ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CULTURA DE TECIDOS
VISANDO O MELHORAMENTO ATRAVÉS DE INDUÇÃO DE MUTAÇÕES
EM *Citrus sinensis* (L.) OSBECK cv. PERA

MARIANGELA CRISTOFANI
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz" da Uni-
versidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de concen-
tração: Genética e Melhoramen-
to de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

C933a Cristofani, Mariangela
Adaptação de metodologias de cultura de tecidos
visando o melhoramento através de indução de muta-
ções em Citrus sinensis (L.) osbeck cv. Pera. Pi-
racicaba, 1991.

185p.. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Laranja pera - Cultura de tecido - Metodolo-
gia 2. Laranja pera - Melhoramento 3. Laranja pera-
Mutação induzida I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.31

ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CULTURA DE TECIDOS
VISANDO O MELHORAMENTO ATRAVÉS DE INDUÇÃO DE MUTAÇÕES
EM *Citrus sinensis* (L.) OSBECK cv. PERA

Mariângela Cristofani

Aprovada em: 27/06/1991

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

CENA/USP

Prof. Dr. Akihiko Ando

ESALQ/USP

Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes

CENA/USP

Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto
Orientador

*Aos meus pais VICENTE E AVANILDA
e aos meus irmãos
NIVALDO, SILVIA e
RODRIGO,*

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Augusto Tulmann Neto, pela orientação, amizade e interesse por minha carreira científica.

À Dra. Beatriz M.J. Mendes pela amizade e inestimável ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Akihiko Ando pela amizade e ensinamentos transmitidos.

À Professora Beatriz Appezzato e a Magali Aparecida Rodrigues Machado pela amizade e orientação nos estudos dos cortes histológicos realizados no presente trabalho.

À Benedita Inês F.P. Rodrigues e Wlamir de Aguiar Godoy pela amizade e auxílio nos trabalhos de laboratório.

Aos companheiros do curso de Mestrado, Benedita Aparecida da Silva e Antônio Fluminhan Junior e as companheiras de "República", Edna Tenório Nunes, Elaine Mendonça Bernades e Marilene Iamauti pela amizade e valiosas sugestões a este trabalho.

Aos funcionários e estagiários da Seção de Radiogenética, Paulo Cassieri, José Benedito Alves, Cristina Falco, Edson Tobias Domingues, Rodrigo Latado e Telma Watanabe pela amizade e valiosa ajuda.

À FAPESP e CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Departamentos de Genética, Botânica e Bioquímica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP.

À Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, agradeço.

Página

3.2.1. Efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA na formação de calos e embrióides em tecido nucelar (Experimento 1)	48
3.2.2. Efeito de diferentes meios de cultura na formação de calos e embrióides em tecido nucelar (Experimento 2)	49
3.2.3. Indução de embriogênese somática em calos nucleares (Experimento 3) ...	50
3.2.4. Efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA no desenvolvimento de plantas a partir de embrióides (Experimento 4)	51
3.2.5. Efeito de diferentes meios de cultura na proliferação de calo e embrióides em calos obtidos em meio MT básico sem suplementação com reguladores de crescimento (Experimento 5)	52
3.2.6. Verificação do fenômeno da habituação em calos nucleares (Experimento 6)	53
3.2.7. Efeito de diferentes concentrações de BAP e NAA na indução de brotações adventícias (Experimento 7) ..	55
3.2.8. Efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação de brotações adventícias (Experimento 8) ..	56
3.2.9. Efeito de diferentes reguladores de crescimento no enraizamento das brotações adventícias (Experimento 9)	57

3.2.10. Cortes histológicos (Experimento 10)	58
3.2.11. Obtenção de protoplastos (Experimento 11)	59
3.2.11.1. Isolamento de protoplastos	59
3.2.11.2. Purificação dos protoplastos	59
3.2.11.3. Verificação do rendimento de protoplastos durante o processo de isolamento.	63
3.2.12. Verificação da viabilidade dos protoplastos (Experimento 12)	63
3.2.13. Cultivo dos protoplastos (Experimento 13)	64
3.2.14. Radiossensitividade dos diferentes materiais	66
3.2.14.1. Radiossensitividade dos tecidos nucelares (Experimento 14)	66
3.2.14.2. Radiossensitividade dos calos nucelares (Experimento 15)	67
3.2.14.3. Radiossensitividade em protoplastos (Experimento 16)	68
3.2.14.4. Radiossensitividade em cotilédones de embriões nucelares (Experimento 17)	69

Página

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Indução de calos e embriões somáticos a partir de núcelos	71
4.1.1. Efeitos de diferentes concentrações de CIN e IAA (Experimento 1)	71
4.1.2. Efeito de reguladores de crescimento CIN, IAA e BAP (Experimento 2) .	76
4.2. Indução de embriogênese somática a partir de calos núcelares (Experimento 3)	80
4.3. Desenvolvimento de plantas a partir de embriões somáticos em meios de cultura com diferentes concentrações de CIN e IAA (Experimento 4)	84
4.4. Efeito de diferentes meios de cultura no desenvolvimento dos calos núcelares e indução da embriogênese nestes calos (Experimento 5)	90
4.5. Verificação da ocorrência da habituação em calos embriogênicos (Experimento 6)	95
4.6. Indução de brotações adventícias (Experimento 7)	108
4.7. Multiplicação de brotações adventícias (Experimento 8)	110
4.8. Indução de enraizamento em brotações adventícias (Experimento 9)	115
4.9. Análises histológicas (Experimento 10) ...	117
4.10. Obtenção de protoplastos (Experimento 11).	131
4.11. Viabilidade dos protoplastos (Experimento 12)	134
4.12. Cultivo dos protoplastos (Experimento 13).	137
4.13. Radiossensitividade dos diferentes materiais	140

Página

4.13.1. Radiossensitividade do tecido nuclear (Experimento 14)	140
4.13.2. Radiossensitividade em calos nucleares (Experimento 15)	145
4.13.3. Radiossensitividade em protoplastos (Experimento 16)	151
4.13.4. Radiossensitividade em cotilédones de embriões nucleares (Experimento 17)	155
4.14. Considerações gerais e perspectivas futuras	157
5. CONCLUSÕES	164
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

LISTA DE TABELAS

TABELA N.º		Página
01	Meios de maceração e purificação (lavagem) de protoplastos de acordo com 4 diferentes protocolos	60
02	Meios de cultura e densidade de plaqueamento utilizados no cultivo de protoplastos isolados a partir de calos embriogênicos do cv. Pera	65
03	Efeito das diferentes concentrações de CIN e IAA adicionadas ao meio MT, na formação de calos e embrióides no tecido nucelar, 8 semanas após a inoculação dos núcelos	73
04	Efeito dos reguladores de crescimento CIN, IAA e BAP, adicionados ao meio de cultura MT, na porcentagem de formação de calos. Avaliações após 8 e 12 semanas de cultivo de núcelos	78
05	Efeito dos reguladores de crescimento CIN, IAA e BAP sobre o número médio de embrióides obtidos por núcelo. Avaliações após 8 e 12 semanas de cultivo de núcelos	78

TABELA N°

06	Efeito de diferentes carboidratos sobre a embriogênese em calos nucelares obtidos em meio MT suplementado com BAP (10 mg/l). Avaliação 40 dias após cultivo	82
07	Observações sobre o desenvolvimento de embriões em meios de cultura com diferentes concentrações de CIN e IAA. Avaliação 8 semanas após o início do cultivo	87
08	Peso médio dos calos e número médio de embriões por calo cultivado em meio básico MT com diferentes suplementações. Avaliação 40 dias após o início do cultivo	92
09	Crescimento de calos nucelares em meios de cultura com e sem adição de reguladores de crescimento ao meio básico MT. Avaliação realizada 45 dias após o início do cultivo	96
10	Efeito de diferentes concentrações de BAP e NAA na formação de brotações adventícias na cultura de cotilédones de embriões nucelares	111

TABELA N°

Página

11	Efeito da concentração de BAP na multiplicação de brotações adventícias. Avaliação realizada 8 semanas após o início do cultivo	114
12	Porcentagem média de enraizamento, de brotações em meio MT suplementado com vários reguladores de crescimento. Avaliação 4 semanas após o início do cultivo	116
13	Rendimento médio de protoplastos isolados em diferentes tratamentos e períodos de digestão enzimática	132
14	Viabilidade dos protoplastos em diferentes diluições de diacetato de fluoresceína em meio de lavagem	136
15	Efeito da radiação gama na formação de embriões em núcelos. Avaliações realizadas 6 e 8 semanas após o tratamento mutagênico	142
16	Desenvolvimento de embriões individualizados oriundos de núcelos submetidos a diferentes doses de radiação gama. Avaliação realizada 60 dias após a inoculação dos embriões no estágio globular	144

TABELA N.º

Página

17	Efeitos de diferentes doses de radiação gama no crescimento de calos e regeneração de embriões a partir destes. Avaliação 40 dias após o início do cultivo	146
18	Desenvolvimento de embriões individualizados oriundos de calos submetidos a diferentes doses de radiação. Avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos embriões no estágio globular	148
19	Germinação de embriões desenvolvidos, oriundos de calos submetidos a diferentes doses de radiação gama. Avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos embriões no estágio cotiledonar .	149
20	Viabilidade dos protoplastos submetidos a diferentes doses de radiação gama ...	153
21	Efeito de diferentes doses de radiação gama na formação de brotações adventícias em cotilédones de embriões nucelares. Avaliação 90 dias após o tratamento mutagénico	155

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N.º

Página

1	Representação gráfica do efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA, adicionadas ao meio MT, na formação de calos e embriões no tecido nucelar	74
2	Proliferação de calo em nucelo, em meio de cultura suplementado com 10 mg/l de BAP. (a) nucelo, (b) calo nucelar (x10)	98
3	Proliferação de calos embriogênicos em meio suplementado com 10 mg/l de BAP	98
4	Proliferação de embriões (b) em nucelos (a) (x10).	99
5	Proliferação de embriões (b) em calos nucleares (a) (x10)	99
6	Embriões normais e maduros (a) e embriões cotiledonares normais e imaturos (b) obtidos em calos nucleares (c) cultivados em meio suplementado com 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM, 40 dias após o cultivo (x10)	100

FIGURA N.º

Página

7	Calo embriogênico (a) apresentando embrióides cotiledonares (b) e embrióides no estágio globular (c) após 60 dias de cultivo em meio com 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM (x10)	100
8	Formação de embrióides em calos embriogênicos	101
9	Embrióides de <i>Citrus sinensis</i> cv. Pera em processo de maturação. Os diferentes estádios de desenvolvimento podem ser observados em calos nucleares inoculados em meio suplementado com lactose e EM (a) embrióide globular; (b) embrióide com cotilédones em formação, (c) e (d) embrióides com dois cotilédones proeminentes (x10)	102
10	Plântula regenerada via embriogênese somática a partir de calos nucleares, apresentando raiz e parte aérea normais	103
11	Plântula anormal com raiz e apresentando cotilédones fundidos, semelhantes a uma corneta	104

FIGURA N.º

Página

12	Plântula em roseta, apresentando raiz e formação de cotilédones fasciados	105
13	Plântula anormal enraizada apresentando um único cotilédone (a) e a presença de um meristema apical rudimentar (b)	106
14	Plântulas apresentando desenvolvimento da parte aérea anormal (gemas apicais múltiplas) e raiz	107
15	Embrião nucelar cotiledonar (a). Cotilédones utilizados na indução de gemas adventícias (b) (x10)	122
16	Desenvolvimento de brotações adventícias em cotilédones de embriões nucleares (x10)	122
17	Multiplicação de brotações adventícias em meio suplementado com 3 mg/l de BAP (x8)	123
18	Enraizamento de brotações em diferentes meios de cultura 4 semanas após o início do cultivo	124

19	Corte transversal da folha cotiledonar, antes da inoculação no meio de cultura, revelando que a epiderme é constituída por células compactas com núcleo grande; o mesófilo é homogêneo e se caracteriza por apresentar células arranjadas de maneira justaposta, os feixes vasculares são colaterais (a)	125
20	Corte transversal do explante, mantido por 4 semanas em meio de cultura (MT + 3 mg/l de BAP + 2,5 mg/l de NAA). Observa-se acúmulo de amido em algumas células subepidermiais (a)	126
21	Corte transversal do explante, mantido por 4 semanas em meio de cultura (MT + 3 mg/l de BAP + 2,5 mg/l de NAA). Observa-se que, em algumas áreas, a epiderme e as camadas subepidérmicas, eram substituídas por um meristema semelhante a um câmbio de cicatrização (a)	127
22	Observa-se no meristema neoformado, a ocorrência de meristemóides (a e b)	128

FIGURA N.º

Página

23	Formações observadas ao longo da superfície do explante (a), após 60 dias em meio de cultura	129
24	A análise dos cortes longitudinais do explante após 60 dias de cultivo revela a formação de gemas vegetativas caracterizadas por apresentarem meristema apical protegido por primórdios foliares (a), glândulas de óleo (b)	130
25	Representação gráfica do efeito de diferentes tratamentos enzimáticos no rendimento do processo de isolamento de protoplastos	132
26	Protoplastos inoculados em meio de cultura contendo 0,45 M de manitol e 0,15 M de sacarose e densidade de plaqueamento de 10^5 protoplastos/ml após 15 dias de cultivo	138
27	Protoplastos inoculados em meio de cultura contendo 0,25 M de manitol e 0,15 M de sacarose e densidade de 10^5 protoplastos/ml, após 15 dias de cultivo	139

FIGURA N.º

28

Página

Representação gráfica da porcentagem de viabilidade de protoplastos em diferentes doses de radiação gama, em relação à testemunha

152

LISTA DE ABREVIATURAS

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

MT	-	meio de cultura descrito por MURASHIGE & TUCKER (1969)
EM	-	extrato de malte
CIN	-	cinetina
IAA	-	ácido indolacético
BA	-	benzil adenina
NAA	-	ácido naftalenoacético
2,4-D-	-	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
GA ₃	-	ácido giberélico
AG	-	8-aza-guanina
CCC	-	2-cloro-etiltrimetilamonia
ALAR	-	ácido 2,2-metilhidrazida
Zip	-	2-isopenteniladenina
IBA	-	ácido indolbutírico
ABA	-	ácido abscísico
BAP	-	benzil-aminopurina
5HNB	-	2-hidroxi-5-nitro benzilbromida
AZI	-	7-aza-indol
FAA	-	Fixador (Formol, álcool, ácido acético e água)

ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE CULTURA DE TECIDOS
VISANDO O MELHORAMENTO ATRAVÉS DE INDUÇÃO DE MUTAÇÕES
EM *Citrus sinensis* (L.) OSBECK CV. PERA

Autora: Mariângela Cristofani

Orientador: Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

RESUMO

O melhoramento de citros através de métodos convencionais tem sérias limitações devido à existência dos embriões nucelares nas sementes das espécies poliembrionicas, ao alto grau de heterozigose e ao longo ciclo reprodutivo, entre outros fatores.

A cultura de tecidos surgiu como uma técnica auxiliar no melhoramento das espécies cítricas visando transpor as dificuldades encontradas na aplicação dos métodos convencionais. Esta técnica também tem sido empregada em trabalhos com indução de mutações, visando à obtenção de mutantes sólidos, quando se utilizam agentes mutagênicos para aumentar a frequência das mutações.

O presente trabalho teve como objetivo adaptar diferentes metodologias de cultura de tecidos no cv. Pera (*Citrus sinensis* Osbeck.), visando futuros trabalhos com indução de mutações.

Nucelos foram extraídos de sementes de frutos imaturos, 12 semanas após a antese. Embriões somáticos foram produzidos diretamente a partir destes explantes em meio MT, com diferentes concentrações de IAA e CIN. O meio suplementado com 1,0 mg/l de CIN favoreceu a formação de embrióides, principalmente através da formação de embrióides a partir dos já existentes. Calos embriogênicos foram produzidos diretamente a partir dos nucelos em meio MT suplementado com BAP (10 mg/l).

Um grande número de embrióides foi obtido a partir dos calos, sendo que o meio MT suplementado com 50 g/l de lactose e 500 mg/l de extrato de malte foi o mais eficiente. Os embrióides produzidos a partir dos nucelos ou a partir de calos nucelares foram capazes de se desenvolver e regenerar plantas, em meio MT contendo 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de extrato de malte.

Protoplastos foram isolados a partir dos calos embriogênicos e sua viabilidade foi verificada pelo teste com diacetato de fluoresceína. O rendimento no isolamento foi de $1,03 \times 10^6$ protoplastos por grama de calo e a viabilidade de 84% foi verificada logo após o processo de purificação dos mesmos.

Brotações adventícias foram induzidas a partir dos cotilédones extraídos de embriões nucelares. As brotações foram obtidas em meio MT contendo diferentes concentrações de NAA e BAP e suas combinações. Entretanto, o

meio contendo 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA foi o que apresentou maior número de brotações por explante responsivo.

Ensaio de doses de radiação gama foram conduzidos nos diferentes materiais: núcelos, calos nucelares, cotilédones de embriões nucelares e protoplastos, visando à determinação de doses recomendáveis para futuros trabalhos utilizando estes explantes na indução de mutações.

ADAPTATION OF TISSUE CULTURE METHODOLOGIES AIMING
AT MUTATION BREEDING IN *Citrus sinensis* (L.) OSBECK.

cv. PERA

Author: Mariângela Cristofani

Adviser: Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

SUMMARY

Citrus improvement via conventional methods has encountered serious limitations due to the existence of nucellar embryos in the seeds of polyembryonic species, as well as to the high degree of heterozygosity and the long reproductive cycle, among other factors.

Tissue culture has emerged as an auxiliary technique for improving citrus species in order to surpass the difficulties found in applying the conventional methods. This technique has also been used in studies involving mutation induction to obtain solid mutants when mutagenic agents are used to increase mutations frequency.

The objective of the present work was to adapt different tissue culture methodologies in cv. Pera (*Citrus sinensis* Osbeck) to future mutation breeding of *Citrus* species.

Nucelli were extracted from seeds of immature

fruit, 12 weeks after anthesis. Somatic embryos were produced directly from these explants in the MT medium with different concentrations of IAA and CIN. The medium supplemented with 1.0 mg/l of CIN favored the formation of embryos, mainly via budding process. Embryogenic calluses were produced directly from the nucelli in the MT medium supplemented with BAP (10 mg/l).

A high number of embryos was obtained from the calluses, where the MT medium supplemented with 50 g/l of lactose and 500 mg/l of malt extract proved to be the most efficient. The embryos produced from nucelli or from nucellar calluses were able to develop and to regenerate plants in the MT medium containing 50 g/l sucrose and 500 mg/l malt extract.

Protoplasts were isolated from the embryogenic calluses and their viability was verified by the test with fluorescein diacetate. The yield provided in the isolation was 1.03×10^6 protoplasts per 1 gram of callus and the viability of 84% was verified soon after the protoplasts purification process.

Adventitious buds were induced from the cotyledons extracted from nucellar embryos. Buds were obtained in the MT medium containing different concentrations of NAA and BAP and their combinations, however the medium containing 0.5 mg/l BAP and 1.0 mg/l NAA provided the highest number of buds per responsive explant.

Gamma irradiation was conducted to the different materials: nucelli, nucellar calluses, cotyledons of nucellar embryos and protoplasts, with the aim of determining the dosages to be recommended in future studies utilizing these explants in mutation induction.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira detém a maior produção de laranja e exportação de suco cítrico concentrado do mundo (FAO, 1990). Em 1990, o suco de laranja concentrado alcançou o segundo lugar como o principal produto exportado pelo Brasil (EXPORTAÇÕES agroindustriais, 1991).

O Estado de São Paulo é o principal produtor de laranja do país e é o responsável por, aproximadamente, 85% da safra nacional (LARANJA, 1988). O cultivar Pera é o mais importante da citricultura paulista e também um dos cultivares mais preferidos pela indústria do suco (TEÓFILO SOBRINHO, 1991).

A muda selecionada representa o principal fator de sucesso na instalação de um pomar comercial de citros, devendo para isto, estar isenta de pragas e doenças (GREVE, 1991). Neste sentido, clones nucelares têm contribuído para a produção de porta-enxertos e borbulhas isentos de viroses (SALIBE, 1969).

A citricultura brasileira é considerada extremamente vulnerável, devido ao limitado número de culti-

vares de laranja e tangerina, e ao uso abusivo do limão cravo como porta-enxerto (GIACOMETTI, 1980).

Segundo BARRET & RHODES (1976), o sistema de monocultura perene empregado nos pomares comerciais, compostos por um pequeno número de genótipos estreitamente relacionados, faz necessário ampliar a base genética dos cultivares de citros a fim de contornar o problema da vulnerabilidade genética do germoplasma.

Entretanto, os trabalhos de genética e melhoramento pouco têm contribuído para a criação de novos cultivares. Os problemas associados com o melhoramento genético de *Citrus* são um reflexo do comportamento genético e reprodutivo deste gênero. Fatores tais como, longo ciclo reprodutivo, apomixia, alto grau de heterozigosidade, dificuldade de reconhecimento e sobrevivência do híbrido originado do cruzamento entre espécies e/ou cultivares poliembrionicos e a complexidade da determinação das características genéticas têm impedido a transferência de genes dentro e entre os *Citrus* e os gêneros relacionados (Barret¹, citado por GROSSER & GMITTER, 1990).

¹ BARRET, H.C. Intergeneric hybridization of citrus and other genera in citrus cultivar improvement. Proc. Intl. Soc. Citricult., 2: 586-9, 1977.

A maioria dos cultivares de importância mundial foi obtida a partir de mutações somáticas espontâneas (SOOST & CAMERON, 1975). Isto demonstra o grande potencial de resposta destas espécies aos tratamentos com agentes mutagênicos.

O tratamento mutagênico de tecidos multicelulares, tais como gemas e sementes, tem conduzido à formação de plantas com quimerismo. Métodos de seleção recorrente de gemas têm sido utilizados para resolver este problema. Tais métodos entretanto, apesar de serem efetivos, são onerosos e trabalhosos (BUTTON & KOCHBA, 1977).

A cultura de tecidos e células, incluindo a cultura de nucelos, calos embriogênicos, gemas adventícias e protoplastos, apresenta-se então, como uma técnica capaz de auxiliar o melhoramento genético das espécies de citros, principalmente quando se associa à técnica de indução de mutações, isto porque, dentre outras vantagens, a probabilidade de se obter mutantes sólidos (plantas sem quimerismo) pode ser maior neste caso.

Levando-se em consideração as dificuldades no emprego de métodos convencionais no melhoramento das espécies cítricas e o potencial das técnicas de cultura de tecidos no melhoramento destas espécies, objetivou-se com este trabalho, (1) estudar uma metodologia para otimizar a produção de calos embriogênicos a partir do tecido nuclear, (2) adaptar a metodologia de cultivo de proto-

plastos isolados a partir dos calos nucelares embriogênicos, (3) estabelecer um protocolo de indução e regeneração de gemas adventícias e (4) estudar a radiosensitividade dos calos embriogênicos, nucelos, protoplastos e gemas adventícias à radiação gama, visando futuros trabalhos com indução de mutações em *Citrus sinensis* cv. Pera.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser definida como o processo de desenvolvimento de embriões, a partir de células somáticas. A produção de embriões somáticos a partir da cultura de células, tecidos e órgãos pode ocorrer direta ou indiretamente. A embriogênese somática direta envolve a formação de um embrião somático, também denominado embrióide (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986), de origem unicelular ou de um grupo de células a partir do explante, sem passar por uma fase intermediária de calo.

A embriogênese somática indireta consiste na proliferação de calo a partir de um explante e subsequente formação de pró-embrióides a partir destes calos.

Estes dois padrões de desenvolvimento de embriões somáticos foram observados em cultura de óvulos inteiros e/ou nucelos em citros. A embriogênese somática direta é de ocorrência notável em cultivares de citros poliembrionários, onde células pré-existentes no tecido nucelar dão origem aos embriões nucleares (*in vivo* ou *in vitro*). Em

vários casos, estes embriões podem ser produzidos a partir da cultura de embriões imaturos (TISSERAT, 1985). O cultivo de protoplastos provenientes de calos embriogênicos também tem resultado na diferenciação de embriões somáticos por via direta e indireta (KOBAYASHI et alii, 1985).

Em ambos os padrões de formação, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme e torpedo, seguido pela formação da planta (SCHULTHEIS et alii, 1990).

2.2.1. Embriogênese somática direta

Vários trabalhos foram realizados com o cultivo *in vitro* de núcelos e óvulos isolados das espécies cítricas, visando à obtenção de embriões somáticos para a produção de porta-enxertos vigorosos e isentos de viroses (NARVARRO & JUAREZ, 1977) e também, em trabalhos que visavam à indução de mutações (KOCHBA et alii, 1972; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977a; STARRANTINO & RUSSO, 1976-1977).

Embriões zigóticos e nucelares de muitos cultivares de citros foram cultivados com sucesso (OHTA & FURUSATO, 1957; RANGASWAMY, 1958; 1959, 1961; RANGAN et alii, 1969). A indução de embriogênese somática foi realizada em muitas espécies e cultivares de citros. Embriões somáticos foram produzidos de cultivares poliembrionários, com ou sem

sementes, através da cultura de tecido nucelar excisado de semente em desenvolvimento (TISSERAT & MURASHIGE, 1977), óvulos abortivos (BITTERS et alii, 1970) e óvulos não fertilizados (BUTTON & BORNMAN, 1971; KOCHBA et alii, 1972), assim como, através da cultura de óvulos inteiros fertilizados ou não (BUTTON & BORNMAN, 1971; KOCHBA et alii, 1972 e MITRA & CHATURVEDI, 1972). A técnica de cultura de óvulos e nucelos *in vitro* foi utilizada também, e com sucesso, na indução de embriogênese somática em uma série de cultivares monoembriônicos (RANGAN et alii, 1968, 1969; BITTERS et alii, 1970; NAVARRO & JUAREZ, 1977; BUTTON & KOCHBA, 1977).

Estudos revelaram a existência de células com citoplasma denso e núcleo grande no tecido nucelar, na extremidade micropilar do saco embrionário, nos cultivares poliembriônicos. No cultivar Trovita (*C. sinensis*), estas células iniciaram a divisão ao mesmo tempo ou logo após a divisão do zigoto, cerca de 50 dias após a polinização. Estas células foram denominadas de células primordiais do embrião nucelar e não foram observadas nos cultivares monoembriônicos (KOBAYASHI et alii, 1981).

Este tipo de estudo é importante em trabalhos visando à indução de mutações, pois o tratamento mutagênico dos explantes, antes da formação dos embrióides, propicia um método ideal na produção de mutantes sólidos.

Neste sentido, KOCHBA et alii (1972), através de estudos histológicos em três cultivares, Shamouti e Valência (*Citrus sinensis*) e Marsh Seedless (*C. paradisi*), verificaram que óvulos e nucelos extraídos de frutos com 1-8 semanas de idade não apresentavam o desenvolvimento de embriões nucelares.

