspensão de protoplastos foi homogeneizada cuidadosamente com pipeta Pasteur, colocando-se 0,5 ml desta suspensão em cada tubo estéril da centrífuga. Foram preparados 5 tubos; 1 deles usado como controle sem irradiação, e os 4 tubos restantes irradiados na fonte de  $\text{Co}^{60}$  do CENA/USP. As doses usadas foram 15, 30, 45 e 60 Gy a uma intensidade de dose de 290 Gy/hora.

Logo após a irradiação, os protoplastos foram centrifugados à 1400 rpm (250 x g) por 3 minutos e foi efetuada a troca do meio. Os mesmos foram corados, 24 horas após a irradiação, com azul de metileno, como descrito no

item 3.14.2., para a determinação da viabilidade. As percentagens de sobrevivência dos protoplastos irradiados foram estabelecidas em relação a sobrevivência do controle, considerada como 100 % .

O experimento para determinar a curva de sobrevivência dos protoplastos à radiação gama foi repetido três vezes, sendo que para cada repetição foi preparada também uma nova suspensão de protoplastos (repetição de todo o procedimento, desde o isolamento de protoplastos).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção de Calos Embriogênicos

Foram retiradas amostras dos frutos coletados 6, 8, 10 e 12 semanas após a antese, para uma determinação das medidas dos frutos nas diferentes idades. Os resultados encontrados estão na Tabela 3.

Os óvulos e nucelos extraídos dos frutos destas idades não apresentavam sinais de diferenciação de embriões, o que concorda com as observações de PASQUAL (1985).

O desenvolvimento dos óvulos e nucelos foi acompanhado e avaliado inicialmente quatro semanas após o começo do cultivo e posteriormente, a cada duas semanas. As respostas dos explantes cultivados puderam ser resumidas em quatro classes: presença de calos, presença de pequena proliferação celular, presença de embriões e ausência de alterações.

Tabela 3 - Medidas dos frutos de *Citrus sinensis* cv. Pera em diferentes idades

Tempo após a antese (semanas)	Medidas dos frutos <sup>a</sup> (mm)
6	11,8±0,3 x 14,0±0,3
8	15,2±0,2 x 19,0±0,3
10	22,8±0,4 x 27,0±0,3
12	29,7±0,6 x 34,1±0,7

<sup>a</sup> média ± erro-padrão



As Tabelas de 4 a 11 mostram os resultados obtidos para o cultivo de óvulos, das quatro idades após a antese, para os quatro meios de cultura e nas duas condições de luminosidade. Nestas tabelas, os resultados foram expressos como a média, dos valores em percentagem, de todas as repetições para cada tratamento. As Tabelas de 4 a 7 correspondem a avaliação após quatro semanas de cultivo, enquanto que as Tabelas de 8 a 11 correspondem a avaliação de doze semanas.

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados do cultivo de nucelos isolados, para os quatro meios de cultura e nas duas condições de luminosidade, relativos às avaliações de quatro e doze semanas, respectivamente. Também nestas tabelas, os resultados foram expressos como a média, dos valores em percentagem, de todas as repetições para cada tratamento. Para o isolamento de nucelos, somente foram usados frutos de 10 a 12 semanas após a antese, devido a impossibilidade de isolar os mesmos, de frutos mais jovens, sem danificá-los.

A Tabela 14 mostra as médias encontradas para a presença de calos e embriões, do cultivo de óvulos avaliado após quatro semanas, enquanto que a Tabela 15 apresenta as mesmas informações para a avaliação após doze semanas. A Tabela 16 inclui as médias obtidas para a presença de embriões, dos cultivos de óvulos e nucelos avaliados após doze semanas, e a Tabela 17 mostra as médias para a presença de calos embriogênicos, numa avaliação após

sete meses de cultivo. Estas quatro últimas tabelas foram organizadas para facilitar uma comparação entre as variáveis testadas com relação aos resultados mais importantes e de interesse.

#### 4.1.1. O Cultivo de Óvulos

Uma análise das Tabelas 14 e 15 permite verificar que: a) parece não haver diferença entre os meios de cultura quanto à formação de calos; b) ocorre uma maior frequência de surgimento de calos em cultivos feitos no escuro; e c) existe uma maior tendência para a formação de calos com o aumento da idade dos frutos usados como fonte de explantes.

A obtenção de calos a partir de óvulos de *Citrus sinensis* cv. Pera, cultivados em meio com hormônios, principalmente com 2,4-D, já havia sido relatado por PASQUAL (1985). Entretanto, o uso deste hormônio em cultura de tecidos tem sido correlacionado com o aparecimento de aberrações cromossômicas (MURASHIGE et alii, 1967; SINGH & HARVEY, 1975; BAYLISS, 1980; VARDI et alii, 1982; SPIEGEL-ROY et alii, 1983; GOULD, 1986; NAGARAJAN & WALTON, 1987 e WAKHLU & BAJWA, 1987). Desta forma, foi necessária a definição de condições que possibilitem a obtenção de calos de *C. sinensis* cv. Pera, evitando a utilização desse hormônio.

Nas condições testadas, conseguiu-se a obtenção de calos em até 88,57 % dos explantes em apenas

Tabela 4 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 6 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	5,90	35,13	0	58,97
2MS	19,43	4,43	0	76,15
MT	14,58	26,68	0	58,75
2MT	17,50	11,93	0	70,58
<b>Luminosidade:</b>				
MS	5,00	6,93	0	88,08
2MS	4,43	2,50	0	93,08
MT	2,50	6,93	0	90,58
2MT	2,50	2,50	0	95,00

Tabela 5 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 8 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	57,80	9,13	0	33,08
2MS	66,90	9,58	0	23,53
MT	54,20	20,80	0	25,00
2MT	62,08	9,18	0	28,75
<b>Luminosidade:</b>				
MS	18,45	6,25	0	75,30
2MS	6,85	11,68	0	81,48
MT	4,58	2,08	0	93,35
2MT	6,08	8,58	0	85,35

Tabela 6 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 10 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	40,00	15,00	0	45,00
2MS	45,00	0	0	55,00
MT	76,20	0	0	23,80
2MT	65,00	5,00	0	30,00
<b>Luminosidade:</b>				
MS	10,55	21,65	0	67,80
2MS	20,55	5,55	0	73,90
MT	15,00	5,00	0	80,00
2MT	25,00	10,00	0	65,00

Tabela 7 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 12 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	71,87	0	0	28,13
2MS	75,67	11,10	0	13,23
MT	88,57	0	0	11,43
2MT	78,53	0	0	21,47
<b>Luminosidade:</b>				
MS	42,57	21,10	0	36,30
2MS	29,60	40,73	0	29,60
MT	19,43	18,97	0	61,60
2MT	44,43	14,07	0	41,47

Tabela 8 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 6 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	31,55	10,00	1,93	58,45
2MS	28,85	7,50	7,70	57,88
MT	26,10	21,67	5,57	49,43
2MT	24,43	14,43	6,35	56,73
<b>Luminosidade:</b>				
MS	9,43	5,00	4,43	81,15
2MS	4,43	10,00	5,30	80,28
MT	9,43	0	7,50	83,08
2MT	5,00	0	11,35	83,65

Tabela 9 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 8 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	69,43	11,40	9,18	19,18
2MS	70,83	12,08	9,18	17,08
MT	65,65	18,10	11,25	11,68
2MT	64,58	9,18	12,28	18,75
<b>Luminosidade:</b>				
MS	37,98	4,58	0	57,43
2MS	21,03	17,65	2,50	58,83
MT	20,38	8,95	9,78	65,90
2MT	24,40	6,08	0	69,53

Tabela 10 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 10 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	50,00	5,00	25,00	35,00
2MS	45,00	5,00	5,00	45,00
MT	76,20	0	11,10	25,40
2MT	70,00	0	5,00	30,00
<b>Luminosidade:</b>				
MS	26,65	10,55	11,10	57,20
2MS	20,55	5,55	5,55	68,35
MT	20,00	5,00	5,00	70,00
2MT	25,00	10,00	15,00	55,00

Tabela 11 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos de frutos de 12 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	71,87	3,33	7,03	21,47
2MS	79,37	11,10	3,70	9,53
MT	88,57	0	3,33	11,43
2MT	78,53	0	0	21,47
<b>Luminosidade:</b>				
MS	45,90	17,77	7,03	36,30
2MS	40,70	25,90	3,70	33,33
MT	23,13	26,83	7,40	46,30
2MT	54,80	7,03	7,03	38,13

Tabela 12 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de nucelos de frutos de 10 a 12 semanas de idade. Avaliação após quatro semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	0	0	22,23	77,77
2MS	0	0	4,77	95,23
MT	0	0	16,63	83,37
2MT	0	0	16,67	83,33
<b>Luminosidade:</b>				
MS	0	0	41,67	58,33
2MS	0	0	0	100,00
MT	0	0	22,20	77,80
2MT	0	0	9,73	90,27

Tabela 13 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de nucelos de frutos de 10 a 12 semanas de idade. Avaliação após doze semanas de cultivo.

Meios de Cultura	Presença de calos	Pequena proliferação celular	Presença de embriões	Ausência de alterações
<b>Escuro:</b>				
MS	0	0	55,57	44,43
2MS	0	0	64,27	35,73
MT	0	0	61,10	38,90
2MT	0	0	66,67	33,33
<b>Luminosidade:</b>				
MS	0	0	69,43	30,57
2MS	0	0	27,00	73,00
MT	0	0	61,13	38,87
2MT	0	0	49,17	50,83

Tabela 14 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos. Avaliação após quatro semanas de cultivo.

		Presença de calos (%)				Presença de embriões (%)			
		Idade dos frutos				Idade dos frutos			
		Tempo após a antese (semanas)				Tempo após a antese (semanas)			
		6	8	10	12	6	8	10	12
<b>Escuro:</b>									
MS		5,90	57,80	40,00	71,87	0	0	0	0
2MS		19,43	66,90	45,00	75,67	0	0	0	0
MT		14,58	54,20	76,20	88,57	0	0	0	0
2MT		17,50	62,08	65,00	78,53	0	0	0	0
<b>Luminosidade:</b>									
MS		5,00	18,45	10,55	42,57	0	0	0	0
2MS		4,43	6,85	20,55	29,60	0	0	0	0
MT		2,50	4,58	15,00	19,43	0	0	0	0
2MT		2,50	6,08	25,00	44,43	0	0	0	0



Tabela 15 - Média dos resultados, expressos em percentagem, do cultivo de óvulos. Avaliação após doze semanas de cultivo.

Presença de calos (%)

Presença de embriões (%)

Idade dos frutos

Idade dos frutos

Tempo após a antese (semanas)

Tempo após a antese (semanas)

6 8 10 12 6 8 10 12

Escuro:

MS	31,55	69,43	50,00	71,87	1,93	9,18	25,00	7,03
2MS	28,85	70,83	45,00	79,37	7,70	9,18	5,00	3,70
MT	26,10	65,65	76,20	88,57	5,57	11,68	11,10	3,33
2MT	24,43	64,58	70,00	78,53	6,35	12,28	5,00	0

Luminosidade:

MS	9,43	37,98	26,65	45,90	4,43	0	11,10	7,03
2MS	4,43	21,03	20,55	40,70	5,30	2,50	5,55	3,70
MT	9,43	20,38	20,00	23,13	7,50	9,78	5,00	7,40
2MT	5,00	24,40	25,00	54,80	11,35	0	15,00	7,03

Tabela 16 - Média dos resultados, expressos em percentagem, encontrados para a presença de embriões.

Avaliação após doze semanas de cultivo.

		Cultivo de Ovulos				Cultivo de Nucleos			
		Idade dos frutos				Idade dos frutos			
		Tempo após a antese (semanas)				Tempo após a antese (semanas)			
		6	8	10	12	6	8	10	12
Escuro:									
MS		1,93	9,18	25,00	7,03				55,57
2MS		7,70	9,18	5,00	3,70				64,27
MT		5,57	11,68	11,10	3,33				61,10
2MT		6,35	12,28	5,00	0				66,67
Luminosidade:									
MS		4,43	0	11,10	7,03				69,43
2MS		5,30	2,50	5,55	3,70				27,00
MT		7,50	9,78	5,00	7,40				61,13
2MT		11,35	0	15,00	7,03				49,17

Tabela 17 - Média dos resultados, expressos em percentagem, encontrados para a presença de calos embriogénicos.  
 Avaliação após sete meses de cultivo.

		Cultivo de Ovulos			Cultivo de Nucelos		
		Idade dos frutos			Idade dos frutos		
		Tempo após a antese (semanas)			Tempo após a antese (semanas)		
		6	8	10	12	10	a 12
ESCURO:							
MS	0	11,25	16,48	5,00	65,85		
2MS	10,57	16,25	5,60	7,14	69,95		
MT	10,00	7,50	11,93	5,00	53,97		
2MT	8,67	7,50	6,03	5,56	64,19		
LUMINOSIDADE:							
MS	2,00	0	8,12	10,00	71,72		
2MS	2,50	4,77	7,86	11,81	34,52		
MT	6,00	7,27	5,47	17,36	63,84		
2MT	12,00	8,15	15,47	5,00	52,86		

quatro semanas de cultivo, com a inoculação de óvulos, extraídos de frutos de 12 semanas, em meio MT e mantidos no escuro. Portanto, fica claro que é viável a obtenção de calos de *C. sinensis* cv. Pera em meio de cultura sem a adição de hormônios vegetais.

Não foram detectadas diferenças entre as eficiências na produção de calos nos quatro meios de cultura testados. Como pode ser verificado nos itens 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3. e 3.2.4., estes meios diferiam apenas nas concentrações de vitaminas, sendo o meio ZMS intermediário entre MS e MT, e o meio ZMT possuindo as mais altas concentrações de vitaminas. Esta comparação foi realizada, pois as diferenças básicas entre o meio MS e o meio MT, este último elaborado especialmente para calos de citros, eram as concentrações aumentadas de tiamina-HCl, piridoxina-HCl e de ácido nicotínico. MURASHIGE & TUCKER (1969) verificaram inclusive que a tiamina-HCl era uma vitamina praticamente essencial e provavelmente a de efeito mais drástico, sendo que nenhum crescimento ocorria em meios sem a mesma. Entretanto, o meio MT foi desenvolvido para a formação e crescimento de calos a partir do albedo e de vesículas de suco de *C. limon* e testado para o crescimento de calos a partir de vesículas de suco de outras quatro espécies de citros, incluindo *C. sinensis*. Os requisitos nutricionais podem variar com o tipo de célula, tecido ou órgão a ser cultivado, além de variar com o cultivar, a espécie e o objetivo específico da investigação. Sendo assim, é

possível que a ausência de diferenças, na formação de calos entre os quatro meios de cultura testados, seja devida: ao fato dos óvulos de *C. sinensis* cv. Pera serem menos exigentes em termos de vitaminas; ou que concentrações elevadas de vitaminas sejam importantes para um maior crescimento dos calos, resposta analisada por MURASHIGE & TUCKER (1969), mas que não interfiram com a frequência de explantes formando calos, resposta analisada no presente trabalho. Uma outra justificativa possível é que, como houve o acréscimo de 500 mg/l de EM em todos os meios de cultura usados, de acordo com o sugerido por RANGAN et alii (1969) e KOCHBA et alii (1972), este tenha suprido as necessidades dos explantes, anulando as diferenças nas concentrações de vitaminas entre os meios testados.

