**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Citrus sinensis*, *C.*
reticulata E *C. nobilis* x *C. deliciosa***

ADRIANA PATRÍCIA RICCI

Engenheira Agrônoma

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

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de Concentração:
Fitotecnia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo –Brasil

Abril - 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Ricci, Adriana Patrícia
Embriogênese somática em *Citrus sinensis*, *C. reticulata* e *C. nobilis* x *C. deliciosa* /
Adriana Patrícia Ricci. - Piracicaba, 2001.
59 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Ácido giberélico 2. Carboidrato 3. Carvão ativado 4. Embriogênese somática
5. Fruta cítrica 6. Maturação 7. Propagação "in vitro" 8. Variedade I. Título

CDD 634.3

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

Aos meus Pais, Armando e Ismênia, que
sempre fizeram de tudo para que eu me
realizasse na vida, dando amor, carinho,
compreensão, incentivo e apoio durante todos
os anos que vivi,

OFEREÇO

À minha querida irmã Ana Paula,
meu cunhado Sérgio Ricardo e meu
lindo sobrinho João Pedro, que
sempre estiveram ao meu lado dando
muita força para que nunca desistisse,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Armando e Ismênia, à minha irmã Ana Paula, ao meu cunhado Sérgio Ricardo e ao meu sobrinho João Pedro pelo apoio, compreensão, carinho, amizade e AMOR que sempre demonstraram e incentivaram o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, disponibilidade e pela oportunidade de realização do curso.

À Deus que nas horas difíceis me acalmou e sempre esteve ao meu lado.

Ao FUNDECITRUS pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro que tanto ajudou para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes (USP/CENA) pelas sugestões e orientação durante a realização do trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez (CENA/USP) pela amizade, carinho, atenção e incentivo para que este trabalho fosse realizado.

Ao colega e professor Weliton Antonio Bastos de Almeida pela amizade, respeito, sugestões e ajuda no desenvolvimento deste.

À Profa. Dra. Sônia Maria de Stefano Piedade (USP/ESALQ) pela ajuda na realização das análises estatísticas.

Ao Professor Dr. João Alexio Scarpate Filho (USP/ESALQ) pela amizade, respeito e descontração nos cafezinhos.

Ao Departamento de Produção Vegetal da USP/ESALQ e todos os professores que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização do mesmo.

Aos amigos Maria Angélica P. de Carvalho, Alessandra Monteiro-Hara, Márcio Leandro Tomaz, pela amizade companheirismo, força e ombro amigo nas horas difíceis.

À colega Fernanda Mendes-da-Glória que tanto me ajudou no início do curso.

Às amigas Liliane Stipp, Silvia Blumer, Telma Passini e Viviane Morbelli Wágana que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram nas alegrias e nas tristezas.

À secretária e amiga Maria Célia pela amizade e ajuda sempre que necessária nas horas de aperto.

À secretária Elizabete Aparecida Sarkis São João pela ajuda sempre que necessária nas horas de aperto.

Às amigas Thaís Lacava de Moura, Vivian Sanches Krause e Aneliese Zimmermann, pela amizade, abrigo e carinho demonstrado.

À amiga, pesquisadora, Maria Julia G. Beretta pela amizade e incentivo sempre demonstrado.

Ao Marcelo R. Gil, pelo incentivo, apoio e carinho no final do curso.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A cultura de tecidos em espécies cítricas.....	4
2.2 Embriogênese somática.....	6
2.2.1 Controle da embriogênese somática	9
2.2.1.1 Tipo e estágio de desenvolvimento do explante	9
2.2.1.2 Composição do meio de cultura.....	11
2.2.2 Maturação e germinação de embriões somáticos	17
2.3 Considerações Finais	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material vegetal.....	20
3.2 Efeito de carboidratos na indução da embriogênese somática de calos de citros	21
3.3 Efeito do GA ₃ , sacarose e carvão ativado na maturação e germinação de embriões somáticos de citros.....	21
3.4 Análise estatística.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Efeito de carboidratos na indução da embriogênese somática de calos de citros	24
4.2 Efeito do GA ₃ , sacarose e carvão ativado na maturação e germinação de embriões somáticos de citros.....	30
5. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	41
APÊNDICE	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Embriões somáticos de tangerina 'Ponkan' obtidos no meio de cultura suplementado com 75 mM de lactose.....	26
2 Resposta à embriogênese somática em função da galactose e lactose para as tangerinas 'Ponkan', 'Cravo' 'Kinnow' e laranja 'Valência'.....	29
3 Aspecto geral dos embriões e plântulas de citros.....	33

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Embriogênese somática de citros em função de diferentes fontes e concentrações de carboidratos.....	27
2 Embriões somáticos germinados nos diferentes tratamentos de maturação.....	31
3 Número total de plântulas de citros obtidas nos diferentes tratamentos para a maturação de embriões somáticos	35
4 Número total de plantas obtidas a partir de 15 embriões somáticos em 5 variedades cítricas, em 14 meios de cultura diferentes.....	37

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Citrus sinensis*, *C. reticulata*, *C. nobilis* x *Citrus deliciosa*

Autora: Adriana Patrícia Ricci

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho

RESUMO

A maioria dos processos de regeneração de plantas em citros por cultura de tecidos envolve embriogênese somática indireta. A otimização desse processo é importante para o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento *in vitro* e micropropagação. Realizaram-se estudos em calos de tangerina 'Ponkan' (*Citrus reticulata*, Blanco), tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata*, Blanco), laranja 'Itaborai' (*Citrus sinensis*, L. Osbeck.), laranja 'Valencia' (*Citrus sinensis*, L. Osbeck) e tangerina 'Kinnow' (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenore) visando avaliar o efeito de diferentes carboidratos na embriogênese somática. Utilizou-se o meio MT acrescido de sacarose, galactose, glicose, maltose e lactose nas concentrações de 18, 37, 75, 110 e 150 mM. O meio de cultura utilizado para a maturação dos embriões somáticos continha sacarose nas concentrações de 0, 15, 29, 44, 58 e 73 mM, na presença ou não de 0,5 g L⁻¹ carvão ativado; 73 mM de sacarose e GA₃ na concentração de 0.1 mg L⁻¹, na presença ou não de 0.5 g L⁻¹ carvão ativado. O estímulo à embriogênese somática foi mais eficiente em meio de cultura

suplementado lactose e galactose. Quanto à maturação de embriões, os meios de cultura contendo 58 e 73 mM de sacarose foram aqueles que geraram um maior número de plantas em tangerina 'Ponkan' e laranja 'Valência'.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*

Author: Adriana Patrícia Ricci

Adviser: Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho

SUMMARY

Most of the plant regeneration processes in citrus, through tissue culture, involves indirect somatic embryogenesis. The optimization of this process is important for the development of *in vitro* plant improvement and micropropagation studies. Studies to evaluate the effect of different carbohydrates in somatic embryogenesis were conducted using calli from tangerine 'Ponkan' (*Citrus reticulata*, Blanco), mandarin 'Cravo' (*Citrus reticulata*, Blanco), sweet orange 'Itaborai' (*Citrus sinensis*, L. Osbeck.), sweet orange 'Valência' (*Citrus sinensis*, L. Osbeck) and tangerine 'Kinnow' (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenore). The culture medium used was MT supplemented with sucrose, galactose, glucose, maltose or lactose with the following concentrations of 18, 37, 75, 110 and 150 mM. The culture medium used for the maturation of somatic

embryos had 0, 15, 29, 44, 58 and 73 mM of sucrose, in the presence or absence of 0,5 g. L⁻¹ of activated charcoal. Seventy-three mM of sucrose with 0.1 mg. L⁻¹ of GA₃ in the presence or absence 0.5 g. L⁻¹ of activated charcoal was also tested. Overall, the carbohydrates galactose or lactose induced a higher number of somatic embryos. Sucrose concentrations of 58 and 73 mM generated a higher number of plantlets from mature embryos of tangerine 'Ponkan' and sweet orange 'Valência'.

1 INTRODUÇÃO

A produção paulista de citros, que corresponde a 80% da produção brasileira, no ano agrícola 2000/2001 foi estimada em 347,7 milhões de caixas de 40,8 Kg (IEA, 2001), o que corresponde a 1/3 de toda a produção mundial, e coloca o Brasil como primeiro produtor mundial de citros (FAO, 2001). Embora ocupe essa posição de liderança, diversos problemas têm ameaçado a citricultura paulista nos últimos anos. Os pomares paulistas apresentam, de uma forma geral, uma das mais baixas produtividades do mundo, ao redor de 2,0 quilos por metro quadrado. Diversos fatores são responsáveis por essa baixa produtividade, destacando-se, o baixo potencial genético de nossas variedades, tratos culturais inadequados e a ameaça de diversas pragas e doenças, tais como Cancro Cítrico, Clorose Variegada dos Citros, Pinta Preta e Declínio dos Citros (Pompeu Junior, 1991; Fundecitrus, 2001).

Apesar da grande variabilidade genética existente entre os citros e outros gêneros da família Rutaceae, a grande proporção de pomares implantados em São Paulo encontra-se em um número bastante reduzido de variedades copa e porta-enxertos. O melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novas variedades de copa e porta-enxerto, e as variedades desenvolvidas neste último século têm sido originadas a partir de seleções naturais e mutações (Soost & Cameron, 1975). As primeiras barreiras encontradas pelos melhoristas de citros estão relacionadas à sua complexa biologia,

podendo-se destacar poliembrionia nucelar (apomixia), elevada heterozigose, auto e interincompatibilidade e longo período juvenil (Cameron & Frost, 1968; Grosser & Gmitter Jr, 1990a; Machado, 1997).

Para que o país se mantenha numa posição de destaque, torna-se necessário a obtenção de plantas com elevado potencial genético e livre de patógenos, possibilitando o aumento da produtividade. Neste sentido, a produção de plantas utilizando técnicas de cultura de tecidos pode ser considerada promissora (Coelho, 1997). A cultura de tecidos e células surgiu como uma técnica auxiliar no processo de melhoramento genético das espécies cítricas. Pesquisas nesta área foram iniciadas com a obtenção de embriões nucleares *in vitro* a partir de espécies poliembrionicas, para a produção plantas isentas de viroses. Posteriormente, intensificou-se a obtenção de calos nucleares devido a possibilidade de se obterem embriões somáticos em grande quantidade a partir desses calos.