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 médio de embriões por explante responsivo.

BUTTON & KOCHBA (1977) observaram que nos cultivares monoembriônicos, somente nucelos extraídos de sementes em desenvolvimento produziram embriões somáticos. Esta afirmação está de acordo com o que NAVARRO & JUAREZ (1977) observaram trabalhando com cultivares monoembriônicos de Clementine (*C. reticulada* Blanco). Estas variedades são auto-incompatíveis e foram polinizadas com pólen de 'Comuna' (*C. sinensis*), com a finalidade de induzir a formação de sementes. Os autores obtiveram resultados satisfatórios, utilizando frutos com 13 a 15 semanas após a polinização.

Entretanto, NAVARRO & JUAREZ (1977), trabalhando com cultivares poliembriônicos do grupo Navel, utilizaram óvulos excisados de ovários de flores, antes da antese e óvulos de frutos em desenvolvimento, obtidos uma a

dez semanas após a antese. Em todas as fontes eles observaram uma taxa semelhante de embriogênese, indicando que a idade do fruto, na época da excisão do óvulo, aparentemente, não determina o número de óvulos que vão produzir embriões. Esta observação não está de acordo com os resultados obtidos para o cv. Shamouti por KOCHBA et alii (1972), no qual as mais altas porcentagens de óvulos, mostrando formação de embriões, foram verificadas em óvulos extraídos de frutos quatro semanas após a antese. GOLDMAN (1988) encontrou melhores respostas em óvulos, do cultivar Pera (*C. sinensis* Osbeck), excisados 10 semanas após a antese.

KOCHBA et alii (1972) verificaram que os nucelos extraídos dos cultivares Valência e Marsh resultaram em maior porcentagem de formação de embriões do que a cultura de óvulos. Este fato também foi verificado por GOLDMAN (1988), em cultura de óvulos e nucelos do cv. Pera, onde nucelos extraídos de frutos com 10-12 semanas produziram as maiores porcentagens (27 - 69,47%) de embriogênese, em todos os tratamentos, em comparação com o cultivo de óvulos, com a mesma idade, após 12 semanas de cultivo.

Os resultados de embriogênese, encontrados para o cultivar Pera, variando de 0 a 25%, nos óvulos, por GOLDMAN (1988), estão de acordo com os resultados obtidos por KOCHBA et alii (1972), MOORE (1985) e GMITTER & MOORE (1986). Por outro lado, resultados entre 50 a 70% de embriogênese, em óvulos, foram verificados por STARRANTINO &

RUSSO (1980) e 80 a 100% para os cultivares do grupo Navel (NAVARRO & JUAREZ, 1977).

Os óvulos em certos cultivares apresentam um desenvolvimento mais lento *in vitro* que os nucelos. NAVARRO & JUAREZ (1977) obtiveram embrióides de óvulos cultivados por até 15 semanas sem qualquer sinal prévio de diferenciação, no cv. Navel. GOLDMAN (1988) observou que os nucelos em cultivo formaram embrióides mais rapidamente e em maior porcentagem que os óvulos, no cv. Pera.

Outros fatores tais como genótipo da planta doadora do explante e composição do meio de cultura têm sido observados influenciando na porcentagem de explantes res-ponsivos.

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.

O extrato de malte foi relatado como sendo benéfico à cultura de óvulos e nucelos (KOCHBA et alii, 1972). Em vários outros trabalhos, esta substância foi adicionada ao meio de cultura, na concentração de 500 mg/l, para estimular a indução da embriogênese (NAVARRO & JUAREZ, 1977; STARRANTINO & RUSSO, 1980). Um estudo realizado por MOORE (1985), com o cv. Marsh (*Citrus paradisi*) demonstrou que o extrato de malte favoreceu a formação de embrióides neste cultivar e que o aumento da concentração

desta substância para 1000 mg/l aumentou em sete vezes a porcentagem de óvulos responsivos em relação à concentração de 500 mg/l.

A caseína hidrolizada e a água de coco também têm sido relatadas estimulando a embriogênese em tecidos nucelares de citros (SABHARWAL, 1963; BUTTON & BORNMAN, 1971; MITRA & CHATURVEDI, 1972; PASQUAL, 1985).

Outros componentes importantes são os reguladores de crescimento, que são compostos da maior significância na cultura de tecidos de plantas. Segundo Esan², citado por PASQUAL et alii (1988), a adição das auxinas IAA, NAA e 2,4-D ao meio de cultura, suprimiu significativamente ou completamente a embriogênese nucelar. Este fato também foi observado por MOORE (1985) com a utilização de IAA, GA₃ e ABA no cv. Marsh (*C. parasisi*) e por PASQUAL et alii (1988) com 2,4-D no cv. Valência.

Por outro lado, TISSERAT & MURASHIGE (1977) relataram que o IAA, em baixas concentrações, suprimiu levemente a embriogênese no cv. Ponkan (*C. reticulata* Blanco) em culturas nucelares.

Um fato interessante, observado por MOORE (1985), foi que a adição de diferentes substâncias ao meio de

² ESAN, E.B., 1973. A detailed study of adventive embryogenesis in the rutaceae. University of California, Riverside (dissertação). 233p.

cultura, influenciou a embriogênese de forma semelhante àquela relatada em trabalhos sobre indução de embriogênese somática a partir de calos nucelares.

Assim, da mesma forma que ocorreu nas culturas de calos nucelares (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b; KOCHBA et alii, 1978), a presença de auxina IAA, no meio de cultura suprimiu a embriogênese em óvulos do cv. Marsh. Assim como, a porcentagem máxima de óvulos responsivos foi verificada com a adição de 0,01 mg/l de daminozida, um inibidor da síntese de GAs (MOORE, 1985).

Em um trabalho posterior, GMITTER & MOORE (1986) estudaram o comportamento de vários genótipos de *Citrus* em diferentes meios, contendo substâncias de crescimento. Os óvulos dos cultivares de laranja doce, cultivados em meio de cultura com 2,4-D e daminozida ou extrato de malte, na presença de luz, foram os mais efetivos na formação de embrióides.

MITRA & CHATURVEDI (1972), examinando três genótipos, encontraram uma relação direta entre o grau de poliembrionia em um genótipo e seu potencial para formação de embrióides *in vitro*. Outros pesquisadores relataram diferenças na formação de embrióides entre cultivares de *Citrus* poliembriônicos e monoembriônicos, mas as diferenças nas respostas, devido ao grau de poliembrionia, não foram examinadas (BUTTON & BORNMAN, 1971; BUTTON & KOCHBA, 1977).

MOORE (1985) observou, em seu trabalho, que os cultivares de *C. sinensis* e *C. paradisi* têm um alto grau de poliembrionia, em relação aos outros clones examinados. Os cultivares destas duas espécies tiveram também a maior porcentagem de óvulos responsivos e a maior média de embriões por óvulos responsivos que os outros clones. Entretanto, houve várias exceções para esta característica, dentro dos cultivares poliembriônicos. Outros fatores, além do grau de poliembrionia, parecem influenciar o número de embriões produzidos a partir de óvulos não desenvolvidos de frutos maduros (MOORE, 1985).

2.2.2. Embriogênese somática indireta

A embriogênese somática pode ocorrer indiretamente a partir de óvulos e nucelos, através do processo de formação de calos e posterior formação de embriões a partir destes. RANGASWAMY (1958) observou a formação de calos em nucelos de óvulos fertilizados em *Citrus microcarpa*.

Posteriormente, outros autores relataram o aparecimento esporádico de pequenos calos em cultura de óvulos e nucelos, além de embriões diferenciados diretamente destes explantes (RANGASWAMY, 1961; SABHARWAL, 1963; BUTTON & BORNMAN, 1971; MITRA & CHATURVEDI, 1972; KOCHBA et alii, 1972).

KOCHBA et alii (1972) cultivaram óvulos e nucelos do cv. Shamouti, Valência e Marsh *in vitro* e observaram que enquanto os cultivares Valência e Marsh mostraram altas porcentagens de cultura com formação de embrióides originários dos óvulos e nucelos, um pequeno número de embrióides formou-se diretamente destes explantes no cultivar Shamouti. Em compensação, este cultivar formou calos que não foram observados nos outros dois cultivares. A produção, diferenciação dos calos, obtenção de embrióides e plantas a partir destes seria, desta forma, um método alternativo para aplicação em trabalhos, visando à indução de mutação em cultivares ou espécies que produzem poucos embrióides a partir do nucelo.

A obtenção de calos nucelares foi estendida para outros genótipos de *Citrus* com a finalidade de se obter protoplastos totipotentes a partir destes materiais (VARDI et alii, 1982; KOBAYASHI et alii, 1984; GROSSER & CHANDLER, 1987; VARDI & GALUN, 1988).

2.2.2.1. Obtenção de calos embriogênicos

Os explantes utilizados nos trabalhos com indução de calos têm sido nucelos e óvulos. Entretanto, tem sido observada a formação destes calos na região do hipocótilo dos embrióides obtidos a partir destes explantes (HIDAKA & KAJIURA, 1988; GOLDMAN, 1988).

GOLDMAN (1988), trabalhando com nucelos e óvulos do cv. Pera (*C. sinensis* Osbeck), verificou a formação de calos embriogênicos na região do hipocótilo de embriões produzidos a partir de nucelos, cinco a sete meses após a inoculação do explante nucelar em meio de cultura. Após este período de cultura, os nucelos apresentaram altas porcentagens de calos embriogênicos (34,52 a 71,12%) quando comparados com os óvulos, após o mesmo tempo de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos para o cultivo de nucelos de cultivares monoembriônicos, porém, os calos surgiram diretamente da região micropilar dos nucelos, após 3-6 semanas de cultivo (JUAREZ et alii, 1976).

Ainda de acordo com o trabalho de GOLDMAN (1988), os óvulos produziram, de uma forma geral, baixas porcentagens de calos embriogênicos (0 a 17,36%). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por VARDI et alii (1982) que observaram uma frequência geralmente baixa na produção de calos ovulares (cerca de 24% para os cultivares de tangerina e 2% para os cultivares de "grapefruit").

SPIEGEL-ROY & VARDI (1984) afirmaram que, para cada cultivar e/ou espécie, o estágio ótimo para a retirada dos explantes, destinados ao desenvolvimento de calos, deve ser determinado separadamente.

Para o cultivar Shamouti, os melhores resultados na obtenção de calos foram obtidos através da cultu-

ra de óvulos extraídos de frutos, 2 a 5 semanas após a antese (KOCHBA et alii, 1972). Para o cultivar Pera, os melhores resultados foram conseguidos com óvulos extraídos de frutos com 12 semanas após a antese (GOLDMAN, 1988). Entretanto, o que se observa nos trabalhos com sistemas de protoplastos onde calos foram obtidos de várias espécies de *Citrus*, é que óvulos extraídos de frutos com 2-6 semanas após a antese foram utilizados invariavelmente para qualquer uma das espécies estudadas (VARDI et alii, 1982; ZHANAO et alii, 1989).

Segundo SPIEGEL-ROY & VARDI (1984), as células nucelares de *Citrus* são pré-determinadas como células embriogênicas e a adição de reguladores de crescimento vegetais não é necessária para induzir a embriogênese somática. Entretanto, segundo SAAD (1975), a adição de 2,4-D foi necessária para indução de calos embriogênicos em cultivares de *Citrus limon*.

A adição de reguladores de crescimento aos meios de cultura para indução de calos embriogênicos pode ser constatada em várias pesquisas. KOBAYASHI et alii (1983), trabalhando com óvulos excisados de gemas florais do cv. Trovita (*Citrus sinensis*), obtiveram calos em meio MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969) suplementado com 100 mg/l de extrato de malte e 20 mg/l de sulfato de adenina, onde, após três meses, numerosos embrióides e pequenos calos foram obtidos. Entretanto, a frequência de indução de calos não

foi suficientemente alta. Estes calos foram, então, propagados em meio MT suplementado com 10 mg/l de BAP. Posteriormente, KOBAYASHI et alii (1984) estudaram o efeito dos reguladores de crescimento NAA, BAP e suas combinações na indução de calos em óvulos de cv. Bahia com a finalidade de estabelecer um meio de cultura mais eficiente. O meio de cultura suplementado com 10 mg/l de BAP foi o mais eficiente na produção de calos embriogênicos, neste cultivar. Calos nucelares foram induzidos em onze cultivares estudados (oito cultivares de laranja doce, *Citrus junos*, *Citrus deliciosa*, "Nova") neste mesmo meio de cultura (KOBAYASHI et alii, 1984).

HIDAKA & KAJIURA (1988) obtiveram calos embriogênicos a partir de embriões originados de sementes imaturas de três espécies de *Citrus*: *C. sinensis* Osbeck (Washington Navel), *C. yuko* (Yuko) e *C. reticulata* Blanco (Ponkan), em meio de cultura MS suplementado com 0,16 M de sacarose e 50 μ M de cinetina. Um a três meses após a inoculação, calos friáveis foram produzidos na região do hipocótilo destes embriões.

A utilização de reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos também pode ser verificada no trabalho realizado por ZHANG et alii (1989), com óvulos obtidos de frutos com 1-6 semanas após o florescimento e cultivados em meio MT suplementado com IAA 0,1 mg/l e cinetina 1,0 mg/l.

Entretanto, em vários outros cultivares, obteve-se a formação de calos através do cultivo de óvulos e nucelos em meio de MURASHIGE & TUCKER (1969), suplementado com 500 mg/l de extrato de malte e 50 g/l de sacarose sem adição de reguladores de crescimento (KOCHBA et alii, 1972; VARDI et alii, 1982).

KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1973) verificaram que os óvulos e nucelos do cv. Shamouti, quando mantidos em meio MT + 500 mg/l de EM, desenvolviam pequenas quantidades de calos. Para induzir maior crescimento, estes calos foram subcultivados em meio MT suplementado com 1 mg/l de cinetina e 1 mg/l de IAA. Este meio produziu um rápido crescimento dos calos. Depois que estes calos proliferaram neste meio de cultura, foram transferidos para outros diferentes meios de cultura suplementados com AD, EM, IAA e CIN com a finalidade de se estudar o crescimento dos calos e o desenvolvimento de embriões, a partir destes, em meios suplementados com diferentes substâncias e concentrações de reguladores de crescimento.

Um fato interessante observado por KOCHBA & BUTTON (1974) e, posteriormente, por outros autores (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1975; HIDAKA & KAJIURA, 1988; ZHANAQ et alii, 1989, GROSSER & GMITTER, 1990) é que calos subcultivados em diferentes concentrações de IAA e cinetina podem tornar-se habituados, em relação a estes reguladores de crescimento após alguns subcultivos.

Segundo SKIRVIN (1978), a habituação é a perda da necessidade de fornecimento exógeno de fatores de crescimento, geralmente de auxinas, ao meio de cultura, para crescimento dos calos.

A habituação, provavelmente, representa uma mudança na expressão gênica envolvendo o sítio da síntese dos reguladores de crescimento. O fato de MEINS (1974) ter observado que plantas provenientes de células totipotentes habituadas só produziram calos na presença de reguladores de crescimento, indica que a habituação, provavelmente, não tem origem mutacional, mas representa uma resposta epigenética. Porém, a verdadeira explicação permanece desconhecida (SKIRVIN, 1978).

2.2.2.2. Obtenção de embriões somáticos em calos nucelares

A embriogênese em cultura de calos de *Citrus* de origem nucelar é estimulada por uma variedade de substâncias e condições de cultivo (KOCHBA & BUTTON, 1974; SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b; KOCHBA et alii, 1978).

KOCHBA et alii (1978) assumiram que as condições que reduzem o nível endógeno de auxinas, em calos habituados (independentes de auxinas e citocininas), levam ao aumento na embriogênese, e isto está de acordo com o que

foi verificado por TISSERAT & MURASHIGE (1977), em seus estudos com cultivares de *Citrus* mono e poliembriônicos.

Calos embriogênicos, do cultivar Shamouti, expostos à radiação gama, mostraram um estímulo na formação de embriões somáticos com doses de 12 a 20 kR, sendo que o efeito máximo foi observado com a dose de 16 kR (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973).

KOCHBA & BUTTON (1974) verificaram que o "envelhecimento", isto é, o período de tempo em que os calos permanecem em um mesmo meio de cultura, entre um subcultivo e outro, estimulou a embriogênese em calos do cv. Shamouti. KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977c) também observaram este efeito, sendo que, a maior produção de embriões somáticos ocorreu quando os calos foram mantidos por dez a quinze semanas no mesmo meio de cultura antes do subcultivo. A omissão de sacarose no meio de cultura, por um período de subcultivo estimulou a embriogênese de modo semelhante ao "envelhecimento" (KOCHBA & BUTTON, 1974).

Nos meios de cultura onde foram utilizados reguladores de crescimento para acelerar o crescimento dos calos, verificou-se que os baixos níveis de cinetina e IAA, separadamente, induziram uma maior diferenciação de embrióides, que os níveis mais altos ou as combinações destes reguladores de crescimento (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1973).

A embriogênese é inibida por aplicações exógenas de IAA, NAA, ou citocininas tais como cinetina, BAP e 2ip (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b; KOBAYASHI et alii, 1984).

Por outro lado, a embriogênese somática é estimulada por inibidores da síntese de auxinas tais como 5HNB e AZI (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b) e por inibidores da síntese de GAs (KOCHBA et alii, 1978), tais como CCC e ALAR. A aza-guanina (AG), que exerce um efeito antagônico sobre as citocininas, estimulou a embriogênese em calos do cv. Shamouti (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977b).

O efeito de vários carboidratos na embriogênese e desenvolvimento de embrióides foi estudado em detalhe nos cultivares Shamouti (*C. sinensis*), Villafranca (*C. limon*), King (*C. nobilis*), laranja azeda (*C. aurantium*) e Navel (*C. sinensis*) (KOCHBA et alii, 1982). A galactose e a lactose estimularam, consideravelmente, a embriogênese em todos os cultivares estudados. A glicose e a frutose foram os carboidratos menos efetivos no estímulo à embriogênese.

A adição de galactose e lactose, na concentração de 50 g/l, quando comparada com outras adições ao meio MT, tais como, extrato de malte, sulfato de adenina, água de coco, extrato de levedura, ácido casamínico, BAP e NAA, produziu um notável aumento no número de embrióides por cultura de calo (KOBAYASHI et alii, 1984).

BEN-HAYYIN & NEUMANN (1983) estudaram o efeito do glicerol no crescimento e embriogênese, nos calos obtidos da cultura de óvulos de várias espécies e/ou cultivares de *Citrus*. O glicerol estimulou a embriogênese em calos que foram capazes de utilizá-lo como fonte de carbono para o crescimento. O glicerol é utilizado, eficientemente, por algumas espécies de *Citrus*. Segundo os autores, o conhecimento do comportamento dos calos de *Citrus* em glicerol pode servir como um fator de seleção para os experimentos de fusão de protoplastos.

A galactose tem se mostrado uma boa fonte de carbono para o crescimento de todos os calos de *Citrus* estudados e calos derivados de protoplastos (KOCHBA et alii, 1982; VARDI et alii, 1982).

2.2.3. Isolamento de protoplastos

As pesquisas sobre protoplastos abriram amplas possibilidades para o melhoramento genético das espécies cítricas. Vários trabalhos, utilizando protoplastos, foram desenvolvidos com indução de mutações (VARDI et alii, 1975; ZHANAQ et alii, 1989), seleção *in vitro* (VARDI et alii, 1986), fusão (KOBAYASHI et alii, 1988; GROSSER & GMITTER, 1990) e transformação (VARDI et alii, 1990).

BUTTON & BOTHA (1975) e VARDI et alii (1975), simultaneamente, desenvolveram um sistema de isolamento de

protoplastos a partir de calos embriogênicos originados de óvulos do cv. Shamouti (*Citrus sinensis*). VARDI et alii (1975) conseguiram a regeneração de plantas a partir dos protoplastos e estabeleceram a sequência completa de planta → protoplastos → colônia de células → calos embriogênicos → embrióides, em trabalho visando à indução de mutações em protoplastos.

Posteriormente, a regeneração de plantas via embriogênese somática, a partir de protoplastos, foi estendida para vários outros genótipos de *Citrus*, como se pode verificar em excelentes revisões realizadas por VARDI & GALUN (1988), GOLDMAN (1988) e GROSSER & GMITTER (1990), sendo que o maior sucesso foi obtido com cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*).

Em geral, as culturas de calos embriogênicos e culturas em suspensão dos mesmos propiciaram excelentes fontes de protoplastos totipotentes. Tais culturas podem ser mantidas em meio de cultivo sem reguladores de crescimento (VARDI, 1977; VARDI et alii, 1982; GROSSER & GMITTER, 1990), ou em meio contendo altos níveis de BAP (KOBAYASHI et alii, 1988).

GROSSER & CHANDLER (1987) desenvolveram um protocolo eficiente para isolamento de protoplastos de folhas e calos de diferentes cultivares e espécies de *Citrus*.

A obtenção de calos embriogênicos pode ser

difícil de se conseguir em muitos genótipos. Em diferentes trabalhos realizados, protoplastos de folhas eram fundidos com aqueles provenientes de calos embriogênicos, dando origem aos híbridos somáticos. Recentemente, TUSA et alii (1990) relataram a regeneração de plantas a partir de protoplastos de folhas do limão 'Femminello'. Mas até então, a obtenção de plantas a partir de protoplastos só havia sido descrita para aqueles provenientes de calos embriogênicos.

Alguns fatores podem influenciar no processo de isolamento dos protoplastos. Não se dispõe de nenhum dado numérico a respeito do impacto da idade dos calos, ou melhor, o tempo decorrido entre um subcultivo e outro, no rendimento (número de protoplastos/ml), no processo de isolamento dos protoplastos. Entretanto, diversos autores recomendam que os calos não sejam mantidos por mais de três semanas no mesmo meio de cultura, antes do processo de isolamento dos protoplastos (VARDI et alii, 1982; KOBAYASHI et alii, 1983, KOBAYASHI et alii, 1988; HIDAKA & KAJIURA, 1988) e que os subcultivos sejam realizados a cada quatro semanas. Nas culturas em suspensão, recomenda-se que o subcultivo seja realizado a cada 15 dias (GROSSER & GMITTER, 1990).

Outros fatores, tais como, pressão osmótica do meio de maceração, a fonte e a combinação das enzimas para a digestão da parede celular, afetam o rendimento

dos protoplastos e a posterior capacidade de divisão dos mesmos em meio de cultura.

Foram realizados vários protocolos, onde as concentrações e as fontes das enzimas variam para cada cultivar e/ou espécie (VARDI & GALUN, 1988). Segundo VARDI et alii (1982), a macerozyme produziu melhores resultados nos diversos cultivares analisados do que a pectinase.

O rendimento, no isolamento, tem variado entre 10^6 a 4×10^6 protoplastos/grama de calo e o tempo de digestão enzimática, entre 4 a 16 horas, dependendo da concentração enzimática, do material tratado (folhas, calos embriogênicos e não embriogênicos) e dos genótipos, de acordo com os diversos protocolos já estabelecidos para *Citrus* e gêneros relacionados.

A concentração osmótica do meio de maceração tem sido mantida por volta de 0,7 M, sendo que os açúcares mais utilizados têm sido o manitol e a sacarose, em combinação ou apenas o manitol (VARDI & GALUN, 1988; GROSSER & GMITTER, 1990).

O meio MT, com a metade da concentração dos macronutrientes e sem os micronutrientes e vitaminas, tem se mostrado bastante adequado para o isolamento de protoplastos.

É importante lembrar que um bom rendimento no isolamento dos protoplastos não pode ser considerado como um fator isolado, pois muitos dos protoplastos podem não ser

viáveis. Por esta razão, é aconselhável o estudo da viabilidade dos protoplastos após o isolamento. Neste sentido, muitos trabalhos têm sido realizados, principalmente, com a utilização de corantes como por exemplo, o diacetado de fluoresceína (BURGER & HACKETT, 1982). Existem muitos corantes que podem ser utilizados para avaliar a viabilidade dos protoplastos (ERIKSON, 1985). O azul de metileno também é um corante que tem sido amplamente utilizado em protoplastos vegetais (Hooley³, citado por GOLDMAN, 1988).

2.2.4. Cultivo de protoplastos

Vários fatores podem influenciar no sucesso do cultivo dos protoplastos, entre eles, os considerados mais importantes são a densidade de plaqueamento e a osmolaridade do meio de cultura.

A densidade dos protoplastos no meio de cultura tem grande influência no processo de divisão e diferenciação dos mesmos (NAGATA & TAKEBE, 1971; VARDI et alii, 1975; KOBAYASHI et alii, 1985).

VARDI et alii (1975) verificaram que nos protoplastos do cv. Shamouti, os melhores resultados, quanto ao

³ HOOLEY, R. Protoplasts isolated from aleurone layers of wild oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberelic acid. *Planta*, 154: 29-40, 1982.

número e o tamanho das colônias de células formadas em meio de cultura foram conseguidos com a densidade de 10^5 e 8×10^4 protoplastos/ml. A mais alta densidade de plaqueamento utilizada (4×10^5 protoplastos/ml) resultou na formação de pequenas colônias de células que logo cessaram o crescimento.

KOBAYASHI et alii (1985) realizaram um estudo para estabelecer as condições adequadas para a embriogênese a partir de protoplastos do cv. Troviata e notaram que em uma densidade de plaqueamento de 4×10^4 protoplastos/ml com 0,15M de manitol, 75% dos protoplastos dividiram-se e desenvolveram-se em embrióides. Em contraste, quando os protoplastos foram cultivados a uma densidade de 10^5 protoplastos/ml, estes dividiram-se e formaram calos.

De uma forma geral, a densidade de plaqueamento utilizada nos diferentes trabalhos tem sido de 10^5 protoplastos/ml (VARDI & GALUN, 1988; GROSSER & GMITTER, 1990).

Com a finalidade de se obter a divisão dos protoplastos, nos casos em que o plaqueamento for realizado com baixa densidade (10^3 - 10^2 protoplastos/ml), estes podem ser plaqueados sobre uma camada "alimentadora", formada por protoplastos que tiveram sua divisão interrompida pelo uso da radiação X ou gama (VARDI & RAVEH, 1976). O plaqueamento a uma baixa densidade de protoplastos sobre uma camada "alimentadora", é um procedimento conveniente

quando o número de protoplastos viáveis é desconhecido (por exemplo, após um tratamento mutagênico) e, especialmente, após a fusão de protoplastos quando número de protoplastos produzidos pela fusão é variável e não previsível (VARDI et alii, 1989).

Os protoplastos, sendo células isoladas, desprovidas de parede celular, representam um sistema bastante eficiente na absorção de elementos minerais do meio. A otimização do meio de cultura é um fator primordial para a aplicação desta tecnologia. Em geral, a exigência nutricional para a cultura de protoplastos é a mesma para células isoladas (CARNEIRO & CONROI, 1990).