Um requisito nutricional dos tecidos de citros, que deve ser ressaltado, é a concentração relativamente alta de sacarose (5 % ou aproximadamente 150 mM) necessária para sustentar a proliferação dos explantes e o crescimento dos calos (MURASHIGE & TUCKER, 1969). Estes autores, ao comparar seus resultados com o de outros trabalhos, usando concentrações entre 2 e 3 % de sacarose para outras espécies, propuseram que os tecidos de citros devem possuir um metabolismo energético eficiente e acelerado. KOCHBA et alii (1982a) também constataram a necessidade de concentrações em torno de 5 % para o crescimento dos calos, embora para estimular a embriogênese, concentrações mais baixas de sacarose sejam mais adequadas.

O cultivo de óvulos, de uma forma geral, resultou numa maior percentagem de calos quando os óvulos foram mantidos no escuro. É bem nítida a diferença dos resultados dos cultivos no escuro e na luminosidade. Esta diferença deve ter ocorrido, pois a luminosidade tem a capacidade de diminuir os níveis endógenos de auxinas (FELIPPE, 1986), o que dificultaria a formação de calos.

Existem diferenças marcantes entre as eficiências na produção de calos em óvulos de frutos de diferentes idades, sendo que com o aumento da idade dos frutos ocorre um aumento no surgimento de calos. Os óvulos de frutos mais desenvolvidos (maiores idades) devem possuir balanços hormonais internos mais adequados à formação de calos do que os óvulos de frutos mais jovens. Isto está de acordo com o fato de que os óvulos de frutos de 12 semanas apresentaram altas percentagens de calos mesmo quando cultivados na luminosidade (Tabelas 14 e 15).

Por outro lado, os dados encontrados por KOCHBA et alii (1972) para a obtenção de calos, a partir de óvulos de *C. sinensis* cv. Shamouti e cv. Valencia, diferem dos resultados do cultivar Pera acima relatados. No trabalho destes autores, numa avaliação após doze semanas de cultivo para o cultivar Shamouti, os óvulos de frutos de 2, 4 e 5 semanas tiveram uma maior percentagem de culturas desenvolvendo calos do que os óvulos de 6 semanas. No entanto, a percentagem de produção de calos (6%), a partir de óvulos de frutos de 6 semanas deste cultivar, não difere

muito da percentagem de calos (9,43 % - Tabela 8) obtida para óvulos da mesma idade, do cultivar Pera, cultivados e avaliados em condições muito semelhantes. Para o cultivar Valencia, os óvulos de frutos de 6 e de 8 semanas de idade, usados por KOCHBA et alii (1972), não desenvolveram calos. Estas diferenças nas respostas entre óvulos de frutos da mesma idade de diferentes cultivares não é surpreendente, pois como SPIEGEL-ROY & VARDI (1984) afirmaram, para cada cultivar e/ou espécie, o estágio ótimo para a retirada dos explantes, destinados ao desenvolvimento de calos, deve ser determinado separadamente.

Os calos do cultivar Pera, obtidos até a décima segunda semana de cultivo, não demonstraram características embriogênicas, como os calos adequados para o isolamento de protoplastos. Os calos obtidos poderiam ser divididos pela aparência em dois tipos: a) rígidos e secos, e b) friáveis e úmidos. Em alguns casos, houve a formação dos dois tipos de calos no mesmo óvulo. Estes dois tipos de calos eram nitidamente diferentes, sugerindo composições celulares diferentes e, provavelmente, origens a partir de diferentes tecidos.

Uma análise da Tabela 15 permite constatar que a frequência de óvulos gerando embriões, após o cultivo por doze semanas, não é alta e varia bastante entre os diversos tratamentos (0 a 25 %). Aparentemente, os óvulos de frutos de 10 semanas após a antese formam embriões mais eficientemente. KOCHBA et alii (1972) também encontraram

frequências de óvulos desenvolvendo embriões bastante variáveis com a idade dos frutos. Para o cultivar Shamouti, estes autores encontraram resultados desde 0 até 22 %, este último correspondendo aos óvulos extraídos de frutos de 4 semanas. Os cultivares Valencia e Marsh apresentavam óvulos com maior tendência à formação de embriões "in vitro", sendo que para óvulos de 8 semanas, os resultados foram 68 e 48 %, respectivamente (KOCHBA et alii, 1972).

Ao contrário do ocorrido com a formação de calos, não houve influência das condições de cultivo no escuro ou na luminosidade sobre a frequência de óvulos originando embriões. GMITTER & MODRE (1986), trabalhando com óvulos de frutos de 8 meses após a antese, pertencentes a três cultivares de *C. sinensis*, verificaram percentagens ligeiramente aumentadas de óvulos produzindo embriões, quando os mesmos foram cultivados na luz. Entretanto, estes autores encontraram o efeito inverso, ou seja, maiores percentagens em cultivos no escuro, para cinco cultivares de outras espécies de Citrus, sendo que um destes cultivares só se desenvolveu no escuro. Com base nestes resultados, poderia ser proposto que a influência da luz na embriogênese nucelar "in vitro" está relacionada com o genótipo da planta. Assim, alguns genótipos podem ser pouco ou mesmo nada influenciados pela luz, enquanto outros podem ser estimulados ou inibidos quanto à embriogênese.

Não houve diferença nas frequências de formação de embriões entre os meios de cultura testados.



É possível que a concentração de vitaminas não seja um fator limitante da embriogênese e que pequenas quantidades sejam suficientes para o desenvolvimento dos óvulos com potencial embriogênico. Uma outra possibilidade, já apresentada acima, é que o EM tenha suprido as necessidades destes explantes, anulando as diferenças entre os meios.

Os resultados da embriogênese encontrados para o cultivar Pera, variando entre 0 e 25 % dos óvulos, estão de acordo com os resultados de KOCHBA et alii (1972), MOORE (1985) e GMITTER & MOORE (1986) para diversos cultivares e espécies de citros. Por outro lado, resultados entre 50 a 70 % de óvulos sofrendo embriogênese foram conseguidos por STARRANTINO & RUSSO (1980) e GMITTER & MOORE (1986). Através destes trabalhos, foi verificado que as respostas diferem bastante entre os diversos cultivares e espécies de Citrus, com a idade dos frutos usados para a retirada dos explantes e com o tempo transcorrido até a avaliação. Para o cultivar Pera, foi observado que óvulos sem nenhum crescimento prévio, após longos tempos de cultivo, começavam a dar embriões, fato que concorda com as observações de NAVARRO et alii (1979).

#### 4.1.2. Cultivo de Nucleos Isolados

Os nucleos isolados não formaram calos semelhantes aos surgidos nos óvulos, em nenhum dos

tratamentos, durante o mesmo tempo de cultivo (Tabelas 12 e 13). Os nucelos somente resultaram em embriões, fato que concorda com os dados encontrados por KOCHBA et alii (1972), para os cultivares Shamouti e Valencia de *C. sinensis* e Marsh de *C. paradisi*. Estes resultados, associados aos resultados de obtenção de calos com o cultivo de óvulos, sugerem que os calos formados tenham origem a partir de outros tecidos do óvulo, e não origem nucelar. Uma outra possibilidade é que a presença dos outros tecidos, de alguma maneira, como por exemplo o fornecimento de hormônios, estimule a formação dos calos a partir do nucelo.

A Tabela 12 mostra que, com apenas quatro semanas de cultivo, os nucelos já estavam originando embriões. As Tabelas 13 e 16 indicam que, com doze semanas de cultivo, os nucelos já haviam formado embriões, numa média de 57 % dos explantes e portanto, realizando embriogênese muito mais rapidamente e em maiores percentagens do que os óvulos. Por outro lado, da mesma forma que para os óvulos, também para os nucelos as condições de luminosidade e os meios de cultura não interferiram com o aparecimento de embriões.

É possível que as diferenças nas percentagens de embriões entre óvulos e nucelos, na avaliação de doze semanas de cultivo (Tabela 16), sejam devidas a uma dificuldade no deslocamento de nutrientes do meio e na sua atuação nas células do nucelo, criada pela presença dos tegumentos que envolvem o nucelo. Estes tegumentos podem

estar agindo como uma barreira, já que os nutrientes do meio de cultura para atingir as células do nucelo precisam percorrer as células dos tegumentos externo e interno. Entretanto, no estudo realizado por KOCHBA et alii (1972) com o cultivar Shamouti, os núclos praticamente não originaram embriões. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que estes autores trabalharam com frutos variando de 1 a 6 semanas de idade, e como já foi mencionado acima, o isolamento de núclos de frutos muito jovens danifica os explantes, prejudicando o seu desenvolvimento. Já para os núclos de frutos de 8 semanas após a antese, dos cultivares Valencia e Marsh usados por estes autores, ocorreram altas percentagens de culturas desenvolvendo embriões.

#### 4.1.3. Formação de Calos Embriogênicos e Embriões Secundários

As avaliações sequenciadas, realizadas de duas em duas semanas, permitiram o acompanhamento do desenvolvimento e das reações dos explantes. Foi possível verificar que os óvulos inicialmente formavam os calos tegumentares (Figura 1 e item 4.3.) e que depois, começavam a originar embriões nucelares que rompem os tegumentos do óvulo (Figura 2). Este rompimento dos tegumentos causado

pelo crescimento dos embriões também foi encontrado por MOORE (1985). Entretanto, os cultivares e espécies de Citrus usados por este autor não apresentaram proliferação dos tegumentos. O aparecimento de embriões nucelares do cultivar Pera ocorreu tanto nos óvulos com calos (proliferação tegumentar) como nos sem calos. Os nucelos isolados deram embriões diretamente, sendo que o desenvolvimento dos embriões, tanto do cultivo de óvulos como do cultivo de nucelos isolados, ocorreu através das mesmas etapas.

Os embriões globulares se desenvolveram em embriões maduros e posteriormente em plântulas, ou aumentaram em tamanho, dando os chamados pseudobulbilhos. Este modelo de desenvolvimento, observado para o cultivar Pera, está de acordo com os trabalhos de SABHARWAL (1963) com *C. reticulata* e de RANGAN et alii (1969) com várias espécies de Citrus. Por outro lado, este modelo difere do observado por RANGASWAMY (1961) para *C. microcarpa*, onde os nucelos inicialmente formavam calos desorganizados, e posteriormente, sofriam diferenciação originando os pseudobulbilhos e estes, algumas vezes, se desenvolviam em embriões e plantas.

Os pseudobulbilhos do cultivar Pera raramente se desenvolveram em plântulas, sendo que originaram embriões e calos embriogênicos (Figura 3). Em adição, os embriões e plântulas já existentes formaram embriões e calos embriogênicos, a partir da região do hipocótilo e

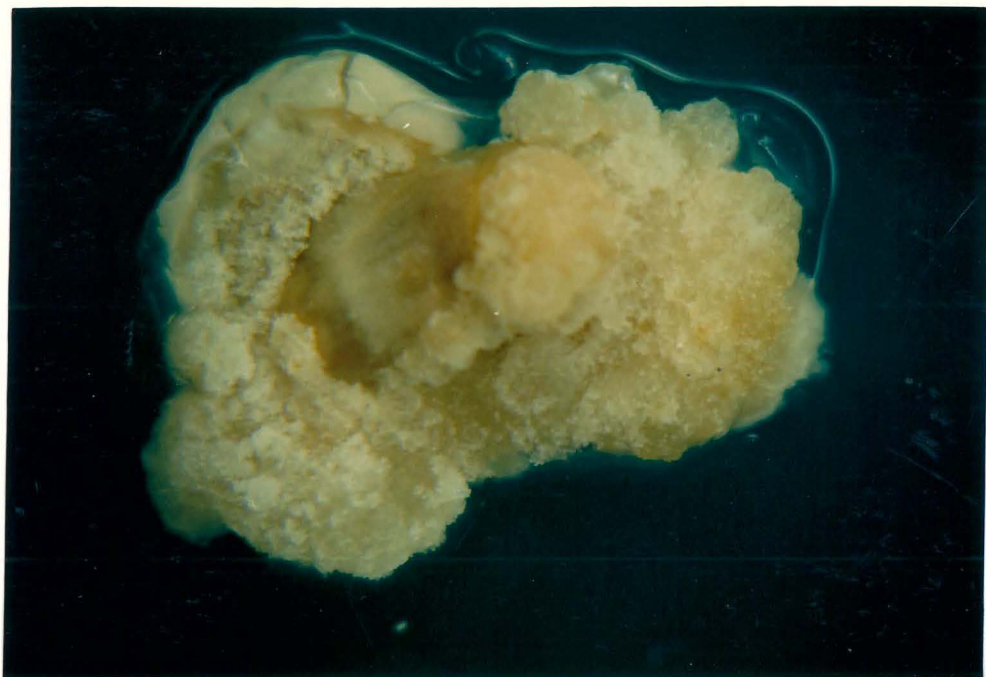


Figura 1 - Calos surgidos nos óvulos, após cultivo por doze semanas, em meio de cultura sem reguladores de crescimento ( x 10 ).

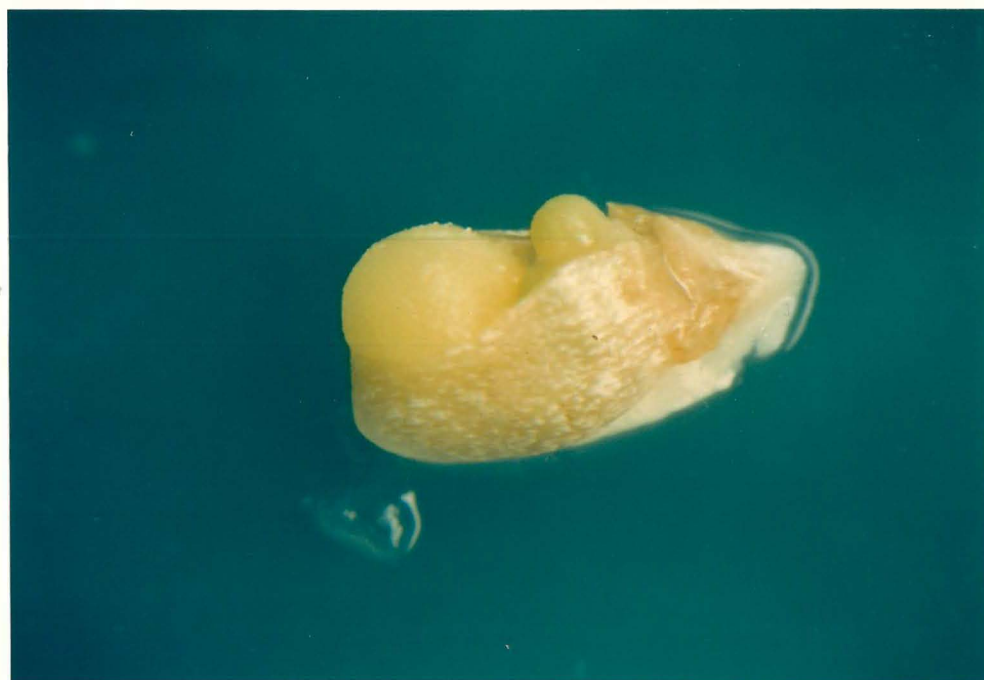


Figura 2 - Embriões nucelares, formados no cultivo de óvulo, rompendo os tegumentos ( x 16 ).