Uma outra estratégia utilizada para o melhoramento de variedades de citros, tanto para copa como para porta-enxerto, consiste na hibridação somática onde faz-se a combinação de parentais complementares, a fim de se transferir características desejáveis à nova planta como resistência à *Phytophthora*, Cancro Cítrico, CVC, Declínio, déficit hídrico, dentre outras. A hibridação somática apresenta vantagens sobre a hibridação sexual para o melhoramento de citros, pois permite combinar parentais com características complementares, sem perda significativa do vigor, na maioria dos casos, resultando em adição de características dominantes aos híbridos (Grosser & Gmitter Jr., 1990a).

O sucesso da aplicação de técnicas de micropropagação, incluindo aquelas por embriogênese, depende não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), como também do meio de cultura e das condições do ambiente em que a cultura é

mantida, permitindo a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias. As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam entre espécies, variedades e até mesmo dentro da própria planta o que torna necessário a otimização dos meios de cultura (Cristofani, 1991).

Tendo em vista a importância da embriogênese somática, tanto para o melhoramento *in vitro* como para a micropropagação dos citros, este trabalho foi realizado visando:

- Avaliar diferentes fontes e concentrações de carboidratos na embriogênese somática de cinco variedades de citros.
- Avaliar o efeito do ácido giberélico (GA_3), da sacarose e do carvão ativado, na maturação de embriões somáticos de cinco variedades de citros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura de tecidos em espécies cítricas

O melhoramento das espécies cítricas por meio de métodos convencionais pouco tem contribuído para o aumento do número de variedades comerciais na citricultura mundial, quando comparado ao progresso alcançado para outras espécies. Isto se explica pelo fato da hibridação e melhoramento em citros estarem seriamente limitados pela poliembrionia, esterilidade, incompatibilidade e longo período juvenil (Cameron & Frost, 1968; Grosser & Gmitter, 1990a).

Os primeiros trabalhos de cultura de tecidos de citros iniciaram-se na década de 50 (Schroeder & Spector, 1957), sendo posteriormente intensificados com o desenvolvimento dos meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e MT (Murashige & Tucker, 1969), os quais propiciaram grandes avanços nas técnicas de cultivo *in vitro*.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática vem adquirindo importância crescente em programas de melhoramento dos citros, pois, permite a realização de trabalhos envolvendo mutagênese, hibridação somática, transferência de genes, preservação de germoplasma e propagação de cultivares livres de doenças (Marin & Duran-Villa, 1988; Ollitrault et al., 1992; Mourão Filho & Grosser, 1992; Mendes-da-Gória, 1998).

Com o desenvolvimento de outras técnicas biotecnológicas, surgiram novas expectativas para o melhoramento de citros. As pesquisas sobre protoplastos abriram amplas possibilidades para o melhoramento genético das espécies cítricas (Cristofani, 1991; Mourão Filho et al., 1996). A técnica de fusão de protoplastos tem sido utilizada para a produção de muitos híbridos somáticos, tendo estes, grandes potenciais para o melhoramento de variedades tanto copa quanto porta-enxerto (Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Grosser, 1993; Ling & Iwamassa, 1994).

Os híbridos somáticos apresentam grande potencial por serem tetraplóides e manterem o genoma integral dos parentais, devido à não segregação meiótica. Assim, os genes deletérios recessivos existentes nos parentais não se expressam e as características controladas por genes dominantes ou codominantes presentes em cada um dos parentais podem expressar-se nos híbridos (Grosser & Gmitter, 1990b; Oliveira et al., 1994).

A partir da década de 80, a hibridação somática pela fusão de protoplastos passou a ser utilizada em programas de melhoramento genético de citros, tendo sido obtidas novas combinações parentais nos centros de pesquisa em Israel, Japão e EUA (Grosser & Gmitter, 1990a). Para a aplicação da técnica de hibridação somática em citros, torna-se necessária a obtenção de calos embriogênicos, fundamentais para a regeneração de plantas via embriogênese nos processos de pós fusão (Mourão Filho & Grosser, 1992; Benedito et al., 2000). Apesar da disponibilidade de trabalhos utilizando este tipo de explante para muitas espécies cítricas, há necessidade de se obterem resultados para espécies de interesse comercial, tanto para variedades copa, quanto para variedades porta-enxerto, sob as condições de cultivo e ambiente do Brasil (Mendes-da-Gória et al., 2000). Isto se deve ao fato de que uma série de fatores interferem na calogênese e embriogênese *in vitro*, tais

como genótipo da planta matriz, estado fisiológico do explante, condições ambientais às quais os explantes são expostos e meio de cultura (Button & Kochba, 1977). A técnica de fusão de protoplastos depende grandemente do desenvolvimento e adaptação de protocolos para regeneração de plantas via embriogênese somática nos processos de pós-fusão (Benedito et al., 2000).

Embriogênese somática a partir de calos tem se mostrado, muitas vezes, ser limitante no processo de melhoramento genético de citros e tem sido alvo de intensas pesquisas, com o intuito de maximizar a produção de plantas oriundas ou não de fusão de protoplastos (Vardi et al., 1982; Kobayashi et al., 1982).

2.2 Embriogênese somática

Embriogênese somática é um processo que vem sendo estudado em cultura de tecidos de mais de 30 famílias (Raghavan, 1976; Ammirato, 1983; Coelho 1997, Tomaz 2000). É muito importante na propagação de plantas, onde células somáticas sofrem uma seqüência de desenvolvimento semelhante ao processo de formação do embrião zigótico e trata-se de uma ferramenta essencial para pesquisas básicas no desenvolvimento de embriões (Dudits et al., 1991) e outros aspectos da fisiologia da planta (Jacobsen, 1991).

Embora não esteja completamente esclarecido se a maioria ou apenas determinadas células do explante ou do calo apresentam competência embriogênica, alguns fatores como o tipo de explante, o genótipo da planta matriz, condições de cultivo e o meio de cultura podem afetar a embriogênese somática *in vitro* (Button & Kochba, 1977).

Qualquer célula que, sob determinadas condições de crescimento, possui capacidade para resultar na formação de embriões somáticos é denominada célula com competência embriogênica.

Segundo Sharp et al. (1980), a embriogênese somática pode ser iniciada por dois diferentes caminhos. Em algumas culturas, a embriogênese ocorre diretamente na ausência da formação de qualquer calo para determinar a célula pró-embriônica. Respostas para este modelo foram verificadas em células nucelares de variedades poliembriônicas de *Citrus* (Sharp et al., 1982), e em embriões imaturos de *Malus pumila* (James et al., 1984). O segundo tipo de desenvolvimento requer a proliferação prévia de calos, e embriões originam-se da célula embriogênica induzida no calo. Este modelo é o mais comumente observado como demonstraram alguns trabalhos com embriões imaturos de *Zea mays* (Vasil & Vasil, 1980), e em folhas e caule de *Petunia inflata* (Handro et al., 1973). As células embriogênicas são caracterizadas por um denso citoplasma contendo grande quantidade de grãos de amido e um núcleo relativamente grande com nucléolo bem escuros (McWilliam et al., 1974).

A expressão destes dois padrões embriogenéticos parece estar relacionada com os eventos determinativos da citodiferenciação durante o ciclo mitótico. Yeoman (1970) observou que o destino de determinadas células filhas, após a mitose, define-se em um ciclo mitótico anterior à diferenciação, isto é, células que passarão por um processo embriogenético são derivadas de uma divisão celular determinativa antecedente. Para Sharp et al. (1982), estas células determinadas podem sofrer uma pausa pós mitótica até que as condições sejam favoráveis para o início da sequência de desenvolvimento característico da embriogênese somática.

Além das descrições geralmente aceitas sobre aspectos estruturais das células embriogenéticas, Williams & Maheswaran (1986) salientaram que existem muitos outros aspectos a serem estudados. Entre estes, destacam-se a origem dos embriões somáticos, a importância da separação física ou fisiológica das células iniciais, a

similaridade com a embriogênese zigótica e a importância relativa dos fitorreguladores no processo indutivo.

Em algumas espécies, estudos histológicos têm confirmado a provável origem unicelular dos embriões somáticos quando o desenvolvimento diretamente de um explante, ou como embriões secundários quando eles originam-se da superfície de outros embriões somáticos. Em *Citrus sinensis*, embriões somáticos podem originar-se de uma única célula na epiderme de embriões somáticos mais avançados (Button et al., 1974).

A questão da origem uni ou multicelular dos embriões somáticos parece estar diretamente relacionada ao comportamento das células. Haccius (1978) elaborou sua definição de embrião não zigótico como um novo indivíduo originado de uma célula simples, sem apresentar conexões vasculares com os tecidos maternos. Contudo, Raghavan (1986) e Tisserat et al. (1979) foram mais cautelosos ao afirmarem que a origem a partir de células simples não foi demonstrada em muitos casos, onde embriões bipolares normais aparentemente foram formados a partir de agregados celulares.

Na embriogênese somática indireta, via calos ou suspensões celulares, parece ser normal a formação de agregados de células embriogenéticas, os chamados complexos proembrionários, a partir dos quais um ou vários embriões somáticos podem se desenvolver. Agregados celulares proembriogenéticos foram assinalados surgindo a partir de células simples que passaram por eventos de redeterminação (Williams & Maheswaran, 1986). Embriões somáticos foram obtidos a partir de agregados embriogenéticos ou nódulos calosos de *Cichorium endivia* (Vasil & Hildebrandt, 1966), de células múltiplas de *Carica papaya* (Litz & Conover, 1981) e por vários destes explantes em *Petunia inflata* (Handro et al., 1973), e *Phoenix dactylifera* (Tisserat & De Mason, 1980). Estas ocorrências poderiam ser explicadas com base na

comparação entre o complexo celular proembrionário e o suspensor das angiospermas, apesar de que outros fatores poderiam justificar os diferentes padrões de expressão embriogenética a partir de um mesmo tipo de complexo proembrionário (Haccius, 1978).