Em citros, tem sido utilizado, na maioria dos trabalhos, o meio de MURASHIGE e TUCKER (1969), sem reguladores de crescimento e com os estabilizadores osmóticos descritos anteriormente. HIDAKA & KAJIURA (1988) utilizaram o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) e GROSSER & GMITTER (1990) idealizaram um meio de cultura, com composição mais complexa, utilizado principalmente para o cultivo de genótipos mais recalcitrantes.

Os protoplastos de citros têm uma fase "lag" relativamente extensa. As primeiras divisões são geralmente observadas 10-14 dias após o plaqueamento. O tempo necessário para a formação de calos é afetado por vários fatores, entre eles estão a fonte de protoplastos e a densidade de plaqueamento (VARDI & GALUN, 1988). Segundo GROSSER &

GMITTER (1990), a eficiência de plaqueamento, definida como a porcentagem de protoplastos que se dividem para produzir colônias, geralmente varia de 0-35%.

A formação de colônias de células é então seguida pelo desenvolvimento de calos e, finalmente, pela produção de embriões a partir destes calos. Os embriões se tornam aparentes 6 a 7 semanas após o plaqueamento dos protoplastos (VARDI et alii, 1982; KOBAYASHI et alii, 1988). O número de embriões formados de cada colônia é baixo e, na maioria dos casos, nem todos mostram a capacidade de formar plantas normais. O glicerol tem sido utilizado para estimular a embriogênese nestes calos (GROSSER & GMITTER, 1990).

Segundo VARDI & GALUN (1988), quando os calos derivados de protoplastos atingem o diâmetro de 1-2 mm, eles são individualizados e transferidos para meio MT contendo 4% de sacarose para melhorar o crescimento dos mesmos. Calos que atingem o diâmetro de 7mm são transferidos para o meio MT com 2% de glicerol para indução de embriões. Os embriões são individualizados e cultivados em meio MT contendo 4% de sacarose e 1.500 mg/l de EM. Embriões com folhas cotiledonares expandidas são transferidos para tubos contendo meio MT com 2% de sacarose e 0,02-0,05 mg/l de NAA. A adição de NAA promove a formação da raiz e o alongamento do eixo caulinar. Posteriormente, as plântulas são aclimatizadas e transferidas para o solo.

2.2.5. Fusão de protoplastos

2.2.5.1. Obtenção de híbridos somáticos

O gênero *Citrus* foi o primeiro gênero arbóreo no qual um processo eficiente foi estabelecido para regenerar plantas a partir de protoplastos (VARDI et alii, 1975, 1982; KOBAYASHI et alii, 1983; GROSSER & CHANDLER, 1987; KOBAYASHI et alii, 1987 e VARDI & GALUN, 1988). VARDI et alii (1986) obtiveram também a regeneração de plantas a partir de protoplastos do gênero *Microcitrus*. Estes trabalhos foram, então, a base para trabalhos posteriores, visando, inclusive, a fusão de protoplastos.

O primeiro exemplo de hibridação somática bem sucedida envolvendo *Citrus* foi um híbrido intergenérico alotetraplóide produzido pela fusão de protoplastos de calos embriogênicos do cv. Trovita (*C. sinensis*) com protoplastos de folhas de *Poncirus trifoliata* (OHGAWARA et alii, 1985).

GROSSER et alii (1988) produziram os primeiros híbridos somáticos a partir de gêneros sexualmente incompatíveis. A fusão foi realizada entre protoplastos isolados de uma cultura de calos, em suspensão, de *Citrus sinensis*, com protoplastos isolados de calos originados na região do epicótilo de *Severinia disticha* (Blanco). A produção deste híbrido demonstrou que a fusão de protoplastos é uma forma viável de transpor a barreira da hibridação

sexual que existe entre *Citrus* e os gêneros relacionados potencialmente importantes.

KOBAYASHI et alii (1988) obtiveram o primeiro híbrido interespecífico produzido pela fusão de protoplastos do cv. Washington Navel (*Citrus sinensis*) e cv. Hayashi (tangerina Satsuma - *C. unshiu*). Trata-se de uma combinação potencialmente importante para o melhoramento da copa, onde o progresso através do melhoramento convencional tem sido limitado.

Os trabalhos realizados com hibridação somática em citros podem ser encontrados em GROSSER & GMITTER (1990). A verificação de que os produtos da fusão eram de fato híbridos somáticos foi baseada, principalmente, na caracterização do formato das folhas, contagem do número de cromossomos e análise dos rDNAs com auxílio das endonucleases de restrição.

Segundo GROSSER & GMITTER (1990), a hibridação somática tem vantagens sobre a hibridação sexual para o melhoramento de citros, em termos de combinar pais com características complementares; sem perda significativa do vigor, na maioria dos casos, resultando na expressão aditiva das características dominantes nos híbridos. A hibridação somática pode propiciar uma forma de utilizar clones estéreis nos esquemas de melhoramento, ou de transpor incompatibilidades de cruzamento na criação de formas híbridas, previamente impossíveis entre espécies e gêneros.

Consequentemente, novos genótipos potencialmente valiosos podem ampliar a base genética dos citros.

Porém, há algumas consequências genéticas que resultam da fusão de protoplastos na criação de novas formas de híbridos nos citros. Primeiro, um dos pais deve ter potencial embriogênico *in vitro*, e isto limita o grupo de materiais disponíveis para a hibridação somática. Segundo, os híbridos somáticos podem não apresentar desenvolvimento normal de flores ou serem inférteis, especialmente, híbridos que combinam os pais geneticamente distantes. Também, o pareamento preferencial dos cromossomos pode inibir a recombinação genética nos híbridos somáticos. Uma terceira consequência seria da incorporação dos híbridos somáticos nos programas de melhoramento é que os ciclos subsequentes da hibridação sexual, para o avanço de gerações (p.ex. retrocruzamento dos híbridos com um dos pais para eliminar características indesejáveis), serão em nível tetraplóide. Se os tetraplóides são hibridizados com diplóides pode ocorrer a formação de triplóides inférteis. Estes triplóides podem ter valor comercial por não possuírem sementes, entretanto, sua utilidade na continuidade do processo de melhoramento genético será mínima. E, finalmente, a eliminação da oportunidade de segregação e recombinação, normalmente propiciada pela hibridação sexual, significa que somente uma combinação híbrida pode ser produzida por qualquer par de parentais e, portanto, nenhuma variação de

caracteres é produzida sobre a qual deva ser aplicada uma pressão de seleção (GROSSER & GMITTER, 1990).

2.2.5.2. Obtenção de cíbridos

A cibridação (VARDI et alii, 1987) ou fusão utilizando protoplastos irradiados com raios gama pode ajudar a transpor algumas das consequências da hibridação somática (GROSSER & GMITTER, 1990).

O método de fusão de protoplastos denominado de doador-receptor foi utilizado em citros pela primeira vez por VARDI et alii (1987) para obter cíbridos entre *Citrus* e *Microcitrus*. Este método consiste em interromper ou inativar a divisão nuclear do protoplasto doador através da irradiação com altas doses (no caso de protoplastos de *Citrus*, 50 a 60 kR) de raios X ou γ . A divisão do protoplasto receptor é impedida por um antimetabólico (p.ex., iodoacetato) causando uma inibição metabólica transitória. Posteriormente é promovida a fusão do protoplasto doador com o receptor.

Este tipo de fusão pode resultar em plantas cíbridas de citros que têm a morfologia codificada pelos genes nucleares do protoplasto receptor, mas contém também os novos genomas mitocondriais do protoplasto doador, que pode ser verificado pela análise dos padrões das enzimas de restrição do DNA mitocondrial (VARDI et alii, 1987).

A produção de tais cíbridos de citros tendo o

genoma nuclear de um dado cultivar e genoma extranuclear de outro é muito relevante para estudos genéticos e para o melhoramento deste gênero, porque não há informações sobre a herança citoplasmática em citros. Tais informações podem ter um impacto direto sobre o melhoramento de citros, isto porque, várias características, como por exemplo, resistência aos patógenos e herbicidas, assim como a macho esterilidade citoplasmática podem ser controladas pelos genomas presentes nas organelas (VARDI & GALUN, 1988).

2.3. Organogênese

A embriogênese somática só foi conseguida até o momento a partir de óvulos e nucelos ou a partir de calos formados nestes explantes. Entretanto, a cultura de outros órgãos e tecidos em *Citrus* tem resultado na formação de plantas via organogênese (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984).

A organogênese ocorre através da formação de gemas adventícias que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. A sua formação ocorre de maneira direta ou indireta. A organogênese direta refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético nas plantas *in vivo*, mas que, em geral, não se expressa. A organogênese indireta

ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. A partir de células não organizadas do calo surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

O primeiro relato sobre organogênese em cultura de tecidos em *Citrus* foi realizado por GRINBLAT (1972). Calos, gemas e plantas foram obtidos em cultivo de segmentos de caule de plântulas do cv. Calamondin (*C. madurensis*).

Posteriormente, a organogênese foi obtida em calos de diferentes cultivares e/ou espécies de *Citrus* a partir de folhas, segmentos de caule e raízes (CHATURVEDI & MITRA, 1974; CHATURVEDI & MITRA, 1975; EDRISS & BURGER, 1984).

A produção de plantas diretamente de segmentos nodais do caule, segmentos de epicótilo e raízes e pontas de raízes também foi relatada (BURGER & HACKETT, 1981; MATSUMOTO & YAMAGUSHI, 1983; MOORE, 1986; EDRISS & BURGER, 1984; BURGER & HACKETT, 1986; DURAN-VILLA et alii, 1989).

Em cultura de tecidos, os principais fatores que controlam a morfogênese são os fitorreguladores, particularmente o balanço auxina-citocinina no meio de cultura, fato estabelecido no clássico trabalho de SKOOG & MILLER (1957). Esses autores verificaram que tal balanço, con-

venientemente manipulado, induzia em calos originados da medula de fumo, a formação de raízes, gemas caulinares ou apenas mais tecido de calo.

Nos processos de organogênese em *Citrus*, calos e gemas formadas direta ou indiretamente a partir dos explantes têm sido obtidos em meio de sais minerais e vitaminas de MURASHIGE & SKOOG (1962) ou MURASHIGE & TUCKER (1969) contendo diferentes concentrações de NAA e BAP e suas combinações. A adição de NAA, em concentração adequada, ao meio básico de cultura tem favorecido a formação de raízes nas brotações obtidas.

2.4. Indução de mutações

Estudos genéticos em *Citrus* são complicados devido à presença de embriões nucelares nas espécies poliembriônicas, ao alto grau de heterozigosidade, à incompatibilidade, à esterilidade e ao longo período de juvenilidade das plantas obtidas por sementes. A embrionia nucelar em *Citrus* é um importante obstáculo para a hibridação, mas é de grande importância na produção de porta-enxertos vigorosos, uniformes e isentos de viroses (FROST & SOOST, 1968). A auto-incompatibilidade foi demonstrada em *Citrus grandis* (SOOST, 1964), na tangerina Clementine, nos tangelos, em alguns cultivares de *Citrus limon*, em *Citrus limettoides* e

Citrus sinensis (SOOST & CAMERON, 1975). Fatores genéticos para esterilidade em óvulos e pólen estão presentes em algumas espécies de *Citrus* (IWAMASA, 1966).

Um alto grau de heterozigosidade está presente na maioria das espécies de *Citrus* devido, presumivelmente, aos seguintes fatores: (1) a ocorrência frequente de mutação genética espontânea, (2) cruzamentos naturais entre espécies distantes e (3) embrionia nucelar. A reprodução por embrionia nucelar preserva a heterozigosidade que pode se originar através da hibridação ou mutação (SOOST & CAMERON, 1975).

A existência de pouca variabilidade entre os cultivares de limões verdadeiros e entre os cultivares de laranja pode representar, principalmente, uma origem através de mutação somática espontânea. As tangerinas, entretanto, têm uma ampla base genética, sugerindo uma maior diferenciação nos cultivares através de reprodução sexual (SOOST & CAMERON, 1975).

Quando as mutações ocorrem, sua expressão nos tecidos somáticos é favorecida pela heterozigosidade da maioria das espécies de *Citrus*. Tal heterozigosidade, por sua vez, implica em que as mutações devem ter ocorrido freqüentemente no passado.

As mutações espontâneas têm sido relatadas em várias espécies de *Citrus*. SOOST & CAMERON (1975) listaram vários mutantes em muitas espécies de *Citrus* e mencionaram

que a maioria dos cultivares comerciais surgiu de algum tipo de mutação espontânea.

A indução de mutações, através do uso de agentes mutagênicos, aumenta a frequência das mutações e afeta o espectro da mutação (HOWLAND & HART, 1977).

Devido aos problemas encontrados no emprego de métodos convencionais de melhoramento genético nas espécies cítricas e ao grande potencial de resposta destas espécies ao emprego da técnica de indução de mutações, vários trabalhos foram desenvolvidos *in vivo* ou *in vitro*.

2.4.1. Indução de mutações *in vivo*

O primeiro relato sobre o uso de raios X para induzir mutações em plântulas de *Citrus* aconteceu em 1935 (Haskins & Moore⁴, citado por RUSSO et alii, 1981). Os raios X aplicados às sementes de 5 espécies de *Citrus* produziram várias anormalidades nas plântulas, tais como, fasciação, folhas bi ou trifoliadas e um grande número de plântulas albinas.

Os trabalhos de melhoramento genético com *Citrus* utilizando a técnica de indução de mutações tiveram grande impulso na década de 70, concentrando-se na obtenção

⁴ HASKINS, C.P. & MOORE, C.N. Growth modifications in citrus seedlings grown from X-rayed seed. *Plant Physiology*, 10: 179-185, 1935.

de amadurecimento precoce e alta qualidade dos frutos obtidos de mutantes espontâneos, subsequentemente na indução de mutantes sem sementes com a utilização de radiação gama e outros mutagênicos físicos e químicos (ZHANG et alii, 1989).

HENSZ (1971) obteve um novo cultivar de "grapefruit" denominado de Star Ruby de coloração vermelha intensa através da irradiação de sementes com nêutrons térmicos. Este cultivar recebeu reconhecimento em todos os países onde se cultiva "grapefruit". Entretanto, alguns produtores obtiveram baixa produção de frutos e voltaram a utilizar o cultivar original a partir do qual o Star Ruby foi obtido. Outra progênie obtida neste mesmo programa de melhoramento através da indução de mutações e mantida por vários anos produzindo árvores vigorosas, frutíferas e frutos de coloração vermelha intensa como os do cultivar Star Ruby foi introduzida recentemente (HENSZ, 1990).

Em geral, a maioria dos projetos de melhoramento, através da indução de mutações, foi iniciada recentemente e ainda não se obteve mutantes comerciais. BROERTJES & VAN HARTEN (1988) listaram dois cultivares mutantes com produção comercial que são, o já comentado Star Ruby, e o cv. Hongju 418, um cultivar de laranja doce, sem sementes e altamente produtivo criado na China em 1983.

Estes mesmos autores fizeram uma revisão sobre este assunto, onde citam trabalhos realizados na URSS

e China, principalmente, com o uso de mutagênicos físicos e químicos em sementes e borbulhas para obter plantas com frutos sem sementes, plantas de porte compacto, frutos com melhores características e com amadurecimento precoce e também, melhora na atividade fotossintética da planta.

HEARN (1985) obteve vários clones promissores juvenis, sem sementes do cv. Foster em "grapefruit", através da irradiação de borbulhas com as doses de 30-50 GY de raios gama.

Da mesma forma, SPIEGEL-ROY et alii (1985) obtiveram uma linhagem mutante de limão Eureka sem sementes a partir de borbulhas irradiadas com 6 kR de raios gama de uma fonte de ^{60}Co .

RUSO et alii (1981), também fazendo uso da mutagênese aplicada ao melhoramento de *Citrus*, irradiaram borbulhas com raios X e obtiveram frutos com número reduzido de sementes no cv. Monreal Clementine (*Citrus reticulata*).

No Brasil, TULMANN NETO et alii (1990) estão utilizando a técnica de indução de mutações com o objetivo de obter resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) e outras características na laranja doce (*Citrus sinensis* Osb.). A irradiação resultou em uma grande variabilidade nas características agronômicas. A seleção para resistência ao cancro está em andamento.

A obtenção de resistência a *Xanthomonas citri* em um cultivar de grapefruit foi relatada por ZUBRZYCKI &

ZUBRZYCKI (1982). Estes mesmos autores estão trabalhando na obtenção de resistência ao vírus da tristeza utilizando a indução de mutações.

Um outro enfoque é dado à utilização da radiação visando diminuir o número de embriões nucelares nas espécies poliembriônicas. IKEDA & NISHIDA (1977) descobriram que a formação de embriões nucelares poderia ser restringida através da irradiação de borbulhas florais com raios gama. Desta forma, WATANABE (1985) obteve híbridos F₁ pela regulação da poliembrião através da radiação gama em cultivares de *Citrus unshiu*.

2.4.2. Indução de mutações *in vitro*

As técnicas de cultura de tecidos e células foram introduzidas visando contornar os problemas de quimerismo e seleção diplôntica ocorridos quando se faz irradiação de borbulhas e sementes (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977a; ZHANAQ et alii, 1989).

Outra vantagem de se utilizar a indução de mutações *in vitro*, no melhoramento, é que grandes populações de indivíduos podem ser tratadas e submetidas à pressão de seleção sob condições uniformes. Os processos *in vitro* podem ser utilizados inclusive para suspensões celulares, culturas de protoplastos, embriogênese somática

em cultura de células em suspensão ou calos, em gemas adventícias e em material tratado com mutagênico *in vivo*, do qual setores de tecidos mutantes são utilizados *in vitro* para recuperar os mutantes (CONSTANTIN, 1984).

Os trabalhos realizados por KOCHBA et alii (1972) com cultura de óvulos e nucelos de três cultivares de *Citrus*, tinham como objetivo estudar a diferenciação de explantes nucelares e expor as culturas ao tratamento mutagênico, antes do desenvolvimento de embrióides. Isto possibilitaria a indução de mutação nas células nucelares de onde posteriormente haveria a regeneração de mutantes sólidos.

PASQUAL (1985) estudou a radiosensitividade, sob diferentes condições, em nucelos extraídos do cv. Valência (*Citrus sinensis*) e encontrou o valor da LD₅₀ (dose que causa 50% de letalidade) de 1-2 Krad. Porém, SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1977a) observaram um aumento na formação de embrióides nas doses de 0,5 e 1,0 kR em relação à testemunha.

Segundo KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977a), óvulos em estágio apropriado de desenvolvimento para os trabalhos com indução de mutação estão disponíveis por um período de tempo limitado. A extração do nucelo é trabalhosa e os explantes nucelares são extremamente sensíveis à radiação gama, o que torna difícil a realização de estudos com indução de mutações nestes explantes.

Um programa de melhoramento de *Citrus* utilizando indução de mutações foi iniciado na Itália em 1974

com a finalidade de induzir resistência ao "mal secco" no limão "Femminello Siracusano" (*C. limon* L. Burm. f.). Este cultivar é extremamente importante na Itália devido à grande produtividade e boa qualidade de seus frutos. Aproximadamente 120 dias após a polinização, frutos imaturos foram irradiados a uma exposição total de 2 kR e 4 kR. Os núcelos foram excisados das sementes destes frutos e cultivados *in vitro* (STARRANTINO & RUSSO, 1976-1977).

A partir da determinação da metodologia para obtenção de calos embriogênicos de cultura de óvulos de *Citrus* (KOCHBA et alii, 1972; SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973), vários trabalhos foram realizados no sentido de se estudar o efeito da radiação sobre estes calos (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977a).

Altas doses de radiação gama (12-20 kR), especialmente 16 kR, estimularam significativamente a formação de embrióides e inibiram o crescimento dos calos do cv. Shamouti. Porém, este estímulo significativo ocorreu a uma taxa de dose de 3,1 kR/h. Aplicando-se uma taxa de 50 kR/h o estímulo ocorreu mas foi pequeno e a 100 kR/h ocorreu uma redução na formação de embrióides (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1973).

SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1973) relataram que o efeito parece ser devido às mudanças ocorridas no meio de cultura, provocadas pela radiação. Porém, este efeito não foi observado quando experimentos foram realizados em calos

habituaados do cv. Shamouti (KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977c).

KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977c) verificaram que alguns fatores tais como, período de tempo entre um subcultivo e outro, e a inoculação dos calos, após irradiação, em meios com diferentes concentrações de IAA podem modificar o efeito da radiação sobre os calos. Estes autores chamaram atenção para o fato de que os calos em subcultivo apresentam-se em vários estádios de desenvolvimento, desde células isoladas, até pró-embrióides (BUTTON et alii, 1974). Portanto, estes diferentes estádios podem responder de modo diferente à irradiação. A constituição dos explantes muda com a idade dos calos, sendo que é esperada uma composição menos uniforme com o aumento da idade dos calos. Verificou-se também que a sensibilidade dos calos às doses mais altas aumentou com o prolongamento do período de subcultivo dos mesmos, e que diferentes níveis de reguladores de crescimento podem influenciar na embriogênese dos calos irradiados no cv. Shamouti. A inibição da embriogênese pela presença de IAA foi removida progressivamente com o aumento da dose de radiação.

Posteriormente, outros trabalhos foram realizados utilizando calos embriogênicos habituaados do cv. Shamouti irradiados com doses de 8, 12 e 16 kR (a uma taxa de dose de 85 kR/h) e calos não irradiados, visando à seleção *in vitro* para resistência à salinidade, herbicidas e es-

treptomicina (KOCHBA et alii, 1982; SPIEGEL-ROY et alii, 1983; KOCHBA et alii, 1982). Mutagênicos químicos e raios gama foram utilizados para indução de mutações em calos de diferentes cultivares de *Citrus* com a finalidade de selecioná-los para tolerância ao NaCl (ZHANAQ et alii, 1989).

Nas pesquisas realizadas com o cv. Shamouti, a comparação não revelou diferenças significantivas entre as linhas originadas de calos irradiados e não irradiados, quanto à tolerância ao NaCl e 2,4-D. Segundo KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1982), estas diferenças, entretanto, poderão ser encontradas nas plantas regeneradas a partir destes calos.

MATSUMOTO & YAMAGUSHI (1984) obtiveram um aumento na variação para tolerância ao NaCl em embriões adventícios de *Poncirus trifoliata* obtidos na região de transição entre a parte aérea e a raiz de plântulas obtidas in vitro e tratadas com EMS.

Em todos estes trabalhos, a estabilidade da tolerância foi verificada através de vários subcultivos em meio sem o agente seletivo e posterior inoculação em meio de cultura com o agente seletivo. Porém, não há relatos sobre a verificação da estabilidade da tolerância em plantas adultas obtidas a partir dos calos e embrióides selecionados nestes trabalhos.

Outra técnica com grande potencial de apli-

cação em trabalhos com indução de mutações é a técnica de isolamento e cultura de protoplastos. Segundo NEGRUTIU et alii (1984), 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 existe grande probabilidade de obtenção de mutantes não quiméricos.

VARDI et alii (1975) estudaram o efeito do mutagênico químico EMS e dos raios X na sobrevivência de protoplastos, analisando a formação de colônias de células após 4 semanas do tratamento mutagênico. Este mesmo tipo de trabalho foi realizado por GOLDMAN (1988), com protoplastos de cv. Pera tratados com raios gama e a sobrevivência foi avaliada com o corante azul de metileno. ZHANG et alii (1989) obtiveram embriões somáticos originados de protoplastos de calos irradiados a partir de vários cultivares e/ou espécies de *Citrus*.

Um fato interessante encontrado no trabalho de VARDI et alii (1975) é que as doses de 4,5 kR e 7,5 kR estimularam a diferenciação de embriões nos calos provenientes de protoplastos irradiados.

Os trabalhos com indução de mutações em protoplastos de *Citrus* foram realizados pelos autores acima citados, para estudar a radiosensitividade dos mesmos, mas não há relatos de obtenção de plantas adultas a partir dos protoplastos obtidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Os frutos foram coletados na Estação Experimental de Limeira, Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, em Cordeirópolis, São Paulo.

3.1. Procedimentos gerais

Os nucelos foram extraídos de frutos imaturos do cv. Pera Premunizada (*Citrus sinensis* Osbeck), aproximadamente, 12 semanas após a antese.

A assepsia das sementes foi realizada em solução composta de uma parte de água sanitária comercial ("Q-Boa" - hipoclorito de sódio 2%) e três partes de água destilada, durante dez minutos. Em seguida, em condições assépticas, foram feitas três lavagens com água destilada estéril.

Após a assepsia, com auxílio de pinça e bisturi, e sob o estéreo-microscópio, as sementes foram cortadas longitudinalmente em duas partes, extraíndo-se o tecido nucelar de cada uma delas e retirando-se os embrióides que eventualmente já estivessem em formação nas sementes por ocasião da extração dos núclosos.

Os meios de cultivo constituíram-se basicamente, dos sais minerais e vitaminas do meio MT suplementado com reguladores de crescimento e substâncias complexas de acordo com cada experimento. Os meios foram solidificados com 8 g/l de ágar e o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos a 1,5 atm. O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado. Para efeito de análise estatística, os dados relativos ao peso e contagem, foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

A irradiação dos diferentes materiais foi realizada com raios gama da fonte ^{60}Co do CENA-USP.

3.2. Procedimentos específicos

3.2.1. Efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA na formação de calos e embrióides em tecido nucelar (Experimento 1)

Os meios constituíram-se basicamente do meio MT suplementado com 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de extrato

de malte (EM), contendo diferentes concentrações dos reguladores de crescimento. Foram testadas todas as combinações das concentrações de 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg dos reguladores de crescimento IAA e CIN, totalizando 16 meios de cultura diferentes. Foram inoculados 15 núcelos por placa de Petri, contendo 40 ml de meio de cultura, com quatro repetições por meio de cultura.

As culturas foram mantidas em condições de escuro (BOD) à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e no mesmo meio de cultivo até a avaliação.

A avaliação foi realizada após 8 semanas do início do cultivo dos núcelos. Foram obtidas as porcentagens de núcelos responsivos, isto é, núcelos que formaram embrióides e/ou calos e o número médio de embrióides por núcelo em cada tratamento. Os resultados estão expressos como as médias obtidas das quatro repetições.

3.2.2. Efeito de diferentes meios de cultura na formação de calos e embrióides em tecido nucelar (Experimento 2)

Estudos complementares foram realizados com a finalidade de se obter um meio de cultura com maior capacidade de formação de calos nucleares embriogênicos.

Neste ensaio, estudou-se três meios de cultura constituídos do meio básico MT sem reguladores de

crecimento, meio MT suplementado com CIN (0,1 mg/l) e IAA (1,0 mg/l) e meio MT suplementado com BAP (10 mg/l). Todos os meios receberam adição de 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de EM.