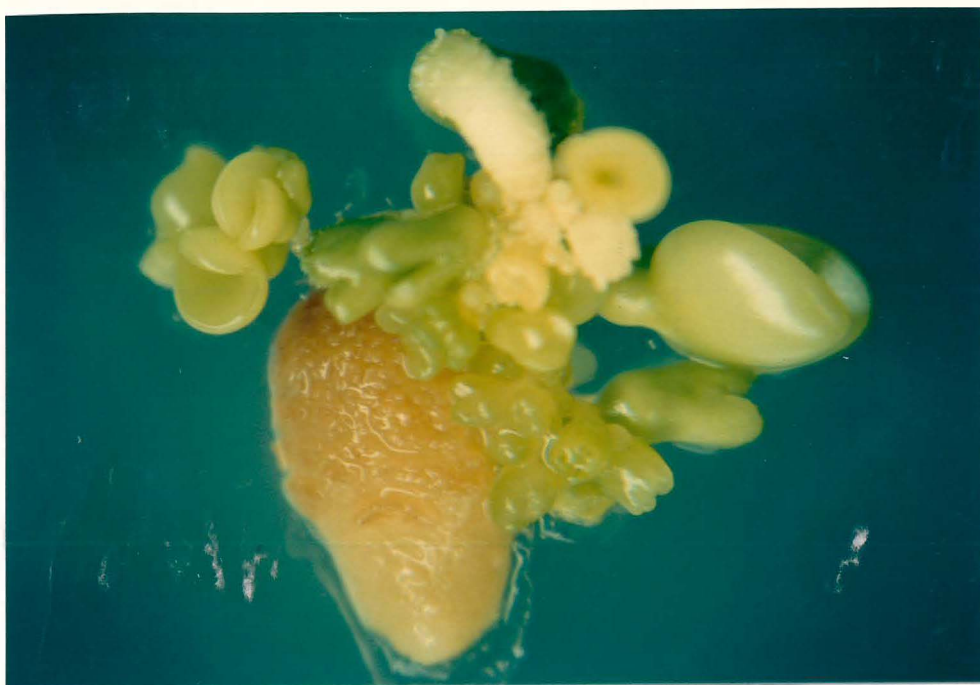


Figura 3 - Pseudobulbilho originando embriões ( x 12 ).

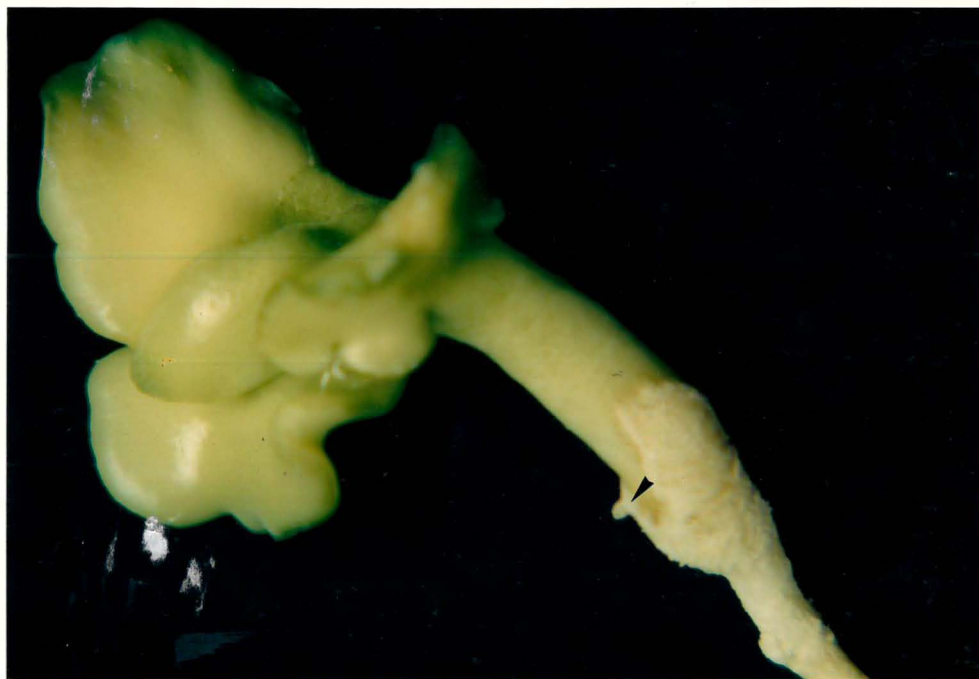
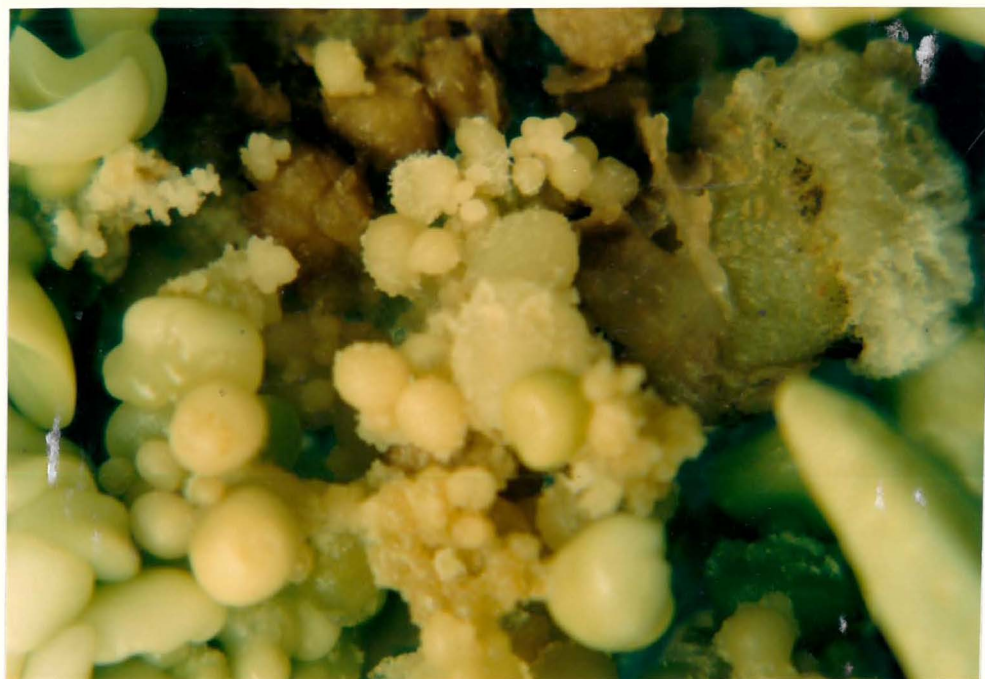


Figura 4 - Plântula gerando embrião na região do hipocótilo e transição para raiz ( x 8 ).

início de transição para raiz (Figura 4). A formação de embriões secundários, ou seja, a partir de outras estruturas que não diretamente do nucelo, já foi relatada por diversos autores (KOCHBA et alii, 1972; MITRA & CHATUVERDI, 1972; BUTTON & KOCHBA, 1977; MOORE, 1985 e GMITTER & MOORE, 1986).

Os calos embriogênicos começaram a surgir em torno de cinco a sete meses após o início do cultivo. Estes calos proliferaram dando mais calos e embriões (Figura 5a e b). A frequência média de explantes apresentando calos embriogênicos, após sete meses de cultivo, pode ser encontrada na Tabela 17. Quanto ao cultivo de óvulos, foi observado que os materiais extraídos de frutos mais desenvolvidos (10 a 12 semanas após a antese) apresentaram frequências ligeiramente mais elevadas de formação de calos embriogênicos. Embora, de uma forma geral, todos os tratamentos do cultivo de óvulos tenham tido baixas percentagens de calos embriogênicos (0 a 17,36 %). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por VARDI et alii (1982). Estes autores trabalharam com diversos cultivares de quatro espécies de Citrus, inclusive com *C.sinensis*, e verificaram que as frequências de óvulos produzindo calos embriogênicos eram variáveis e geralmente baixas (cerca de 24 % para os cultivares Murcott e Ponkan de *C.reticulata* e de 2 % para o cultivar Duncan de *C.paradisi*, representando os mais e menos eficientes). Entretanto, foi constatado que os óvulos do cultivar Pera de *C.sinensis*

a.



b.



Figura 5 - Proliferação de calos embriogênicos, com formação de embriões ( a. x 8 e b. x 12 ).



formam calos embriogênicos muito mais lentamente que outros cultivares. Enquanto VARDI et alii (1982) relataram que o aparecimento destes calos ocorreu após um, dois ou até quatro meses do início do cultivo, no presente trabalho o aparecimento de calos embriogênicos do cultivar Pera efetuou-se cerca de sete meses do começo do cultivo.

Os meios de cultura e as condições de luz ou escuro não afetaram de maneira sistemática a formação de calos embriogênicos, ou seja, os melhores e os piores resultados dentro das quatro idades foram conseguidos em tratamentos diversos. Também os nucelos não foram influenciados diferentemente pelos meios de cultura e as condições de luz ou escuro. Entretanto, os nucelos apresentaram altas percentagens de calos embriogênicos (34,52 a 71,12 % - Tabela 17) quando comparados com os óvulos, em avaliação realizada após o mesmo tempo de cultivo. Isto deve ter ocorrido pois os óvulos possuem uma evolução normalmente mais lenta que a do nucelo, fato este já relatado por NAVARRO et alii (1979). A diferença, na eficiência de formação de calos embriogênicos, entre nucelos e óvulos pode ser contrabalanceada pelo cultivo de grandes quantidades de óvulos, já que o isolamento de nucelos é um processo lento e trabalhoso.

Os calos embriogênicos obtidos continuaram crescendo e desenvolvendo embriões após repetidos subcultivos. Um diagrama do desenvolvimento dos óvulos e nucelos, e da proliferação dos calos embriogênicos do

cultivar Pera, pode ser visto na Figura 6. Este modelo de desenvolvimento é bastante geral em suas diretrizes principais entre os citros (BUTTON & KOCHBA, 1977). Por outro lado, comportamentos ligeiramente divergentes do acima descrito já foram relatados (MOORE, 1985).

O desenvolvimento normal dos embriões "in vitro" até plantas parece ser dependente da luz, pois somente nos cultivos realizados na luminosidade foram obtidas plantas normais (Figura 7), sendo que os cultivos realizados no escuro formaram plântulas anormais com cotilédones fasciados e pseudobulbilhos com raiz. Assim, o início do cultivo dos explantes pode ser realizado no escuro, mas após a formação dos embriões, estes devem ser separados e cultivados na luz para permitir o desenvolvimento de plantas normais.

#### 4.2. Verificação dos Efeitos do 2,4-D

Os resultados encontrados para o cultivo de óvulos, em meios de cultura contendo diferentes concentrações de 2,4-D estão representados na Tabela 18. É possível verificar que o 2,4-D estimulou a formação e o crescimento de calos, sendo que as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/l apresentaram as maiores percentagens de calos grandes. A concentração de 2,0 mg/l exerceu um efeito estimulador menos acentuado do que as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/l. Embora a concentração de 2,0 mg/l de 2,4-D seja

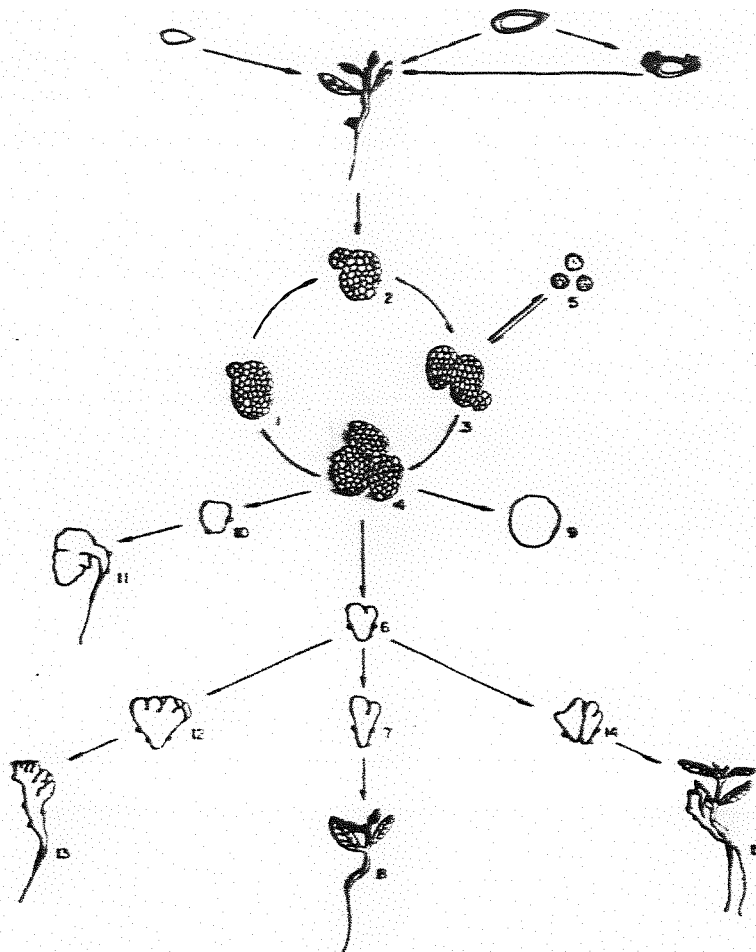


Figura 6 - Diagrama do desenvolvimento de óvulos e nucelos e da proliferação dos calos embriogênicos (1, 2, 3, 4, 1); separação enzimática e regeneração a partir de células isoladas e protoplastos (5); formação de grandes pseudobulbilhos (9), os quais ocasionalmente desenvolvem raiz (10, 11). Plântulas normais (8) se desenvolvem por linhas clássicas a partir de proembriões (4) através de embriões em forma de coração (6, 7). Plântulas fusionadas (6, 14, 15) e anormais com cotilédones fasciados (6, 12, 13) podem também aparecer. Os pequenos nódulos ligados às grandes estruturas representam proembriões surgindo de células superficiais individuais. Seu desenvolvimento subsequente parece não ser influenciado pela estrutura parental (Modificado a partir de BUTTON & KOCHBA, 1977)



Figura 7 - Sequência de desenvolvimento "in vitro" de plântulas normais de *C. sinensis* cv. Pera.