2.2.1 Controle da embriogênese somática

2.2.1.1 Tipo e estágio de desenvolvimento do explante

O primeiro trabalho de embriogênese somática em espécies frutíferas envolveu a regeneração de *Citrus* sp. por tecidos nucelares em 1956. A significância deste trabalho não foi totalmente apreciada na época, e tem sido muito discutida nos dias de hoje, uma vez que naquela época os explantes mais utilizados para cultura de tecidos eram discos de folha, segmento de raiz e segmentos internodais, o que dificultava muito mais o trabalho, visto que necessitavam de ser desinfestados. Hoje, o uso de tecidos nucelares tem facilitado muito a introdução e manipulação de variedades *in vitro* (Litz & Gray, 1992).

Pesquisas realizadas por Ragan et al. (1968) resultaram na obtenção de explantes nucelares de *Citrus grandis*, sem passar por fase intermediária de calo. Embriões somáticos de *Citrus microcarpa* apresentaram a formação de uma massa globular pro-embriônica que produziu em abundância embriões somáticos secundários (Maheshwari & Rangaswamy, 1958).

O estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico dos tecidos do explante são os aspectos mais importantes para a iniciação de culturas embriogênicas. Para isto, é fundamental o reconhecimento de tecidos embriogênicos competentes em estágios iniciais. Neste sentido, Street (1976) desenvolveu o conceito de que a indução da divisão celular por si só não revela a totipotência das células, que parece

ser dependente do estado fisiológico das células do explante e das condições existentes durante a iniciação da cultura *in vitro*. A importância deste estado fisiológico é reforçada pela observação de que culturas embriogênicas são rapidamente obtidas de embriões somáticos e dificilmente a partir de tecidos diferenciados de plantas adultas. Segundo Vasil & Vasil (1980), tecidos maduros ou diferenciados de gramíneas geralmente não originam culturas embriogênicas. Esta ausência de resposta poderia ser atribuída a uma falta de conhecimento de como extrair a expressão deste potencial ou então às mudanças irreversíveis na competência dos tecidos. Em decorrência disto, apenas certos tecidos apresentam respostas em culturas *in vitro*.

Em citros, a juvenilidade dos tecidos é um dos fatores mais importantes para obtenção de embriões somáticos. Dentre os tecidos juvenis de espécies cítricas, os que apresentam melhores resultados são óvulos fertilizados ou não, embriões imaturos, nucelos e calos nucelares (Navarro & Juarez, 1977; Starrantino & Russo, 1980; Ollitrault, 1992).

Alguns autores citam diferenças na resposta embriogênica entre os tecidos citados anteriormente (Pasqual, 1985; Goldman, 1988). Entretanto, Navarro & Juarez (1977) observaram que a taxa de embriogênese a partir do cultivo de nucelo excisado de óvulos e do cultivo de óvulos inteiros é similar para ambos os tipos de explantes, porém a evolução *in vitro* do nucelo a embrião é mais rápida. No entanto, em relação à cultura de nucelos, a cultura de óvulos é mais vantajosa por ser conduzida mais facilmente e durante o ano inteiro, ou seja, em vários estádios de crescimento do fruto (Navarro & Juarez, 1977; Starrantino & Russo, 1980; Gmitter & Moore, 1986; Goldman, 1988).

Diferentes espécies mostram variação no potencial para a embriogênese somática, como *Daucus carota* (Steward et al., 1975) e *Trifolium praetense* (Keyes et al., 1980). Lu et al. (1982) estudaram

embriogênese somática em doze cultivares de *Zea mays*, e a frequência de resposta à embriogênese variou consideravelmente de um cultivar para o outro.

A época de extração e o tipo de explante (óvulos inteiros ou nucelos) têm variado bastante, de acordo com a espécie utilizada nos diferentes trabalhos, e parecem ter influência na resposta quanto à porcentagem e ao número de embriões por explante responsivo. (Cristofani, 1991).

Os óvulos apresentam um desenvolvimento mais lento *in vitro* que os nucelos em certos cultivares. Navarro & Juarez (1977) obtiveram embrióides de óvulos cultivados por até quinze semanas sem qualquer sinal prévio de diferenciação em laranja 'Navel'. Goldman (1988) observou que os nucelos em cultivo formaram embrióides mais rapidamente e em maior porcentagem que os óvulos, para laranja 'Pera'.

2.2.1.2 Composição do meio de cultura

Um importante aspecto da cultura de tecidos é definir um meio de cultura que possa sustentar seu crescimento e desenvolvimento. Isto requer, muitas vezes, testar diferentes meios de cultura, não raro modificados de forma empírica (Hu & Ferreira, 1998).

O meio de cultura idealizado por Murashige & Skoog (1962) e sua modificação realizada por Murashige & Tucker (1969) contribuíram muito para um maior sucesso na cultura e morfogênese de óvulos e outros órgãos de citros.

Dois tipos distintos de meio de cultura são necessários para que ocorra o processo de embriogênese somática, um meio para a iniciação da células embriogênicas e um outro para o subsequente desenvolvimento destas células em embriões. O primeiro meio de cultura (indução) normalmente contém auxina. O segundo meio

geralmente contém concentração inferior da mesma auxina ou baixa concentração de uma auxina diferente. Em algumas plantas, tanto a iniciação do embrião quanto a maturação do mesmo ocorre no primeiro meio de cultura e um segundo meio de cultura é empregado para o desenvolvimento da plântula (Ammirato, 1983). Embriogênese secundária ocorre com muita freqüência em meio de cultura líquido contendo 1 a 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Entretanto, isto pode ocorrer em culturas habituadas na ausência de auxina, por exemplo, em *Citrus sinensis* (Button et al., 1974).

O extrato de malte foi relatado como sendo benéfico à cultura de óvulos e nucelos de citros (Kochba et al., 1972). Em vários outros trabalhos, esta substância foi adicionada ao meio de cultura, na concentração de 500 mg L⁻¹, para estimular a indução da embriogênese de citros (Navarro & Juarez, 1977; Starratino & Russo, 1980). O efeito positivo do extrato de malte na indução à embriogênese somática de calos nucelares de citros também foi relatado por Vardi et al. (1982) e Gentile et al. (1992). Sabe-se que o extrato de malte é fundamental para indução da embriogênese somática em nucelos extraídos de óvulos não fertilizados e também é importante para a obtenção de embriões somáticos de citros por via direta (Kochba et al., 1982; Gmitter & Moore, 1986).

Andreoli (1985) constatou que os meios de cultura para a indução e cultivo de embriões imaturos devem ser mais complexos, contendo, além dos macro e micronutrientes, também substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas, carboidratos, compostos orgânicos e extratos naturais. Porém, Kobayashi et al. (1982) obtiveram uma resposta de 72% na taxa de embriogênese de óvulos excisados de flores de *Citrus sinensis* em meio constituídos por ágar e sacarose.

Dos componentes do meio de cultura, os carboidratos têm uma importância fundamental para a indução da embriogênese

somática e o cultivo dos embriões. O carboidrato mais comumente utilizado para cultura de tecidos ou células é a sacarose e a maioria dos meios de cultura o contem como a única fonte de energia (Jumin & Nito, 1996a, 1996b). Em vista de certas características, tais como alta solubilidade e rápida metabolização pela maioria das células vegetais, acredita-se que a sacarose é o melhor carboidrato para meios de cultura (Thorpe & Beaudoin-Eagan, 1984). Por outro lado, poucos trabalhos foram feitos com fontes alternativas de carboidratos nos meios de cultivo na cultura de embriões somáticos.

Para entrar na célula e ser prontamente metabolizada, a sacarose deve ser quebrada em moléculas menores e, nestas condições, é transportada através das membranas. Similarmente, nas plantas cultivadas em condições *in vitro*, a hidrólise da sacarose em glicose e frutose são realizadas por enzimas específicas localizadas na parede celular (Maretzki et al., 1971). Os produtos da hidrólise da sacarose, glicose e frutose, uma vez no interior da célula, podem entrar via glicolítica, rota da pentoses fosfato ou serem armazenadas nos vacúolos na forma de amido. A metabolização da sacarose fornece ATP e precursores intermediários para o ciclo de ácido tricarboxílico e a rota da pentose fosfato fornece poder redutor na forma de NADP, pentoses para a síntese de ácidos nucleicos e outros compostos intermediários (Thorpe, 1982). O poder redutor pode ser utilizado na redução de nitrato em amônio no processo de assimilação do nitrogênio e os ácidos nucleicos na síntese de várias proteínas.

Não só a fonte de carboidrato tem grande influência nos processos de cultivo *in vitro*, mas também sua concentração efetiva. A sacarose é empregada nos meios de cultura na concentração de 58 a 204 mM para *Citrus*, de acordo com os explantes utilizados (Chaturverdi & Mitra, 1974; Navarro et al., 1985).

A concentração de sacarose parece afetar a assimilação de nitrogênio do meio de cultura pelas células, e o efeito da citocinina na divisão celular pode também depender da disponibilidade deste carboidrato. Meios contendo alta concentração de sacarose e baixa de citocinina favorecem a diferenciação e crescimento de brotações Gamborg (1970).

Segundo Grey (1987), a taxa de consumo de sacarose presente no meio de cultura estaria relacionada com o nível e com a natureza da fonte de nitrogênio. Muitos estudos concentram-se na otimização da embriogênese somática, não levando em conta a importância da incorporação do nitrogênio no meio de cultura. A maioria das espécies de angiospermas que têm sido regeneradas por embriogênese somática foram cultivadas em meio MS ou outra formulação que contenha relativamente elevados níveis de nitrato de amônio. Os primeiros estudos feitos a este respeito incluindo, os de Steward et al. (1958) e Reinert (1959) em *Daucus carota*, utilizaram o meio White (1963) com fontes não reduzidas de amônia e baixas concentrações de nitrato. Sharp et al. (1980) constataram que um nível crítico de nitrogênio no meio de cultura de crescimento é dependente da concentração de auxina. Christianson (1985) revelou que a mudança da fonte de nitrogênio de amônia para nitrato é essencial em soja para melhoria na indução da embriogênese somática.

A embriogênese somática também é induzida quando a sacarose é substituída por outros carboidratos em diferentes espécies, incluindo sorbitol e maltose em cenoura (Kinnersley & Henderson, 1988), maltose em alfafa (Strickland et al., 1987), sorbitol e manitol em *Vigna aconitifolia* (Kumar et al., 1988).