Foram inoculados 25 núcelos por placa de petri, contendo 40 ml de meio de cultura. Sete repetições foram realizadas para cada tratamento.

As culturas foram mantidas no escuro (BOD), a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ no mesmo meio de cultivo até a última avaliação.

As avaliações foram realizadas após 8 a 12 semanas de cultivo. Foram obtidas as porcentagens de núcelos responsivos para formação de calos e/ou embrióides e o número médio de embrióides por núcelo em cada tratamento. Os resultados estão expressos como as médias obtidas das sete repetições.

3.2.3. Indução de embriogênese somática em calos nucleares (Experimento 3)

Os calos nucleares, obtidos em meio de cultura MT, suplementado com BAP (10 mg/l) (Experimento 2), foram inoculados em meio MT contendo diferentes açúcares e diferentes concentrações de EM, como listados a seguir:

MT + 50 g/l de galactose + 500 mg/l de EM

MT + 50 g/l de galactose

MT + 50 g/l de lactose + 500 mg/l de EM

MT + 50 g/l de lactose

MT + 30 g/l de sacarose + 1000 mg/l de EM

MT + 30 g/l de sacarose + 500 mg/l de EM

MT + 50 g/l de sacarose + 1000 mg/l de EM

MT + 50 g/l de sacarose + 500 mg/l de EM

O cultivo se realizou sob intensidade luminosa de 3000 lux, fotoperíodo de 16 horas de luz e à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram realizadas dez repetições para cada tratamento. Cada repetição era composta por um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura onde foram inoculados 20 mg de calo.

A avaliação foi realizada após 40 dias fazendo-se a contagem do número de embriões, no estágio cotiledonar e embriões em diferentes outros estádios (globular, cordiforme e torpedo), por cultura com auxílio do estereomicroscópio.

3.2.4. Efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA no desenvolvimento de plantas a partir de embriões (Experimento 4)

Embriões somáticos, obtidos em meio MT suple-

mentado com 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM (Experimento 3), no estágio cordiforme (2-3 mm) foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio de cultivo composto do meio MT suplementado com 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de EM, contendo diferentes concentrações dos reguladores de crescimento CIN e IAA. Foram estudadas todas as combinações das concentrações de 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l dos reguladores de crescimento, totalizando 16 tratamentos. O cultivo foi realizado sob intensidade luminosa de 3000 lux, fotoperíodo de 16 horas e à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cada tratamento era composto de um número diferente de repetições. A avaliação foi realizada após 60 dias da inoculação dos embriões. Foram obtidas as porcentagens de plantas normais, de anormalidades e a porcentagem de enraizamento em cada tratamento.

3.2.5. Efeito de diferentes meios de cultura na proliferação de calo e de embriões em calos obtidos em meio MT básico com reguladores de crescimento (Experimento 5)

Calos embriogênicos, obtidos em meio MT básico (suplementado com 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de EM) (Experimento 2), foram inoculados em meio básico de cultura contendo 1 mg/l de CIN e 1 mg/l de IAA, 50 g/l de sacarose e

500 mg/l de EM para que se proliferassem mais rapidamente. Após o período de subcultivo de 4 semanas e, posteriormente, foram subcultivados três vezes em meio MT sem reguladores de crescimento. Estes calos foram inoculados em meios de cultura com diversos tipos de suplementações. Estes meios eram: MT + 50 g/l de sacarose, MT + 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de EM e as combinações das concentrações de 0 ; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l de CIN e IAA; MT + 50 g/l de lactose; MT + 50 g/l de galactose; MT + 50 g/l de sacarose + BAP (10 mg/l) e EM (500 mg/l), perfazendo-se um total de 20 tratamentos.

Foram inoculados 20 mg de calos em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura, com dez repetições por tratamento. O cultivo realizou-se sob intensidade luminosa de 3.000 lux, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Quarenta dias após o início do cultivo, realizou-se a avaliação pesando-se os calos (peso fresco) e contando-se o número de embriões obtidos por calo. A contagem do número de embriões foi feita com auxílio do microscópio estereoscópico.

3.2.6. Verificação do fenômeno da habituação em calos nucleares (Experimento 6)

O objetivo deste experimento era verificar a ocorrência da habituação em calos nucleares, frequentemente

observada em outros cultivares de *Citrus* (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1975).

Calos do cv. Pera foram subcultivados por 6 passagens de 4 semanas cada uma, nos seguintes meios de cultivo (Experimento 5): MT + CIN (0,1 mg/l) + IAA (0,5 mg/l), MT + CIN (0,5 mg/l) + IAA (0,5 mg/l), MT + CIN (1,0 mg/l) + IAA (0 mg/l), MT + CIN (1,0 mg/l) + IAA (0,1 mg/l), MT + CIN (1,0 mg/l) + IAA (0,5 mg/l) e MT + BAP (10 mg/l). Todos os meios foram suplementados com 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de EM.

Subsequentemente, uma parte destes calos continuou a ser subcultivada nos mesmos meios de cultivo e outra parte foi inoculada em meio básico MT, suplementado com 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de EM sem reguladores de crescimento. Estes calos foram subcultivados por mais 3 subcultivos de 4 semanas cada um e um subcultivo com 45 dias. Ao final do último subcultivo, obteve-se o peso fresco dos calos subcultivados em meio básico MT e em meio com reguladores de crescimento.

Foram realizadas 10 repetições para cada tratamento. Cada repetição era composta por 1 tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura e inicialmente, 20 mg de calo. O cultivo foi realizado sob fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 3000 lux e à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.7. Efeito de diferentes concentrações de BAP e NAA na indução de brotações adventícias (Experimento 7)

O objetivo deste experimento era estudar o desenvolvimento de brotações adventícias, a partir de cotilédones de embriões nucelares do cv. Pera (*C. sinensis* Osbeck), uma vez que, estes são obtidos de tecido somático e, portanto, possuem o mesmo genótipo da planta mãe e, além disto, por serem obtidos *in vitro*, estes explantes não necessitam de assepsia.

Os nucelos foram inoculados em meio MT, suplementado com 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de EM e mantidos em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ sob intensidade luminosa de 3000 lux. Após aproximadamente 3-4 semanas, começaram a surgir os embriões nucelares. Estes embriões foram individualizados e transferidos para o mesmo meio de cultura fresco. Após 3-4 semanas, estes embriões atingiram o estágio cotilédonar expandido. Os cotilédones foram extraídos e divididos longitudinalmente em duas partes, sob condições assépticas com auxílio de pinça e bisturi. Estas partes foram inoculadas em meio básico MT, suplementado com 30 g/l de sacarose e todas as combinações das concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg/l de BAP e NAA.

O cultivo foi realizado, inicialmente, por duas

semanas sob condição de 24 horas de escuro (BOD) e à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Subsequentemente, o cultivo foi realizado sob intensidade luminosa de 3000 lux, fotoperíodo de 16 horas de luz e à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram inoculados 3 explantes por tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura e três repetições foram realizadas para cada tratamento.

A avaliação foi realizada após 90 dias do início do cultivo dos cotilédones, obtendo-se a porcentagem de explante responsivo e o número médio de brotações por explante responsivo.

3.2.8. Efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação de brotações adventícias (Experimento 8)

Nesse experimento, brotações (1,0 a 1,5 cm de altura) provenientes de gemas adventícias, obtidas a partir de cotilédones inoculados em meio MT, suplementado com 30 g/l de sacarose, 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA (Experimento 7) foram individualizadas em tubos de ensaio contendo meio MT, 30 g de sacarose e as concentrações de 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/l de BAP.

O cultivo foi realizado sob intensidade luminosa de 3000 lux, fotoperíodo de 16 horas e à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram realizadas 8 repetições para cada tratamento sendo que cada repetição era constituída de uma brotação inoculada em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura. A avaliação foi realizada 60 dias após a inoculação dos explantes. Obteve-se a porcentagem de explantes que produziram gemas adventícias e o número médio de gemas adventícias por explante.

3.2.9. Efeito de diferentes reguladores de crescimento no enraizamento das brotações adventícias (Experimento 9)

Brotações adventícias (1,0 a 1,5 cm) obtidas em meio básico MT suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA (Experimento 7) e multiplicadas em meio contendo 3 mg/l de BAP (Experimento 8), foram inoculadas em meio básico MT, contendo 30 g/l de sacarose e diferentes reguladores de crescimento e concentrações dos mesmos: NAA (0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg/l), GAs (1,0; 5,0 e 10,0 mg/l), NAA (0,1 mg/l) + IBA (2,0 mg/l), NAA (1,0 mg/l) + IBA (2,0 mg/l), NAA (1,0 mg/l) + IBA (5,0 mg/l), NAA (5,0 mg/l) + IBA (2,0 mg/l) e NAA (5,0 mg/l) + BAP (0,1 mg/l).

Tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio de cultura, foram inoculados com 3 brotações. Foram realizadas nove repetições para cada tratamento.

O cultivo se realizou sob fotoperíodo de 16

horas, sob intensidade luminosa de 3.000 lux e à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

A avaliação foi realizada 4 semanas após o início do cultivo, obtendo-se a porcentagem média de plantas enraizadas em cada tratamento.

3.2.10. Cortes histológicos (Experimento 10)

Os cortes histológicos foram realizados em cotilédones de embriões nucelares com aproximadamente 3-4 semanas de idade (estádio cotiledonar expandido), obtidos *in vitro*, e trinta dias após a inoculação dos cotilédones em meio de cultura para induzir a formação de brotações adventícias.

As amostras do material para estudo anatômico foram fixadas em FAA 50% (SASS, 1951).

A técnica empregada para desidratação e emblocamento de material em parafina, corte e distensão das fitas em lâminas, foi a indicada por SASS (1951). A espessura dos cortes variou entre 10 e 12 μm . Seguiram-se a desparafinação das lâminas pelo xilol, a coloração do material pela safranina e "fast-green" (SASS, 1951), e, finalmente, a montagem em diáfane.

Foram tiradas fotografias de material vivo e fotomicrografias de material preparado em lâminas.

3.2.11. Obtenção de protoplastos

3.2.11.1. Isolamento de protoplastos

(Experimento 11)

Calos obtidos em meio MT, 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de extrato de malte e 10 mg/l de BAP (Experimento 2) foram subcultivados neste mesmo meio a intervalos de 4 semanas. Estes calos foram utilizados para o isolamento dos protoplastos. Foram estudados meios de maceração e lavagem (Tabela 1) extraídos de 4 protocolos diferentes, utilizados em diversos cultivares de *Citrus sinensis*, inclusive cv. Pera. Estes meios foram denominados Meio 1, Meio 2, Meio 3 e Meio 4, apresentados na Tabela 1.

Foram inoculados 500 mg de calo/10 ml de meio de maceração em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Foram realizadas duas repetições por tratamento enzimático e por período de digestão enzimática, sendo que cada repetição era representada por uma placa de Petri. A digestão enzimática ocorreu em condição de escuro à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, à 25 rpm de agitação rotatória. As avaliações foram realizadas 5, 10 e 15 horas após a inoculação dos calos em meio enzimático.

3.2.11.2. Purificação dos protoplastos

Após cada período de incubação, a suspensão, composta por meio enzimático, protoplastos e calos, foi fil-

trada em peneiras com tela de Nylon com poros de 30 μm e 25 μm . A suspensão de protoplastos foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e aos protoplastos precipitados foram acrescentados 10 ml do meio de lavagem (Tabela 1). Os protoplastos foram ressuspensos cuidadosamente com pipeta de Pasteur e centrifugados novamente. Esta operação foi repetida por mais duas vezes.

Tabela 1. Meios de maceração e de purificação (lavagem) de acordo com 4 diferentes protocolos.

MEIO 1 (GOLDMAN, 1988)

Meio de maceração:

- metade da concentração dos macronutrientes do meio MT
- enzimas:

celulase "ONDOZUKA" R-10	307,6 mg/10 ml
macerozyme R-10	30,6 mg/10 ml
- estabilizadores osmóticos

manitol	328,0 mM
sacarose	336,2 mM

Meio de lavagem:

- meio MT completo
- estabilizadores osmóticos:

manitol	328,0 mM
sacarose	336,0 mM

Tabela 1. Continuação.

MEIO 2 (VARDI et alii, 1982)

Meio de maceração:

Metade dos macronutrientes do meio MT

- enzimas:

pectinase	30 mg/10 ml
celulase "ONOZUKA" R-10	20 mg/10 ml
driselase	10 mg/10 ml
- estabilizadores osmóticos

sacarose	0,14 M
manitol	0,56 M

Meio de lavagem:

Meio MT completo

- estabilizadores osmóticos

sacarose	0,3 M
manitol	0,3 M

MEIO 3 (KOBAYASHI et alii, 1987)

Meio de maceração:

metade da concentração dos macronutrientes do meio MT

Enzimas:

celulase "ONOZUKA" R-10	30 mg/10 ml
macerozyme R-10	30 mg/10 ml
driselase	1,0 mg/10 ml

Estabilizadores osmóticos:

manitol	0,7 M

Meio de lavagem:

meio MT completo

Tabela 1. Continuação.

Estabilizadores osmóticos:

manitol	0,6 M	(1a. e 2a. lavagem)
manitol	0,45 M	(3a. lavagem)

MEIO 4 (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984)

Meio de maceração:

metade da concentração dos macronutrientes do meio MT

- enzimas

macerozyme R-10	30 mg/10 ml
celulase "ONOZUKA" R-10	20 mg/10 ml
driselase	10 mg/10 ml

- estabilizadores osmóticos:

sacarose	0,3 M
manitol	0,4 M

Meio de lavagem:

meio MT completo

sacarose	0,3 M
manitol	0,3 M

3.2.11.3. Verificação do rendimento dos protoplastos durante o processo de isolamento

Após a purificação dos protoplastos, a verificação do rendimento foi realizada, retirando-se duas amostras de cada repetição por tratamento, após cada período de digestão enzimática e fazendo-se a contagem do número de protoplastos em 8 campos da câmara de Neubauer para cada amostra. O resultado final foi expresso como o número médio de protoplastos por grama de calo.

3.2.12. Verificação da viabilidade dos protoplastos (Experimento 12)

A avaliação dos protoplastos viáveis foi realizada, utilizando-se o método de coloração com diacetato de fluoresceína, descrito por WIDHOLM (1972).

Estudou-se o efeito de três diluições de diacetato de fluoresceína em meio de lavagem. As diluições foram de 1:50, 1:100 e 1:150 da solução estoque de diacetato de fluoresceína e meio de lavagem, respectivamente. Uma alíquota de 1 ml do corante diluído foi adicionada a uma alíquota de igual volume da suspensão de protoplastos.

A contagem realizou-se 5 minutos após a inoculação do corante na suspensão de protoplastos.

Imediatamente após o isolamento e purificação dos protoplastos, foi verificada a viabilidade dos mesmos. Três repetições foram realizadas para cada diluição do corante, sendo que duas amostras foram obtidas de cada repetição, contando-se o número de protoplastos em 8 campos da câmara de Neubauer. Obteve-se o número total de protoplastos através da contagem em câmara de Neubauer, em microscópio ótico comum e posterior contagem em microscópio de fluorescência. Verificou-se desta forma, a porcentagem de protoplastos viáveis.

3.2.13. Cultivo dos protoplastos (Experimento 13)

Após o processo de purificação, a densidade dos protoplastos foi ajustada para 10^5 e 2×10^5 protoplastos/ml. O meio de cultura era constituído do meio básico MT, complementado com diferentes concentrações de manitol e sacarose, conforme descrito na Tabela 2.

Foram adicionados 2 ml de meio líquido, de cada tratamento, aos protoplastos precipitados nos tubos de centrífuga. Posteriormente, 2 ml de meio de cultura, contendo 1,2% de agarose (40°C), foram adicionados em cada frasco contendo uma suspensão de meio de cultura e protoplastos. Desta forma, o volume foi completado para 4 ml e a concentração final de agarose no meio de cultura, ficou sendo de 0,6% (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984). Assim como, as densidades

de plaqueamento de protoplastos ficaram ajustadas em 5×10^4 e 10^5 protoplastos/ml. As suspensões, de protoplastos e meio de cultura, foram cuidadosamente homogeneizadas e inoculadas em placas de petri com 5 cm de diâmetro, com auxílio da pipeta de Pasteur.

Tabela 2. Meios de cultura e densidade de plaqueamento utilizadas no cultivo de protoplastos isolados a partir de calos embriogênicos do cv. Pera.

Meios de cultura	Manitol (M)	Sacarose (M)	Densidade (prot/ml)
1	0,15	0,15	5×10^4
2	0,25	0,15	5×10^4
3	0,15	0,25	5×10^4
4	0,25	0,25	5×10^4
5	0,15	0,15	10^5
6	0,25	0,15	10^5
7	0,15	0,25	10^5
8	0,25	0,25	10^5
9	0,15	0,15	5×10^4
10	0,45	0,15	5×10^4
11	0,15	0,25	5×10^4
12	0,45	0,25	5×10^4
13	0,15	0,15	10^5
14	0,45	0,15	10^5
15	0,15	0,25	10^5
16	0,45	0,25	10^5

O cultivo realizou-se à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sob condição de escuro.

Três repetições foram realizadas para cada tratamento.

Observações foram realizadas semanalmente com auxílio do microscópio invertido.

3.2.14. Radiossensitividade dos diferentes materiais

3.2.14.1. Radiossensitividade dos tecidos nucelares (Experimento 14)

Neste experimento, os nucelos foram extraídos de acordo com o que foi descrito no item 3.1 (Procedimentos gerais). O meio de cultura utilizado foi o meio básico MT suplementado com 50 g/l de sacarose e 500 mg/l de EM.

Cada parte do tecido nucelar, extraído de uma semente, foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura e imediatamente após a inoculação foram irradiados juntamente com o meio de cultura com as doses de radiação gama de: 0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0; 120,0; 140,0 e 160,0 Gy a uma taxa de dose de 970 Gy/h. Foram realizadas 28 repetições para cada tratamento. O cultivo se realizou sob fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de 3.000 lux.

As avaliações realizaram-se após 6 e 8 semanas de cultivo, fazendo-se a contagem do número de embriões

des por nucelo responsivo e o número de núclos responsivos.

3.2.14.2. Radiossensitividade dos calos nucelares (Experimento 15)

Calos provenientes de núclos cultivados em meio MT, suplementado com 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de EM e 10 mg/l de BAP, e subcultivados a intervalos de 4 semanas foram irradiados com doses de 0 ; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0; 150,0 e 180,0 Gy, com taxa de dose de 970 Gy/h.

Cinco tubos de ensaio, contendo calos com 4 semanas de subcultivo e mantidos no escuro à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ foram irradiados em cada dose. Após o tratamento mutagênico com radiação gama, sob condições assépticas, os calos irradiados com a mesma dose foram agrupados em uma placa de Petri, de onde foram retiradas porções de 25 mg de calos e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio MT, adicionado de 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM. O cultivo se realizou sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Realizaram-se 10 repetições para cada tratamento, isto é, 10 tubos de ensaio contendo 25 mg de calo. Quarenta dias após o tratamento mutagênico, realizou-se a avaliação, pesando-se os calos e fazendo-se a contagem do número de embriões por calo.

3.2.14.3. Radiossensitividade em protoplastos (Experimento 16)

Protoplastos isolados de calos embriogênicos, obtidos através de núcelos inoculados em meio MT contendo 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de EM e 10 mg/l de BAP, foram irradiados com as doses de 0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 Gy a uma taxa de dose de 290 Gy/h. Quarenta gramas de calos embriogênicos foram inoculados em 80 ml de solução enzimática. Após a primeira lavagem, uma alíquota de 2,5 ml da suspensão de protoplastos foi inoculada em tubo de ensaio. Três tubos de ensaio contendo 2,5 ml da suspensão de meio de lavagem e protoplasto foram irradiados em cada dose.

Após a irradiação, os protoplastos foram lavados mais duas vezes e ressuspensos novamente em 2,5 ml de meio de lavagem com uma densidade final de 2×10^5 protoplastos/ml e incubados por 24 horas, neste mesmo meio, em condições de escuro, à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Vinte e quatro horas após o tratamento mutagênico, estudou-se a viabilidade dos protoplastos através da técnica de coloração com diacetato de fluoresceína descrita no item 3.2.12. De cada uma das três repetições por tratamento, uma amostra foi retirada e misturada a um volume igual do corante, diacetato de fluoresceína, previamente diluído em meio de lavagem na proporção de 1:150, ou seja, 0,1 ml do corante para 15 ml da solução de lavagem. Aguardou-se 5 minutos para que ocorresse a reação com o corante e a fluoresceína fosse liberada.

Com auxílio da câmara de Neubauer e do microscópio de fluorescência, realizou-se a contagem do número de protoplastos viáveis.

Na câmara de Neubauer, contou-se para cada amostra o número de protoplastos em 8 campos e tirou-se uma média. Obteve-se, desta forma, a porcentagem de protoplastos viáveis após exposição às diferentes doses de radiação gama.

3.2.14.4. Radiossensitividade em cotilédones de embriões nucelares (Experimento 17)

Embriões nucelares, no estágio cotiledonar expandido (3 a 4 semanas de idade), obtidos *in vitro*, foram irradiados com raios gama com as doses de 0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0 e 90,0 Gy a uma taxa de dose de 970 Gy. Após a irradiação, as folhas cotiledonares foram extraídas e divididas longitudinalmente em duas partes iguais e 4 partes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MT suplementado com 30 g/l de sacarose, 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA. O cultivo se deu inicialmente, em condição de escuro, por 15 dias e, posteriormente, sob intensidade luminosa de 3.000 lux, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram realizadas 10 repetições para cada tratamento. A avaliação realizou-se 90 dias após o início do

cultivo, obtendo-se a porcentagem de explantes responsivos e o número médio de brotações adventícias por explante responsivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Indução de calos e embriões somáticos a partir de núcelos

4.1.1. Efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA (Experimento 1)

Os resultados obtidos com o uso de diferentes concentrações de CIN e IAA e suas combinações estão apresentados na Tabela 3. Pode-se observar, que de uma forma geral, o aumento da concentração de IAA em todas as concentrações de CIN produziu um aumento na porcentagem de formação de calos a partir dos núcelos (Figura 1). A maior porcentagem (66,67) para a formação de calos foi obtida no meio de cultura MT, suplementado com 0,1 mg/l de cinetina e 1,0 mg/l de IAA, e a menor porcentagem (0%) foi obtida no meio de cultura MT sem suplementação com reguladores de crescimento.

Quanto a formação de embriões, pode-se notar que, de uma forma geral, a porcentagem de núcelos res-

ponsivos e o número médio de embriões por nucelo diminuiu com o aumento da concentração de IAA em todas as concentrações de CIN. O maior número de embriões por nucelo foi obtido no meio de cultura suplementado com 1,0 mg/l de CIN e 0,0 mg/l de IAA. Pode-se observar também que os meios que proporcionaram as maiores porcentagens de núclos responsivos (60%), não são os que produziram maior número de embriões por núclos.

Os calos obtidos em todos os tratamentos apresentavam coloração amarela, eram compactos e não havia sinal de formação de embriões a partir dos mesmos.

Os calos formaram-se por toda a superfície dos explantes e, eventualmente, a partir destes calos compactos proliferava uma massa de células de coloração branca e de textura friável. Houve a proliferação de calo e embriões a partir do mesmo explante nos diferentes tratamentos e os calos proliferavam-se lentamente.

Estes dois tipos de calos foram observados no cultivo de óvulos inteiros do cv. Pera por GOLDMAN (1988), que sugeriu que a formação dos calos tivesse sido estimulada pelo fornecimento de reguladores de crescimento presentes em outros tecidos do óvulo. De fato, no presente trabalho, verificou-se que o fornecimento de reguladores ao meio de cultura estimulou a formação de calos a partir do tecido nucelar, entretanto, os calos não apresentavam características embriogênicas como se desejava.

Tabela 3. Efeito das diferentes concentrações de CIN e IAA, adicionadas ao meio MT, na formação de calos e embriões no tecido nucelar, 8 semanas após a inoculação dos núcelos.

Tratamentos (mg/l)	Prolife- ração de calos (%)	Prolife- ração de embriões (%)	Nº médio de embriões /núcelo ($\pm$ S)
CIN-0,0 + IAA-0,0	0,00	33,34	1,34 $\pm$ 0,28
CIN-0,0 + IAA-0,1	40,00	54,84	1,13 $\pm$ 0,84
CIN-0,0 + IAA-0,5	26,67	40,00	0,43 $\pm$ 0,14
CIN-0,0 + IAA-1,0	26,67	27,05	0,50 $\pm$ 0,04
CIN-0,1 + IAA-0,0	26,67	33,34	0,97 $\pm$ 0,52
CIN-0,1 + IAA-0,1	20,00	33,34	1,40 $\pm$ 0,09
CIN-0,1 + IAA-0,5	46,67	33,34	0,70 $\pm$ 0,52
CIN-0,1 + IAA-1,0	66,67	26,67	0,40 $\pm$ 0,09
CIN-0,5 + IAA-0,0	6,67	60,00	1,20 $\pm$ 0,66
CIN-0,5 + IAA-0,1	22,20	55,56	1,34 $\pm$ 0,56
CIN-0,5 + IAA-0,5	40,00	26,67	0,57 $\pm$ 0,04
CIN-0,5 + IAA-1,0	57,13	20,00	0,34 $\pm$ 0,09
CIN-1,0 + IAA-0,0	20,00	46,67	1,97 $\pm$ 0,14
CIN-1,0 + IAA-0,1	20,00	60,00	1,47 $\pm$ 0,09
CIN-1,0 + IAA-0,5	40,00	40,00	0,77 $\pm$ 0,14
CIN-1,0 + IAA-1,0	33,34	20,00	0,53 $\pm$ 0,09

Figura 1. Representação gráfica do efeito de diferentes concentrações de CIN e IAA na porcentagem de formação de calos e embriões e no número médio de embriões obtidos por núcleo.

Nucelos cultivados em meio de cultura sem suplementação com reguladores de crescimento, não apresentaram formação de calos, mas foi observada somente a formação de embrióides, neste caso. Este fato está de acordo com o que foi verificado por KOCHBA et alii (1972), para cultivares Shamouti, Valência e Marsh e por GOLDMAN (1988), para o cv. Pera.

Segundo Esan, citado por PASQUAL et alii (1988), a adição das auxinas IAA, NAA e 2,4-D ao meio de cultura suprimiu significativamente ou completamente a embriogênese nucelar. PASQUAL et alii (1988) observaram que a adição de 2,4-D, em qualquer concentração, aos nucelos mantidos no escuro, inibiu completamente a embriogênese, independentemente da presença de citocinina. Este mesmo fato foi observado por GOLDMAN (1988), para o cv. Pera. Entretanto, GMITTER & MOORE (1986) obtiveram porcentagens entre 0 e 54% de óvulos produzindo embrióides, 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 quando ao efeito do 2,4-D sobre a embriogênese.