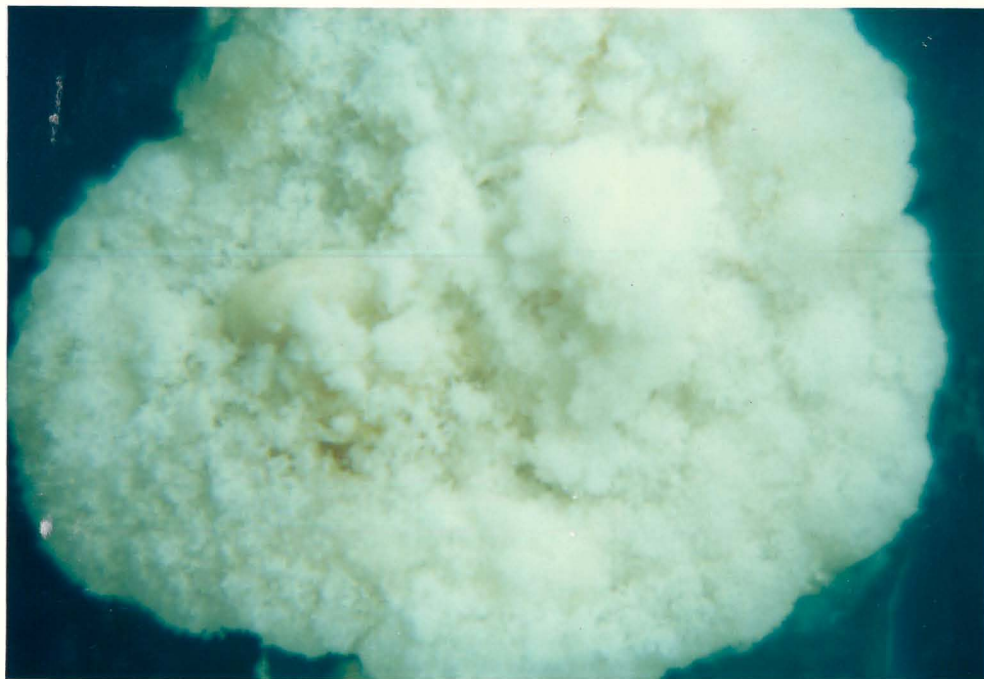


Figura 8 - Calos formados em meio com 0,5 mg/l de 2,4-D (x 8).

Tabela 16 - Média dos resultados, expressos em percentagem, encontrados para o cultivo de óvulos em meios com 2,4-D.

Avaliação após doze semanas de cultivo.

Meio 2MS + 2,4-D (mg/l)	Presença de calos (%)			Presença de embridões (%)	Ausência de alterações (%)
	++a	++b	+++c		
0	73,33	0	0	6,67	20,00
0,5	3,33	26,67	70,00	0	0
1,0	3,33	33,33	63,33	0	0
2,0	17,40	34,07	48,53	0	0

a calos pequenos

b calos médios

c calos grandes

comumente usada em cultura de tecidos de outras espécies, o efeito adverso causado nos óvulos do cultivar Pera não é surpreendente. Diversos autores já haviam relatado a extrema sensibilidade das plantas e dos tecidos de Citrus ao 2,4-D (COGGINS & HIELD, 1968; KOCHBA et alii, 1980 e SPIEGEL-ROY et alii, 1983). Os calos do cultivar Pera, obtidos nos meios acrescidos de 2,4-D, não eram embriogênicos (Figura 8 ). São escassos os relatos de cultivares de Citrus que desenvolveram calos embriogênicos na presença de 2,4-D (VARDI et alii, 1982).

Um outro efeito constatado foi a inibição da embriogênese nos óvulos cultivados em qualquer concentração de 2,4-D. Este resultado está de acordo com o verificado por KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977c), SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1980) e PASQUAL (1985), de que a aplicação exógena de auxinas suprimem a embriogênese nos tecidos nucelares. Em contraposição, GMITTER & MODRE (1986) obtiveram percentagens entre 0 e 54 % de óvulos produzindo embriões, em meio acrescido de 0,01 mg/l de 2,4-D. Estes autores trabalharam com vários cultivares e espécies de Citrus, que diferiram bastante quanto ao efeito do 2,4-D sobre a embriogênese.

#### 4.3. Cortes Histológicos

Os cortes histológicos, realizados como descrito no item 3.10., podem ser visualizados nas Figuras de 9 a 14. A Figura 9 apresenta um corte longitudinal em

óvulo recém extraído de fruto de 8 semanas após a antese. Pode-se verificar que o óvulo do cultivar Pera nesta fase é bem desenvolvido e possui um grande nucelo, sendo que nenhuma formação de embriões zigóticos ou nucelares pode ser detectada. Esta verificação é muito semelhante aos resultados do exame histológico de óvulos da mesma idade de *C. sinensis* cv. Valencia e de *C. paradisi* cv. Marsh (KOCHBA et alii, 1972).

O estudo dos cortes, efetuados nos óvulos cultivados durante 42 dias (Figura 10), comprovou a hipótese que havia sido feita baseada nos resultados dos cultivos de óvulos e nucelos (item 4.1.2.). Realmente, os calos surgidos nos óvulos nos períodos iniciais de cultivo, não têm origem nucelar. Ambos os tipos de calos, já descritos anteriormente, originaram-se dos tegumentos ovulares, sendo que os calos rígidos e secos em geral apareceram na extremidade micropilar, enquanto que os calos friáveis e úmidos geralmente formaram-se na região da calaza. A Figura 11 mostra o calo rígido e seco em maiores detalhes. Este tipo de calo é composto basicamente de células parenquimáticas, estruturadas compactamente e com crescimento amorfo, sendo que o mesmo não apresenta diferenciação. Este calo é muito semelhante, em composição e organização celular, aos calos obtidos por MURASHIGE et alii (1967) a partir do albedo e de vesículas de suco de *C. limon*. A Figura 12 apresenta, em maior aumento, o calo friável e úmido, sendo este composto por células frouxamente

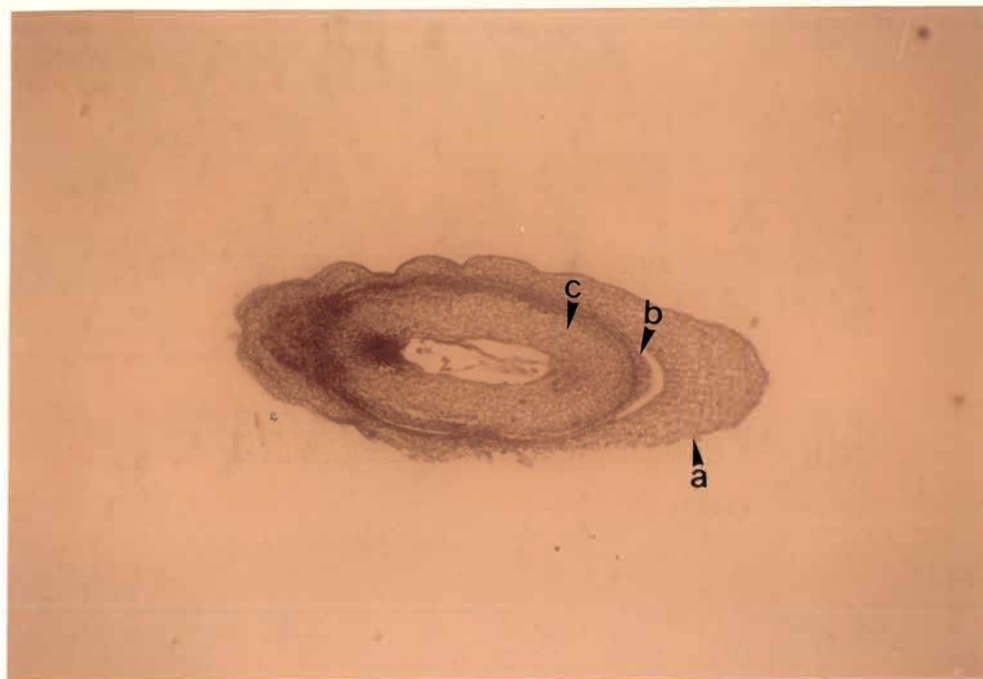


Figura 9 - Corte longitudinal em óvulo recém extraído de fruto de 8 semanas. a) tegumento externo; b) tegumento interno; c) nucelo ( x 40 ).

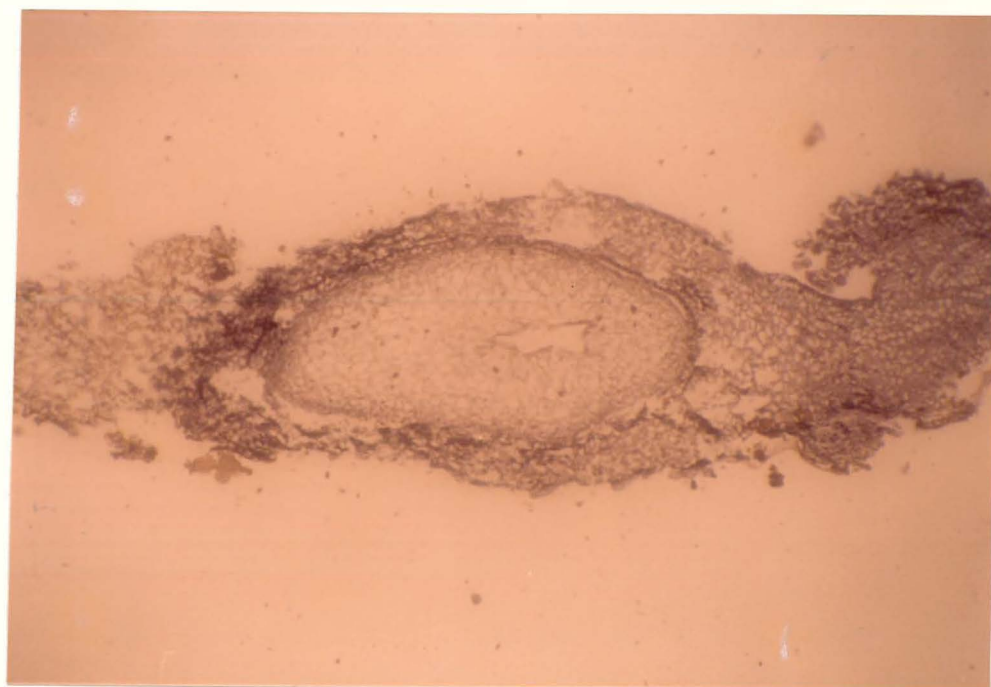


Figura 10 - Corte longitudinal em óvulo de fruto de 8 semanas, cultivado por seis semanas. Presença de dois tipos de calos no mesmo óvulo ( x 40 ).



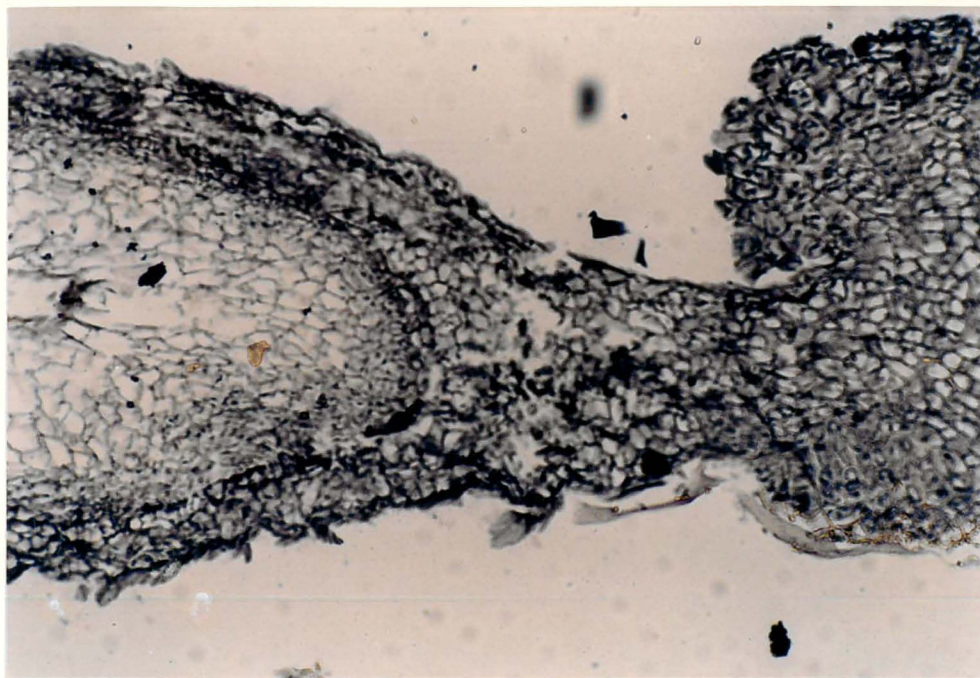


Figura 11 - Corte longitudinal mostrando a estrutura do calo rígido e seco ( x 100 ).

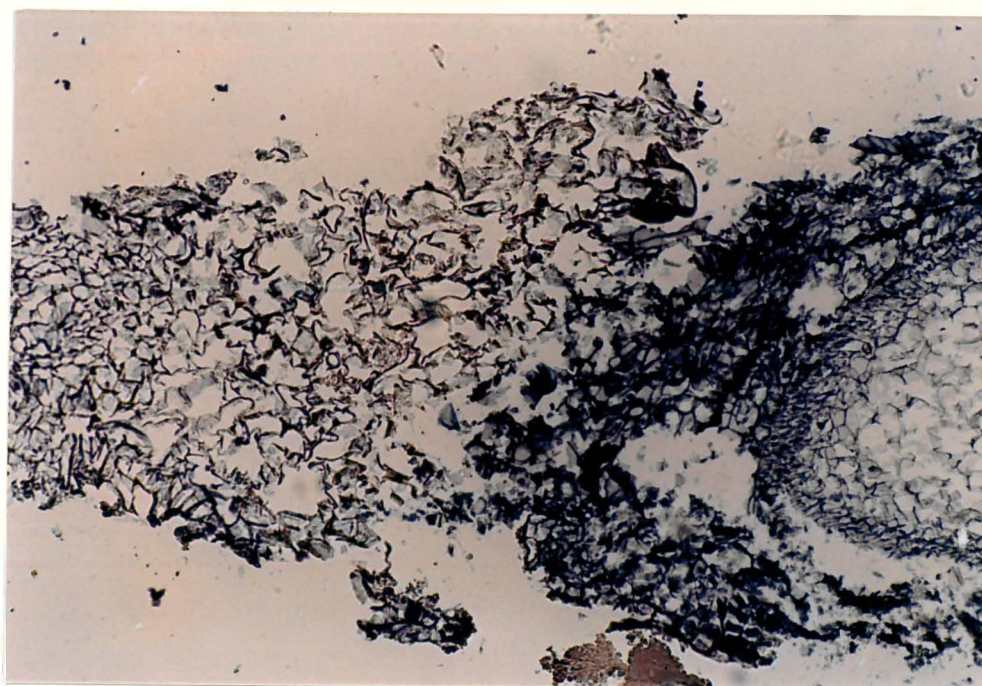


Figura 12 - Corte longitudinal mostrando a estrutura do calo friável ( x 100 ).

ligadas e também com crescimento amorfo. Esta consistência, característica dos calos friáveis, dificultou a obtenção de cortes que permitissem uma boa visualização das células do mesmo.