Investigações nesta área, em cultura de tecidos também têm sido realizadas, destacando-se o uso de galactose, glicerol e lactose (Button, 1978; Kochba et al., 1982; Ollitrault, 1992) e sorbitol e manitol

(Bem-Havvyim & Neumann, 1983). Extrato de malte a 1% na presença de sacarose aumentou a frequência da embriogênese somática (Murashige & Tucker, 1969). Pesquisas realizadas por Button (1978) envolvendo oito fontes de carbono no meio de cultura, revelaram que a lactose e maltose aumentam a frequência da embriogênese somática em citros. Kochba et al. (1982) observaram que galactose e lactose apresentaram um efeito estimulatório considerável na embriogênese somática, para laranja 'Shamouti' (*C. sinensis*) e limão 'Villafranca' (*Citrus limon*). Mendes-da-Glória (1998) estudando o efeito de carboidratos na embriogênese somática de calos oriundos da fusão de protoplastos constatou que ao substituir a fonte de carboidrato do meio de cultura sacarose por lactose, maltose ou galactose o número de embriões produzidos aumentou.

Tomaz (2000) estudou o efeito de carboidratos na embriogênese de *Citrus* e constatou que a maior eficiência para o estímulo à embriogênese somática ocorreu em meio de cultura suplementado com maltose, galactose ou lactose, para linhagens de calo de laranjas 'Valência' e 'Caipira' e tangerina 'Cleopatra'.

Ben-Hayyim & Neumann (1983) estudaram o efeito do glicerol na embriogênese somática de *Citrus* e constataram que, em alguns cultivares, a embriogênese somática foi mais eficaz na ausência de sacarose nos meios de cultura. Deng et al. (1991) reportaram o efeito estimulatório do glicerol sobre a embriogênese somática, observando que praticamente todo calo de *Citrus sinensis* transformou-se em pequenos embriões somáticos verdes quando substituíram a sacarose por glicerol nas concentrações de 108, 217 e 543 mM.

Ling & Iwamasa (1997), estudando o efeito da sacarose, BA e lactose na embriogênese somática de oito espécies da família dos citros ou seja, em *Aegle marmelos*, *Atalantia ceylanica*, *Citropsis gabunensis*, *Clausena excavata*, *Glycosmis pentaphylla*, *Microcitrus australasia*,

Murraya paniculata e *Severinia buxifolia*, constataram que os meios de cultura MT contendo 146 mM de sacarose e MT contendo 146 mM de sacarose e 10 mg L⁻¹ BA estimularam a proliferação de calos enquanto que o meio MT contendo 146 mM de lactose, sem a presença de regulador vegetal, estimulou a embriogênese somática, concluindo, assim, que a embriogênese somática é também regulada por componentes do meio de cultura.

Os reguladores vegetais são substâncias da maior importância em cultura de tecidos de plantas. Segundo Pasqual et al. (1988) a adição das auxinas IAA, NAA e 2,4-D ao meio de cultura, suprimiu significativamente ou completamente a embriogênese somática nucelar em laranja 'Valência'. Este fato também foi observado por Moore (1985), com a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de IAA, 1,0 mg L⁻¹ de GA₃ e 0,01, 0,1, 1,0, 10 mg L⁻¹ ABA em pomelo 'Marsh' (*Citrus paradisi*). Em contraste, Kochba & Spiegel-Roy (1978), estudando tecidos nucleares de laranja 'Shamouti' (*Citrus sinensis*), observaram que as concentrações de 2 a 4 mM de ABA apresentaram a máxima resposta no estímulo à embriogênese somática. Um bom estímulo à embriogênese também foi observado quando baixas concentrações de ethephon (0,01 – 1,0 mg L⁻¹) foram adicionadas ao meio de cultura, enquanto que elevadas concentrações inibiram a embriogênese somática.

Existem outras substâncias que podem ser adicionadas ao meio de cultura com o intuito de promover a embriogênese somática em tecidos nucleares de citros, tais como, carvão ativado, caseína hidrolisada e água de coco (Sabharwal, 1963; Pasqual, 1985).

2.2.2 Maturação e germinação de embriões somáticos

Para o adequado desenvolvimento dos embriões somáticos, é necessário que estes passem pela etapa de maturação, a qual tem por finalidade fornecer condições de cultivo adequadas para simulação de um stress osmótico a fim de que os embriões acumulem reservas, como proteínas e aminoácidos, e que ocorra a expansão celular garantindo assim a sua germinação (Roberts et al., 1990).

Ling & Iwamasa (1997) isolaram embriões somáticos de 8 espécies da família dos citros, e subcultivaram esses embriões mensalmente no meio MS contendo 2,4-D ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), benzil adenina (BA) ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), extrato de malte (400 mg L^{-1}) e sacarose 146 mM . Constataram que a maioria dos embriões somáticos se desenvolveram em plântulas durante o primeiro subcultivo, mas aproximadamente 20% destes produziram embriões secundários ou até mesmo calos. Finalmente, observaram que a percentagem de germinação diminuiu gradativamente em subcultivos prolongados.

Ribeiro (1997), estudando o efeito dos sais do meio MS na presença de sacarose sobre o comprimento da parte aérea de embriões de laranja 'Pera', constatou a importância desse carboidrato no desenvolvimento *in vitro* de embriões, e evidenciou que embriões imaturos, em estádios iniciais, necessitam de concentrações mais elevadas de sacarose (131 a 175 mM) para completarem o desenvolvimento, enquanto os embriões adultos são menos exigentes. Este fato também foi observado por Hu & Ferreira (1998).

Desde os primeiros trabalhos descrevendo a embriogênese somática em *Citrus* não se descreveu um tratamento que favorecesse à maturação de embriões sendo estes transferidos diretamente do meio de cultura de indução para o meio de cultura de germinação de embriões, normalmente contendo GA_3 . Assim, muitas vezes ocorria a formação de

uma massa de calo ao redor do embrião e com isso o embrião acabava ficando oxidado e não germinava (Kochba et al., 1974).

Embriões no estágio de coração, derivados de protoplastos de tangerina 'Satsuma', foram transferidos para meio de cultura contendo metade da concentração de sais do meio MT, GA₃ (1 mg L⁻¹), sacarose (1%) e agente solidificante (0,2%). Após dois meses de cultivo, apenas 5% apresentavam desenvolvimento normal e regeneraram plantas; 50% a 60% apresentaram crescimento anormal com embriogênese secundária (Kunitake et al., 1991).

Beloualy (1991) observou que existe diferença significativa na capacidade de regeneração de plantas de diferentes variedades de *Citrus*. Para *Poncirus trifoliata* e citrange 'Carrizo', o maior número de embriões germinados foi obtido em meio MT suplementado com 5 mg L⁻¹ de BAP, mas este número é significativamente reduzido quando aumenta-se a concentração do BAP para 10 mg L⁻¹. No entanto, para *Citrus aurantium*, não ocorreu germinação nestas concentrações, sendo que o melhor meio de cultura foi aquele suplementado com 1 mg L⁻¹ de NAA e 5 mg L⁻¹ de BAP.

Estudos realizados com tangerina 'Kinnow' mostraram que o meio MS, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de cinetina e NAA (2 mg L⁻¹ a 10 mg L⁻¹) favoreceu à embriogênese somática, de 7 a 30%. Em contraste, acrescentando-se 2,4-D (2 mg L⁻¹ a 5 mg L⁻¹), a média de embriogênese somática decresceu significativamente de 25 para 8%. A maioria destes embriões somáticos germinaram como embriões normais mostrando desenvolvimento radicular e caulinar, mas alguns apresentaram apenas desenvolvimento caulinar os quais não puderam ser enraizados *in vitro* (Gill et al., 1994).

Fridborg et al. (1978) observaram o efeito do carvão ativado na embriogênese somática em *Daucus* e constataram que na ausência dessa substância ocorreu a inibição do desenvolvimento e não foi

observado sinais de diferenciação celular. Tomaz (2000), estudando o efeito do carvão ativado na germinação de embriões somáticos de laranja 'Westin', observou que o número de embriões não germinados em tratamentos que utilizaram carvão ativado, foi muito maior que o número de plantas obtidas, sugerindo que este elemento estaria adsorvendo substâncias responsáveis pelo processo de germinação.

2.3 Considerações finais

A análise criteriosa da literatura científica sobre o assunto revela que a embriogênese somática é uma técnica promissora para o auxílio nos programas de melhoramento genético *in vitro* de *Citrus*, porém, ainda faltam protocolos para otimização do processo.

Com exceção de alguns estudos, a maioria dos trabalhos realizados comprova a eficiência do uso da sacarose, lactose e galactose como fonte de carboidratos no meio de cultura para a indução da embriogênese somática em citros.

Por outro lado, não se tem um consenso quanto ao melhor protocolo a ser seguido para a otimização do processo de regeneração de plantas via embriogênese, visto que poucos trabalhos tratam de alteração no meio de cultura para aumentar a eficiência da maturação de embriões somáticos de citros.

Justifica-se desta forma, a investigação científica direcionada à otimização do processo de embriogênese somática e maturação de embriões em citros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados no Departamento de Produção Vegetal da USP/ESALQ e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da USP/CENA.

3.1 Material vegetal

Foram utilizados calos embriogênicos dos seguintes cultivares de citros: tangerina 'Ponkan' (*Citrus reticulata*, Blanco), tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata*, Blanco), laranja 'Itaborai' (*Citrus sinensis*, L. Osbeck.), laranja 'Valência' (*Citrus sinensis*, L. Osbeck.) e tangerina 'Kinnow' (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenore) em meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com 500 mg L⁻¹ de extrato de malte, 50 g L⁻¹ de sacarose, cultivados em ausência de luz, à temperatura de 27 ± 2°C, e subcultivados em intervalos de 4 semanas.

As linhagens de calos foram obtidas a partir de tecidos nucelares e ou de sementes abortadas, em cultivo *in vitro* por aproximadamente 12 meses.

3.2 Efeito de carboidratos na indução da embriogênese somática de calos de citros

Cinco fontes de carboidratos na indução da embriogênese somática foram avaliadas: sacarose, galactose, glicose, lactose e maltose, nas concentrações de 18, 37, 75, 110 e 150 mM. O meio de cultura utilizado foi o MT (Murashige & Tucker, 1969) modificado com 500 mg L⁻¹ de extrato de malte, com o pH ajustado para 5.8 (Apêndice).