No presente trabalho, verificou-se que a adição do IAA ao meio de cultura não suprimiu completamente a embriogênese em nenhuma das concentrações utilizadas, porém, causou uma diminuição do número médio de embrióides obtidos por nucelo (Figura 1), conforme aumentou sua concentração no meio de cultura. Entretanto, a porcentagem de nucelos res-

ponsivos, em certas concentrações de IAA, foi maior que a porcentagem encontrada em meio de cultura sem suplementação com reguladores de crescimento.

A proliferação de embrióides, a partir dos embrióides já presentes, foi evidenciada, principalmente, nos meios de cultura contendo cinetina. É possível então, que a cinetina esteja favorecendo a formação de embrióides a partir de embrióides imaturos, no presente trabalho. GMITTER & MOORE (1985) observaram a formação de embrióides, a partir dos embrióides já existentes, no cultivo de óvulos do cv. Marsh, em meio suplementado com daminozida, um inibidor da síntese de GAs. Estes autores verificaram que o número de embrióides produzidos por óvulos responsivos aumentou consideravelmente no tratamento utilizado a concentração 10 mg/l de daminozida, devido, principalmente, à formação de embrióides a partir dos já existentes.

4.1.2. Efeito dos reguladores de crescimento

CIN, IAA e BAP (Experimento 2)

O efeito dos reguladores de crescimento CIN, IAA e BAP, adicionados ao meio de cultura MT, sobre a formação de calos e embrióides, a partir de nucelos, está apresentado nas Tabelas 4 e 5, em duas datas diferentes de avaliação.

A primeira avaliação foi realizada 8 semanas

após a inoculação dos núcelos em meio de cultura. Observa-se que não houve a formação de calos no meio MT, sem a suplementação de reguladores de crescimento. O meio suplementado com CIN e IAA resultou na maior porcentagem de núcelos com calos. Porém, assim como foi observado no Experimento 1 (item 4.1.1), estes calos eram compactos e não apresentavam características embriogênicas. O meio suplementado com 10 mg/l de BAP originou pequenos calos na extremidade micropilar dos núcelos (Figura 2). Estes calos eram friáveis e bastante soltos. Não foi observada a formação de embriões nestes calos durante o período de avaliação.

Após 12 semanas de cultivo, observou-se um aumento na porcentagem (de 7,42 para 36,57%) de núcelos responsivos quanto à formação de calos no meio de cultura suplementado com BAP. Pequena proliferação de células aparecia na extremidade micropilar dos núcelos, mas proliferavam-se rapidamente neste meio de cultura (Figura 3). Foi observada também uma pequena proliferação de células a partir de pró-embriões e embriões imaturos (região do hipocótilo) no meio MT, sem suplementação com reguladores de crescimento.

Quanto a obtenção de embriões, diretamente do explante nucelar, observa-se que o meio MT, sem a suplementação com reguladores de crescimento, foi o que resultou em maior número de embriões/nucelo (Figura 4). O meio suplementado com BAP (10 mg/l) resultou na formação de um número muito pequeno de embriões/nucelo.

Tabela 4. Efeito dos reguladores de crescimento CIN, IAA e BAP, adicionados ao meio de cultura MT, na porcentagem de formação de calos. Avaliações 8 e 12 semanas após o cultivo de nucelos.

Tratamentos (mg/l)	8 semanas (%)	12 semanas (%)
MT	0,00	1,71
MT + CIN-0,1 + IAA- 1,0	47,00	52,00*
MT + BAP-10,0	7,42	36,57**

* calos não embriogênicos

** calos embriogênicos

Tabela 5. Efeito dos reguladores de crescimento CIN, IAA e BAP sobre o número médio de embriões obtidos por nucelo. Avaliações 8 e 12 semanas após o cultivo de nucelos.

Tratamentos (mg/l)	8 semanas ($\pm$ S)	12 semanas ($\pm$ S)
MT	0,96 $\pm$ 0,11	1,54 $\pm$ 0,21
MT+CIN-0,1+IAA-1,0	0,65 $\pm$ 0,26	0,92 $\pm$ 0,17
MT+BAP-10,0	0,03 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,07

A obtenção de calos embriogênicos em cv. Pera (*C. sinensis*) já havia sido relatada por PASQUAL et alii (1988) em óvulos cultivados em meio com reguladores de cres-

cimento, principalmente 2,4-D. Entretanto, o uso deste regulador de crescimento em cultura de tecido tem sido correlacionado com o aparecimento de aberrações cromossômicas (VARDI et alii, 1982; SPIEGEL-ROY et alii, 1983). GOLDMAN (1988) obteve calos embriogênicos deste cultivar sem a utilização de reguladores de crescimento. Entretanto, estes calos foram obtidos cerca de 7 meses após a inoculação dos explantes em meio de cultura, na região do hipocótilo dos embriões formados a partir dos núcelos.

A formação de calos embriogênicos, em meio sem suplementação com reguladores de crescimento, foi obtida para diferentes cultivares e espécies de *Citrus* (KOCHBA et alii, 1972; VARDI et alii, 1982). Estes calos proliferavam-se lentamente e apresentavam uma composição bastante heterogênea.

No presente trabalho, observou-se a formação de calos extremamente pequenos a partir de embriões imaturos na região do hipocótilo em uma porcentagem pequena dos núcelos (1,71%) em meio básico MT sem suplementação com reguladores de crescimento. Além disto, estes calos tinham um crescimento lento quando subcultivados neste mesmo meio de cultura.

O meio MT, suplementado com 10 mg/l de BAP, produziu calos que se proliferavam rapidamente e com características embriogênicas. KOBAYASHI et alii (1984) induziram a formação de calos em onze cultivares de *Citrus* em

meio de cultura com BAP (10 mg/l), após aproximadamente 80 dias de cultivo. Segundo estes autores, estes calos foram mantidos por cinco anos de subcultivo no meio de cultura e conservaram seu potencial embriogênico. Estudos realizados sobre o formato das folhas, padrões de cromatografia, padrões de bandamento de isoenzimas e número de cromossomos em plantas regeneradas a partir destes calos e a partir de protoplastos obtidos destes calos embriogênicos não revelaram nenhuma variação nas características examinadas. A uniformidade observada entre as plantas regeneradas era idêntica à encontrada nas plantas nucelares.

Assim sendo, este meio de cultura constituiu-se em um meio bastante adequado para a indução e proliferação de calos nucelares. A obtenção de calos embriogênicos, em grande quantidade e em pequeno espaço de tempo, era de importância fundamental para o prosseguimento deste trabalho, pois estes se constituíam na matéria prima para o isolamento de protoplastos e para os estudos sobre radiosensitividade em calos embriogênicos.

4.2. Indução de embriogênese somática em calos nucelares (Experimento 3)

Os resultados, obtidos com o uso de meios de cultura suplementados com diferentes carboidratos e dife-

rentes concentrações de EM, estão apresentados na Tabela 6. Pode-se notar que houve um estímulo sensível na formação de embrióides (em diferentes estádios de desenvolvimento), em calos obtidos no meio MT contendo BAP (10 mg/l), quando os meios de cultura utilizados para indução da embriogênese continham galactose e lactose (Figuras 5 a 8). O EM beneficiou a embriogênese nos meios suplementados com galactose e lactose.

Nos meios de cultura, contendo sacarose, verificou-se que a concentração de 30 g/l deste açúcar e de 1000 mg/l de EM produziram o maior número de embrióides.

A avaliação foi realizada, levando-se em conta os embrióides presentes em todos os estádios de desenvolvimento, isto é, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 9).

O efeito estimulador da galactose e lactose sobre a embriogênese foi interpretado em relação à interação destes carboidratos com a biossíntese de IAA. A galactose age diretamente inibindo a síntese de IAA ou, indiretamente, estimulando a formação do etileno que, em altos níveis, suprime a biossíntese de auxinas (KOCHBA et alii, 1978; BEN-HAYYIM & NEUMANN, 1983).

KOCHBA et alii (1982), estudando o efeito de vários carboidratos sobre a embriogênese em calos habituados de diferentes cultivares e espécies de *Citrus*, verificaram que as mais baixas concentrações de sacarose (8, 16 e 32 mM)

favoreceram a embriogênese nos diferentes genótipos estudados. Entretanto, o efeito estimulador da galactose e lactose sobre a embriogênese foi pronunciado, em todos os genótipos estudados, em concentrações de 32 ou 64 mM até 256 mM.

Tabela 6. Efeito de diferentes carboidratos sobre a embriogênese em calos nucleares, obtidos em meio MT, suplementado com BAP (10 mg/l). Avaliação 40 dias após cultivo.

Meio de cultura (mg/l)	Nº médio de embriões maduros/ calo*	Nº médio de embriões em diferentes estádios/calos**
MT+galactose-50.000+EM-500	1,50 b	1.175,25 a
MT+lactose-50.000+EM-500	4,00 b	1.316,25 a
MT+galactose-50.000	2,25 b	691,75 ab
MT+lactose-50.000	5,75 b	705,00 ab
MT+sacarose-30.000+EM-1000	19,00 a	142,00 bc
MT+sacarose-30.000+EM-500	13,00 a	27,75 c
MT+sacarose-50.000+EM-1000	15,75 a	25,50 c
MT+sacarose-50.000+EM-500	11,25 a	41,50 c

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey - 5%.

* embriões maduros = embriões completamente desenvolvidos.

** embriões nos estádios: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

No presente trabalho, estudou-se o efeito de concentrações relativamente altas de sacarose (30 a 50 g/l), verificando-se que a menor concentração produziu melhores resultados que a maior concentração. Entretanto, um estudo ampliando a faixa de concentração de sacarose e de outros carboidratos seria interessante, pois segundo KOCHBA et alii (1982), baixas concentrações de sacarose aumentaram a embriogênese em diferentes genótipos, inclusive, em cultivares de *C. sinensis*. Entretanto, por mais que estas concentrações de sacarose tivessem aumentado o número de embriões por calo, não conseguiram atingir os valores obtidos quando se utilizamos carboidratos galactose e lactose.

O número de embriões, em estágio mais avançado de desenvolvimento (cotiledonar maduro), aumentou nos meios suplementados com sacarose. Este fato ocorreu, possivelmente, porque o número total de embriões nestes meios foi menor e, havendo pouca concorrência pelos nutrientes do meio de cultivo, os embriões puderam utilizá-los com mais eficácia para promover o desenvolvimento.

KOCHBA et alii (1982) verificaram que a galactose e a lactose influenciaram positivamente o desenvolvimento dos embriões, favorecendo o desenvolvimento destes para formas cotiledonares mais avançadas, sendo que a lactose foi mais efetiva que a galactose.

No presente trabalho, observou-se que a lactose produziu maior efeito no desenvolvimento dos em-

brióides entre meios suplementados com galactose e lactose, porém, os meios contendo sacarose produziram os melhores resultados quanto ao número de embrióides que alcançaram o estágio mais avançado de desenvolvimento, possivelmente, pela razão já citada acima.

4.3. Desenvolvimento de plantas a partir de embriões somáticos em meios de cultura com diferentes concentrações de CIN e IAA (Experimento 4)

Os embrióides seguem um processo de maturação passando pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar expandido ou embrião maduro (RANGASWAMY, 1961). Uma vez obtidos embriões somáticos maduros, a próxima fase de desenvolvimento, é sua conversão em plantas (SCHULTHEIS et alii, 1990).

A formação de raízes e parte aérea, *in vitro*, é controlada pela relação entre a concentração de auxinas e citocininas presentes no meio de cultura.

KOCHBA et alii (1972) não obtiveram desenvolvimento dos embrióides em meio básico de cultura, porém, com a adição de reguladores de crescimento tais como IAA, CIN ou GA₃, este problema foi resolvido. Entretanto, outros autores não tiveram dificuldade em regenerar plantas em meio básico de cultivo, sem a adição de reguladores de crescimento (NAVARRO & JUAREZ, 1977; GOLDMAN, 1988).

A Tabela 7 apresenta as observações realizadas, no presente estudo, sobre o desenvolvimento de embriões inoculados em meios de cultura com diferentes concentrações de CIN e IAA, no estágio cordiforme (2-3 mm de comprimento). Foram avaliadas as porcentagens de embriões que desenvolveram raízes, parte aérea e plântulas normais (parte aérea e raiz aparentemente normais). O desenvolvimento anormal foi observado em muitos embriões em todos os meios de cultura, e incluía anormalidades tais como cotilédones múltiplos, cotilédones fundidos e fasciados. A formação de plântulas normais (Figura 10) foi prejudicada devido às anomalias encontradas nos embriões. Muitos embriões desenvolveram o sistema radicular, porém, os cotilédones apresentavam anormalidades (Figuras 11 a 13) e não se observou o desenvolvimento dos ápices meristemáticos deixando, então, de formar a parte aérea da planta. Anormalidades foram também observadas nos ápices meristemáticos (Figura 14), desenvolvidos a partir dos embriões germinados. Estas anormalidades já foram relatadas em vários trabalhos (RANGASWAMY, 1958; KOCHBA et alii, 1972; GMITTER & MOORE, 1986; PASQUAL et alii, 1988).

Um trabalho semelhante a este foi realizado por GMITTER & MOORE (1986). Estes autores inocularam embriões cordiformes em meio de cultura e, quando estes atingiram o estágio desenvolvido (cotilédones e primórdios de gemas e raízes), foram transferidos para meio suplementa-

do com 1 mg/l de GAs para induzir a germinação. No entanto, eles observaram que, das várias centenas de embriões produzidos pela maioria dos cultivares estudados, poucas plantas foram obtidas. Foram observadas anormalidades entre os embriões produzidos de todos os cultivares, em todos os meios estudados, incluindo pluricotiledonia, ápices meristemáticos múltiplos, embriões fundidos e fasciação dos cotilédones. Para o cv. Hamlin (*Citrus sinensis*), somente 35% dos embriões pareciam suficientemente normais (isto é, com alguma evidência de polaridade e desenvolvimento cotiledonar) para garantir a transferência para meio de germinação.

No presente trabalho não se quantificou o número de embriões que foram capazes de se desenvolver até o estágio cotiledonar, assim como, o número de embriões que atingiram o estágio cotiledonar e, posteriormente, formaram plantas. No entanto, observou-se que de um total de plantas inoculadas no meio contendo 1,0 mg/l de CIN e 0,1 mg/l de IAA, por exemplo, 36,37% dos embriões desenvolveram plantas normais.

Tabela 7. Observações sobre o desenvolvimento de embriões* em meios de cultura com diferentes concentrações de CIN e IAA. Avaliação 8 semanas após o início do cultivo.

Tratamentos (mg/l)	Nº de embriões inoculados	Embriões despro- zindo raízes (%)	Embriões produ- zindo p.aérea (%)	Plântulas normais (%)
MT	24	58,33	33,33	25,00
MT+CIN-0,0+IAA-0,1	18	55,55	22,22	11,11
MT+CIN-0,0+IAA-0,5	16	62,50	50,00	18,75
MT+CIN-0,0+IAA-1,0	13	69,23	46,16	15,38
MT+CIN-0,1+IAA-0,0	18	50,00	27,77	22,22
MT+CIN-0,1+IAA-0,1	19	42,10	36,84	26,31
MT+CIN-0,1+IAA-0,5	21	52,38	28,57	19,04
MT+CIN-0,1+IAA-1,0	19	57,89	42,10	21,05
MT+CIN-0,5+IAA-0,0	22	57,27	27,27	4,54
MT+CIN-0,5+IAA-0,1	20	55,00	15,00	10,00
MT+CIN-0,5+IAA-0,5	21	57,14	42,85	21,85
MT+CIN-0,5+IAA-1,0	14	71,42	35,71	21,42
MT+CIN-1,0+IAA-0,0	20	55,00	20,00	10,00
MT+CIN-1,0+IAA-0,1	22	50,00	45,45	36,37
MT+CIN-1,0+IAA-0,5	20	55,00	25,00	15,00
MT+CIN-1,0+IAA-1,0	16	43,75	31,25	12,50

* embriões inoculados no estágio cordiforme 2-3 mm de comprimento

Quanto ao efeito dos reguladores CIN e IAA no desenvolvimento dos embriões, os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram que, no presente estudo, a porcentagem de formação de raiz não foi muito diferente para os meios utilizados, exceto para os meios contendo a maior concentração de IAA (1,0 mg/l) e as mais baixas concentrações de CIN. Este resultado está de acordo com o que foi observado por KOCHBA et alii (1972). Segundo estes mesmos autores, tanto o GA₃ e o IAA estimularam o enraizamento nos embriões do cv. Shamouti (*C. sinensis*), enquanto os embriões do cv. Valência enraizaram melhor com a adição de GA₃ e o cv. Marsh, com a adição de IAA.

Uma interação entre sacarose e reguladores de crescimento foi encontrada no enraizamento de embriões somáticos de *Citrus sinensis* cv. Shamouti. O enraizamento foi ótimo com 5% e 6% de sacarose, quando o sulfato de adenina (ADS) e o GA₃ foram adicionados ao meio. No entanto, o enraizamento, na ausência de ADS ou GA₃, ocorreu numa faixa mais ampla de concentrações (2 a 6%) de sacarose (KOCHBA et alii, 1974).

Os resultados apresentados na Tabela 7, mostraram que as altas concentrações de IAA também favoreceram o desenvolvimento da parte aérea nos embriões; no entanto, observa-se que o meio contendo CIN (1,0 mg/l) e IAA (0,1 mg/l) também favoreceu o desenvolvimento da parte aérea e, ainda, deu origem à maior porcentagem de plantas normais

(36,37%). Em sua pesquisa, KOCHBA et alii (1972) verificaram que altos níveis de CIN e baixos de IAA foram melhores que outras taxas de CIN/IAA para o desenvolvimento de ambos os órgãos.

No presente trabalho, os embrióides foram inoculados em meio de cultura no estágio cordiforme aproximadamente 2-3 mm de comprimento. O estágio de desenvolvimento dos embrióides tem grande influência sobre a germinação destes embrióides e regeneração de plantas. KOCHBA et alii (1974) observaram que embrióides com cotilédones já desenvolvidos tiveram uma porcentagem de enraizamento de 83% em meio básico, enquanto que em embrióides inoculados no estágio cordiforme (3-5 mm de comprimento) observou-se uma porcentagem de 38% de enraizamento em meio básico. Neste último caso, a adição de GAs, ao meio básico de cultivo, elevou a porcentagem para 67% de enraizamento. Portanto, se os embrióides utilizados estivessem em um estágio mais avançado de desenvolvimento, é possível que maiores porcentagens de plantas normais tivessem sido obtidas.

Apesar da grande porcentagem de anormalidades encontradas nos embrióides, estudos demonstraram que as plantas, obtidas a partir da regeneração de embrióides obtidos em núcelos, calos embriogênicos e protoplastos, eram normais (NAVARRO et alii, 1979; VARDI et alii, 1982; KOBAYASHI et alii, 1984, KOBAYASHI, 1987).

Segundo KOBAYASHI (1987) a explicação para a estabilidade fenotípica encontrada nos protoclonos (clones regenerados de protoplastos obtidos a partir de calo embriogênico) pode estar na forma de regeneração destas plantas, ou seja, via embriogênese somática. VASIL (1983) relatou que a estabilidade genética encontrada em plantas regeneradas a partir de calos e tecidos de muitas espécies de gramíneas era devido à regeneração através da embriogênese somática.

Este fato indica o grande potencial da aplicação prática de calos nucelares embriogênicos em programas de melhoramento de citros.

4.4. Efeito de diferentes meios de cultura no desenvolvimento dos calos nucelares e indução da embriogênese nestes calos (Experimento 5)

Calos obtidos de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.5 foram inoculados em diferentes meios de crescimento. Os resultados apresentados na Tabela 8 representam o peso médio destes calos e o número médio de embriões obtidos a partir destes nos diferentes meios de cultura estudados.

Observa-se que o meio de cultura MT, suplementado com galactose foi o que apresentou maior peso médio

de calo. Entretanto, devido à impossibilidade de separar calos e embrióides, os valores médios para peso representam o peso total de calos e embrióides formados. Assim sendo, é natural que grande parte do valor apresentado para o peso médio seja devido à presença de embrióides e não propriamente à proliferação de calos, neste meio de cultura. Este fato também se aplica ao meio de cultura MT suplementado com lactose. Por outro lado, é possível que, os embrióides, competindo por nutrientes do meio de cultura, não permitam maior desenvolvimento dos calos nos meios com galactose e lactose.

Levando estes fatos em consideração, pode-se notar que o meio de cultivo, suplementado com CIN (1,0 mg/l) e IAA (0,1 mg/l), apresenta um valor que não difere significativamente do maior valor encontrado para o peso e também apresenta um pequeno número de embrióides por calo, podendo-se, então, concluir que este meio de cultura favoreceu a proliferação de calos nucelares.

Os meios de cultivo suplementados com lactose e galactose promoveram significativamente a embriogênese nos calos nucelares.

Tabela 8. Peso médio dos calos e número médio de embriões por calo cultivado em meio básico MT com diferentes suplementações. Avaliação 40 dias após início do cultivo.

Tratamentos (mg/l)	Peso médio dos calos (mg)	Nº médio de embriões/calos
Lactose-50.000	126,79 ab	540,05 a
Galactose-50.000	201,93 a	207,11 b
EM-500	71,88 b	25,43 c
CIN-0,0+IAA-0,0	69,69 b	19,94 c
CIN-0,0+IAA-0,1	89,95 b	14,65 c
CIN-0,0+IAA-0,5	115,20 ab	18,86 c
CIN-0,0+IAA-1,0	89,95 b	6,84 c
CIN-0,1+IAA-0,0	128,94 ab	28,03 c
CIN-0,1+IAA-0,1	101,42 b	10,89 c
CIN-0,1+IAA-0,5	97,82 b	12,11 c
CIN-0,1+IAA-1,0	95,32 b	9,18 c
CIN-0,5+IAA-0,0	99,83 b	15,25 c
CIN-0,5+IAA-0,1	85,56 b	12,31 c
CIN-0,5+IAA-0,5	89,54 b	10,89 c
CIN-0,5+IAA-1,0	67,96 b	8,17 c
CIN-1,0+IAA-0,0	157,14 ab	37,77 c
CIN-1,0+IAA-0,1	155,74 ab	7,83 c
CIN-1,0+IAA-0,5	119,73 ab	25,74 c
CIN-1,0+IAA-1,0	93,74 b	12,82 c
BAP-10,0	85,51 b	0,58 c

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey - 5%.

Embora os valores obtidos para o número médio de embriões por calo não estejam diferindo significativamente entre si, pode-se observar que, de forma geral, há uma tendência do número de embriões diminuir com o aumento da concentração de IAA, nos tratamentos combinando as diferentes concentrações de CIN e IAA. O tratamento que resultou no maior número de embriões diferenciados por calo foi aquele em que se adicionou 1 mg/l de CIN ao meio MT.

O meio contendo BAP (10 mg/l) resultou no menor número de embriões obtidos e o meio contendo EM (500 mg/l) não estimulou a embriogênese; estes fatos estão de acordo com o que foi observado por KOBAYASHI et alii (1984).

De acordo com os trabalhos realizados por KOCHBA e SPIEGEL-ROY (1977b) e KOCHBA et alii (1982), substâncias que inibem a síntese de auxinas e citocininas estimularam a embriogênese em calos nucelares habituados do cv. Shamouti (*C. sinensis*). Segundo KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977b), a presença de IAA, no meio de cultura, suprimiu a embriogênese em concentrações acima de 1,0 mg/l. A presença de CIN não suprimiu a embriogênese em nenhuma das concentrações utilizadas, porém, causou uma diminuição no número de embriões obtidos em relação ao meio básico.

No presente estudo, observou-se que as diferentes concentrações de IAA diminuíram a embriogênese, porém, não houve supressão da mesma em nenhuma concentração; veri-

ficou-se também que a CIN promoveu um aumento na embriogênese nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg/l. Curiosamente, neste trabalho, a maior concentração de CIN (1,0 mg/l) utilizada também foi a melhor para induzir a embriogênese a partir de nucelos. Possivelmente, concentrações maiores de cinetina sejam necessárias, no cv. Pera, para induzir a embriogênese.

A cinetina também promoveu um aumento no peso dos calos nas maiores concentrações, o que está de acordo com os resultados obtidos por KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977b).

O crescimento dos calos, de forma geral, diminuiu com o aumento da concentração de IAA, porém, deve-se considerar que o número de embrióides também diminuiu nestes casos e isto pode estar influenciando nos valores encontrados para o peso. KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977b) observaram que o crescimento dos calos na presença de IAA foi, geralmente, menor que na ausência desta substância, mas a resposta ao aumento das concentrações de IAA flutuaram, consideravelmente.

4.5. Verificação da ocorrência da habituação em calos embriogênicos (Experimento 6)

Os resultados apresentados na Tabela 9 permitem concluir que os calos nucelares do cv. Pera, após quatro subcultivos em meio básico MT, continuaram a proliferar mesmo sem a adição de reguladores de crescimento ao meio básico de cultivo. Este fato indica que os calos nucelares perderam a necessidade de fornecimento de citocininas e auxinas ao meio básico de cultura para proliferação. Este fenômeno é denominado de habituação.

Observando-se os resultados apresentados na Tabela 9, pode-se notar que os meios suplementados com 0,1 mg/l de CIN e 0,5 mg/l de IAA, 0,5 mg/l de CIN e 0,5 mg/l de IAA, e 1,0 mg/l de CIN e 0,1 mg/l de IAA e 10 mg/l de BAP tiveram um aumento da proliferação em meio básico MT, o que significa que nestes meios obteve-se o efeito da habituação dos calos. Os meios suplementados com 0,5 mg/l de CIN e 0,5 mg/l de IAA e 0,5 mg/l de CIN e 1,0 mg/l de IAA não promoveram a habituação dos calos nucelares.

A habituação foi observada em vários trabalhos com cultivo de calos em *Citrus* (SPIEGEL-ROY & KOCHBA, 1975; HIDAKA & KAJIURA, 1988). Os calos habituados continuaram a proliferar em meio sem reguladores de crescimento por vários anos (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984).

Tabela 9. Crescimento de calos nucelares em meios de cultura com e sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura básico - MT. Avaliação realizada 45 dias após o início do cultivo.

Adições ao meio MT (mg/l)	Peso médio na presença de adições (A)	Peso médio na ausência de adições (B)	Taxa de crescimento B/A
CIN-1,0 + IAA-0,1	119,02a	194,63a	1,63
CIN-0,1 + IAA-0,5	71,93a	116,49ab	1,62
CIN-0,5 + IAA-0,1	87,18a	107,89b	1,23
BAP-10,0	75,12a	79,24bc	1,05
CIN-0,5 + IAA-1,0	80,47a	76,00bc	<u>0,94</u>
CIN-0,5 + IAA-0,5	70,05a	53,18c	<u>0,75*</u>

* Meios de cultura onde não ocorreu a habituação.

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey - 5%.

SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1975) verificaram que a maior concentração de cinetina (1 mg/l) mostrou um maior efeito na habituação de calos, exceto quando a cinetina estava combinada com adenina. No presente trabalho, verificou-se que as concentrações de 1 mg/l de CIN em combinação com 0,1 mg/l de IAA e 0,1 mg/l de CIN e 0,5 mg/l de IAA produziram o maior efeito na habituação, pois os calos

provenientes destes meios de cultura apresentaram a maior taxa de crescimento em meio de cultivo, sem suplementação com reguladores de crescimento.

A habituação é considerada uma variação epigenética associada com a cultura de tecidos de plantas *in vitro* (SKIRVIN, 1978).

Calos nucelares embriogênicos habituados têm sido utilizados, com grande sucesso, na obtenção de protoplastos totipotentes. Segundo GROSSER & GMITTER (1990), calos que necessitam de reguladores de crescimento, isto é, calos não habituados, não são capazes de ressintetizar a parede celular e entrar em divisão nos meios de cultura estabelecidos para cultivo de protoplastos de citros, meios estes que, em sua grande maioria, não incluem os reguladores de crescimento. Porém, quando protoplastos provenientes de calos não habituados são fundidos com protoplastos de calos habituados, ocorre a complementação e, portanto, é restaurada a capacidade de regeneração de plantas a partir dos protoplastos fundidos. Daí, provavelmente, a importância de se obter calos habituados.

Figura 2. Proliferação de calo em nucelo, em meio de cultura suplementado com 10 mg/l de BAP.
(a) nucelo; (b) calo nucelar (x10).

Figura 3. Proliferação de calos embriogênicos em meio suplementado com 10 mg/l de BAP.

Figura 4. Proliferação de embriões (b) em nucelos (a) (x10).

Figura 5. Proliferação de embriões (b) em calos nucelares (a) (x10).

Figura 6. Embriões normais e maduros (a) e embriões cotiledonares normais e imaturos (b) obtidos em calos nucelares (c) cultivados em meio suplementado com 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM, 40 dias após o cultivo (x10).

Figura 7. Calo embriogênico (a) apresentando embriões cotiledonares maduros (b) e embriões no estágio globular (c) após 60 dias de cultivo em meio com 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM (x10).

Figura 8. Formação de embriões em calos embriogênicos.

Figura 9. Embriões de *Citrus sinensis* cv. Pera em processo de maturação. Os diferentes estádios de desenvolvimento podem ser observados em calos nucleares inoculados em meio suplementado com lactose e EM. (a) embrião globular; (b) embrião com cotilédones em formação; (c) e (d) embriões com dois cotilédones proeminentes (x10).

Figura 10. Plântula regenerada via embriogênese somática a partir de calos nucelares, apresentando raiz e parte aérea normais.

Figura 11. Plântula anormal com raiz e apresentando coti-
dones fundidos, semelhante a uma corneta.

Figura 12. Plântula em roseta apresentando raiz e formação de cotilédones fasciados.

Figura 13. Plântula anormal enraizada apresentando um único cotilédone (a) e a presença de um meristema apical rudimentar (b).

Figura 14. Plântula apresentando desenvolvimento da parte aérea anormal (gemas apicais múltiplas) e raiz.

4.6. Indução de brotações adventícias (Experimento 7)

Os cotilédones de embriões nucelares (Figura 15) foram escolhidos como explantes, neste experimento, pois são os primeiros órgãos a se formarem no embrião maduro e devido ao seu potencial inerente para regeneração de órgãos adventícios (BURGER & HACKETT, 1982).

Nos diferentes protocolos estabelecidos para a indução de gemas adventícias, por via direta ou indireta, o meio de cultivo constituía-se do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 50 g/l de sacarose, 500 mg/l de EM e o balanço da concentração de dois reguladores de crescimento, invariavelmente, BA e NAA.

A Tabela 10 apresenta as porcentagens médias de formação de brotações adventícias e o número médio de brotações obtidas por explante responsivo, 90 dias após o início do cultivo dos explantes. Observa-se que as porcentagens de explantes que responderam aos tratamentos variam de 0 a 44,45%. A maior média de brotações por explante foi encontrada para o meio de cultura suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA.

No presente estudo, utilizou-se o meio básico MT suplementado com 30 g/l de sacarose, e diferentes combinações de concentrações iguais de BAP e NAA, enquanto, na maioria dos protocolos estas combinações eram feitas com concentrações altas de BAP e baixas de NAA. A avaliação, no

presente estudo, foi realizada fazendo-se a contagem do número de brotações obtidas por explante e não o número de gemas formadas. Por esta razão, a avaliação foi realizada 90 dias após o início do cultivo dos explantes. Entretanto, as culturas foram inspecionadas semanalmente. Observou-se que as gemas começaram a surgir 3 a 4 semanas após a inoculação dos explantes e continuaram a se proliferar até aproximadamente 8 semanas após o cultivo. As primeiras gemas a se formarem já apresentavam um estágio mais desenvolvido em relação às gemas mais tardias. Geralmente, os explantes que formaram poucas gemas, não apresentaram a proliferação de gemas tardias, permanecendo apenas aquelas que se formaram nas primeiras semanas de cultivo. Nos explantes que formaram um bom número de gemas, observou-se que estas surgiram em toda a superfície do explante e também na face do explante que estava em contato com o meio de cultura.

Após 60 dias de cultivo, todos os explantes foram transferidos para meios de cultura frescos, onde permaneceram por mais 30 dias e onde, também, as gemas tardias se desenvolveram em brotações. Não foi observada a proliferação de novas gemas, nestes explantes, após a transferência para meio fresco. Todos os meios de cultura que formaram gemas foram capazes de promover o alongamento destas gemas e a formação de brotações (Figura 16).

Normalmente, tem-se utilizado uma relação de altas concentrações de BAP e baixas de NAA. Entretanto, no

trabalho realizado por EDRISS & BURGER (1984) verificou-se a formação direta de gemas em segmentos do epicótilo nas concentrações de 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA.

BURGER & HACKETT (1981) verificaram que os cotilédones dos cultivares de *Citrus* estudados, regeneraram gemas somente quando uma grande proporção (100:1) de BAP foi utilizada em relação ao NAA.

No presente estudo, observou-se que houve formação de brotações em cotilédones em várias combinações das concentrações de BAP e NAA, inclusive em meio sem adição de reguladores de crescimento.

4.7. Multiplicação das brotações adventícias

(Experimento 8)

Brotações adventícias, com aproximadamente 1,5 cm de altura, obtidas em meio de cultivo contendo 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg /l de NAA, foram transferidas para meios de cultura contendo diferentes concentrações de BAP para induzir a multiplicação das brotações.

O principal objetivo da fase de multiplicação é o de produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo. Entretanto, outro aspecto essencial é a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, o que vai determinar, em grande parte, o sucesso na fase seguinte de enraizamento.

Tabela 10. Efeito de diferentes concentrações de BAP e NAA na formação de brotações adventícias na cultura de cotilédones de embriões nucelares.

Tratamentos (mg/l)		Frequência de cotilédones com brotações adventícias (%)	Nº médio de brotações adventi- cias/explante responsivo
BAP + NAA			
0	0	11,12 (9)*	2,0 ± 0,0
0	0,5	11,12 (9)	2,0 ± 0,0
0	1,0	11,12 (9)	1,0 ± 0,0
0	1,5	22,23 (9)	1,0 ± 0,0
0	2,0	33,34 (9)	6,3 ± 4,0
0	2,5	33,34 (9)	7,3 ± 3,0
0	3,0	44,45 (9)	7,7 ± 4,5
0,5	0,0	33,34 (9)	3,0 ± 2,6
0,5	0,5	11,12 (9)	3,0 ± 0,0
0,5	1,0	44,45 (9)	15,6 ± 6,6
0,5	1,5	11,12 (9)	2,0 ± 0,0
0,5	2,0	11,12 (9)	6,0 ± 0,0
0,5	2,5	44,45 (9)	6,7 ± 4,9
0,5	3,0	33,34 (9)	11,6 ± 1,5
1,0	0	11,12 (9)	7,0 ± 0,0
1,0	0,5	11,12 (9)	9,0 ± 0,0
1,0	1,0	0 (9)	-
1,0	1,5	33,34 (9)	1,3 ± 0,5
1,0	2,0	0 (9)	-
1,0	2,5	11,12 (9)	11,0 ± 0,0
1,0	3,0	11,12 (9)	4,0 ± 0,0
1,5	0	0 (9)	-
1,5	0,5	11,12 (9)	13,0 ± 0,0
1,5	1,0	11,12 (9)	4,0 ± 0,0

Continua

Tabela 10. Continuação.

Tratamentos (mg/l)		Frequência de cotilédones com brotações adventícias (%)	Nº médio de brotações adventi- cias/explante responsivo
1,5	1,5	22,23 (9)*	3,0 ± 1,4
1,5	2,0	33,34 (9)	3,0 ± 1,0
1,5	2,5	0 (9)	-
1,5	3,0	22,23 (9)	2,5 ± 2,1
2,0	0	22,23 (9)	3,0 ± 0,0
4,0	0,5	0 (9)	-
4,0	1,0	11,12 (9)	4,0 ± 0,0
2,0	1,5	22,23 (9)	3,5 ± 0,7
2,0	2,0	22,23 (9)	4,0 ± 2,8
2,0	2,5	22,23 (9)	6,0 ± 2,8
2,0	3,0	22,23 (9)	2,5 ± 2,1
2,5	0	0 (9)	-
2,5	0,5	11,12 (9)	6,0 ± 0,0
2,5	1,0	0 (9)	-
2,5	1,5	0 (9)	-
2,5	2,0	22,23 (9)	10,5 ± 0,7
2,5	2,5	22,23 (9)	2,0 ± 1,4
2,5	3,0	22,23 (9)	3,0 ± 2,8
3,0	0	0 (9)	-
3,-	0,5	11,12 (9)	4,0 ± 0,0
3,0	1,0	11,12 (9)	2,0 ± 0,0
3,0	1,5	44,45 (9)	2,0 ± 0,8
3,0	2,0	44,45 (9)	10,0 ± 2,5
3,0	2,5	11,12 (9)	9,0 ± 0,0
3,0	3,0	33,34 (9)	5,0 ± 2,0

* Número total de explantes inoculados depois de descartados os frascos contaminados

Segundo KITTO & YOUNG (1981) a proliferação de gemas em ápice meristemático é influenciada pelo genótipo, fonte de explante, citocinina, nível de sacarose e intensidade luminosa.

As citocininas constituem o grupo de reguladores de crescimento indispensável para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

No presente trabalho, estudou-se o efeito da concentração de BAP, no meio de cultura, na formação de gemas em brotações. A Tabela 11 apresenta os valores obtidos para porcentagem de explantes com proliferação de gemas e número médio de gemas/explante, 8 semanas de cultivo. Observou-se que a concentração de 3 mg/l de BAP induziu a produção de gemas em 100% dos explantes e um número médio (12,12) gemas por explante. As concentrações de citocininas para a multiplicação estão, em geral, entre 0,1 e 5,0 mg/l nos diferentes trabalhos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

MATSUMOTO & YAMAGUSHI (1983) obtiveram maior multiplicação de gemas adventícias em meio contendo 1,0 mg/l NAA e 5 mg/l de BAP.

Tabela 11. Efeito da concentração de BAP na multiplicação de brotações adventícias. Avaliação realizada 8 semanas após o início do cultivo.

Tratamentos (mg/l)	Explantes (%) com gemas (%)	Nº médio de gemas/explante ($\pm$ S)
MT	62,5	1,625 $\pm$ 1,59
MT + BAP-1,0	87,5	6,125 $\pm$ 4,10
MT + BAP-2,0	87,5	7,125 $\pm$ 3,83
MT + BAP-3,0	100,0	12,125 $\pm$ 3,04
MT + BAP-4,0	100,0	11,125 $\pm$ 4,35
MT + BAP-5,0	87,5	8,375 $\pm$ 4,98

(*) Explantes = brotações com $\geq$ 1,5 cm, total de 8 explantes por tratamento

Embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação (Quoirin e Lepoivre⁵, citados por GRATTA-PAGLIA & MACHADO, 1990), as auxinas são utilizadas com o intuito de estimular o crescimento das partes aéreas. Entretanto, como foi observado no Experimento 7, o alongamento da parte aérea foi obtido em todos os meios que formaram gemas adventícias. No presente estudo, observou-se que todas as concentrações de BAP promoveram o alongamento das gemas obtidas.

⁵ QUOIRIN, M. & LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Hort.*, 78: 437-442, 1977.

As gemas obtidas eram gemas axilares e gemas adventícias formadas na região de transição, entre a parte aérea e raiz da brotação principal (Figura 17). As gemas começaram a surgir por volta da segunda semana de cultivo e aumentaram em número após 8 semanas. As gemas formadas, nas primeiras semanas de cultivo, desenvolveram-se em brotações, mesmo estando ligadas à brotação principal e, posteriormente, foram transferidas para meio de cultivo para induzir o enraizamento.

4.8. Indução de enraizamento em brotações adventícias (Experimento 9)

A Tabela 12 apresenta as porcentagens médias de enraizamento obtidas em brotações inoculadas em meio básico MT, suplementado com diferentes reguladores de crescimento e suas combinações.

Verificou-se que o meio suplementado com 2,0 mg/l de NAA produziu a maior porcentagem de enraizamento (58,33%). Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por MATSUMOTO & YAMAGUSHI (1983) e EDRISS & BURGER (1984).

O regulador de crescimento, GAs, não promoveu o enraizamento em nenhuma concentração utilizada e provocou um estiolamento nas brotações. Concentrações de NAA abaixo de 0,5 mg/l não promoveram o enraizamento.

Tabela 12. Porcentagem média de enraizamento, de brotações em meio MT suplementado com vários reguladores de crescimento. Avaliação 4 semanas após o início do cultivo.

Tratamento (mg/l)	Enraizamento (%)
NAA - 0,0	0
NAA - 0,1	0
NAA - 0,3	0
NAA - 0,5	11,11
NAA - 1,0	22,22
NAA - 2,0	58,33
NAA - 3,0	11,11
NAA - 5,0	11,00
GA ₃ - 1,0	0
GA ₃ - 5,0	0
GA ₃ - 10,0	0
NAA-0,1 + IBA-2,0	16,67
NAA-1,0 + IBA-2,0	16,67
NAA-5,0 + IBA-2,0	25,00
NAA-5,0 + IBA-2,0	20,83
NAA-5,0 + BAP-0,1	0

Existem diversos fatores que podem afetar o enraizamento de brotações tais como a concentração de macronutrientes no meio de cultura, concentração de sacarose e ágar, tipos e concentrações de auxinas. Compostos fenólicos podem atuar como cofatores de enraizamento como por exemplo,

o floroglucírol. As condições de incubação também podem afetar o enraizamento.

Estudos realizados por KITTO & YOUNG (1981) na cultivar Citrange Carrizo, mostraram que o NAA favoreceu o enraizamento quando comparado com IBA ou IAA. Das concentrações de NAA estudadas (0,2; 1,0 e 5,0 mg/l) somente a concentração 1,0 mg/l favoreceu a formação de raízes. Outros fatores foram estudados, tais como: concentração de agar, sacarose, utilização de suco de laranja, intensidade luminosa e fonte de nitrogênio no meio de cultura. Somente a diminuição da concentração de agar de 2,0 para 0,5% produziu um aumento na resposta ao enraizamento das brotações.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 12, as porcentagens de enraizamento variaram de 0 a 58,33%. PASQUAL (1985) encontrou porcentagens de enraizamento de 12,5% a 96,0% para o cv. Valência e valores de 0 a 63,5% para o cv. Trifoliata nos diferentes meios de cultura estudados. É possível que, um genótipo seja mais responsivo que outro quanto ao enraizamento.

4.9. Análises histológicas (Experimento 10)

Os explantes utilizados nas análises histológicas eram cotilédones de embriões nucelares, obtidos *in vitro*, com 30 dias de idade são mostrados na Figura 15.

Cortes transversais da folha cotiledonar, antes da inoculação no meio de cultura, revelam que a epiderme é constituída por células compactas com núcleo grande; o mesófilo é homogêneo e se caracteriza por apresentar células isodiamétricas arranjadas de maneira justaposta; os feixes vasculares são colaterais (Figura 19, seta a).

YEUNG et alii (1981) verificaram que quando os cotilédones estão ainda no estado meristemático de crescimento, a adição de BAP ao meio de cultura induz novos tecidos meristemáticos, porque as células epidérmicas e subepidérmicas não estão completamente diferenciadas, sendo então, mais suscetíveis às citocininas exógenas.

A análise de cortes transversais do explante, mantido por 4 semanas em meio de cultura (MT + 3 mg/l de BAP + 2,5 mg/l de NAA), revelou que em algumas áreas, a estrutura interna permanecia inalterada, verificando-se apenas o acúmulo de amido em algumas células subepidérmicas (Figura 20, seta a).

Porém, em outras áreas, a epiderme e as camadas subepidérmicas, eram substituídas por um meristema semelhante a um câmbio de cicatrização (Figura 21, seta a).

Neste meristema neoformado observou-se a ocorrência de meristemóides (Figura 22, setas a e b).

THORPE & MURASHIGE (1968), por meio de observações histoquímicas, observaram uma forte correlação entre

o acúmulo de amido nas células e a iniciação de primórdios vegetativos. Os grãos de amido foram observados antes do início de qualquer desenvolvimento organizado, e nos locais de maior acúmulo, posteriormente, formaram-se primórdios. Segundo os autores, o tratamento dos tecidos com gibberelina evitou o acúmulo e a formação de primórdios, possivelmente devido à produção "de novo" da enzima α -amilase. Em trabalho posterior, THORPE & MEIER (1972) constataram grande relação entre o acúmulo de amido, o aumento na taxa de respiração e a formação de gemas.

Após 60 dias em meio de cultura, podia-se observar várias formações ao longo da superfície do explante (Figura 23, seta a).

A análise dos cortes longitudinais do explante passando pelas referidas formações revela que estas são gemas vegetativas, caracterizadas por apresentarem meristema apical protegido por primórdios foliares (Figura 24, seta a), glândulas de óleo (Figura 24, seta b). As gemas apresentavam meristema vascular conectado ao explante.

As análises revelam que a neoformação de gemas ocorreu a partir das estruturas meristemáticas comentadas anteriormente; não houve a formação de calo. Portanto, as gemas neoformadas são exógenas na origem.

RUMARY et alii (1986) estudaram a formação de gemas adventícias em epicótilo cultivado *in vitro* (White & Black Spruce). Os autores observaram 3 fases distintas na

formação dos brotos: indução da divisão celular em áreas denominadas "alvo"; formação de meristemóides e, finalmente, o desenvolvimento de gemas. Tais observações concordam com as análises realizadas no presente estudo.

Os autores acima citados comentam que as divisões celulares ocorriam na periferia do explante levando a formação de numerosos meristemóides e, finalmente, de brotos adventícios. Tais brotos desenvolviam um sistema vascular que tornou-se conectado ao sistema vascular do explante. As mesmas observações foram verificadas no presente estudo.

Ainda, RUMARY et alii (1986) comentam que a indução de gema teve lugar em tecidos do explante sem a formação significativa de calo. Assim, segundo os autores, é provável que a fidelidade genética tenha sido mantida nas plântulas desenvolvidas.

PATEL & BERLYN (1982) comentam que as gemas formadas nos calos podem mostrar mudanças no nível de ploidia; aquelas formadas diretamente dos explantes são mais estáveis geneticamente (PATEL & THORPE, 1984).

Uma vez que, neste estudo, as gemas se organizaram diretamente no explante sem a proliferação do tipo calo, é provável que, a fidelidade genética das plântulas formadas tenha sido mantida.

As gemas adventícias podem ocorrer *in vivo* ou *in vitro* em diferentes partes da planta; frequentemente se originam de forma indireta a partir de calos, mas também diretamente de tecidos mais ou menos diferenciados. Elas podem ser de origem endógena ou exógena. O número de células a partir do qual os primórdios das gemas adventícias se originam varia de um a muitos. Este ponto é de grande importância para os trabalhos de melhoramento genético utilizando indução de mutações, devido à ocorrência de quimerismo (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

Figura 15. Embrião nucelar cotiledonar (a). Cotilédones utilizados na indução de gemas adventícias (b) (x10).

Figura 16. Desenvolvimento de brotações adventícias em cotilédones de embriões nucleares (x10).

Figura 17. Multiplicação de brotações adventícias em meio suplementado com 3 mg/l de BAP (x 8).

Figura 18. Enraizamento de brotações em diferentes meios de cultura 4 semanas após o início do cultivo .
(c) MT + NAA (0,5 mg/l); (f) MT + NAA (2,0 mg/l); (i) MT + NAA (0,1 mg/l + IBA (2,0 mg/l); (j) MT + NAA (1,0 mg/l) + IBA (2,0 mg/l), (l) MT + NAA (1,0 mg/l) + IBA (5,0 mg/l); (m) MT + NAA (5,0 mg/l) + IBA (2,0 mg/l).

Figura 19. Corte transversal da folha cotiledonar, antes da inoculação no meio de cultura, revelando que a epiderme é constituída por células compactas com núcleo grande; o mesófilo é homogêneo e se caracteriza por apresentar células arranjadas de maneira justaposta; os feixes vasculares são colaterais (16 x 1,25).

Figura 20. Corte transversal do explante, mantido por 4 semanas em meio de cultura (MT + 3 mg/l de BAP + 2,5 mg/l de NAA). Observa-se acúmulo de amido em algumas células subepidérmicas (a) (6,3 x 1,6).

Figura 21. Corte transversal do explante, mantido por 4 semanas em meio de cultura (MT + 3 mg/l de BAP + 2,5 mg/l de NAA). Observa-se que, em algumas áreas, a epiderme e as camadas subepidérmicas, eram substituídas por um meristema semelhante a um câmbio de cicatrização (a) (16 x 1,25).

Figura 22. Observa-se no meristema neoformado, a ocorrência de meristemóides (a e b) (16 x 1,25).

Figura 23. Brotações formadas ao longo da superfície do explante (a) após 60 dias em meio de cultura (x10).

Figura 24. A análise dos cortes longitudinais do explante após 60 dias de cultivo, revela a formação de gemas vegetativas caracterizadas por apresentarem meristema apical protegido por primórdios foliares (a), glândulas de óleo (b) (6,3 x 1,25).

4.10. Obtenção de protoplastos

(Experimento 11)

Através dos resultados apresentados na Tabela 13, observa-se que os meios de maceração e lavagem correspondentes ao meio 1 (item 3.2.11) foram os mais eficientes no isolamento dos protoplastos. O melhor tempo de digestão enzimática foi o de 10 horas após a inoculação dos calos em meio de maceração. Os outros tratamentos, que contêm concentrações menores de enzimas, aumentaram a produção de protoplastos de acordo com o tempo de digestão enzimática. O tratamento denominado meio 1 causou uma diminuição no número de protoplastos obtidos por ml na avaliação realizada após 15 horas de digestão enzimática (Figura 25). Este fato deve ter ocorrido, provavelmente, porque a concentração de celulase no meio de maceração deste tratamento era pelo menos 10 vezes maior que nos outros tratamentos; é provável que, após um certo tempo a alta concentração desta enzima provoque danos à membrana plasmática dos protoplastos isolados, diminuindo o rendimento do tratamento enzimático. Com os outros três tratamentos, é possível que, aumentando o tempo de digestão enzimática, o rendimento possa ser maior. Seria, então, conveniente realizar um estudo ampliando o tempo de digestão enzimática nestes casos.

Tabela 13. Rendimento* médio de protoplastos isolados em diferentes tratamentos e períodos de digestão enzimática.

Tratamentos	5**	10	15
Meio 1	$3,4 \times 10^5$ a	$10,34 \times 10^5$ a	$9,16 \times 10^5$ a
Meio 2	$1,96 \times 10^5$ b	$6,18 \times 10^5$ b	$8,48 \times 10^5$ a
Meio 3	$0,51 \times 10^5$ c	$5,40 \times 10^5$ b	$8,24 \times 10^5$ a
Meio 4	$1,54 \times 10^5$ b	$3,60 \times 10^5$ c	$5,29 \times 10^5$ b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey - 5%.

* rendimento = número de protoplastos/grama de calo

** tempo de digestão enzimática em horas

Figura 25. Representação gráfica do efeito de diferentes tratamentos enzimáticos no rendimento do processo de isolamento de protoplastos.

A utilização de pectinase, no lugar de macerozyme, outra enzima com atividade pectinolítica, não foi prejudicial aos protoplastos, neste experimento. VARDI et alii (1982) observaram que a enzima macerozyme produziu melhores resultados na maioria dos oito cultivares estudados.

Os meios de maceração e lavagem utilizados no tratamento 1 foram extraídos do protocolo estabelecido para protoplastos do cv. Pera (GOLDMAN, 1988). Neste caso, o tempo ótimo de digestão encontrado foi de 5 horas. Entretanto, no presente trabalho, verificou-se que este tempo de digestão enzimática resultou em um rendimento baixo de protoplastos. Porém, é preciso levar em consideração que neste experimento os calos tiveram origem a partir de núcelos cultivados em meios MT contendo 10 mg/l de BAP e, no trabalho realizado por GOLDMAN (1988), os calos se originaram a partir do hipocótilo em meio MT sem suplementação de reguladores de crescimento.

Fatores tais como, combinação apropriada de enzimas e tempo de digestão enzimática, devem ser determinados empiricamente para cada linhagem de calo (VARDI & GALUN, 1988; GROSSER & GMITTER, 1990).

O principal objetivo deste experimento foi verificar qual protocolo e qual o tempo de digestão enzimática resultavam em maior eficiência na obtenção de protoplastos, para que fosse possível dar continuidade aos tra-

balhos com o cultivo de protoplastos e estudo da radiosensitividade dos mesmos. Observou-se que o protocolo estabelecido por GOLDMAN (1988) apresentou os melhores resultados nos períodos de digestão enzimática estudados. Este protocolo foi o escolhido para dar prosseguimento aos trabalhos com protoplastos e o tempo de digestão enzimática que produziu o melhor resultado, foi o de 10 horas. Obteve-se um rendimento de $1,03 \times 10^6$ protoplastos/grama de calo, o que está de acordo com os valores encontrados para protoplastos isolados a partir de calos embriogênicos em *Citrus* (VARDI et alii, 1975; GOLDMAN, 1988; HIDAKA & KAJIURA, 1988).