O fato de ter ocorrido o aparecimento de calos tegumentares, em meios de cultura sem hormônios, contrasta com os resultados de VARDI et alii (1982). Segundo estes autores, a formação de calos a partir dos tegumentos é estimulada como consequência da adição de reguladores de crescimento.

Cortes histológicos foram realizados em calos embriogênicos, surgidos em fases avançadas do cultivo de óvulos e nucelos, podendo ser vistos nas Figuras 13 e 14. Estes calos são compostos por nódulos esféricos, pequenos e compactos. Estes nódulos se assemelham muito aos proembriões globulares descritos em *C.sinensis* cv. Shamouti por BUTTON et alii (1974). Assim, é possível supor que estes proembriões se desenvolvam até dimensões macroscópicas, originando embriões globulares, tão destacados na Figura 5a.

Ao contrário dos calos embriogênicos de outras espécies, compreendendo principalmente células parenquimáticas vacuoladas com ocasionais células embriogênicas (SHOEMAKER et alii, 1986), os calos embriogênicos de *C.sinensis* cv. Pera são compostos por células pequenas e densas, aparentemente todas com potencial embriogênico. Estas observações concordam com o que foi

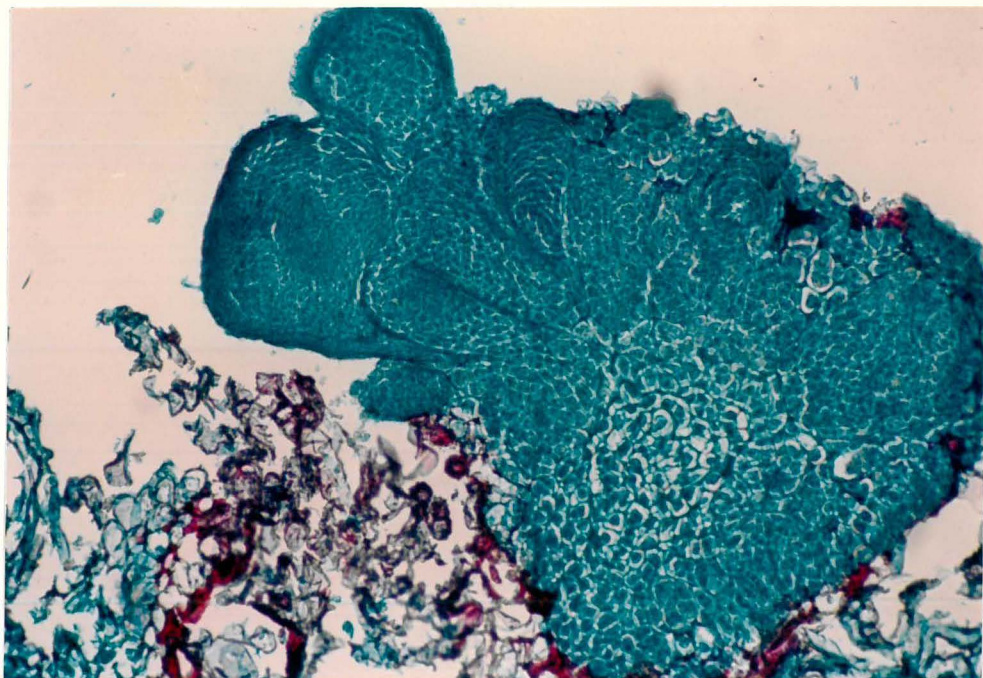


Figura 13 - Corte em calo embriogênico de *C. sinensis* cv. Pera ( x 100 ).

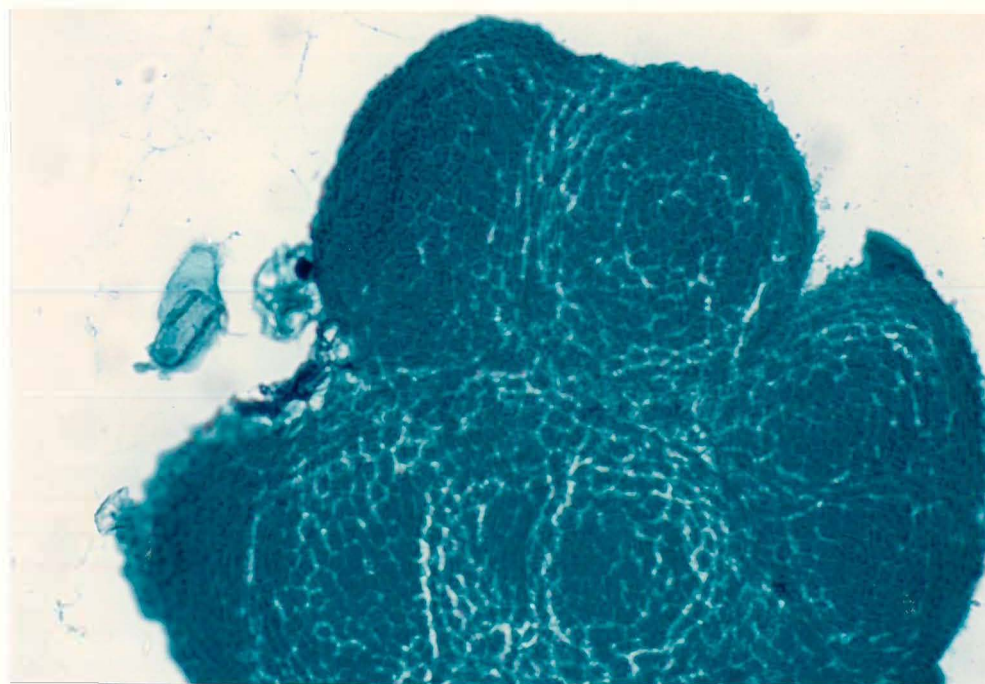


Figura 14 - Calo embriogênico do cultivar Pera mostrando um aglomerado de proembriões ( x 200 )

descrito por BUTTON et alii (1974) para o cultivar Shamouti, sendo que estes autores preferiram definir os calos embriogênicos de citros como uma massa de proembriões em proliferação. Portanto, são nítidas as diferenças entre os calos tegumentares, surgidos nos estágios iniciais do cultivo de óvulos, e os calos embriogênicos, formados após alguns meses do cultivo de óvulos e nucelos.

Estudos da histologia, anatomia e citologia, dos explantes iniciais e do seu comportamento após cultivo, têm sido recomendados para elucidar a origem e a natureza das plantas regeneradas, facilitando portanto a manipulação "in vitro" para o melhoramento genético (IAEA, 1984 e 1986).

#### 4.4. Isolamento de Protoplastos

A liberação de um protoplasto de *C. sinensis* cv. Pera pode ser visto na Figura 15, sendo que os resultados encontrados nos experimentos, definidos através do método "Simplex", estão na Tabela 19. Esta tabela apresenta as coordenadas de cada vértice (tratamento) obtidas pela evolução do "Simplex" (Figura 16) e as respostas (número de protoplastos/g de calos, a percentagem de viabilidade e o número de protoplastos viáveis/g) correspondentes a cada vértice. No hiperplano definido pelos fatores testados, a resposta máxima foi conseguida no



Figura 15 - Liberação de um protoplasto a partir de calos embriogênicos de *C. sinensis* cv. Pera ( x 1000).

Tabela 19 - Evolução do "Simplex" para a otimização do isolamento de protoplastos viáveis de *C. sinensis* cv. Pera

Vértice	F A T O R E S					R E S P O S T A S		
	Tempo (min)	Cellulase (mg/10ml)	Macerozyme (mg/10 ml)	Manitol (mM)	Sacarose (mM)	Número de protoplastos/g	% de viabilidade	Número de prot. viáveis /g
1	180	300,0	30,0	300,0	300,0	$1,00 \times 10^5$	87,65	$0,88 \times 10^5$
2	270	300,0	30,0	300,0	300,0	$3,94 \times 10^5$	87,75	$3,46 \times 10^5$
3	225	300,0	35,2	300,0	300,0	$2,03 \times 10^5$	89,33	$1,81 \times 10^5$
4	225	300,0	31,7	300,0	336,8	$5,23 \times 10^5$	81,97	$4,29 \times 10^5$
5	225	300,0	31,7	335,6	309,2	$3,14 \times 10^5$	87,88	$2,76 \times 10^5$
6	225	311,6	31,7	307,1	309,2	$4,27 \times 10^5$	83,06	$3,55 \times 10^5$
7	288	304,6	34,1	317,1	322,1	$6,03 \times 10^5$	79,47	$4,79 \times 10^5$
8	371	307,3	38,6	327,3	335,3	$12,00 \times 10^5$	89,12	$10,50 \times 10^5$
9	301	307,6	30,3	328,0	336,2	$14,44 \times 10^5$	88,12	$12,70 \times 10^5$
10	346	312,2	26,0	359,0	361,6	$11,10 \times 10^5$	89,50	$9,90 \times 10^5$
11	332	310,6	33,3	289,4	337,8	$10,30 \times 10^5$	87,79	$9,04 \times 10^5$
12	312	314,8	36,2	320,8	362,2	$10,06 \times 10^5$	87,59	$8,81 \times 10^5$

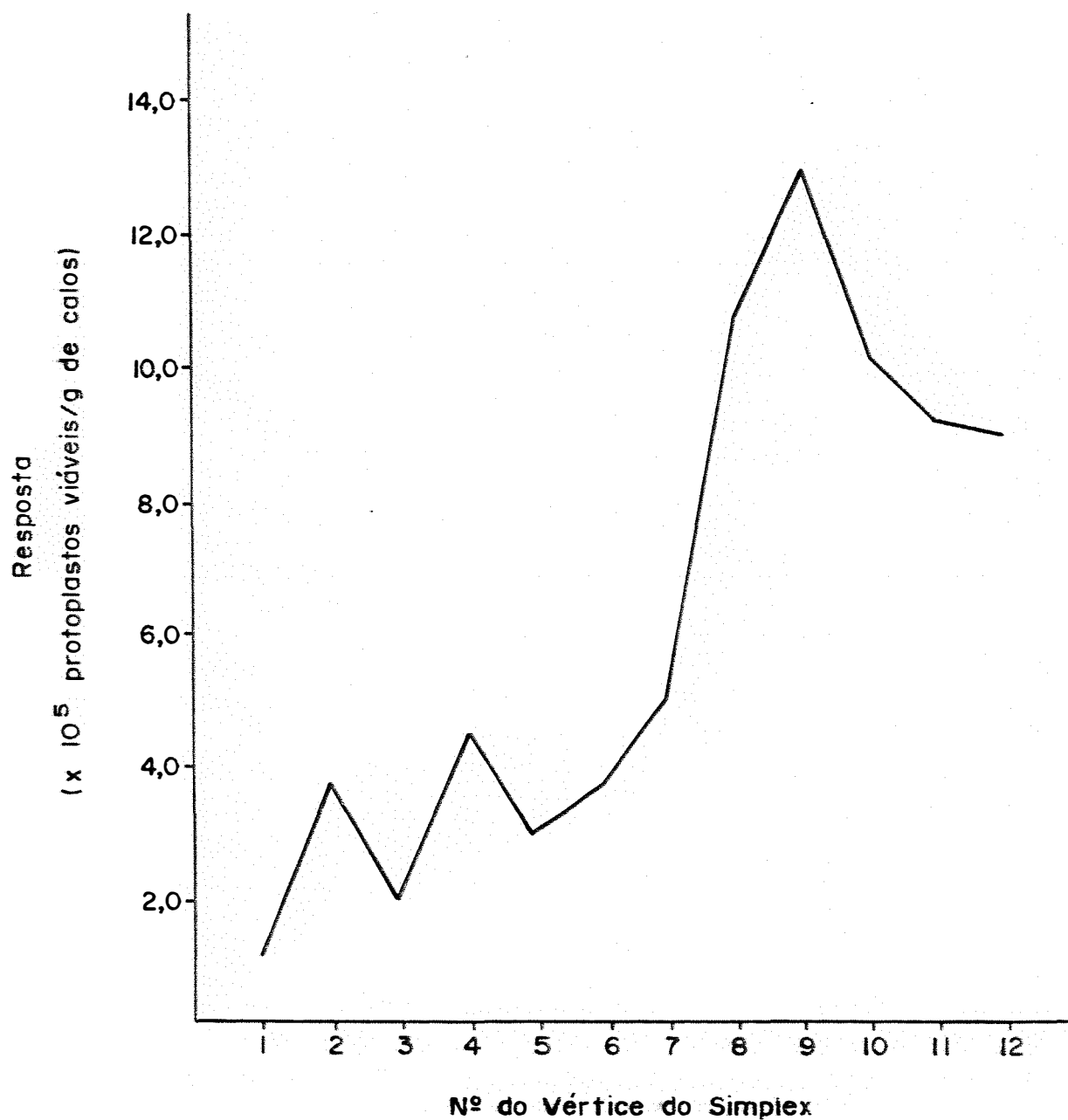


Figura 16 - Otimização das condições para a obtenção de protoplastos viáveis de *C. sinensis* cv. Pera. Evolução do "Simplex".

vértice 9 com as seguintes coordenadas:

- . tempo de maceração - 301 minutos
- . cellulase - 307,6 mg/10 ml
- . macerozyme - 30,3 mg/10 ml
- . manitol - 328,0 mM
- . sacarose - 336,2 mM

Foram feitas cinco repetições com as variáveis otimizadas e os resultados obtidos estão na Tabela 20. A Figura 17 mostra os protoplastos isolados a partir dos calos embriogênicos através das condições otimizadas do "Simplex". Nesta figura, pode-se verificar que ocorre uma variação no tamanho dos protoplastos. Esta variação provavelmente é devida ao fato dos calos embriogênicos serem compostos por células e agregados celulares em vários estágios diferentes de desenvolvimento (BUTTON et alii, 1974). Pode-se verificar também que os protoplastos apresentavam grânulos citoplasmáticos identificados como grãos de amido por KOBAYASHI et alii (1983).