Utilizaram-se 50 mg de calos embriogênicos por placa de Petri de plástico descartável (100 x 15 mm). Para que o explante fosse distribuído de forma homogênea, acrescentou-se 1 ml do mesmo meio de cultura líquido após a adição do calo e realizou-se movimentos circulares a fim de que ocorresse a desagregação do calo e este se espalhasse por toda a superfície do meio de cultura. O material foi incubado sob condições de luz indireta (300 lux), com fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com 50 mg de calo. As avaliações foram realizadas com a ajuda de um microscópio estereoscópio (Nikon, 102), após quatro semanas de incubação. Avaliou-se o número de embriões desenvolvidos em cada tratamento.

3.3 Efeito do GA₃, sacarose e carvão ativado na maturação e germinação de embriões somáticos de citros

Os embriões somáticos, no estágio cotiledonar, utilizados para avaliar o efeito do tratamento de maturação de embriões na obtenção de plântulas de citros foram aqueles provenientes dos tratamentos que deram melhor resultado no ensaio anterior, ou seja,

obtidos no meio de cultura MT suplementado com 75 mM de lactose e 500 mg L⁻¹ de extrato de malte, da variedade de tangerina 'Ponkan' e 'Kinnow'; MT suplementado com 37 mM de lactose e 500 mg L⁻¹ de extrato de malte, da variedade de laranja 'Valência' e tangerina 'Cravo' e os obtidos no meio de cultura MT suplementado com 75 mM de maltose e 500 mg L⁻¹ de extrato de malte, da variedade de laranja 'Itaborai'.

Os embriões somáticos foram transferidos com uma pinça para os meio de cultura sólido contendo sacarose nas concentrações de 0, 15, 29, 44, 58 e 73 mM na presença ou não de 0,5 g L⁻¹ carvão ativado, meio de cultura sólido contendo 73 mM de sacarose e GA₃ na concentração de 0,1 mg L⁻¹, na presença ou não de 0.5 g L⁻¹ carvão ativado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri descartável de plástico (100 x 15 mm) com 5 embriões.

Este material foi cultivado nos tratamentos por 15 dias em sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Os embriões somáticos foram transferidos para meio de cultura sólido contendo 73 mM de sacarose e 0,1 mg L⁻¹ de ácido giberélico, para favorecer à germinação, e mantidos em sala de crescimento com temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. As avaliações foram feitas 5 semanas após a transferência, determinando-se o número de embriões somáticos germinados por tratamento.

As plântulas obtidas foram transferidas para meio de cultura RMAN (Apêndice), para enraizamento onde foi avaliado o número de plantas enraizadas após 150 dias da maturação.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa SANEST, com análise de variância e teste de Tukey para comparações de médias (nível de significância de 1%). A análise estatística foi realizada com os dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de carboidratos na indução da embriogênese somática de calos de citros

A embriogênese somática foi constatada devido à observação dos diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos (globular, cotiledonar e coração) através de observações em microscópio estereoscópio (Figura 1). Para as variedades de tangerina 'Ponkan', 'Cravo' e 'Kinnow' e laranja 'Valência' e 'Itaborai' obtiveram os diferentes estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos em meio de cultura de estímulo à embriogênese somática, não se fazendo necessário o uso de um meio de cultura específico para que favorecesse a diferenciação dos embriões somáticos. Isto também foi observado por Perez et al. (1998) e Tomaz (2000) em vários genótipos de citros.

Pela análise dos experimentos realizados, pôde-se verificar que na variedade 'Ponkan' os carboidratos lactose e galactose foram aqueles que proporcionaram o maior número de embriões somáticos sendo a concentração 75 mM de lactose aquela que induziu a melhor resposta (Tabela 1). Esse mesmo efeito dos carboidratos foi verificado também nas variedades de laranja 'Valência', tangerina 'Kinnow' e tangerina 'Cravo', salientando-se que para esta última, houve menor intensidade de resposta e as concentrações 37 mM, 75 mM e 37 mM de lactose proporcionaram o maior número de embriões, respectivamente

(Tabela 1). Este resultado foi semelhante àquele obtido por Kochba et al. (1982), que estudaram a embriogênese somática de calos de diversas variedades de *Citrus* e constataram que o efeito estimulatório da galactose e ou da lactose foi evidente. Segundo estes autores, principalmente, a galactose estimula a produção de etileno e sabe-se também que altos níveis de etileno inibem a biossíntese de auxina, o que favorece a formação de embriões somáticos em calos embriogênicos. Este fato, provavelmente explica a resposta obtida em relação às variedades mencionadas.

O efeito benéfico da galactose também foi verificado por Tomaz (2000), onde constatou-se que uso de galactose na concentração de 110 mM provocou um maior número de embriões somáticos em calos de laranja 'Caipira'. Kunitake et al. (1991), estudando o efeito de carboidratos na embriogênese somática de tangerina 'Satsuma', verificaram que embriões podem ser induzidos somente quando acrescenta-se 15 mM de lactose ao meio de cultura. Nenhum embrião é formado em meio contendo 15 mM de glicose ou sacarose.

Benedito et al. (2000) estudando o efeito de carboidratos na embriogênese somática de calos cítricos concluíram que a galactose foi responsável pelas melhores respostas, embora a sua concentração fosse diferente para cada variedade estudada. A glicose foi o segundo carboidrato que melhor estimulou a embriogênese somática. Esses bons resultados com a glicose não foram observados com as variedades estudadas neste estudo, fortalecendo a afirmação de que existem diferenças na resposta ao estímulo embriogênico aos diversos carboidratos entre as espécies e variedades de citros (Vardi et al., 1982; Benedito et al., 2000).

Figura 1. Embriões somáticos de tangerina 'Ponkan' obtidos no meio de cultura suplementado com 75 mM de lactose. a) Embriões somáticos no estágio globular. b) Embrião somático no estágio coração. c) Embrião somático no estágio cotiledonar. Co = cotilédone. Barra = 0.6 mm.

Tabela 1. Embriogênese somática de citros em função de diferentes fontes e concentrações de carboidratos.

Concentrações	18 mM	37 mM	75 mM	110 mM	150 mM
Número médio de embriões por placa de Petri					
Tangerina 'Ponkan'					
Sacarose	0dA	0dA	0dA	0cA	0cA
Galactose	731,56aA	440,10bB	623,37bAB	701,62aA	653,25aA
Glicose	41,81cA	42,33cA	62,41cA	43,85bA	47,54bA
Lactose	314,44bC	820,86aAB	896,93aA	772,46aAB	650,31aB
Maltose	16,68cdA	17,92cdA	19,69cdA	31,83bA	832,65aB
Tangerina 'Cravo'					
Sacarose	0cA	0cA	0Ac	0dA	0dA
Galactose	196,58aA	237,97aA	180,05aA	226,82aA	194,08bA
Glicose	0cA	0cA	0cA	0cA	0cA
Lactose	146,14aB	276,39aA	240,02 aA	235,02aA	230,34abA
Maltose	39,04bBC	19,24bC	61,93bB	68,46bB	207,30bA
Laranja 'Itaborai'					
Sacarose	6,97bA	8,59cA	32,89dA	24,59dA	12,39cA
Galactose	67,48bC	330,02aB	381,23bB	1265,61aA	510,82aB
Glicose	25,84bB	135,40bA	152,09cA	148,94cA	131,82bA
Lactose	48,18bA	134,87bA	45,12cdA	36,61cdA	29,57bcA
Maltose	473,06aB	389,12aB	914,01aA	451,36bB	395,60aB
Laranja 'Valência'					
Sacarose	0cA	0dA	0dA	0dA	0dA
Galactose	420,82aA	327,97bA	428,87bA	472,63bA	507,93bA
Glicose	119,95bA	123,47cA	122,49cA	98,32cA	81,17cA
Lactose	497,28aB	955,60aA	893,53aA	864,94aA	763,66aA
Maltose	64,45bB	66,71cB	157,52cB	164,93cB	405,51bA
Tangerina 'Kinnow'					
Sacarose	0cA	0cA	0cA	0cA	0bA
Galactose	708,74aAB	448,96bB	678,38aAB	823,91aA	730,60aA
Glicose	12,90cA	27,98cA	77,76bA	57,73bA	0bA
Lactose	331,77bB	843,77aA	929,50aA	901,81aA	776,93aA
Maltose	0cB	0cB	0cB	0cB	739,07aA

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si (Tukey a 1%).

A sacarose, carboidrato largamente utilizado em cultivo de calos de *Citrus*, mostrou-se pouco eficiente ou ineficiente no estímulo da embriogênese somática para as variedades estudadas (Tabela 1). Isto também foi observado por Kochba et al. (1982), onde os autores demonstraram que níveis de sacarose maiores que 32 mM suprimem a embriogênese somática nos calos das variedades de *Citrus* testadas. Estudos realizados por Tomaz (2000) mostram que ocorreu a formação apenas de alguns embriões somáticos em linhagens de calos de laranja 'Caipira' e tangerina 'Cleópatra'. Mendes-da-Glória et al. (2000) ao trabalharem com calos cítricos oriundos de fusão de protoplastos concluíram que quando substituíam-se a sacarose por maltose (73mM) o número de embriões produzidos aumentava significativamente.

Para a variedade de laranja 'Itaborai' observou-se o efeito estimulatório de galactose e maltose, sendo que este último parece ser mais eficiente no estímulo da embriogênese somática para tal variedade até a concentração 75 mM, a partir da qual o efeito da galactose foi superior, onde a concentração 110 mM foi aquela de melhor resposta (Tabela 1). Nesta variedade, observou-se que a lactose não foi muito eficiente no estímulo da embriogênese, discordando de Singh et al. (1992) que observaram o efeito estimulatório deste carboidrato nas concentrações de 29 a 146 mM na embriogênese somática de laranja 'Shamouti'.

Observou-se também o efeito das variedades na embriogênese somática, visto que a galactose e lactose promoveram a indução de um maior número de embriões para as tangerinas 'Ponkan', 'Kinnow' e 'Cravo' e laranja 'Valência' com diferentes intensidades de resposta (Figura 2). Além disso, a laranja 'Itaborai' mostrou sua melhor resposta, quando utilizou-se a galactose e maltose (Tabela 1). Benedito et al. (2000) também observaram o efeito de diferentes variedades de

Citrus na resposta a embriogênese somática. Isto sugere que a embriogênese somática em citros é genótipo-dependente.