4.11. Viabilidade dos protoplastos (Experimento 12)

Para determinar a viabilidade de protoplastos isolados, podem ser utilizados corantes como Evans Blue (KANAI & EDWARDS, 1973) e fenolsafranina (KARANARATNE & SCOTT, 1981) adicionados a uma amostra após purificação. Protoplastos intactos são capazes de excluir os corantes, enquanto protoplastos quebrados e mortos são permeáveis a eles. O azul de metileno é um corante que tem sido amplamente utilizado em protoplastos vegetais. Este corante é reduzido por células vivas que se coram em amarelo (HOOLEY, 1982, citado por GOLDMAN, 1988). O diacetato de fluoresceína (FDA) numa concentração final do reagente de

0,01% (p/v) também é bastante utilizado no teste de viabilidade. O diacetato de fluoresceína é um composto não fluorescente, não polar e bastante permeável através da membrana plasmática. Após absorção, as esterases presentes no citoplasma dos protoplastos viáveis, hidrolizam esta substância liberando a fluoresceína, que é fluorescente, polar e não se movimenta com facilidade através do plasmalema, acumulando-se no citoplasma da célula viva (LARKIN, 1976). A fluorescência pode ser detectada depois de 5 minutos de reação, através de microscopia de fluorescência.

No presente trabalho, o estudo de viabilidade foi realizado somente em protoplastos isolados de acordo com o melhor protocolo estudado no item 4.10 (Experimento 11) e que corresponde ao Tratamento 1. A viabilidade foi analisada, logo após a purificação dos protoplastos, utilizando-se diacetato de fluoresceína em três diferentes concentrações finais do reagente. Os resultados deste experimento estão apresentados na Tabela 14.

As porcentagens de viabilidade obtidas (80,68 a 84,03%), logo após a purificação, estão dentro da faixa de viabilidade observada por GOLDMAN (1988), que obteve porcentagens variando de 79,47 a 89,50% para o cv. Pera, utilizando o corante azul de metileno.

Tabela 14. Viabilidade dos protoplastos em diferentes diluições de diacetato de fluoresceína em meio de lavagem.

Diluição	Sem fluorescência	Com fluorescência	Viabilidade (%)
1:50	$1,10 \times 10^5$ a	$0,89 \times 10^5$ a	81,40 a
1:100	$1,05 \times 10^5$ a	$0,85 \times 10^5$ a	80,68 a
1:150	$1,06 \times 10^5$ a	$0,89 \times 10^5$ a	84,03 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey - 5%.

As diluições utilizadas, neste estudo, não diferiram entre si estatisticamente, podendo ser utilizada a diluição de 1:150 ou a concentração final de 0,006% (p/v) de diacetato de fluoresceína (FDA).

BURGER & HACKETT (1982) demonstraram que a viabilidade dos protoplastos analisada imediatamente após o isolamento pode, não necessariamente, refletir a capacidade dos protoplastos de sobreviver após um período de tempo em meio de cultura. Estes autores verificaram que uma porcentagem de 20% de viabilidade dos protoplastos após 13 dias do isolamento (assegurada pelo FDA) coincidiu com a eficiência de plaqueamento dos mesmos após 20 dias de cultivo, isto indica que, o diacetato de fluoresceína é um indicador confiável da viabilidade dos protoplastos.

4.12. Cultivo de protoplastos (Experimento 13)

A concentração osmótica do meio de cultivo e a densidade de plaqueamento dos protoplastos são considerados fatores muito importantes na obtenção de sucesso na cultura de protoplastos (VARDI & GALUN, 1988).

No presente trabalho, os protoplastos foram inoculados em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e manitol e nas densidades de 5×10^4 e 10^5 protoplastos/ml (item 4.10 - Experimento 11). Não se observou a formação de parede e nem divisão dos protoplastos em nenhum dos tratamentos estudados. Após uma semana de cultivo, os protoplastos estavam em perfeitas condições, porém, a partir da segunda semana muitos fragmentos e organelas foram observados no meio de cultura.

Nos meios de cultura com concentração osmótica (0,3-0,4 M), em qualquer uma das duas densidades estudadas, observou-se que os protoplastos absorveram água aumentando seu volume (Figura 27) e, posteriormente, ocorria o rompimento da membrana plasmática com a liberação das organelas no meio de cultura. Nas concentrações osmóticas maiores (0,5-0,7 M) e densidade de 10^5 protoplastos/ml foi onde se observou protoplastos com melhor aparência (Figura 26) até a segunda semana. Na terceira semana de avaliação, iniciou-se degeneração dos protoplastos em todos os meios de cultura e densidades de plaqueamento estudados.

Outros fatores, além dos citados acima, podem estar influenciando o desenvolvimento dos protoplastos.

Figura 26. Protoplastos inoculados em meio de cultura contendo 0,45 M de manitol e 0,15 M de sacarose e densidade de plaqueamento de 10^5 protoplastos/ml após 15 dias de cultivo.

Figura 27. Protoplastos inoculados em meio de cultura contendo 0,25 M de manitol e 0,15 M de sacarose e densidade de 10^5 protoplastos/ml, após 15 dias de cultivo.

A utilização de um gradiente de sacarose-manitol durante o processo de purificação dos protoplastos, tem sido recomendada para a purificação dos protoplastos derivados de calo. Esta técnica está descrita com detalhes nos trabalhos de TUSA et alii (1990) e GROSSER & GMITTER (1990).

Este processo reduz a quantidade de fragmentos e protoplastos danificados e não viáveis, fatores estes que podem ter um efeito negativo no cultivo dos protoplastos.

Um meio de cultivo descrito por GROSSER & GMITTER (1990), bastante rico em nutrientes, foi recomendado para todas as lavagens no processo de purificação e também para o cultivo de protoplastos dos genótipos mais recalcitrantes.

Estudos utilizando a técnica de purificação dos protoplastos com um gradiente de sacarose-manitol e o cultivo dos protoplastos em meio de cultivo mais elaborado podem ser realizados nos protoplastos, obtidos no presente trabalho, no sentido de se obter sucesso na regeneração da parede celular, divisão celular e regeneração de plantas a partir destes.

4.13. Radiossensitividade dos diferentes materiais

4.13.1. Radiossensitividade do tecido nucelar

(Experimento 14)

O efeito da radiação gama sobre a formação de embrióides, a partir de nucelos, é apresentada na Tabela 15. As avaliações foram realizadas após 6 e 8 semanas de cultivo; entretanto, inspeções foram realizadas semanalmente na cultura permitindo observar que a radiação aumentou a fase "lag" dos nucelos quanto à formação de embrióides. Na tes-

temunha iniciou-se formação de embrióides após a terceira e quarta semanas de cultivo, enquanto os núcelos irradiados começaram a formar embrióides a partir da sexta semana de cultivo quando foi realizada a primeira avaliação. Após oito semanas de cultivo, não se observou diferença nas porcentagens de núcelos responsivos nas doses de 20 a 80 Gy. As doses de 20 e 40 Gy formaram praticamente o mesmo número de embrióides por núcelo responsivo. As doses acima de 100 Gy foram letais, não se observando a formação de embrióides nestes tratamentos. Este efeito também foi observado no trabalho realizado por SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1977a).

Segundo SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1977a), os núcelos são muito sensíveis à irradiação. Entretanto, estes autores verificaram que as doses de 5 e 10 Gy promoveram um estímulo na embriogênese neste tecido. Este efeito não foi observado no trabalho realizado por PASQUAL (1985) que utilizou as mesmas doses do trabalho dos autores citados acima, no cv. Valência.

No presente trabalho, os núcelos foram irradiados juntamente com o meio de cultura, onde foram mantidos durante o período de cultivo, baseando-se no trabalho de PASQUAL (1985), que não verificou efeito prejudicial aos núcelos quando estes e o meio de cultivo foram irradiados em comparação com os resultados obtidos quando somente o núcelo foi irradiado. Esta prática também facilita o processo de tratamento mutagênico em núcelos.

Tabela 15. Efeito da radiação gama na formação de embriões em nucelos. Avaliações realizadas 6 e 8 semanas após o tratamento mutagênico.

Doses (Gy)	Nº de nucelos com em- briões	Nucelos responsivos (%)		Nº médio de embriões/nucelos responsivos ($\pm S$)
		6 semanas	8 semanas	
0	8 (28)	21,41	28,57	4,25 $\pm$ 2,05
20	2 (28)	7,14	7,14	6,00 $\pm$ 1,41
40	2 (28)	7,14	7,14	6,50 $\pm$ 0,70
60	2 (28)	0,00	7,14	2,00 $\pm$ 0,00
80	2 (28)	3,57	7,14	3,50 $\pm$ 0,70
100	0 (28)	0,00	0,00	0,00
120	0 (28)	0,00	0,00	0,00
140	0 (28)	0,00	0,00	0,00
160	0 (28)	0,00	0,00	0,00

Foram utilizados frutos com 12 semanas de idade e em alguns deles se observou que já havia a existência de embriões no estágio globular (em média 3 embriões/semente). Estes embriões foram retirados dos nucelos para garantir que os embriões se formariam somente após o tratamento mutagênico. Talvez, este fato tenha influenciado no potencial de resposta destes nucelos. STARRANTINO & RUSSO (1976-1977) utilizaram frutos com 100-120 dias de idade para extração de nucelos. PASQUAL (1985) utilizou

frutos com 12 semanas de idade do cv. Valência e GOLDMAN (1988) utilizou frutos com 10-12 semanas de idade no cv. Pera, devido à dificuldade de se extrair nucelos sem danificá-los, de frutos mais jovens. Porém, com o emprego da metodologia de extração, utilizada no presente estudo, talvez seja possível evitar maiores danos aos nucelos, e sementes de frutos mais jovens possam ser utilizadas.

Verificou-se, no presente estudo, que o aumento das doses de radiação causou uma redução na porcentagem de enraizamento e um aumento na porcentagem de anormalidades (Tabela 16). Embora a porcentagem de anormalidades não esteja diferindo entre os tratamentos em que se utilizou a irradiação, verifica-se que as doses acima de 40 Gy causaram uma grande redução no número de embriões obtidos e no enraizamento destes embriões. Doses de 20 a 40 Gy seriam indicadas para o tratamento mutagênico, levando-se em consideração a necessidade de se aumentar o número de nucelos a serem tratados.

PASQUAL (1985) recomenda a dose de 10-20 Gy para indução de mutações no cv. Valência, aplicada a nucelos por ocasião da inoculação ou uma semana depois. STAR-RANTINO & RUSSO (1976-1977) trabalharam com nucelos extraídos de frutos irradiados com as doses 20 e 40 Gy e verificaram que a porcentagem de nucelos responsivos comparada com a testemunha foi praticamente a mesma e era de cerca de 27,5% dos nucelos cultivados. Provavelmente, a

irradiação dos frutos esteja causando menos dano aos núcleos que a irradiação direta destes explantes.

Tabela 16. Desenvolvimento de embriões individualizados oriundos de núcleos submetidos a diferentes doses de radiação gama. Avaliação realizada 60 dias após a inoculação dos embriões no estágio globular.

Doses (Gy)	Nº de embriões obtidos	Raízes (%)	Anormalidades (%)	Plântulas normais (%)
0	34	58,80	76,45	23,52
20	12	41,67	83,33	16,67
40	13	38,46	34,60	15,38
60	4	0,00	100,00	0,00
80	7	18,56	85,68	14,28
100	0	28,56	85,68	0,00
120	0	0,00	0,00	0,00
140	0	0,00	0,00	0,00
160	0	0,00	0,00	0,00

4.13.2. Radiossensitividade em calos nucelares

(Experimento 15)

Calos obtidos a partir de nucelos cultivados em meio MT suplementado com BAP (10 mg/l) foram utilizados neste experimento. Estes calos, quando mantidos neste mesmo meio de cultivo, se proliferam e não formam embrióides, mantendo assim, uma composição uniforme. Este fato os tornam diferentes daqueles mantidos em meio MT sem reguladores de crescimento, onde embrióides se diferenciam tornando o calo um tecido com composição bastante heterogênea, onde além das células, existem pró-embrióides e embrióides em vários estádios de desenvolvimento, diminuindo a probabilidade de obtenção de mutantes sólidos, após tratamento com agentes mutagênicos.

Após o tratamento com diferentes doses de raios gama, os calos foram inoculados em meio MT contendo 50 g/l de lactose e 500 mg/l de EM. Os embrióides, assim formados foram transferidos ainda no estágio globular, para meio MT suplementado com 500 mg/l de EM e 50 g/l de sacarose, onde observou-se o desenvolvimento destes embrióides. Os embrióides que se desenvolveram até o estágio cotiledonar foram inoculados em meio fresco, contendo a mesma constituição do meio anterior, para germinação e regeneração de plantas.

A Tabela 17 mostra o efeito de diferentes do-

ses de radiação gama no crescimento dos calos e na diferenciação de embriões a partir destes, 40 dias após o tratamento mutagênico. Observa-se que o peso médio/calor diminuiu com o aumento da dose de radiação. Na dose de 180 Gy, os calos apresentavam um aspecto necrosado e não formaram nenhum embrião. A dose de 150 Gy diminuiu drasticamente o número de embriões por calor. Verificou-se que o número de embriões por calor foi maior nas doses de 30 a 120 Gy, embora não diferissem significativamente da testemunha. A dose de 30 Gy apresentou o maior número de embriões por calor.

Tabela 17. Efeitos de diferentes doses de radiação gama no crescimento de calos e diferenciação de embriões a partir destes. Avaliação 40 dias após o início do cultivo.

Doses (Gy)	Peso médio/calor (mg)	Número médio de embriões/calor
0	239,39 a	935,95 a
30	207,47 a	2.551,41 a
60	151,40 b	2.280,63 a
90	103,93 c	1.984,75 a
120	84,27 cd	1.002,30 a
150	44,34 de	22,11 b
180	38,71 e	0,00 c

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey - 5%.

A diminuição do peso dos calos, com o aumento da dose de radiação, está de acordo com o que foi observado por KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977c). Estes mesmos autores observaram um aumento no número de embrióides/calos a partir da dose de 40 Gy até a dose de 200 Gy, sendo que o efeito máximo foi conseguido com a dose de 160 Gy, com uma intensidade de 850 Gy/h.

Skoog⁶, citado por SPIEGEL-ROY & KOCHBA (1973), mostrou que os raios-X inativam auxinas. A diminuição do peso dos calos tem sido associada à inativação das auxinas endógenas nos calos irradiados. Esta inativação ou redução dos níveis endógenos de auxinas nos calos irradiados também está associada ao aumento do número de embrióides após tratamento mutagênico.

KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977c) irradiaram calos com diferentes doses até 300 Gy e, posteriormente, inocularam em meio contendo diferentes concentrações de IAA e observaram que certas concentrações de IAA aumentaram a proliferação de embrióides nas doses mais altas de radiação. Segundo estes autores, a irradiação com as mais altas doses, pode ter reduzido o nível de auxina a um nível subótimo e a adição de IAA estaria promovendo a embriogênese, em tais condições.

⁶ SKOOG, F. The effect of X-irradiation on auxin and plant growth. *F. Cell. Compo. Physiol.*, 1: 207, 1935.

Os embriões, obtidos no presente estudo, foram transferidos para meio básico de cultivo MT, no estágio globular (1-2 mm de diâmetro). Observações foram realizadas sobre a porcentagem de embriões que se desenvolveram até o estágio cotiledonar, de embriões que germinaram formando raízes e plantas normais e a porcentagem de anormalidades encontradas nos embriões e plantas. Todos estes resultados estão apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Desenvolvimento de embriões individualizados oriundos de calos submetidos a diferentes doses de radiação. Avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos embriões no estágio globular.

Doses (Gy)	Nº de embriões transferidos (1-2mm ϕ)	Estádio globular (%)	Estádio cotiledonar (%)
0	164	51,82	48,16
30	194	84,53	15,46
60	226	63,40	34,59
90	269	73,23	26,76
120	337	78,33	21,66
150	198	81,31	18,68
180	0	0	0

Tabela 19. Germinação de embriões desenvolvidos, oriundos de calos submetidos a diferentes doses de radiação gama. Avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos embriões no estágio cotiledonar.

Doses (Gy)	Nº de embriões transferidos no estágio cotiledonar	Raiz (%)	Anormalidades (%)	Plântulas normais (%)
0	79	55,69	62,00	37,97
30	30	13,33	76,63	23,33
60	78	21,51	75,51	24,46
90	72	17,94	81,42	17,94
120	73	32,88	72,52	27,40
150	37	40,05	72,90	27,00
180	0	0	0	0

Pode-se notar na Tabela 18, que a maior porcentagem (48,16%) de embriões, que se desenvolveram até o estágio cotiledonar, ocorreu na testemunha. A radiação pode ter afetado a capacidade dos embriões de completarem seu desenvolvimento. KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977c) verificaram que a adição de IAA aos calos irradiados promoveu um melhor desenvolvimento dos embriões em plantas. Possivelmente, no presente trabalho, a irradiação tenha causado uma redução no nível de IAA causando assim uma redução na capacidade de desenvolvimento destes embriões.

A porcentagem de enraizamento também sofreu uma redução com a radiação, assim como a porcentagem de plântulas normais, como se observa na Tabela 19. Anormalidades são frequentemente observadas nos embrióides obtidos de cultura de nucelos e calos (GMITTER & MOORE, 1986), sem tratamento mutagênico. Segundo estes autores, a porcentagem de embrióides que apresentam capacidade de desenvolverem plantas adultas pode variar de acordo com o cultivar estudado; para o cv. Hamlin (*C. sinensis*) eles encontraram o valor de 35% de embrióides que se desenvolveram até estádios mais avançados e destes 48% germinaram. Encontrou-se, no presente estudo, uma porcentagem de 37,97% de embrióides, que já haviam atingido o estágio maduro (cotiledonar expandido) e se desenvolveram em plântulas, na testemunha. Alguns embrióides formaram raízes mas não desenvolveram a parte aérea da planta. Anormalidades tais como cotilédones múltiplos, fundidos e fasciados foram encontrados. Alguns embrióides desenvolveram parte aérea anormal com epicótilo fasciado ou gemas apicais múltiplas.

As anormalidades foram observadas em todas as doses de radiação estudadas. As doses de 30 a 150 Gy apresentaram porcentagens de plantas anormais bastante semelhantes conforme os resultados apresentados na Tabela 19.

KOCHBA et alii (1982) utilizaram doses de 80, 120 e 160 Gy a uma taxa de dose de 800 Gy/h e verificaram que estas doses aceleraram o processo de seleção

em calos embriogênicos do cv. Shamouti para salinidade. A dose de 120 Gy produziu o melhor resultado quando se utilizou 10 g/l de NaCl no meio de cultura.

No presente estudo, verificou-se que a dose de 120 Gy produziu um número médio de embrióides (1.002,30) que não diferiu estatisticamente do valor obtido na testemunha. A dose de 150 Gy produziu uma redução drástica no número médio de embrióides formados por calo (22,11). Este fato deve ser considerado, pois uma dose que cause tal redução não é conveniente; muitas mutações induzidas nas células dos calos podem ser perdidas, se estas células não tiverem capacidade de formar embrióides. Assim sendo, a dose de 120 Gy pode ser recomendada para a indução de mutações em calos embriogênicos de citros.

4.13.3. Radiossensitividade em protoplastos

(Experimento 16)

A Tabela 20 mostra os resultados obtidos após a exposição dos protoplastos a diferentes doses de radiação gama.

A Figura 28 mostra a curva de sobrevivência dos protoplastos do cv. Pera (*C. sinensis*), em relação à testemunha. Os protoplastos foram expostos à radiação imediatamente após o isolamento. A sobrevivência é expressa como a porcentagem de protoplastos viáveis através do

uso de diacetato de fluoresceína, após 24 horas do tratamento mutagênico.

Figura 28. Representação gráfica da porcentagem de viabilidade de protoplastos em diferentes doses de radiação gama, em relação à testemunha

O valor da LD₅₀ (dose que causa 50% de letalidade) nas condições em que o experimento foi realizado, situa-se ao redor de 41 Gy. Esta dose é maior que os valores de 34 e 37,5 Gy encontrados por VARDI et alii (1975) para o cv. Shamouti e GOLDMAN (1988) para o cv. Pera, respectivamente. Estas diferenças podem ser explicadas, tal-

vez, devido às diferentes metodologias utilizadas nestes trabalhos. Neste estudo, os protoplastos foram irradiados logo em seguida ao isolamento, enquanto VARDI et alii (1975) e GOLDMAN (1988) o fizeram 42 horas após o isolamento. Segundo GALUN & RAVEH (1975) que trabalharam com protoplastos de *Nicotiana*, ocorre um aumento abrupto na radiosensitividade em protoplastos irradiados após um ou dois dias do isolamento, em relação ao tratamento mutagênico realizado logo após o isolamento.

Tabela 20. Viabilidade dos protoplastos submetidos a diferentes doses de radiação gama.

Doses (Gy)	Sem fluorescência	Com fluorescência	Viabilidade (%)
0	10,32x10 ⁴ a	6,35x10 ⁴ a	64,80
15	10,04x10 ⁴ a	5,96x10 ⁴ ab	61,48
30	10,18x10 ⁴ a	3,92x10 ⁴ ab	38,00
45	10,62x10 ⁴ a	3,36x10 ⁴ ab	30,82
60	10,14x10 ⁴ a	2,08x10 ⁴ b	20,76

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey - 5%.

GOLDMAN (1988) também observou, em seu trabalho, uma diminuição na sensibilidade dos protoplastos em todas as doses utilizadas em relação ao trabalho de VARDI et alii (1975). Talvez, este fato esteja relacionado com o genótipo da planta estudada, uma vez que o genótipo é um dos fatores que influenciam na sensibilidade à irradiação.

No trabalho realizado por VARDI et alii (1975), os protoplastos foram irradiados juntamente com o meio de cultura e ali mantidos durante todo o tempo de cultivo. A avaliação foi realizada após 4 semanas de cultivo fazendo-se a contagem do número de colônias de células formadas. GOLDMAN (1988) utilizou o corante azul de metileno para avaliar a viabilidade dos protoplastos, 24 horas após o tratamento mutagênico, e estabeleceu a porcentagem de sobrevivência em relação à testemunha.

Apesar das diferentes metodologias empregadas, constatou-se que as respostas à irradiação foram bastante próximas, embora, uma pequena redução na radiosensibilidade tivesse sido observada, no presente estudo, quando se faz uma comparação com os trabalhos realizados por VARDI et alii (1975) e GOLDMAN (1988).

É possível, então, realizar o tratamento mutagênico e imediatamente após a irradiação utilizar o corante diacetado de fluoresceína para estudar a viabilidade dos mesmos.

4.13.4. Radiossensitividade em cotilédones de embriões nucelares (Experimento 17)

A Tabela 21 apresenta a porcentagem de explantes responsivos e número médio de brotações por explante responsivo em cotilédones de embriões nucelares expostos a diferentes doses de radiação gama.

Tabela 21. Efeito de diferentes doses de radiação gama na formação de brotações adventícias em cotilédones de embriões nucelares. Avaliação 90 dias após o tratamento mutagênico.

Doses (Gy)	Explantes responsivos (%)		Nº médio de brotações/ explante responsivo ($\pm$ S)
	observada	em relação ao controle=100	
0	55	100,0	8,78 $\pm$ 3,84
10	55	100,0	10,10 $\pm$ 2,83
20	50	90,9	8,86 $\pm$ 4,33
30	50	90,9	5,96 $\pm$ 4,52
40	45	81,8	8,50 $\pm$ 3,53
50	30	54,6	5,00 $\pm$ 1,22
60	10	18,2	0,60 $\pm$ 0,89
70	10	18,2	0,60 $\pm$ 0,89
80	5	9,1	1,00 $\pm$ 2,23
90	5	9,1	0,40 $\pm$ 0,89

A dose de 50 Gy provocou uma redução na porcentagem de explantes responsivos, em relação ao controle (54,59%), e no número médio de brotações/explante responsivo, em relação às doses menores que 50 Gy, utilizadas no presente estudo. Além disto, não produziu uma grande redução na formação de brotações, como se observou nas doses maiores. Por esta razão, pode-se recomendar esta dose na indução de mutações a partir de gemas adventícias, obtidas em cotilédones de embriões nucelares.

O interesse nas brotações adventícias como um meio de produzir mutantes sólidos, isto é, sem quimerismo, em partes irradiadas de uma planta, começou com experimentos em *Saintpaulia*. Folhas destacadas de vários cultivares de violeta africana foram irradiadas e, após o enraizamento e subsequente produção de plântulas adventícias *in vivo*, observou-se a produção de plantas completamente normais e de mutantes não quiméricos. Segundo BROERTJES & VAN HARTEN (1988), a explicação para o aparecimento de uma grande porcentagem de plantas não quiméricas, se deve ao fato de que a nova brotação pode ter se originado de uma única célula da epiderme.

No presente estudo, verificou-se (item 4.9) que as gemas neoformadas são exógenas na origem, isto é, têm origem nas camadas epidérmica e subepidérmicas dos cotilédones. Não foi possível evidenciar se as brotações tiveram origem unicelular ou multicelular.

Entretanto, existem várias formas de se evitar a formação de quimeras mesmo nas situações em que as gemas se formam a partir de mais de uma célula (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

VENVERLOO et alii (1983) colocaram que mesmo se a área apical de uma gema adventícia for formada por células descendentes de mais de uma célula epidérmica, o resultado final pode ser comparável à situação com uma única célula. Isto porque, se o ápice é um sistema dinâmico, muitas células do domo apical podem deixar o ápice e se incorporar nas folhas e ramos. Então, o ápice por si só pode, finalmente, consistir indiretamente de células descendentes de uma única célula epidérmica. Podendo-se desta forma, dar origem a um mutante sólido após tratamento mutagénico.

4.14. Considerações gerais e perspectivas futuras

Os estudos realizados no presente trabalho, tinham como objetivo adaptar diferentes metodologias de cultura de tecidos para o cv. Pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck), visando, principalmente, a aplicação destas técnicas em trabalhos com indução de mutações.

A embriogênese somática em citros ocorre via direta e indireta e os embrióides têm origem unicelular (BUTTON et alii, 1974; KOBAYASHI et alii, 1981). Portanto, nucelos e calos embriogênicos constituem-se em materiais adequados para se evitar a ocorrência de quimerismo, após o tratamento mutagênico. Protoplastos também constituem-se em excelentes materiais para se trabalhar com indução de mutações pois são células isoladas com maior homogeneidade de penetração do agente mutagênico e do agente seletivo, no caso de se estar trabalhando com seleção *in vitro*.

A obtenção de calos com rápida formação, proliferação e grande potencial embriogênico, é, então, o ponto de partida para a aplicação de diferentes técnicas que podem auxiliar no melhoramento das espécies cítricas.

No presente trabalho, obteve-se a formação e proliferação de calos nucelares, mais rapidamente, em meio básico MT suplementado com 10 mg/l de BAP e 500 mg/l de EM (Experimento 2). Estes calos apresentavam uma composição bastante homogênea (Figura 4), pois não se observa a formação de embrióides quando mantidos neste mesmo meio de cultivo, notando-se apenas a proliferação de calos. Este é um aspecto bastante importante a ser considerado em trabalhos com indução de mutações e isolamento de protoplastos a partir de calos nucelares.