O método "Simplex" de otimização é conceitualmente simples e a execução dos cálculos envolvidos é rápida e fácil, além de ser um método de vasta aplicação. A otimização de um sistema é o processo de ajustar as variáveis ou fatores controláveis para que um resultado específico alcance o melhor nível possível. O método "Simplex" tem sido utilizado para a otimização de sistemas químico-enzimáticos (LONG, 1969; MORGAN & DEMING, KRAUSE & LOTT, 1974 e SHAVERS et alii, 1979) e inclusive,



Tabela 20 - Valores médios das respostas encontradas para o isolamento de protoplastos com as variáveis otimizadas pelo "Simplex"

R E S P O S T A S			
Repetições	Número de protoplastos/g ( x 10 <sup>6</sup> )	Viabilidade (%)	Número de protoplastos viáveis/g ( x 10 <sup>6</sup> )
1	1,44	88,12	1,27
2	1,51	84,72	1,28
3	1,33	82,73	1,10
4	1,12	92,97	1,04
5	1,46	89,05	1,30
	X = 1,37	X = 87,52	X <sub>±s</sub> = 1,20±0,11

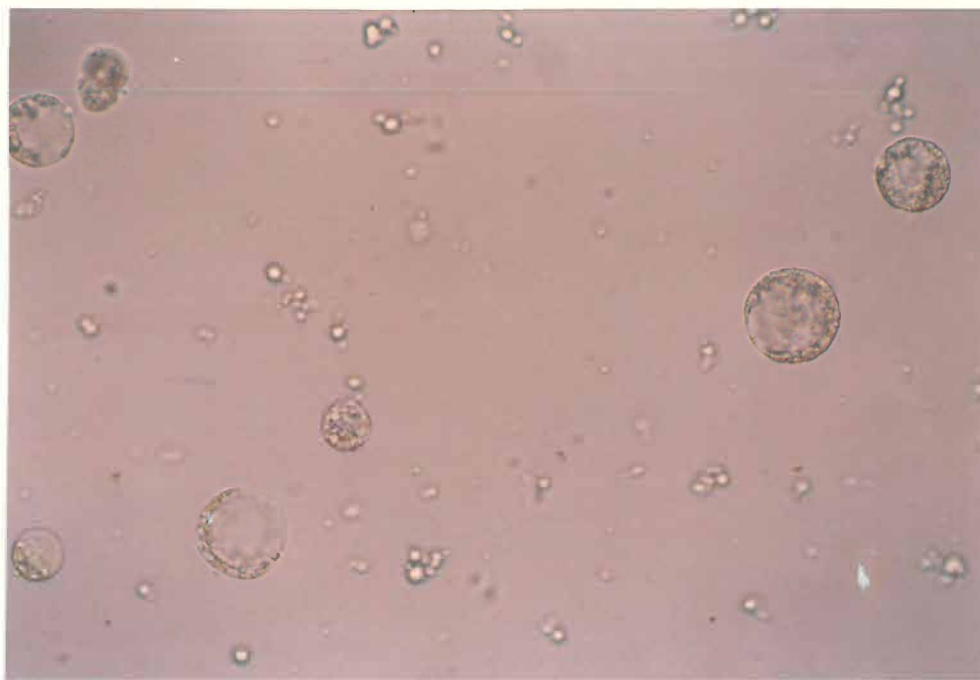


Figura 17 - Protoplastos isolados em condições otimizadas pelo método "Simplex" ( x 400 ).

para a otimização da eficiência no isolamento de protoplastos do fungo filamentoso *Humicola* sp (MACEDO, 1986), com bons resultados.

O método "Simplex" de otimização é extremamente útil, pois leva em consideração que as variáveis analisadas podem ser interagentes, sem no entanto ser necessária a montagem dos experimentos em esquema fatorial. Além disto, este método não precisa que repetições sejam feitas durante a evolução do mesmo, pois se erros estão interferindo nos resultados, a consequência é que um número um pouco maior de experimentos torna-se necessário para a otimização, mas o alcance do ponto ótimo não fica comprometido. As repetições só devem ser efetuadas com as variáveis otimizadas, para uma melhor estimativa do valor de resposta ótima e sua precisão. Portanto, este método é eficiente com um número reduzido de experimentos, implicando em grande economia, principalmente em se tratando de reagentes de custo elevado como as enzimas. Entretanto, o método "Simplex" só pode ser usado em experimentos com resultados rápidos, pois o planejamento do experimento seguinte depende do conhecimento do resultado anterior.

O método "Simplex", baseado na variação programada dos fatores, permitiu uma melhoria considerável na eficiência do isolamento de protoplastos viáveis de *C.sinensis* cv. Pera. Uma análise da Tabela 19 revela que houve um aumento de cerca de quinze vezes no número de protoplastos viáveis/g, enquanto que a percentagem de

viabilidade permaneceu praticamente constante, cerca de 80 a 90 %. As alterações mais marcantes entre o ponto inicial (vértice 1) e o vértice otimizado (vértice 9) foram o aumento no tempo de maceração e o aumento da concentração dos estabilizadores osmóticos (sacarose e manitol). A molaridade ideal encontrada para o isolamento de protoplastos do cultivar Pera foi de 0,66 M. Este resultado se aproxima da concentração de 0,7 M verificada por VARDI et alii (1975) como sendo a mais adequada para o isolamento de protoplastos de *C. sinensis* cv. Shamouti. Estes autores afirmam que a molaridade do meio tem um efeito apreciável na viabilidade dos protoplastos e na subsequente capacidade de dividir.

O meio de maceração usado nos experimentos, além de conter os estabilizadores osmóticos e as enzimas, possuía metade da concentração dos macronutrientes do meio MT. O acréscimo dos macronutrientes se justifica, pois VARDI et alii (1982) verificaram que o meio de maceração assim composto permitia a obtenção de resultados mais consistentes no isolamento de protoplastos. A combinação de dois estabilizadores osmóticos, um metabolicamente ativo (sacarose) e um relativamente inerte (manitol), foi realizada por ter sido relatada como vantajosa por ERIKSSON (1985). Aparentemente, a utilização gradativa do estabilizador ativo reduz o choque osmótico quando as células regeneradas são transferidas para meios com alto

potencial osmótico. O sorbitol não foi usado no presente trabalho, pois alguns cultivares de Citrus mostraram sensibilidade a este estabilizador (VARDI et alii, 1982).

O resultado de  $1,20 \times 10^6$  protoplastos viáveis/g, encontrado no vértice 9 (Tabela 19), está na faixa de eficiência do isolamento de protoplastos, a partir de calos embriogênicos, descritos para Citrus na literatura (VARDI et alii, 1975 e HIDAKA & KAJIURA, 1988). Contudo, não é possível afirmar que este valor é o ótimo absoluto que poderia ser conseguido para o isolamento de protoplastos de C. sinensis cv. Pera, a partir de calos embriogênicos. Para isto, seria necessária a construção de novos "Simplex", com outros pontos de partida e com condições diferentes pré-determinadas (temperatura, agitação, luminosidade, pH, etc). Este estudo não foi realizado, uma vez que o objetivo era obter uma quantidade de protoplastos suficiente para sua utilização em programas de melhoramento genético posteriores, o que já foi conseguido.

A eficiência de isolamento de  $1,20 \times 10^6$  protoplastos viáveis/g foi verificada em condições de maceração sem agitação, sendo que uma agitação suave (20 rpm) durante este período, geralmente facilita a liberação dos protoplastos. Portanto, é possível que haja ainda um aumento da eficiência de isolamento com esta pequena alteração (maceração com agitação). A ausência de agitação foi parcialmente substituída pela compressão mecânica suave (item 3.12.) realizada após a digestão enzimática. Este

procedimento melhorou a eficiência do isolamento, estando de acordo com os resultados encontrados para outras técnicas semelhantes descritas por RUSSEL & McCOWN (1986).

A eficiência na produção de protoplastos varia com a espécie e o cultivar em estudo, além de estar relacionada com a condição dos calos embriogênicos usados. HIDAKA & KAJIURA (1988) relataram que a produção de protoplastos, a partir de calos embriogênicos subcultivados por períodos superiores a dois meses, foi muito baixa e inaceitável. Desta forma, os calos embriogênicos, utilizados para o isolamento no presente trabalho, tinham sido subcultivados num período máximo de um mês.

Existem muitos corantes que podem ser usados para avaliar a viabilidade de células e protoplastos (ERIKSSON, 1985). O azul de metileno é um corante que tem sido amplamente utilizado em protoplastos vegetais (BUTTON & BOTHA, 1975; HODLEY & MCCARTHY, 1980; HODLEY, 1982 e HUANG et alii, 1986). Este corante é absorvido pelas células vivas e pelas mortas, sendo que as células vivas reduzem o corante a sua forma incolor, enquanto que as células mortas e os fragmentos celulares permanecem com a cor azul. O azul de metileno permitiu uma boa distinção entre os protoplastos vivos e mortos de *C. sinensis* cv. Pera (Figura 18).

A utilização do corante fucsina carbólica modificada tem sido proposta, para a coloração de núcleos de protoplastos, por diversos autores (KAO, 1982; GOULD, 1984 e MURAYAMA, 1987). Este método demonstrou ser bastante

eficaz na distinção do núcleo de protoplastos de *C. sinensis* cv. Pera (Figura 19 ), mostrando a presença de 3 % de protoplastos binucleados. Não foram observados protoplastos com mais de dois núcleos. A frequência de protoplastos binucleados foi baixa, indicando que o procedimento estabelecido para o isolamento de protoplastos é adequado para o uso no melhoramento genético.

Protoplastos multinucleados podem ser produzidos por fusões espontâneas durante o isolamento, sendo que a frequência de protoplastos multinucleados varia bastante entre diversos relatos. DE LA ROCHE et alii (1977) obtiveram 10 % de protoplastos multinucleados em centeio, enquanto que BRAR et alii (1980) observaram 52,8 % de protoplastos multinucleados em milho. Os resultados de DE LA ROCHE et alii (1977) sugerem que a temperatura de crescimento dos tecidos, a concentração de enzimas, o tempo e a temperatura durante a digestão enzimática tenham pouco efeito sobre a frequência de fusões espontâneas. Por outro lado, EVANS & COCKING (1977) salientaram que o isolamento de protoplastos, em baixas concentrações de estabilizadores osmóticos, pode resultar em protoplastos multinucleados por fusões espontâneas. Assim, é possível que a baixa frequência de protoplastos binucleados, encontrada para *C. sinensis* cv. Pera, tenha ocorrido pois as concentrações dos estabilizadores osmóticos (sacarose e manitol) foram determinadas pelo método "Simplex" de otimização, sendo portanto bastante adequadas para este material.

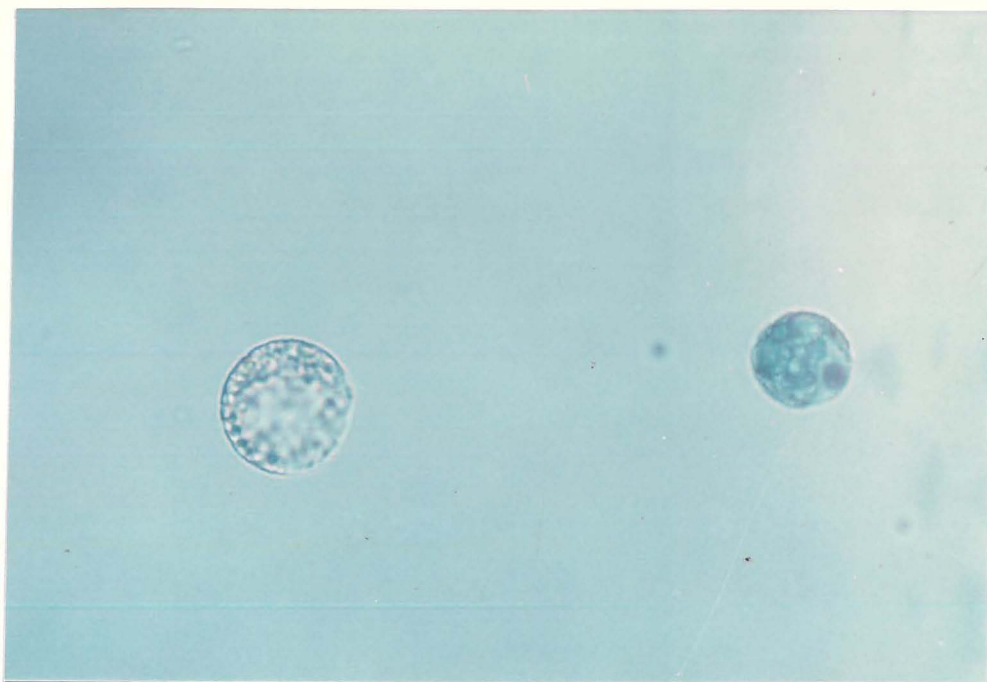


Figura 18 - Verificação da viabilidade dos protoplastos com o corante azul de metileno; à esquerda encontra-se o protoplasto viável ( x 400 ).

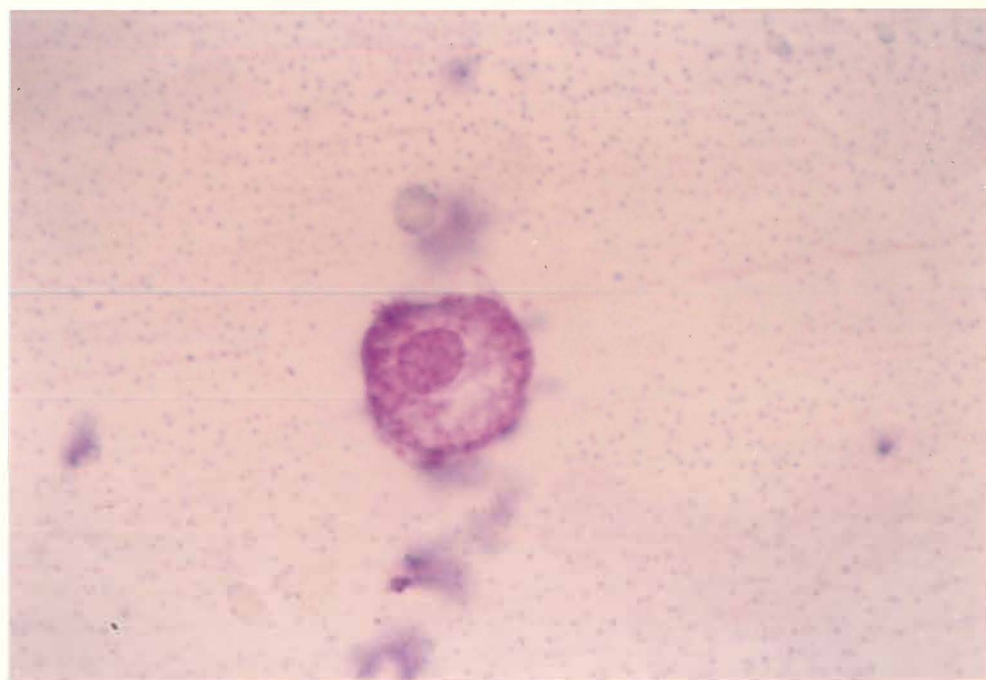


Figura 19 - Protoplasto uninucleado de *C. sinensis* cv. Pera ( x 1000 ).