Figura 2. Resposta à embriogênese somática em função da galactose e lactose para as tangerinas 'Ponkan', 'Kinnow' e 'Cravo' e laranja 'Valência'.

Foi observado elevado número de embriões anormais formados em todos os tratamentos de todos os experimentos. Embriões pluricotiledonares ou fasciculados, embriões com apenas um cotilédone normal, embriões com os cotilédones fundidos, embriões com ápices ramificados, embriões oxidados, embriões que não se desenvolviam e acabava crescendo uma camada de calo ao seu redor e embriões vitrificados. Anomalias similares foram encontradas por vários autores (Button & Kochba, 1977; Gmitter Jr. & Moore, 1986; Coelho, 1997). Perez et al. (1998) observaram respostas diferenciadas nas estruturas embriogênicas obtidas em meio de cultivo suplementado com lactose ou maltose, como embrião globular e proliferação de calos, demonstrando assim a falta de sincronismo no desenvolvimento dos embriões somáticos de citros.

4.2 Efeito do GA₃, sacarose e carvão ativado na maturação de embriões somáticos de citros

Após ter observado o efeito da fonte de carboidrato na embriogênese somática, estudou-se o efeito do ácido giberélico, da sacarose e do carvão ativado na maturação dos embriões somáticos.

Constatou-se que, tanto para as tangerinas 'Cravo' e 'Kinnow' como para a laranja 'Itaborai' não houve diferença significativa entre os tratamentos para maturação de embriões somáticos no número final de embriões germinados (Tabela 2).

Tabela 2. Embriões somáticos germinados nos diferentes tratamentos de maturação.

Meio de cultura MT	Tangerina 'Ponkan'	Tangerina 'Cravo'	Tangerina 'Kinnow'	Laranja 'Itaborai'	Laranja 'Valência'
suplementado com:	Número médio de embriões somáticos germinados por placa de Petri				
0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ + 73 mM de sacarose c/ carvão	2.19 ab	1.34 a	0.70 a	1.38 a	1.55 ab
0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ + 73 mM de sacarose s/ carvão	2.18 ab	0.99 a	0.87 a	1.26 a	1.63 ab
0 mM sacarose	0.70 c	0.70 a	0.70 a	0.70 a	0.70 b
15 mM sacarose	1.67 b	0.87 a	0.70 a	1.34 a	1.63 ab
29 mM sacarose	1.85 ab	0.99 a	0.87 a	1.22 a	1.55 ab
44 mM sacarose	2.18 ab	1.46 a	0.87 a	1.26 a	1.55 ab
58 mM sacarose	2.19 ab	1.54 a	1.17 a	1.34 a	1.85 a
73 mM sacarose	2.18 ab	1.64 a	0.99 a	1.34 a	1.85 a
0 mM sacarose c/ carvão	0.70 c	0.70 a	0.70 a	0.70 a	0.70 b
15 mM sacarose c/ carvão	1.77 ab	0.99 a	1.17 a	1.38 a	1.55 ab
29 mM sacarose c/ carvão	1.67 b	1.22 a	1.28 a	1.46 a	1.58 ab
44 mM sacarose c/ carvão	2.27 ab	1.34 a	1.05 a	1.05 a	1.93 a
58 mM sacarose c/ carvão	2.35 a	1.58 a	0.70 a	1.54 a	2.02 a
73 mM sacarose c/ carvão	2.35 a	1.55 a	0.87 a	1.28 a	2.11 a

Médias seguidas da mesma na horizontal não diferem entre si (Tukey, a 1%).

Para a tangerina 'Ponkan' ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, sendo que aqueles com concentrações de sacarose de 58 e 73 mM na presença de carvão ativado foram mais eficientes para a maturação dos embriões somáticos, embora tenham diferido significativamente apenas daqueles com concentrações de 15mM de sacarose na ausência de carvão ativado, 29 mM de sacarose na presença de carvão ativado e nos tratamentos na ausência da sacarose. Com relação a presença ou não de carvão ativado no meio de cultura, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados.

Com relação à laranja 'Valência' as concentrações de 58 e 73 mM de sacarose na presença de carvão ativado também mostraram-se as mais eficazes na maturação dos embriões somáticos. No entanto diferiram significativamente apenas dos tratamentos com ausência de sacarose. Não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, no referente a presença ou não de carvão ativado no meio de cultura. Observou-se que os embriões colocados para a maturação nos meios de cultura isentos de sacarose apresentaram uma forte oxidação, embora chegasse até a ocorrer uma ligeira formação de calos ao seu redor mas após as 5 semanas o material estava oxidado (Figura 3a), mesmo em meio de cultura com presença de carvão ativado (Figura 3b).

Esses resultados demonstraram a importância da sacarose no desenvolvimento *in vitro* de embriões. Segundo Ribeiro (1997) embriões imaturos de citros em estágios iniciais, necessitam de concentrações mais elevadas de sacarose para completarem o desenvolvimento, enquanto que embriões adultos não são exigentes.

Figura 3. Aspecto geral dos embriões, plântulas e plantas de citros. a) Embriões somáticos de laranja 'Valência' maturados em meio de cultura na ausência de sacarose e presença de carvão ativado apresentando oxidação. b) Embriões somáticos de laranja 'Valência' maturados em meio de cultura na ausência de sacarose e carvão ativado apresentando intensa oxidação. c) Plântulas de laranja 'Valência' antes de serem transferidas para o meio de enraizamento. d) Plantas enraizadas de tangerina 'Ponkan'.

Em todas as variedades estudadas, o uso de GA₃ na concentração de 0,1 mg L⁻¹ não mostrou-se fundamental para a maturação de embriões somáticos. Este fato é verificado quando compara-se os tratamentos na presença de GA₃ com aqueles ausentes, na mesma concentração de sacarose (Tabela 2). Isto não foi observado por Button & Bornman (1971) e Kochba et al. (1974) onde constataram que o uso de 1,0 g L⁻¹ de GA₃ aumentou o desenvolvimento de raízes em embriões de *Citrus*, plenamente ou parcialmente desenvolvidos.

O carvão ativado possui a capacidade de adsorver substâncias tóxicas liberadas pelos explantes ou que casualmente são adicionadas ao meio de cultura através de seus componentes a exemplo das contidas no agar, sacarose e sais. É de se supor que o crescimento e desenvolvimento dos embriões sejam favorecidos quando componentes inibitórios são adsorvidos pelo carvão ativado (Debergh, 1983). Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho não demonstraram diferença significativa entre os meios de cultura contendo carvão e aqueles sem a presença do mesmo.

Na Tabela 3, observa-se o número de plântulas de citros obtidas por tratamento. Os embriões estavam em meio de cultura MT suplementado com 73 mM e 0,1 mg L⁻¹ de GA₃ e eram repicados entre quatro e cinco semanas.

Para tangerina 'Ponkan' pode-se observar que o maior número de plântulas foi obtido dos embriões provenientes do meio de cultura MT suplementado com 44 mM de sacarose e 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado, seguido do meio MT suplementado com 58 mM de sacarose mais 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado (Tabela 3). Isto também foi observado por Tomaz (2000), onde, para laranja 'Seleta Vermelha', o maior número de plantas foi obtido em meio de cultura com 44 mM de sacarose, sendo observado uma superioridade de 16% no número de embriões somáticos germinados, em comparação ao meio de cultura com 37mM de maltose.

Tabela 3. Número total de plântulas de citros obtidas nos diferentes tratamentos para maturação de embriões somáticos.

Meio de cultura MT suplementado com:	Tangerina 'Ponkan'	Tangerina 'Cravo'	Tangerina 'Kinnow'	Laranja 'Itaborai'	Laranja 'Valência'
0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ + 73 mM de sacarose c/ carvão	6	4	0	3	6
0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ + 73 mM de sacarose s/ carvão	5	2	3	4	4
0 mM sacarose	0	0	0	0	0
15 mM sacarose	2	1	0	6	4
29 mM sacarose	6	2	2	3	6
44 mM sacarose	7	7	3	2	5
58 mM sacarose	6	9	4	2	9
73 mM sacarose	9	10	2	2	8
0 mM sacarose c/ carvão	0	0	0	0	0
15 mM sacarose c/ carvão	6	4	3	0	0
29 mM sacarose c/ carvão	7	5	6	3	5
44 mM sacarose c/ carvão	11	3	2	4	6
58 mM sacarose c/ carvão	10	4	4	2	10
73 mM sacarose c/ carvão	9	7	3	2	15

Para tangerina 'Cravo', foi observado que o maior número de plântulas foi obtido dos embriões provenientes do meio de cultura suplementado com 73 mM de sacarose na ausência de carvão ativado, seguido do meio MT suplementado com 58 mM de sacarose na ausência de carvão ativado (Tabela 3). Para laranja 'Itaborai' e tangerina 'Kinnow', o maior número de plântulas foi obtido dos embriões provenientes do meio de cultura MT suplementado com 15 mM de sacarose na ausência de carvão ativado e 29 mM de sacarose na presença de carvão ativado, respectivamente.

Para laranja 'Valência' foi observado que o maior número de plântulas foi obtido dos embriões somáticos provenientes do meio de cultura MT, suplementado com 73 mM de sacarose na presença de carvão ativado (Tabela 3), o que difere do resultado obtido por Tomaz (2000), onde o autor observou que o maior número de plântulas foi obtido em meio de cultura MT, suplementado com 44 mM de sacarose na ausência de carvão ativado.

As plântulas obtidas foram transferidas em meio de cultura RMAN para enraizamento (Apêndice). Na Figura 3c observam-se as plântulas de laranja 'Valência' antes de serem transferidas para o meio de cultura para enraizamento.

Observou-se que o maior número de plantas regeneradas foi obtido dos embriões oriundos do meio de cultura MT suplementado com 58mM de sacarose na presença ou na ausência de carvão ativado para tangerina 'Ponkan' (Tabela 4). Tanto para tangerina 'Kinnow' como para laranja 'Itaborai' parece não haver tido uma grande influência dos tratamentos no número total de plantas obtidas (Tabela 4). Para laranja 'Valência' e tangerina 'Cravo' observou-se que o maior número de plantas regeneradas foi obtido dos embriões que permaneceram no meio

de cultura MT suplementado com 58 mM na presença de carvão ativado, e 73 mM na ausência de carvão ativado, respectivamente. (Tabela 4).