Os calos nucelares, obtidos no meio MT sem reguladores de crescimento (Experimento 2), apresentavam um

crescimento lento e uma composição bastante heterogênea, isto é, além da proliferação de calos, observava-se embrióides em diferentes estádios de desenvolvimento tornando-se difícil a separação de calos e embrióides. Quando estes calos foram transferidos para diferentes meios de cultura (Experimento 5) o número de embrióides/calos diminuiu em alguns tratamentos e verificou-se que o meio com 1,0 mg/l de CIN e 0,1 mg/l de IAA favoreceu a proliferação de calos, embora, houvesse uma pequena proliferação de embrióides nestes calos. Foi verificado, também, que este meio de cultura produziu o maior efeito na habituação dos calos embriogênicos (Experimento 6). Portanto, estes calos constituem-se também, em um bom material para se trabalhar com indução de mutações e isolamento de protoplastos.

O meio suplementado com BAP (10 mg/l) também resultou na habituação dos calos. A habituação é considerada uma característica importante em calos que vão dar origem a protoplastos, pois segundo GROSSER & GMITTER (1990), a divisão dos protoplastos só foi observada em protoplastos obtidos a partir de calos embriogênicos habituados. Os calos, obtidos neste meio de cultura, foram transferidos para meio suplementado com lactose 50 g/l e 500 g/l de EM (Experimento 3), onde se observou a grande capacidade embriogênica destes calos.

Parte dos embrióides, obtidos neste meio de cultura, desenvolveram-se em plantas (Experimento 4), sendo

que o meio suplementado com 1,0 mg/l de CIN e 0,1 mg/l de IAA favoreceu a formação de parte aérea e raiz. Observou-se o desenvolvimento anormal de vários embriões formando cotilédones fundidos, múltiplos e fasciados.

Anormalidades na morfologia externa dos embriões têm sido constantemente relatadas também para outras espécies de plantas (AMMIRATO, 1985).

Como foi observado no Experimento 15, dos embriões inoculados no estágio globular (1-2 mm de diâmetro), 52% permaneceram neste estágio e não se desenvolveram em estágio maduro, a partir do qual ocorre a germinação e a regeneração de plantas. Estudos devem ser realizados no sentido de aumentar a porcentagem de embriões globulares que conseguem atingir estádios mais avançados de desenvolvimento. As anormalidades observadas em cotilédones e plântulas e as porcentagens de plântulas normais foram bastante semelhantes, tanto na embriogênese diretamente a partir dos núcelos como na embriogênese indireta.

Dando prosseguimento aos trabalhos, protoplastos foram isolados de calos nucelares obtidos em meio com BAP. O rendimento obtido no isolamento dos protoplastos foi de $1,03 \times 10^6$ protoplastos/grama de calo e a viabilidade dos mesmos foi de 84%. Estes valores estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (GOLDMAN, 1988 e HIDAKA & KAJIURA, 1988). Futuros trabalhos devem ser concentrados na obtenção de um meio de cultura e condições de

cultivo que favoreçam a divisão e regeneração de plantas a partir de protoplastos, pois, no presente trabalho, não se obteve sucesso nesta etapa, nas condições em que o cultivo de protoplastos foi realizado.

A importância dos protoplastos para estudos genéticos e de melhoramento das espécies cítricas tem sido amplamente destacada na literatura (VARDI & GALUN, 1988; GROSSER & GMITTER, 1990; TUSA et alii, 1990). Além dos vários híbridos somáticos já conseguidos (GROSSER & GMITTER, 1990) através da fusão de protoplastos, em estudos mais recentes, obteve-se a regeneração de plantas transgênicas a partir da transformação direta dos protoplastos (VARDI et alii, 1990). Outra técnica, utilizada com sucesso em protoplastos de citros, é a obtenção de cíbridos (VARDI et alii, 1987). Os cíbridos têm vantagens sobre os híbridos somáticos, pois não são tetraplóides e podem ser utilizados em cruzamentos com outros cultivares e espécies em um programa de melhoramento.

Os estudos realizados sobre a radiosensitividade dos diferentes materiais, no presente trabalho, permitiram obter doses recomendáveis a serem utilizadas em futuros trabalhos, aliando as técnicas de indução de mutações e seleção *in vitro*, por exemplo. A obtenção de plântulas resistentes à salinidade em cultura de calos em citros por BEN-HAYYIN & GOFFER (1989) estimula o emprego da técnica de seleção *in vitro* para a seleção de outras carac-

terísticas possíveis de serem selecionadas por este processo. O tratamento mutagênico seria utilizado para aumentar a frequência das mutações para as características desejadas.

No presente estudo, também se verificou a possibilidade de obtenção de brotações adventícias a partir de cotilédones de embriões nucelares. O meio de cultura suplementado com 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA foi o que apresentou melhores resultados quanto à indução de brotações e os meios suplementados com 3,0 mg/l de BAP e 2,0 mg/l de NAA foram os que apresentaram melhores resultados na multiplicação e enraizamento das brotações, respectivamente. Esta técnica se constitui em uma forma adequada para a micropropagação de plantas, pois a formação da brotações ocorre diretamente do explante e, provavelmente, é mantida a fidelidade genética. GROSSER & GMITTER (1990) descreveram uma técnica semelhante a esta a partir de embriões obtidos de hibridação somática e que não se desenvolveram em plantas. Tais embriões foram divididos em partes e inoculados em meio de cultura contendo 2,5-5,0 mg/l de BAP. Este processo garantiu a formação de inúmeras plantas a partir dos embriões provenientes da fusão de protoplastos.

A técnica de obtenção de brotações adventícias constitui-se num material com grande potencial para se trabalhar com indução de mutações, pois o tratamento muta-

gênico, antes da indução da formação das gemas, pode resultar em plantas que não apresentam quimerismo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições em que foi realizado o presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

a) Foi possível obter calos embriogênicos diretamente dos núcelos cerca de 60 dias após a inoculação dos mesmos em meio básico MT suplementado com BAP (10 mg/l);

b) Os calos cultivados em meio de cultura MT suplementado com 1,0 mg/l de CIN e 0,1 mg/l de IAA; 0,1 mg/l de CIN e 0,5 mg/l de IAA e 10 mg/l de BAP, tornaram-se habitados.

c) A adição de IAA ao meio de cultura MT diminuiu o número de embrióides por núcelos, porém não suprimiu totalmente o aparecimento destes;

d) A CIN (1,0 mg/l) foi benéfica à formação de embrióides a partir dos nucelos;

e) A adição de lactose (50 g/l) e EM (500 mg/l) em meio básico 'MT' promoveu sensivelmente a embriogênese em calos nucelares;

f) Embrióides inoculados em meio básico MT contendo 1,0 mg/l de CIN e 0,1 mg/l de IAA apresentaram o melhor desenvolvimento, atingindo o estágio de plântula;

g) Gemas adventícias foram induzidas em meio MT contendo diferentes concentrações de NAA e BAP, porém, as melhores concentrações foram 0,5 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de NAA;

h) Todas as concentrações de BAP promoveram a multiplicação das brotações adventícias, porém a melhor resposta foi obtida com a concentração de 3 mg/l deste hormônio. O enraizamento das brotações só foi observado nas maiores concentrações de NAA estudadas ou nos meios contendo NAA e IBA, porém a melhor resposta foi observada com a concentração de 2 mg/l de NAA;

i) Os cortes histológicos demonstraram que a neoformação de gemas ocorreu a partir de estruturas meris-

temáticas formadas nas camadas epidérmica e subepidérmicas não havendo a formação de calo;

j) O estudo realizado com diacetato de fluoresceína revelou que a diluição de 1:150 do corante pode ser utilizada no estudo da viabilidade dos protoplastos de *Citrus*;

k) As doses de radiação gama recomendadas para os diferentes materiais podem ser: 20-40 Gy para núcleos, 110-130 Gy para calos nucleares, 35-45 Gy para protoplastos e 40-60 Gy para brotações adventícias, a uma taxa de dose de 970 Gy/h, exceto para protoplastos onde se utilizou 290 Gy/h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R.R.; HOGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.P., ed. **Tissue culture in forestry and agriculture**, New York, Plenum, 1985. p.9-29.
- BARRET, H.C. & RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. **Systematic Botany**, Oxford, 105-36, 1976.
- BEN-HAYYIN, G. & GOFFER, Y. Plantlet regeneration from a NaCl - selected salt-tolerant callus culture of Shamouti orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.). **Plant Cell Report**, Heidelberg, 7: 680-3, 1989.
- BENN-HAYYIN, G. & NEUMANN, H. Stimulatory effect of glycerol. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, 110: 331-7, 1983.
- BITTERS, W.P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T.S.; NAUER, E. Investigations on established virus-free citrus plants through tissue culture. **California Citrus Nurseremen's Society**, Los Angeles, 9: 27-30, 1970.

- BROERTJES, C. & VAN HARTEN, A.M. "Citrus". In: _____, ed. **Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops**. Amsterdam, Elsevier, 1988. 279p.
- BURGER, D.W. & HACKETT, W.P. Regeneration of buds and roots from several citrus tissues. **Proceedings of International Society of Citriculture**, 161-6, 1981.
- BURGER, D.W. & HACKETT, W.P. The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons (*Citrus sinensis*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 56: 324-8, 1982.
- BURGER, D.W. & HACKETT, W.P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root section of citrus. **HortScience**, Alexandria, 43: 229-32, 1986.
- BUTTON, J. & BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the Washington navel orange in vitro. **Journal of South African Botany**, Claremont, 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**, Oxon, 26: 723-9, 1975.
- BUTTON, J. & KOCHBA, J. Tissue culture in the citrus industry. In: REINERT, J. & BAJAN, Y.P.S., ed. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.70-92.

- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. Fine structure of embryoid development from embryogenic ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis* Osb.). *Journal of Experimental Botany*, Oxon, 25(85): 446-7, 1974.
- CAMERON, J.W. & FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embriony. In: REUTHER, W.; BATCHLOR, L.D.; WEBBER, H.J., ed. *The citrus industry*. Berkeley, University of California Press, 1968. p.325-70.
- CARNEIRO, V.T.C. & CONROI, T. Protoplastos de células vegetais. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., ed. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP; EMBRAPA/CNPH, 1990. p.171-202.
- CHATURVEDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of citrus from somatic callus culture. *HortScience*, Alexandria, 9(2): 118-20, 1974.
- CHATURVEDI, H.C. & MITRA, G.C. Shift in morphogenetic pattern in *Citrus* callus tissue during prolonged culture. *Annal of Botany*, London, 39: 671-2, 1975.
- CONSTANTIN, M.J. Potential of in vitro mutation breeding for the improvement of vegetatively propagated crop plants. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Induced mutations for crop improvement in Latin America*, Vienna, 1984. p.59-77.
- DURAN-VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of three citrus species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 16: 123-33, 1989.

- EDRISS, M.H. & BURGER, O.W. "In vitro" propagation of "Troyer" citrange from epicotyl segments. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 23: 162-9, 1984.
- ERIKSON, T.R. Protoplast isolation and culture. In: FOWLE, L.C. & CONSTABEL, F., ed. *Plant protoplasts*, Florida, CRC Presss, 1985. p.1-20.
- EXPORTAÇÕES agroindustriais. *Suma Agrícola*, São Paulo, v: 5-6, mar., 1991.
- FAO QUARTERLY BULLETIN OF STATISTICS, Rome, 2: 1990.
- FROST, H.B. & SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J., ed. *The citrus industry*. Berkeley, University of California Press, 1968. v.2. p.290-324.
- 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*, Oxford, 15: 79-82, 1975.
- GIAGOMETTI, D.C. Taxonomia e nomenclatura dos citros. In: RODRIGUEZ, O. & VIÉGAS, F.C.P., ed. *Citricultura brasileira*. Campinas, Fundação Cargill, 1980. p.185-94.
- GMITTER, F.G. & MOORE, G.A. Plant regeneration from underdeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination, and plant survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 6: 139-47, 1986.

- GOLDMAN, M.H.S. Cultura de tecidos nucelares, isolamento e radiosensitividade de protoplastos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera. Piracicaba, 1988. 127p. (M.S. - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. e CALDAS, L.S., eds. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP, EMBRAPA/CNPq, 1990. p.99-171.
- GREVE, A. Formação da muda cítrica. In: MENTEN, J.O.M.; DOURADO NETO, D.; TORRADO, P.V., ed. Curso intensivo de citricultura. Piracicaba, A.E.C. Ceres; ESALQ, 1991. p.25-36.
- GRINBLAT, U. Differentiation of citrus stem in vitro. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 97: 599-603, 1972.
- GROSSER, J.W. & CHANDLER, J.L. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Poncirus* x *Citrus*brids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 31: 253-7, 1987.
- GROSSER, J.W. & GMITTER, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germoplasm enhancement and cultivar development. *HortScience*, Alexandria, 25(2): 147-51, 1990.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybridization sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, 75: 397-401, 1988.

- HEARN, C.J. Development of seedless grapefruit cultivars through budwood irradiation. *HortScience*, Alexandria, 20(3): 84, 1985.
- HENSZ, R.A. Star Ruby, a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. *Journal of Rio Grande Vally Horticultural Society*, Weslaco, 25: 54-8, 1971.
- HENSZ, R.A. Mutation breeding of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE CONTRIBUTION OF PLANT MUTATION BREEDING TO CROP IMPROVEMENT, Vienna, 1990. *Extended synopses*. Vienna, IAEA; Rome, FAO, 1990. p.153-4.
- HIDAKA, T. & KAJIURA, I. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 34: 85-92, 1988.
- HOWLAND, G.P. & HART, R.W. Radiation biology of cultured plant cells. In: REINART, J. & BAJAJ, Y.P.S., eds. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and culture*. Springer-Verlag, 1977. p.731-56.
- IKEDA, F. & NISHIDA, T. Studies on the off-polyembriogeny by gamma-ray in polyembrionic citrus. *Journal of Japanese Society Horticulturae Science*, Kyoto, 46(1): 100-1, 1977.
- IWAMASA, M. Study on the sterility in genus *Citrus* with special reference to the seedless. *Bulletin of the Horticultural Research Station of Japan* Ser. B, Shizuoka, 6: 1-77, 1966.

- JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; GUARDIOLA, J.L. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle in vitro. *Fruits*, Paris, 31(12): 751-62, 1976.
- KANAI, R. & EDWARDS, G.E. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C₃, C₄ and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two phase system. *Plant Physiology*, Rockville, 52: 484-90, 1973.
- KARANARATNE, S.M. & SCOTT, K.J. Mitotic activity in protoplasts isolated from *Sorghum bicolor* leaves. *Plant Science Letters*, Limerick, 23: 11, 1981.
- KITTO, S.L. & YOUNG, M.J. In vitro propagation of Carrizo citrange. *HortScience*, Alexandria, 16(3): 305-6, 1981.
- KOBAYASHI, S. Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 44: 10-14, 1987.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Role on the primordium cell in nucellar embryogenesis in citrus. *Proceedings of the International Citricultura*, (1): 44-8, 1981.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osb.) ovules, and uniformity of regenerated plants. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station*, Ser. E, Hiroshima, 5: 43-54, 1984.

- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I. UCHIMIYA, H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 4: 149-59, 1985.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H.; IKEDA, I. Plant regeneration from "Trovita" orange protoplasts. *Japan Journal of Breeding*, Tokyo, 33(2): 119-22, 1983.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; OHGAWARA, E.; OYAMA, I.; ISHIL, S. A somatic hybrid plant of protoplasts fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 5: 63-9, 1988.
- 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. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 73: 415-21, 1974.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Plant Breeding*, Berlin, 69: 156-62, 1973.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Cells and tissue culture for breeding and developmental studies of citrus. *Hort-Science*, Alexandria, 12: 110-4, 1977a.

- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 81: 283-8, 1977b.
- 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*, Oxford, 17: 1519, 1977c.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, J.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and ovule - parts in *Citrus*. *Planta*, Heidelberg, 106: 237-45, 1972.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, N.; SAAD, S. Stimulation of embryogenesis in citrus ovular callus by ABA, ethephon, CCC and alar and its suppression by GAs. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 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. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 105: 359-68, 1982.
- KOCHBA, J.; BEN-HAYYIN, G.; SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S.; NEUMANN, H. Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *C. aurantium*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 106: 111-8, 1982.

- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of *Citrus* sulphate by gibberelic and adenine sulphate. *Annals of Botany*, London, 38: 755-802, 1974.
- LARANJA. *Agroanalysis*, Rio de Janeiro, 12(2): 28-32, fev. 1988.
- LARKIN, P.J. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta*, Heidelberg, 128: 213-6, 1976.
- MAHESWARI, P. & RANGASWAMY, N.S. Polyembryony and in vitro culture of *Citrus* and *Mangifera*. *Indian Journal Horticulture*, Bangalore, 15: 275-86, 1958.
- MATSUMOTO, K. & YAMAGUSHI, H. Induction of adventitious buds and globular of seedlings of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*). *Japanese Journal Breeding*, Tokyo, 33 (2): 123-9, 1983.
- MATSUMOTO, K. & YAMAGUSHI, H. Increased variation of NaCl-tolerance in adventitious embryoids of trifoliate orange using an in vitro technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 2(1): 73-82, 1984.
- MEINS, F. Mechanisms underlying the persistence of tumor anatomy in crown-gall disease. In: STREET, H.E., ed. *Tissue culture and plant science*. New York, Academic Press, 1974. p.233-64.
- MITRA, G.C. & CHATURVEDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vivo grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Bronx, 99: 184-9, 1972.

- MOORE, G.A. Factors affecting in vitro embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruit. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 110: 66-70, 1985.
- MOORE, G.A. In vitro propagation of citrus rootstocks. *HortScience*, Alexandria, 21(2): 300-1, 1986.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-97, 1962.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1968. *Proceedings*, Riverside, University of California, 1969. v.3, p.1155-66.
- NAGATA, T. & TAKEBE, I. Plant of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, Heidelberg, 99: 12-20, 1971.
- NAVARRO, L. & JUAREZ, J. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free citrus plants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, 78: 425-35, 1977.
- NEGRUTIU, T.; JACOBS, M.; CABOCHE, M. Advances in somatic cell genetics of higher plants - the protoplast Nygeren, A. *Encycl. Pl. Physiol.*, 15(1), 1984.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHILL, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. Somatic hybridization in citrus: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, 78: 609-12, 1989.

- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHILL, S. Somatic plants obtained by protoplasts fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 71: 1-4, 1985.
- OHTA, Y. & FURUSATO, K. Embryoculture in citrus. *Reports of the Kihara Institute for Biological Research*, Kuala, 8: 49-54, 1957.
- PASQUAL, M. Regeneração de plantas in vitro e radiosensibilidade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba, 1985. 106p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- 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*, Brasília, 23(3): 255-9, 1988.
- PATEL, K.R. & BERLYN, G.P. Genetic instability of multiple bride of *Pinus coulteri* regenerated from tissue culture. *Canadian Journal of Forestry Research*, Ottawa, 19: 93-101, 1982.
- PATEL, K.R. & THORPE, T.A. Histochemical examination of shoot initiation in cultured cotyledon explant of radiata pine. *Botanical Gazzete*, Chicago, 145: 312-22, 1984.
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. *HortScience*, Alexandria, 3: 226-7, 1968.

- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1969. Proceedings. p.225-9.
- RANGASWAMY, N.S. Culture of nucellar of citrus in vitro. *Experientia*, Basel, 14: 111-2, 1958.
- RANGASWAMY, N.S. Morphogenetic response of *Citrus* ovules to growth adjuvants in culture. *Nature*, London, 183(4663): 735-6, 1959.
- RANGASWAMY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. *Phytomorphology*, New Delhi, 11: 108-27, 1961.
- RUMARY, C.; PATEL, K.R.; THORPE, T.A. Plantlet formation in black and white Sprince. II. Histological analysis of adventitious shoot formation "in vitro". *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 69: 997-1002, 1986.
- RUSSO, F.; DONINI, B.; STARRANTINO, A. Mutagenesis applied for citrus improvement. *Proceedings of International Society for Citriculture*, 1: 68-70, 1981.
- SAAD, S. Factor affecting the growth of lemon (*C. limon*) callus in vitro culture. (M.S. Hebrew University, Jerusalem, 1975.
- SABHARWAL, P.S. In vitro culture of ovules, nucelli and embryos of *Citrus arantifolia* Swingle. In: MAHESWARI, P. & RANGASWAMY, N.S., ed. *Plant tissue and organ culture*. Univ. of Delhi, 1963. p.265-74.

- SALIBE, A. Propagação das plantas cítricas. Curso de especialização em citricultura a nível de pós-graduação, Recife, s.ed., 1969. p.52-60.
- SASS, J.E. Botanical microtechnique. Iowa, The Iowa State College Press, 1951. 228p.
- SCHULTHEIS, R.J.; CHÉW, R.P.; CANTLIFFE, D.J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C. e CALDAS, L.S., eds. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP, EMBRAPA/CNPH, 1990. p.213-27.
- SKIRVIN, R. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*, Wageningen, 27(1): 241-66, 1978.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. In: *Biological Action of Growth Substances*. 11th. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-31, 1957.
- SOOST, R.K. Self-incompatibility in *Citrus grandis* (Linn.) Osbeck. *Proceeding of American Society for Horticulture Science*, Alexandria, 84: 137-40, 1964.
- SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J. & MOORE, J.N., ed. *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Purdue University Press, 1975. p.507-40.
- SPIEGEL-ROY, P. & BEN-HAYYIN, G. Selection and breeding for salinity tolerance in vitro. *Plant and Soil*, Dordrecht, 89: 243-52, 1985.

- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. *Radiation Botany*, Oxford, 13: 97-103, 1973.
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Production of solid mutants in citrus, using new approaches and techniques. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Improvements of vegetatively propagated plants through induced mutations. Vienna, 1975. p.113-27.
- SPIEGEL-ROY, P. & VARDI, A. Citrus. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant cell culture*, vol. 4. New York, Macmillan, 1984. p.355-71.
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J.; SAAD, S. Selection for tolerance to 2,4-dichlorophenocetic acid in ovular callus of orange (*Citrus sinensis*). *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 109: 41-8, 1983.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A.; ELHANATI, A. Seedless induced mutant in lemon (*Citrus limon*). *Mutation Breeding Newsletters*, Vienna, 26: 1-2, 1985.
- STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Coltura in vitro di nucelle isolate da frutticini de limone irraggiati con ⁶⁰Co. Tentative per ottenere semenzali nucellari resistenti al 'mal secco'. *Annali Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura*, Acireale, 9/10: 209-21, 1976/1977.

- STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars. *HortScience*, Alexandria, 15(3): 296-7, 1980.
- TEÓFILO SOBRINHO, J. Variedades copas e porta-enxertos para os citros. In: MENTEN, J.O.M.; DOURADO NETO, D.; TORRADO, P.V., ed. *Curso intensivo de citricultura*. Piracicaba, A.E.C. CERES; ESALQ, 1991. p.25-36.
- THORPE, T.A. & MEIER, D.D. Starch metabolism, respiration, and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 27: 365-9, 1972.
- THORPE, T.A. & MURASHIGE, T. Starch accumulation in shoot forming tobacco callus cultures. *Science*, Washington, 160: 421-2, 1968.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and planta regeneration. In: DIXON, R.A., ed. *Plant cell culture*, Oxford, IRL Press, 1985. p.79-104.
- TISSERAT, B. & MURASHIGE, T. Effect of ethephon, ethylene and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on sexual embryogenesis in vitro. *Plant Physiology*, Rockville, 60: 437-9, 1977.
- TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M.; ANDO, A.; POMPEU JUNIOR, J.; CERAVALLO, L.; NAKEMATA, T.; ROSSI, A.C. Mutation breeding aiming at obtaining resistance to citrus canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citru*) and other characteristics in sweet orange (*Citrus sinensis* Osb.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE CONTRIBUTION OF PLANT MUTATION TO CROP IMPROVEMENT, Vienna, 1990. *Extended Synopses*. Vienna, IAEA; Rome, FAO, 1990. p.182-3.

- TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.B. Plant regeneration of "valencia" Sweet Orange, "Femminello" Lemon, and the interespecific somatic hybrid following protoplast fusion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 115(6): 1043-6, 1990.
- VARDI, A. Isolation of protoplasts in Citrus. *Proceedings of the International Society Citriculture*, 2: 575-8, 1977.
- VARDI, A. & GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 37: 217-30, 1988.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Science*, Limerick, 69: 199-206, 1990.
- VARDI, A. & RAVEH, D. Cross-feeder experiments between tobacco and orange protoplasts. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 78: 350-9, 1976.
- VARDI, A.; BREIMAN, A.; GALUN, E. Citrus cybrids: production of donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, 75: 51-8, 1987.
- VARDI, A.; EPSTEIN, E.; BREIMAN, A. Is the *Phytophthora citrophthora* culture filtrate a reliable tool for in vitro selection of resistant *Citrus* variants? *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 72: 569-74, 1986.

- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, R. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Science Letters*, Limerick, 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*, Berlin, 62: 171-6, 1982.
- VARDI, A.; PARZER-GONEN, A.; FRYDMAN-SHANI; CLEICHMAN, S., GALUN, E. Protoplast fusion mediated transfer of organelles from Microcitrus into Citrus and regeneration of novel alloplasmic tress. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 78: 741-7, 1989.
- VASIL, I.K. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. In: LURQUIN, P.F.; KLEINHOF, A., eds. *Genetic engineering in eukaryote*, New York, Plenum, 1983. p.233-52.
- VENVERLOO, C.J.; KOSTER, J.; LIBBENGA, K.R. The formation of adventitious organs. IV. The ontogeny of shoots and leaves from epidermis cells of *Nautilocalyx lynchii*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 109: 55-67, 1983.
- WATANABE, H. F₁ hybrids obtained through the regulation of polyembryony by continuous gamma irradiation in Citrus unshu cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 110: 742-4, 1985.

WIDHOLM, J.M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology*, Baltimore, 47: 189-94, 1972.

WILLIAMS, E.G. & MAHESWARAN, G.M. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, London, 57: 443-62, 1986.

YEUNG, E.C.; AITKEN, J.; BIONDI, S.; THORPE, T.A. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine. *Botanical Gazette*, Chicago, 142: 494-501, 1981.

ZHANAQ, D.; WENCAI, Z.; SHUYAN, W. In vitro mutation breeding for salinity tolerance in *Citrus*. *Mutation Breeding Newsletter*, Vienna, 33: 12-14, 1989.

ZUBRZYCKI, H.M. & ZUBRZYCKI, D.A. Induction of mutations in *Citrus* to produce resistance to the Tristeza virus. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Induced mutations in vegetatively propagated plants II*, Vienna, 1982, vol. 2, p.111.

ZUBRZYCKI, H.M. & ZUBRZYCKI, D.A. Induction of mutations in *Citrus* for the development of resistance to *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Induced mutations in vegetatively propagated plants II*, Vienna, 1982, vol. 2, p.91-110.