#### 4.5. Determinação da Radiossensitividade dos Protoplastos

A Figura 20 mostra a curva de sobrevivência dos protoplastos de *C.sinensis* cv. Pera após a irradiação com raios-gama. O valor de LD<sub>50</sub> (dose que causa 50 % de letalidade), nas condições em que os experimentos foram realizados (item 3.15.), situou-se ao redor de 37,5 Gy. Ao se comparar esta curva de sobrevivência (Figura 20) com a curva de sobrevivência aos raios-X obtida por VARDI et alii (1975), para *C.sinensis* cv. Shamouti, verifica-se que os protoplastos do cultivar Pera apresentaram uma menor sensibilidade às mesmas doses de radiação gama. Isto pode ter ocorrido devido a diferenças na intensidade de radiação ou outras condições experimentais. Outra possibilidade é que os protoplastos do cultivar Pera sejam realmente mais resistentes à radiação, pois o genótipo é um dos fatores que discrimina a radiossensitividade. Já foram relatadas diferenças de cerca de 20 % na sobrevivência de protoplastos de dois genótipos de *Nicotiana sylvestris*, expostos à mesma dose de radiação (MAGNIEN & DEVREUX, 1980). Ainda uma outra explicação para a diferença na radiossensitividade entre os dois cultivares de *C.sinensis*, está na metodologia empregada para a avaliação da sobrevivência. No presente trabalho, a sobrevivência foi determinada através do corante azul de metileno, enquanto que VARDI et alii (1975) determinaram a sobrevivência através da formação de colônias após quatro semanas de

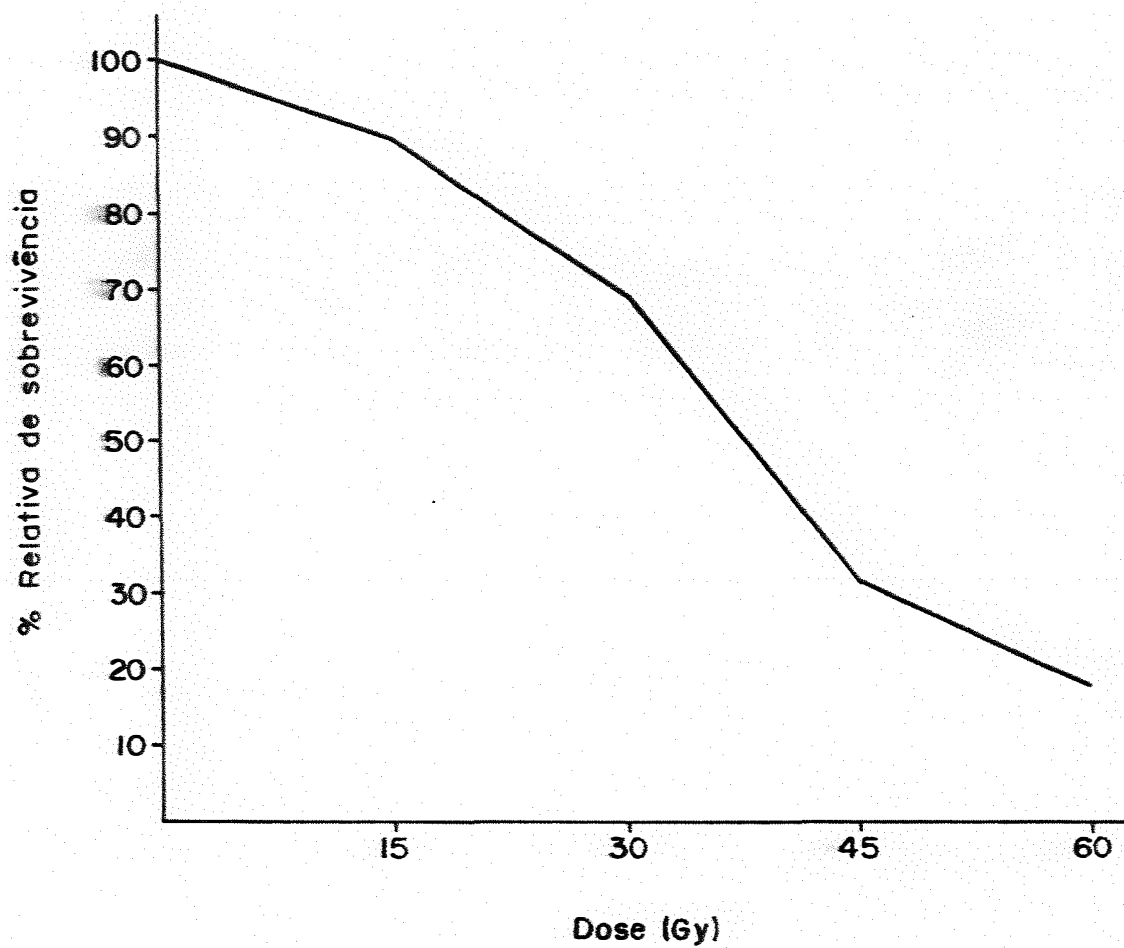


Figura 20 - Curva de sobrevivência de protoplastos de *C. sinensis* cv. Pera à radiação gama (valores médios de três repetições).

cultivo.

A utilização de corantes na verificação da sobrevivência de protoplastos à radiação tem sido relatada por diversos autores (BORNMAN et alii, 1982; CONSTANTIN, 1984 e NEGRUTIU et alii, 1984). Embora a determinação da viabilidade com corantes seja fácil, rápida e não sofra interferências dos efeitos dos meios de cultura e da densidade de protoplastos no plaqueamento, esta metodologia não distingue entre as células vivas com capacidade de divisão e as células fisiologicamente ativas mas sem esta capacidade. Esta última classe de células pode se formar após a irradiação, pois já tem sido relatada por RAVEH et alii (1973) e OHYAMA et alii (1974). Como somente as células, com capacidade de reprodução e regeneração de plantas, interessam para alcançar o objetivo final que são as plantas mutantes melhoradas, seria bastante útil estabelecer a correlação entre estas duas metodologias de avaliação da sobrevivência. TOWILL & MAZUR (1975) verificaram uma boa correlação entre a redução do corante tetrazólio e a eficiência de plaqueamento em células de *Haplopappus*. HOWLAND & HART (1977) relataram que uma determinada dose de radiação, selecionada através de corante por reduzir a sobrevivência celular a 50 %, foi capaz de aumentar em dez vezes o número de células de cenoura resistentes a um análogo de aminoácido.

A irradiação dos protoplastos de *C. sinensis* cv. Pera foi realizada 42 horas após o isolamento. Isto se

justifica pois é recomendado que os protoplastos sejam tratados com mutagênicos antes ou durante a primeira divisão mitótica (IAEA, 1984 e 1986). Diversos trabalhos têm demonstrado que as divisões nucleares iniciam-se cerca de dois dias após o isolamento (GALUN & RAVEH, 1975; GALBRAITH et alii, 1981; NEGRUTIU et alii, 1984 e GOULD & DAINES, 1985). Na maioria dos casos, os protoplastos passam por uma fase de adaptação após o isolamento. Por essa razão, GALUN & RAVEH (1975) e VARDI et alii (1975) sugerem que a irradiação seja feita no segundo dia. No presente trabalho, a avaliação da sobrevivência com o azul de metileno foi efetuada 24 horas após a irradiação, já que o dano biológico expresso como a morte celular só ocorre algumas horas depois.

A espécie *C. sinensis* tem sido relatada como relativamente tolerante à radiação quando comparada com outras espécies (KUKIMURA & YATOU, 1984). Esta constatação também pode ser feita em relação à sensibilidade dos protoplastos. Enquanto o valor de LD<sub>50</sub> para protoplastos do cultivar Pera, obtido no presente trabalho, foi de 37,5 Gy e do cultivar Shamouti foi 34,0 Gy (VARDI et alii, 1975), o valor de LD<sub>50</sub> encontrado para os protoplastos de *Nicotiana tabacum* foi 7,0 Gy (GALUN & RAVEH, 1975), para *Datura innoxia* foi 10,0 Gy (SCHIEDER, 1976 e KRUMBIEGEL, 1979) e para *Petunia hybrida* foi 5,0 Gy (KRUMBIEGEL, 1979).

É interessante observar que existem diferenças marcantes entre as radiosensitividades de diferentes órgãos

e tecidos em citros (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973a). De uma forma geral para citros, os valores de LD<sub>50</sub> são os seguintes: para borbulhas e plântulas decapitadas, entre 20,0 e 40,0 Gy; para protoplastos, entre 30,0 e 40,0 Gy; para gemas, em torno de 50,0 Gy; para sementes, entre 80,0 e 100,0 Gy; e para calos, em torno de 240,0 Gy (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973a; VARDI et alii, 1975 e PASSOS & TULMANN NETO, 1987). Deve-se ressaltar também o fato de que a radiação, em determinadas doses, pode ter um efeito estimulador sobre o desenvolvimento de protoplastos, células e tecidos de citros (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973 a e b; VARDI et alii, 1975 e KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b ).

## 5. CONCLUSOES

Os resultados obtidos com *Citrus sinensis* cv. Pera no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a) os óvulos e nucelos, extraídos de frutos jovens, têm a capacidade de originar embriões e estes de se desenvolver até plântulas, em meios de cultura sem hormônios vegetais;
- b) os calos embriogênicos podem se formar a partir dos pseudobulbilhos e da região do hipocótilo de embriões e plântulas pré-existentes;
- c) o aparecimento e a proliferação dos calos embriogênicos ocorrem na ausência de hormônios vegetais, sendo que estes calos têm mantido proliferação autônoma por períodos de tempo acima de seis meses;
- d) os nucelos isolados, de frutos de 10 a 12 semanas após a antese, apresentam as maiores percentagens de formação de calos embriogênicos em todas as condições de cultivo testadas;
- e) o 2,4-D, em concentrações de 0,5 , 1,0 e 2,0 mg/L, suprime a embriogênese nucelar "in vitro";

- f) os cortes histológicos demonstram a formação de calos, sem características embriogênicas, a partir dos tegumentos dos óvulos;
- g) o método "Simplex" de otimização é bastante eficiente na definição de condições experimentais para o isolamento de protoplastos viáveis, aumentando cerca de 15 vezes o número de protoplastos viáveis por grama de calo embriogênico usado;
- h) as melhores condições experimentais para o isolamento de protoplastos são: digestão enzimática por 5 horas, em meio com as enzimas celulase 307,6 mg/10 ml e macerozyme 30,3 mg/10 ml e os estabilizadores osmóticos manitol 328,0 mM e sacarose 336,2 mM;
- i) é possível a obtenção de grandes quantidades de protoplastos viáveis para posteriores usos no melhoramento genético do cultivar em questão;
- j) a LD<sub>50</sub> de protoplastos em suspensão, 42 horas após o isolamento, está estimada em torno de 37,5 Gy.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. International Review of Cytology Supplement 11A: 113-44, 1980.

BEN-HAYYIM, G. & KOCHBA, J. Growth characteristics and stability of tolerance of citrus callus cells subjected to NaCl stress. Plant Science Letters, 27: 87-94, 1982.

BITTERS, W.P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T.S.; NAUER, E. Investigations on established virus-free citrus plants through tissue culture. Calif. Citrus Nurserymen's Soc.. 9: 27-30, 1970.

BORNMAN, J.F.; BORNMAN, C.H.; BJORN, L.O. Effects of ultraviolet radiation on viability of isolated Beta vulgaris and Hordeum vulgare protoplasts. Z.Pflanzenphysiol., 105: 297-306, 1982.

BRAR, D.S.; RAMBOLD, S.; CONSTABEL, F.; GAMBORG, D.L. Isolation, fusion and culture of Sorghum and corn protoplasts. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, 96: 269-75, 1980.

BURGER, D.W. & HACKETT, W.P. Protoplast culture of several citrus tissues. HortScience, 16: 417, 1981.



- BURGER, D.W. & HACKETT, W.P. The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons (*Citrus sinensis*). *Physiologia Plantarum*, 56: 324-8, 1982.
- BUTTON, J. & BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington Navel orange in vitro. *Journal South African Botany*, 37: 127-34, 1971.
- BUTTON, J. & BOTHA, C.E.J. Enzymic maceration of Citrus callus and regeneration of plants from single cells. *Journal of Experimental Botany*, 26: 723-9, 1975.
- BUTTON, J. & KOCHBA, J. Tissue culture in the Citrus industry. In: REINERT, J & BAJAJ, Y.P.S. eds. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, 1977, p. 70-82.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Journal of Experimental Botany*, 25: 446-53, 1974.
- BUTTON, J. & BOTHA, C.E.J. Enzymic maceration of Citrus callus and regeneration of plants from single cells. *Journal of Experimental Botany*, 26: 723-9, 1975.
- CAILLOUX, M. Plant tissue culture: rapid propagation, induced mutations, and the potential role of protoplast techniques. In: VOSE, P.B. & BLIXT, S.G. *Crop breeding: a*

contemporary basis, New York, 1984. p.311-46.

CAMERON, J.W. & FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J., eds. The citrus industry. University of California Press, 1968. p.325-70.

COGGINS, C.W. & HIELD, H.Z. Plant-growth regulators. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J., eds. The citrus industry. University of California Press, 1968. p.372-86.

CONSTANTIN, M.J. Potential of in vitro mutation breeding for the improvement of vegetatively propagated crop plants. In: IAEA, ed. Induced mutations for crop improvement in Latin America. Vienna, IAEA, 1984. p. 59-77.

DE LA ROCHE, A.I.; KELLER, W.A.; SINGH, J.; SIMINOVITCH, D. Isolation of protoplasts from unhardened and hardened tissues of winter rye and wheat. Canadian Journal of Botany, 55: 1181-5, 1977.

DEMING, S.N. & MORGAN, S.L. Simplex optimization of variables in analytical chemistry. Analytical Chemistry, 45: 278-83, 1973.

DUDITS, D. Increase of genetic variability by asymmetric cell hybridization and isolated chromosome transfer. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12: 205-11, 1988.

- EARLE, E.D. & GRACEN, V.E. The role of protoplasts and cell cultures in plant disease research. In: STAPLES, R.C. & TOENNIESSEN, G.H., eds. Plant disease control: resistance and susceptibility. New York, John Wiley and Sons, 1981. p. 285-97.
- EPSTEIN, E.; KOCHBA, J. & NEUMANN, H. Metabolism of indoleacetic acid by embryogenic and non-embryogenic callus lines of Shamouti orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Z.Pflanzenphysiol.*, 85: 263-8, 1977.
- ERIKSSON, T.R. Protoplast isolation and culture. In: FOWLE, L.C. & CONSTABEL, F., eds. Plant protoplasts, Florida, CRC Press, 1985. p. 1-20.
- EVANS, D.A. Agricultural applications of plant protoplast fusion. *Bio/Technology*, 1: 253-61, 1983.
- EVANS, P.K. & COCKING, E.C. Isolated plant protoplasts. In: STREET, H.E., ed. Plant tissue and cell culture. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. p.103-35.
- FAO. FAO production yearbook. FAO Statistics series, 76: Rome, FAO, volume 40, 1987. 306 p.
- FELIPPE, G.M. Fotomorfogênese. In: FERRI, M.G., ed. *Fisiologia Vegetal 2*. E.P.U.-EDUSP, 1986. p.231-80.
- GALBRAITH, D.W.; MAUCH, T.J.; SHIELDS, B.A. Analysis of the initial stages of plant protoplast development using

33258      Hoechst: reactivation of the cell cycle.  
*Physiologia Plantarum*, 51: 380-6, 1981.

GALUN, E.; AVIV, D.; RAVEH, D.; VARDI, A.; ZELCER, A.  
Protoplasts in studies of cell genetics and  
morphogenesis. In: REINHARD, E. & ALFERMANN, A.W., eds.  
*Proceedings in life sciences*. Berlin, Springer-Verlag,  
1977. p. 301-12.