Tabela 4. Número total de plantas obtidas a partir de 15 embriões somáticos em 5 variedades cítricas, em 14 meios de cultura diferentes.

Meio de cultura MT suplementado com:	Tangerina 'Ponkan'	Tangerina 'Cravo'	Tangerina 'Kinnow'	Laranja 'Itaborai'	Laranja 'Valência'
0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ + 73 mM de sacarose c/ carvão	2	1	0	1	2
0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ + 73 mM de sacarose s/ carvão	3	1	2	2	1
0 mM sacarose	0	0	0	0	0
15 mM sacarose	2	0	0	3	3
29 mM sacarose	4	1	1	2	3
44 mM sacarose	2	3	2	1	4
58 mM sacarose	5	4	2	1	3
73 mM sacarose	2	6	2	1	2
0 mM sacarose c/ carvão	0	0	0	0	0
15 mM sacarose c/ carvão	4	1	2	0	0
29 mM sacarose c/ carvão	2	2	3	1	3
44 mM sacarose c/ carvão	0	2	2	2	4
58 mM sacarose c/ carvão	5	3	1	1	7
73 mM sacarose c/ carvão	3	5	2	2	6

Foi observado que os embriões que permaneceram em meio de cultura com 58mM de sacarose na presença ou ausência de carvão ativado (tangerina 'Ponkan'), 73 mM de sacarose na ausência de carvão ativado (tangerina 'Cravo'), 29 mM de sacarose na presença de carvão ativado (tangerina 'Kinnow'), 15 mM de sacarose na ausência de carvão ativado (laranja 'Itaborai'), e 58 mM de sacarose na presença de carvão ativado (laranja 'Valência) para a maturação, quando foram transferidos para o meio de cultura de germinação e posterior enraizamento, proporcionaram a maior percentagem de plantas enraizadas 33%, 40%, 20%, 20% e 47% respectivamente. Enquanto que todos os meios de cultura que não apresentavam sacarose não houve conversão de embriões em plantas para todas as variedades estudadas (Tabela 4).

Nota-se que houve uma baixa conversão dos embriões somáticos em plantas (máximo de 47%), isso pode ser explicado pelo fato de que em citros, apesar do grande número de embriões formados a partir de calos embriogênicos, poucas são as plantas que se desenvolvem destes embriões. Existem alguns requisitos básicos para aumentar a eficiência de regeneração, como a obtenção de embriões normais, a obtenção de um equilíbrio entre o desenvolvimento do sistema radicular e brotos e a composição do meio de cultura (Gmitter Junior & Moore, 1986; Gindy, 1990; Song et al., 1991).

Nota-se ainda que obteve-se um número de plantas enraizadas inferior ao número de plântulas obtidas para todas as variedades estudadas, isto se deve ao fato de que muitas plântulas não formavam raízes, oxidavam e não se desenvolveram.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos, pode-se concluir que:

- Galactose 18 mM e lactose 75 mM induziram eficientemente a embriogênese somática em tangerina 'Ponkan'.
- Galactose e lactose 37 mM induziram eficientemente a embriogênese somática em de tangerina 'Cravo'.
- Galactose 110 mM e lactose 75 mM induziram eficientemente a embriogênese somática em de tangerina 'Kinnow'.
- Galactose 150 mM e lactose 37 mM induziram eficientemente a embriogênese somática em de laranja 'Valência'.
- Galactose 110 mM e maltose 75 mM induziram eficientemente a embriogênese somática em de laranja 'Itaborai'.
- O uso de 0.5 g L⁻¹ de carvão ativado em meio de cultura para a maturação de embriões não favoreceu a germinação dos mesmos.

- O uso de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 em meio de cultura para a maturação de embriões não favoreceu a germinação dos mesmos.
- As concentrações de 58 e 73mM de sacarose foram melhores para a maturação de embriões da variedade de laranja 'Valência' e tangerina 'Ponkan'.
- A máxima eficiência de conversão de embriões somáticos em plantas, para as tangerinas 'Ponkan', 'Cravo' e 'Kinnow' e laranjas 'Itaborai' e 'Valência', foi de 33%, 40%, 20%, 20% e 47%, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985, **Anais** Brasília, DF: EMBRAPA-CNPQ/ABCTP, 1985. p.25-28.
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds), **Handbook of Plant Cell Culture, Techniques for Propagation and Breeding** New York: Macmillan, 1983. v1, p.82-123.
- BELOUALY, N. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.24, p.29-34, 1991.
- BEM-HAYYIM, G.; NEUMANN, H. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in citrus callus cultures. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie** v.110, p.331-338, 1983.
- BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, p.33-38, 2000.

- BUTTON, J. The effects of some carbohydrates on the growth and organization of *Citrus* ovular callus. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologia**, v.110, p.331-337, 1978.
- BUTTON, J. ; BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange in vitro. **Journal of South African of Botany**, v.37, n.2, p.127-134, 1971.
- 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**, v.25, n.85, p.446-457, 1974.
- BUTTON, J., KOCHBA, J. Tissue culture in the *Citrus* industry. In; REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer- Verlag,. v.90, p.70-92, 1977
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, H.J. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: Univ. of California Press,. v.2, p.325-381, 1968.
- CHATURVERDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus culture. **HortScience**, v.9, n.2, p.118-120, 1974.

- CHRISTIANSON, M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis In: HENKE, R.R., HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. (Eds), **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum, 1985. p 83-103.
- COELHO, A.F.S. Regeneração de plantas de espécies cítricas a partir do cultivo de óvulos *in vitro*. Viçosa, 1997. 67p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.
- CRISTOFANI, M. Adaptação de metodologias de cultura de tecidos visando o melhoramento através de indução de mutações em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera. Piracicaba, 1991. 185p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DELBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.270-276, 1983.
- DENG, Z.A.; ZHANG, W.C.; WAN, S.Y. Induction of somatic embryogenesis from habituated nucellar calluses in *Citrus*. **Journal of Fruit Science**, v.8, n.4, p.193-200, 1991.
- DUDITS, D.; BOGRE, L.; GYORGY, J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v.99, p.475-484, 1991.
- FAO. FAOSTAT - **statistics database**. [Http://apps.fao.org](http://apps.fao.org) (8 abril 2001).

- FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. The effect of active charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v.43, p.104-106, 1978.
- FUNDECITRUS (2001). <http://www.fundecitrus.com.br/> (8 de abril de 2001).
- GAMBORG, L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, v.45, p.372-375, 1970.
- GENTILE, A.; TRIBULATO, E.; DENG, Z.N. *In vitro* selection of nucellar lemon callus and regeneration of plants tolerant to *Phoma tracheiphila* toxin. **Advances in Horticultural Science**, v.6, n.4, p.151-154, 1992.
- GILL, M.I.S.; SINGH, Z.; DHILLON, B.S.; GOSAL, S.S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on calluses derived from seedling explants of 'Kinnow' mandarin (*Citrus nobilis* Lour. X *Citrus deliciosa* Tenore). **Journal of Horticultural Science**, v.69, n.2, p.231-236, 1994.
- GINDY, E.F. Plant regeneration from sour orange and Rangpur lime undeveloped ovule cultures. **Annals of Agricultural Science**, v.28, n.4, p.2407-2417, 1990.

- GMITTER JUNIOR, 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**, v.6, n.2, p. 139-147, 1986.
- GREY, M. Biochemistry of forest trees especies in culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J., (Eds.) **Cell and tissue culture in forestry**. Dordresht: Marthinus Nijhoff, 1987.
- GROSSER, J.W. Citrus scion and rootstock improvement via somatic hybridization. **Acta Horticulturae**, v.336, p.297-305, 1993.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**. v.8, p.339-374, 1990a.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JR, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germoplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, v.25, n.2, p.147-51, 1990b.
- GOLDMAN, M.H.S. Cultura de tecidos nucleares, isolamento e radiosensitividade de protoplastos de *Citrus sinensis* (L. Osbeck cv. Pera.) Piracicaba: ESALQ, 1988. 127p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74-81, 1978.

- HANDRO, H.; RAO, P.S.; HARADA, H. A histological study of the development of buds, roots and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. **Annals of Botany**, v.37, p.817-821, 1973.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : EMBRAPA-CNPq/ABCTP, 1998. p. 371-393.
- INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Previsões e estimativas das safras agrícolas por escritório de desenvolvimento rural do Estado de São Paulo**. Ano agrícola - 2000/20001. <http://www.ie.sp.gov.br> (mar 2001).
- JACOBSEN, H.J. Somatic embryogenesis in seed legumes: the possible role of soluble auxin receptors. **Journal of Botany**, v.40, p.139, 1991.
- JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; MALHOTRO, S.B. Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.3, p.333-341, 1984.
- JUMIN, H.B.; NITO, N. Plant regeneration via embryogenesis from protoplasts of six plant species related to *Citrus*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.332-336, 1996a.
- JUMIN, H.B.; NITO, N. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of Uganda cherry orange (*Citrus schuweinfurthii*). **Plant Cell Reports**, v.15, p.754-757, 1996b.

KEYES, G.J.; CLILNS, G.B.; TAYLOR, N.M. Genetic variation in tissue culture of red clover. **Theoretical Applied Genetics**, v.58, p.256-271, 1980.

KINNERSLEY, A.M.; HENDERSON, W.E. Alternative carbohydrates promote differentiation of plant cells. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.15, p. 3-16, 1988.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Studies on the nucellar embryogenesis in *Citrus*. III. On the differences in ability to form embryoids en *in vitro* culture of ovules from poly and mono-embryonic cultivars. **Bulletin Fruit Tree Research Station**, v.4, p.21-27, 1982.

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

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by giberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, v.38, p.795-802, 1974.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMAN, H.; SAAD, S. Stimulation of embriogenesis in citrus ovular callus by ABA, ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA₃. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**. v.89, p.427-432, 1978.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subculture nucellar ?