GALUN, E. & RAVEH, D. "In vitro" culture of tobacco  
protoplasts: survival of haploid and diploid protoplasts  
exposed to X-ray radiation at different times after  
isolation. *Radiation Botany*, 15: 79-82, 1975.

GMITTER, F. G. & MOORE, G.A. Plant regeneration from  
undeveloped ovules and embryogenic calli of Citrus:  
embryo production, germination, and plant survival. *Plant  
Cell, Tissue and Organ Culture*, 6: 139-47, 1986.

GOLIADZE, Sh., K. Use of breeding material in solving  
breeding problems in citrus. *Subtropicheskie Kul'tury*,  
3: 93-8, 1985 (Abstract).

GOULD, A. R. Staining and nuclear cytology of cultured  
cells. In: VASIL, I.K., ed. *Cell culture and somatic cell  
genetics of plants: laboratory procedures and their  
applications*. Academic Press, 1984. p.698-711.

GOULD, A.R. Factors controlling generation of variability  
"in vitro". In: VASIL, I.K., ed. *Cell culture and somatic*

cell genetics of plants, volume 3. Academic Press, 1986.  
p.549-67.

GOULD, A.R. & DAINES, R.J. Plant protoplasts and the cell cycle. In: FOWLE, L.C. & CONSTABEL, F., eds. Plant protoplasts. CRC Press, Florida, 1985. p. 67-76.

GRIMELIUS, K. Potentials of protoplast fusion in plant breeding programmes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12: 163-72, 1988.

GROSSER, J.W. & CHANDLER, J.L. Aseptic isolation of leaf protoplasts from Citrus, Poncirus, Citrus x Poncirus hybrids and Severinia for use in somatic hybridization experiments. Scientia Horticulturae, 31: 253-7, 1987.

GROSSER, J.W.; GMITTER, Jr., F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of Citrus sinensis cv. Hamlin and Poncirus trifoliata cv. Flying Dragon. Plant Cell Reports, 7: 5-8, 1988.

HEARN, C.J. Development of seedless grapefruit cultivars through budwood irradiation. Journal of the American Society for Horticultural Science, 111: 304-6, 1986.

HENSZ, R.A. Star Ruby, a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. Journal of Rio Grande Valley Horticultural Society, 25: 54-8, 1971.

HIDAKA, T. & KAJIURA, I. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from Citrus embryo.

Scientia Horticulturae, 34: 85-92, 1988.

HODLEY, R. Protoplasts isolated from aleurone layers of wild oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberellic acid. *Planta*, 154: 29-40, 1982.

HODLEY, R. & MCCARTHY, D. Extracts from virus infected hypersensitive tobacco leaves are detrimental to protoplast survival. *Physiology and Plant Pathology*, 16: 25-38, 1980.

HOWLAND, G.P. & HART, R. W. Radiation biology of cultured plant cells. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S., eds. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, 1977. p.731-56.

HUANG, C.N.; CORNEJO, M.J.; BUSH, D.S.; JONES, R.L. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma*, 135: 80-7, 1986.

IAEA - International Atomic Energy Agency/joint FAO. Mutation breeding of crops and related "in vitro" techniques and problems. Vienna, IAEA, 1984. 13 p.

IAEA - International Atomic Energy Agency/joint FAO. Mutation breeding for disease resistance using "in vitro" culture techniques. Vienna, IAEA-TECDOC-342, 1985. 42 p.

IAEA - International Atomic Energy Agency/joint FAO. "In vitro" technology for mutation breeding. Vienna, IAEA-

TECDOC-392, 1986. 58 p.

- INGRAM, D.S. & MacDONALD, M.V. In vitro selection of mutants. In: IAEA, ed. Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. Vienna, IAEA, 1986. p.241-58.
- KAO, K.N. Staining methods for protoplasts and cells. In: WETTER, L.R. & CONSTABEL, F., eds. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada, 1982. p.67-71.
- KERKADZE, I.G. Induced mutation in subtropical crops. IV. Genetic effect of gamma rays on the somatic organs of citrus. Subtropicheskie Kul'tury, 3: 103-9, 1985a (Abstract).
- KERBADZE, I.G. Induced mutation in subtropical crops. VI. Biological and genetical effect of gamma rays on the pollen of citrus. Subtropicheskie Kul'tury, 5: 71-5, 1985b (Abstract).
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Studies on the nucellar embryogenesis in citrus. I. Formation of nucellar embryo and development of ovule. Bull. Fruit Tree Res. Stn. E., 2: 9-24, 1978.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; UCHIMIYA, H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. Plant Cell Tissue Organ Culture, 4:

249-59, 1985.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H.; IKEDA, I. Plant regeneration from "Trovia" orange protoplasts. Japanese Journal of Breeding, 33: 119-22, 1983.

KOCHBA, J.; BEN-HAYYIM, G.; SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S.; NEUMANN, H. Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *C. aurantium*. Z.Pflanzenphysiol., 106: 111-8, 1982b.

KOCHBA, J. & BUTTON, J. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. Z.Pflanzenphysiol., 73: 415-21, 1974.

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. Ann. Bot., 38: 795-802, 1974.

KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Effects of culture media on embryoid formation from ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). Z.Pflanzenphysiol., 69: 156-62, 1973.

KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. The use of *Citrus* tissue culture for mutation breeding: effects of plant growth substances and gamma irradiation on embryogenesis. In:



- IAEA, ed. Improvement of vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutations. Vienna, IAEA, 1976. p.83-91.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of citrus. HortScience, 12: 110-4, 1977a.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the "Shamouti" orange as affected by auxin and by tissue age. Environmental and Experimental Botany, 17: 151-8, 1977b.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the "Shamouti" orange (Citrus sinensis). Z. Pflanzenphysiol., 81: 283-8, 1977c
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Progress in selection for sodium chloride, 2,4-D and streptomycin tolerance in Citrus sinensis ovular callus lines. In: IAEA, ed. Induced mutations in vegetatively propagated plants II. Vienna, IAEA, 1982. p.77-89.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Stimulation of embryogenesis in Citrus ovular callus by ABA, ethephon, CCC and alar and its suppression by GA<sub>3</sub>. Z.Pflanzenphysiol., 89: 427-32, 1978.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of

carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of Citrus cultivars. Z.Pflanzenphysiol., 105: 359-68, 1982a.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S. Selection for tolerance to sodium chloride (NaCl) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in ovular callus lines of Citrus sinensis. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, D., eds. Plant cell cultures: results and perspectives. Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980. p.187-92.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. Planta, 106: 237-45, 1972.

KRAUSE, R.D. & LOTT, J.A. Use of the simplex method to optimize analytical conditions in clinical chemistry. Clinical Chemistry, 20: 775-82, 1974.

KRUMBIEGEL, G. Response of haploid and diploid protoplasts from Datura innoxia Mill. and Petunia hybrida L. to treatment with X-rays and a chemical mutagen. Environmental and Experimental Botany, 19: 99-103, 1979.

KUKIMURA, H. & YATOU, O. In vitro mutation breeding in medicinal plants. Gamma field symposia number 23: Widening of genetic variation by tissue culture, 1984. p.55-67.

- LONG, D.E. Simplex optimization of the response from chemical systems. *Analytica Chimica Acta*, 46: 193-206, 1969.
- MACEDO, J.M.B. Avaliação do comportamento de *Humicola* sp com vistas ao melhoramento genético para produção de celulasas. Rio de Janeiro, 1986. 90 p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- MAGNIEN, E. & DEVREUX, M. A critical assessment of the protoplast system as a tool for radiosensitivity studies. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, D., eds. *Plant cell cultures: results and perspectives*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. p.121-6.
- MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S. Polyembryony and in vitro culture of Citrus and Mangifera. *Indian Journal of Horticulture*, 15: 275-86, 1958.
- MITRA, G.C. & CHATUVERDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vivo-grown emasculated flower buds of Citrus spp. *Bull. Torrey Bot. Club.*, 99: 184-9, 1972.
- MODRE, G.A. Factors affecting in vitro embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruit. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 110: 66-70, 1985.
- MORGAN, S.L. & DEMING, S.N. Simplex optimization of analytical chemical methods. *Analytical Chemistry*, 46:

1170-81, 1974.

MURASHIGE, T.; NAKANO, R.; TUCKER, D.P.H. Histogenesis and rate of nuclear change in Citrus limon tissue in vitro. Phytomorphology, Memorial Volume: 469-77, 1967.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-97, 1962.

MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. First Int. Citrus Symp., 3: 1155-61, 1969.

MURAYAMA, M.Y. Isolamento, cultivo e fusão de protoplastos de cana-de-açúcar (Saccharum spp). Piracicaba, 1987, 102 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

NAGARAJAN, P. & WALTON, P.D. A comparison of somatic chromosomal instability in tissue regenerants from Medicago media Pers. Plant Cell Reports, 6: 109-13, 1987.

NAVARRO, L.; JUAREZ, J.; BALLESTER, J.F.; PINA, J.A.; ORTEGA, C. Obtención de plantas nucelares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo Navel (Citrus sinensis (L.) Osbeck) por cultivo de ovulos "in vitro". Anales del I.N.I.A., 12: 95-113, 1979.

NEGRUTIU, T.; JACOBS, M.; CABOCHE, M. Advances in somatic cell genetics of higher plants - the protoplast

approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theoretical and Applied Genetics*, 67: 289-304, 1984.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*, *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 1-4, 1985.

OHYAMA, K. ; PELCHER, L.E.; GAMBORG, O.L. The effects of ultraviolet irradiation on survival and on nucleic acids and protein synthesis in plant protoplasts. *Radiation Botany*, 14: 343-6, 1974.

OKA, S. & OHYAMA, K. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Broussonetia kazinoki* Sieb. (Paper mulberry). *Journal of Plant Physiology*, 119: 455-60, 1985.

PASQUAL, M. Regeneração de plantas "in vitro" e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba, 1985. 106 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" /USP).

PASQUAL, M.; ANDO, A.; TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M. Determination of methodology to obtain resistance to citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) through nuclear techniques combined with in vitro culture.

Preliminar report. In: IAEA, ed. Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. Vienna, IAEA, 1986. p.129-36.

PASSOS, R.C. & TULMANN NETO, A. Cultura e irradiação de gemas de citros "in vitro". In: 5<sup>o</sup> Encontro de geneticistas paulistas. Anais. Piracicaba, 1987, p.30.

RANGAN, T.S. Clonal propagation: somatic embryos of Citrus. In: VASIL, I.K., ed. Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications. Academic Press, 1984. p. 68-73.

RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. HortScience, 3: 226-7, 1968.

RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: CHAPMAN, H.D., ed. Proc. First Int. Citrus Symp., 1: 225-9, 1968.

RANGASWAMY, N.S. Culture of nucellar tissue of Citrus in vitro. Experientia, 14: 111-2, 1958.

RANGASWAMY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of Citrus microcarpa Bunge. Phytomorphology, 11: 108-27, 1961.

RAO, P.S. & OZIAS-AKINS, P. Plant regeneration through somatic embryogenesis in protoplast cultures of

sandalwood (*Santalum album* L.). *Protoplasma*, 124: 80-8, 1985.

RAVEH, D.; HUBERMAN, E.; GALUN, E. In vitro culture of tobacco protoplasts: use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities. *In Vitro*, 9: 216-22, 1973.

RUSSEL, J.A. & McCOWN, B.H. Techniques for enhanced release of protoplasts in *Populus*. *Plant Cell Reports*, 5: 284-7, 1986.

SABHARWAL, P.S. In vitro culture of ovules, nucelli and embryos of *Citrus aurantifolia* Swingle. In: MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S., eds. *Plant tissue and organ culture*. Univ. of Delhi, 1963. p.265-74.

SALIBE, A.A. & CEREDA, E. Characteristics of Pera sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *International Citrus Congress, São Paulo*. International Society of Citriculture, 1984. p. 11.

SCHIEDER, D. Isolation of mutants with altered pigments after irradiating haploid protoplasts from *Datura innoxia* Mill. with X-rays. *Molecular and General Genetics*, 149: 251-4, 1976.

SHAVERS, C.L.; PARSONS, M.L.; DEMING, S.N. Simplex optimization of chemical systems. *Journal of Chemical Education*, 56: 307-9, 1979.

- SHOEMAKER, R.C.; COUCHE, L.J.; GALBRAITH, D.W.  
Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 3: 178-81, 1986.
- SINGH, B.D. & HARVEY, B.L. Effects of different 2,4-D concentrations on the cytogenetic behaviour of plant cells cultured "in vitro". *Biologia Plantarum*, 17: 167-74, 1975
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Mutation breeding in citrus. In: IAEA, ed. *Induced mutations in vegetatively propagated plants*. Vienna, IAEA, 1973a. p. 91-103.
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. *Radiation Botany*, 13: 97-103, 1973b.
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Embryogenesis in Citrus tissue cultures. *Advances in Biochemical Engineering*, 16: 27-48, 1980.
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J.; SAAD, S. Selection for tolerance to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in ovular callus of orange (*Citrus sinensis*). *Z.Pflanzenphysiol.*, 109: 41-8, 1983.
- SPIEGEL-ROY, P. & VARDI, A. Citrus. In: AMMIRATO, P.V.;



EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y., eds. Handbook of plant cell culture; crop species, volume 3. New York, MacMillan, 1984. p. 355-72.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A.; ELHANATI, A. Seedless induced mutant in lemon (*Citrus limon*). Mutation Breeding Newsletter, 26: 1-2, 1985.

STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars. HortScience, 15: 296-7, 1980.

TOWILL, L.E. & MAZUR, P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Canadian Journal of Botany, 53: 1097-102, 1975.

VARDI, A. Isolation of protoplasts in Citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture, 2: 575-8, 1977.

VARDI, A.; EPSTEIN, E.; BREIMAN, A. Is the Phytophthora citrophthora culture filtrate a reliable tool for the in vitro selection of resistant Citrus variants? Theoretical and Applied Genetics, 72: 569-74, 1986a.

VARDI, A.; HUTCHISON, D.J.; GALUN, E. A protoplast-to-tree system in Microcitrus based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus. Plant Cell Reports, 5: 412-4, 1986b.

VARDI, A. & SHANI, A. Correlation in salt tolerance between

different citrus protoplasts and corresponding nucellar plants. In: International Citrus Congress, São Paulo, International Society of Citriculture, 1984. p.9.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Science Letters*, 4: 231-6, 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*, 62: 171-6, 1982.

VASIL, I.K. & VASIL, V. Isolation and culture of protoplasts. *International Review of Cytology*, 11b: 1-9, 1980.

WAKHLU, A.K. & BAJWA, P.S. Cytological analysis in embryogenic callus cultures and regenerated plants of *Papaver somniferum* L. (opium poppy). *Cytologia*, 52: 631-8, 1987.

WATANABE, H. F1 hybrids obtained through the regulation of polyembryony by continuous gamma irradiation in *Citrus unshiu* cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110: 742-4, 1985.

WU, S.Y.; LIANG, J.; LIN, R.C.; LI, Z.Q.; TANG, X.L.; ZENG, S.R. Using gamma rays to induced mutations for

seedlessness in citrus. Mutation Breeding Newsletter,  
27: 14, 1986.