- KUMAR, A.S.; GAMBORG, O.L.; NABORS, M.W. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Vigna aconitifolia*. **Plant Cell Reports**, v.7, p.138-141, 1988.
- KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Scientia Horticulturae**, v.47, p.27-33, 1991.
- LING, J.T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* e *Citrus gabunensis* through electrofusion. **Plant Cell Reports**, v.13, n.9, p.493-497, 1994.
- LING, J.T.; IWAMASA, M. Plant regeneration from embryogenic calli of six *Citrus* related genera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.49, p.145-148, 1997.
- LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Effect of sex type season and other factors on in vitro establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. **Journal of American Society for Horticultural Science.**, v.106, p.792-794, 1981.
- LITZ, R. E.; GRAY, D.J. Organogenesis and somatic embriogenesis. In: HAMMERCHALAG, F. A.; LITZ, R.E., (Ed.) **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. cap. 1, p. 3-34.
- LU, C.; VASIL, I.K.; OZIAS-AKINS, P. Somatic embriogenesis in *Zea mays* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, p.109-112, 1982.

MACHADO, M.A. Biotecnologia na citricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, v.1, n.1, 8-10, 1997.

MAHESHWARI, P.; RANGASWAMY, N.S. Polyembryony and *in vitro* cultures of embryos of *Citrus* and *Magifera*. **Indian Journal of Horticulture**, v.15, p.272-282, 1958.

MARETZKI, A.; DELLA CRUZ, A.; NICKELL, L.G. Extracellular hydrolysis of starch in sugarcane cell suspensions. **Physiologia Plantarum**, v.54, p.521-5, 1971.

MARIN, M.L., DURAN-VILA, N. Survival of somatic and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) after immersion in liquid nitrogen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.**, v.14, n.1, p.51-57, 1988.

McWILLIAM, A.A., SMITH, S.M.; STREET, H.E. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). **Annals of Botany**, v.38, p.243-250, 1974.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J. Hibridação somática entre laranja 'Caipira' e limão 'Cravo' através de fusão de protoplastos. Piracicaba, 1998. 78p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

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

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

MOURÃO FILHO, F.A.A.; GROSSER, J.W. Callus induction from Citrus relatives: an alternative source of protoplasts for somatic hybridization experiments. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.105, p.52-56, 1992.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus development. **Fruit Varieties Journal**, v. 50; p76-80, 1996.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1969. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. p.1155-1161.

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

NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M.; JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. **HortScience**, v.20, n.2, p.214-215, 1985.

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

OLLITRAULT, P. Somatic embryo grafting: a promising technique for *Citrus* breeding and propagation. **Fruits**, v.47, p. 213-218, 1992 (Número spécial Agrumes).

OLLITRAULT, P., OLLITRAULT, F., CABASSON, C. Induction de cals embryogènes d'agrumes par culture d'ovules. Détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons. **Fruits**, v.47, p.204-212, 1992. (Numéro spécial Agrumes).

PASQUAL, M.; ANDO, A.; CRÓCOMO, O.J. Influência de reguladores de crescimento sobre a embriogênese *in vitro* de nucelos de *Citrus sinensis* cv. Valência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.3, p.255-259, 1988.

- PASQUAL, M. Regeneração de plantas *in vitro* e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba: ESALQ, 1985. 106p. Dissertação (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.
- PEREZ, R.M.; GALIANA, A.M.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Embryogenesis in vitro several citrus species and cultivars. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.73, n.6, p.796-802, 1998.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargil, 1991. p.281-296.
- RAGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro initiation of nucelar embryos in monoembryonic *Citrus*. **HortScience** v 3, p. 226-227, 1968.
- RAGHAVAN, V. **Experimental Embryogenesis in Vacuolar Plants**. London: Academic Press, 1976. 603p.
- RAGHAVAN, V. **Embryogenesis in Angiosperms**. **Cambridge:University** Press, 1986. 303p.
- REINERT, J. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von advantivembryonem and gluebekulturen aus kootten. **Planta**, v.53, p.318-338, 1959.

- RIBEIRO, V. G. Localização de embriões zigóticos e nucelares em sementes de citros e ajustes do meio MS para o resgate de embriões imaturos *in vitro*. Lavras, 1997. 61p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras, 1997. 61p.
- ROBERTS, D.S.; FLINN, B.S.; WEBB, D.T.; WEBSTER, F.B.; SUTTON, C.S. Absciscic and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. **Physiologia Plantarum**, v.78, p.355-360, 1990.
- SABHARWAL, P.S. In vitro culture of ovules, nucelli and embryos of *Citrus reticulata* Blanco var.Nagpuri. In: MAHESWARI, P. ; RANGASWAMY, N.S., (Eds.) **Plant tissue and organ culture – A Symposium**. New Delhi: Univesity of Delhi, 1963. p. 265-274.
- SCHROEDER, C.A., SPECTOR, C. Effect of giberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. **Science**, v.126, n.32, p. 701-702, oct. 1957.
- SHARP, W.R.; SONDAHL, M.R.; CALDAS, L.S. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, v.2, p.269-310, 1980.
- SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; SONDAHL, M.R. Application on somatic embriogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. **Proceedings 5 th International Congress Plant Tissue Culture** Japan Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo: Maruzen, 1982.p. 759-762, 1982.

- SHING, A.K.; NITO, N.; IWAMASA, M.; SUBHADRA, B.S. Influence of lactose and glicerol on growth somatic embryogenesis of *Citrus* callus. **Acta Horticulturae**, n.321, 606-609p., 1992. / Presented at International Symposium on Tropical Fruit, Frontier in Tropical Fruit Research, Japan. 1992.
- SONG, W.S.; OH, S.D.; CHO, H.M.; PARK, J.H. Plant regeneration in dangyooza (*Citrus grandis* Osbeck) trough somatic embryogenesis. 1 - Effect of plant growth regulators on embryogenic callus induction and somatic embryogenesis. **Research Reports of the Rural Development Administration, Biotechnology**, v.33, n.2, p.14-21, 1991.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: Janick, J.; Moore, J.N. (Eds) **Advances in Fruit Breeding**. West Lafayette, Indiana: Purdue University Press, 1975. p. 507-540
- STARRANTINO , A.; RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe of polyembrionic *Citrus* cultivars. **HortScience**, v.15, n.3, p.296-297, 1980.
- STEWARD, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organization in cultures from freely suspended cell. **American Journal of Botany**, v.45, p.705-708, 1958.
- STEWARD, F.C.; ISRAEL, H.W.; MOTT, R.L.; WILSON, H.J.; HRIKORIAN, A.D. Observation on growth and morphogenesis in cultured cells of carrot (*Daucus carota* L.). **Philosophical Transactions of Royal Society of London** Ser. B. v. 273, 1975. 33-53p.

- STREET, H.E. Cell cultures a toll in plant biology. In: DUDITS, D.; FARKAS, G.L.; MALIGA, G. (Eds.) **Cell genetics in high plants**. Budapest: House Hungarian. Academic of Sciences, 1976. p.7-38.
- STRICKLAND, S.G.; NICHOL, J.W.; McCALL, C.M.; STUART, D.A. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 48, p.113-121, 1987.
- TISSERAT, B.; ESAN, E.B.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperms **Horticultural Reviews**, v.1, p.1-78, 1979.
- TISSERAT, B.; DE MASON, D.A. A histological study of development of adventive EMBRYOS IN ORGAN CULTURE OF *Phoenix dactylifera*. **Annals of Botany**, v.46, p.465-472, 1980.
- THORPE, T.A. Carbohydrate utilization and metabolism. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Eds) **Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1982. cap 11, p.325-68.
- THORPE, T.A.; BEAUDOIN-EAGAN, L.D. C-metabolism during grow and shoot formation in tabacco callus cultures. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.113, p.337-346, 1984.
- TOMAZ, M.L. Embriogenese somática em *Citrus* spp. Piracicaba, 2000. 60p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Plant regeneration from citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, n.2, p.171-176, 1982.

VASIL, V.; HILDERBRANDT, A.C. Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown in vitro. **Planta**, v.68, p.69-82, 1966.

VASIL, V.; VASIL, I.K. Isolation and culture of cereal protoplasts II. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum Americanum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.56, p.97-99, 1980.

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

WHITE, P.R. **A handbook of plant and animal tissue culture**. Lancaster: Jaques Cattle Press, 1963.

YEOMAN, M.M. Early development in callus cultures. **International Journal of Cytology**, v.29, p.283-409, 1970.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA PARA CITROS

Soluções estoque do meio MT (Murashige & Tucker, 1969)

MT Macronutrientes estoque (50 X)		g L⁻¹
NH ₄ NO ₃		82.5
KNO ₃		95.0
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O		18.5
KH ₂ PO ₄		7.5
K ₂ HPO ₄		1.0
MT Micronutrientes estoque (100 X)		g L⁻¹
H ₃ BO ₃		0.62
MnSO ₄ H ₂ O		1.68
ZnSO ₄ 7H ₂ O		0.86
KI		0.083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0.025
CuSO ₄ 5H ₂ O		0.0025
CoCl ₂ 6H ₂ O		0.0025
MT Ferro estoque (200 X)		g L⁻¹
Na ₂ EDTA		7.45
FeSO ₄ .7H ₂ O		5.57
MT Vitaminas estoque (100 X)		g L⁻¹
Myo-inositol		10.0
Thiamine-HCl		1.0
Pyridoxine-HCl		1.0
Nicotinic Acid		0.5
Glycine		0.2

MT Cálcio estoque (66 X)**g L⁻¹**CaCl₂ MnSO₄ H₂O

29.33

Composição dos meios de cultura**EME**

MT Macronutrientes estoque (50X)	20 mL L ⁻¹
MT Micronutrientes estoque (50X)	10 mL L ⁻¹
MT Vitaminas estoque (100X)	10 mL L ⁻¹
MT Cálcio estoque (66X)	15 mL L ⁻¹
MT Ferro estoque (200X)	5 mL L ⁻¹
Sacarose	50 g L ⁻¹
Extrato de Malte	0.5 g L ⁻¹
Agar	8 g L ⁻¹

RMAN

MT Macronutrientes estoque (50X)	10 mL L ⁻¹
MT Micronutrientes estoque (50X)	5 mL L ⁻¹
MT Vitaminas estoque (100X)	5 mL L ⁻¹
MT Cálcio estoque (66X)	15 mL L ⁻¹
MT Ferro estoque (200X)	5 mL L ⁻¹
Sacarose	25 g L ⁻¹
NAA estoque (279,3 mg L ⁻¹)	1.0 mL L ⁻¹
Agar	8 g L ⁻¹

O pH foi ajustado para 5.8 com KOH, antes de adicionar o Agar.

Os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 1atm.