Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Hibridação somática visando à produção de genitores tetraplóides para o melhoramento de cultivares copa de citros

Leonardo Soriano

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2010

Leonardo Soriano
Engenheiro Florestal

Hibridação somática visando à produção de genitores tetraplóides para o melhoramento de cultivares copa de citros

Orientadora:
Profª. Drª. **BEATRIZ M. JANUZZI MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2010

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

Soriano, Leonardo
Hibridação somática visando à produção de genitores tetraplóides para o melhoramento de cultivares copa de citros / Leonardo Soriano. - - Piracicaba, 2010.
105 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Cultura de tecidos vegetais 2. Embriogênese somática 3. Frutas cítricas 4. Hibridação vegetal 5. Melhoramento genético vegetal 6. Protoplastos I. Título

CDD 634.3
S614h

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

Aos meus valorosos pais Elson e Fátima

Agradeço

Ao grande amigo e motivador
Domingos Marquiori

Dedico

A minha eterna companheira Mariana,
Minha família e irmãos
(Érico, Fernando, Mariana e Juliana),
Amigos e família Marquiori,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às instituições e pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de mestrado, e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por oferecer toda a estrutura para a realização do projeto.

Ao Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"- IAC pelo fornecimento do material vegetal e infra-estrutura utilizados na pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas concessões de bolsas de estudo e recursos financeiros para o desenvolvimento do trabalho.

A Prof.ª Dr.ª Beatriz M. Januzzi Mendes, pela oportunidade, dedicação, seriedade e irretocável orientação.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, por todo apoio, orientação, respaldo e exemplo de pesquisador/docente.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela atenção, suporte e orientação nas análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rocha Latado pelo auxílio nas análises de ploidia.

Aos Professores Ricardo Alfredo Kluge, Lázaro Eustáquio Pereira Peres e Marcílio de Almeida, da Coordenação do curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade e apoio às atividades acadêmicas.

Aos Professores Paulo Hercílio Viegas Rodrigues, Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez e José Lavres Junior pelo excelente convívio.

A Rafaella, grande amiga e companheira de laboratório e de representação discente; e ao Maurel, pelo incrível conhecimento e suporte estatístico.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal - CENA (Renata, Marcelo “Bidson”, Liliane, Alessandra, Aninha, Fab´s, Flávia, Doutora Eveline, Tarcísio, Luciane, Juliana, Sylvia, Talitha, Mônica, Renan, Hilo, Raquel, Karina e Priscila), do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas - ESALQ (Pâmela, Lívia, Marina, Janaynna, Luzia, Lísia, Tati, Luana, Suane, Meire, Flávia, Filipi, Ernani, Rodrigo, André,

Marcus “Motorhead” e Bruno “Néguer”), do Laboratório de Genética Molecular - ESALQ (Raphaelle, Carol Monteiro, Carol Fazza, Débora e Mariana) e do Laboratório de Biotecnologia - Centro APTA Citros (Jean Cardoso e Joice).

Aos prestativos funcionários do Depto de Produção Vegetal (José, David, Éder, Aparecido e Antônio) por toda a ajuda e auxílio na manutenção do material nas casas-de-vegetação.

Aos saudosos integrantes do Grupo de Estudos da Fisiologia (Marcelo Lattarulo, João Paulo, Fred e Giovani).

Ao secretário Paulo do Depto de Produção Vegetal e as secretárias Solizete da PG-Fisiologia e Bioquímica, Luciane da PG-Fitotecnia e Suzi do LBV-CENA, pelo convívio, companheirismo e amizade.

Ao Gabriel, Silvana e José Geraldo do setor de informática do CENA.

Aos companheiros de PG-Fisiologia: João Marcelo “Sustagem”, Anielca, Fran, Cecílio, Gabriel, Simone, Tábata, Magda, Luciane, George, Eduardo, Fausto, Oléguer, Geraldo, Evandro, Willian, André, Maysa, Mariana, Vanessa, Natália, Ivan, Tuane, Jaislanny, Marina, Camila, Martha e Rodrigo.

Aos grandes amigos: Frutal, Panguá, Mineiro, Eduardo, Maysa, Cris, Marcelo Casagrande e Andressa.

A todos os integrantes do glorioso Cloroplasto Futebol Clube (Guilherme “Popaye”, Roberto, Marcelo Rogalski, Mário, Gilvano e Denis).

Aos amigos do CENA (Robinho, Marcelão, Carolina, Mariana e Cleusa) e da PG-Fitotecnia (Vanessa, Horst, Erick, Mateus, Leonardo e Patrícia).

A Alexandra Pavan, pela atenção e auxílio nas análises moleculares.

A bibliotecária Eliana, pela dedicação na revisão da dissertação.

Aos estimados Matheus, Natália Risi, Marcelo “Famozo” e Alê, pela companhia e conversas de incentivo durante as longas e íngremes caminhadas.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO..... 9
ABSTRACT..... 11
LISTA DE FIGURAS..... 13
LISTA DE TABELAS..... 15
1 INTRODUÇÃO..... 21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 25
2.1 Os *Citrus*..... 25
2.1.1 Origem e aspectos gerais..... 25
2.1.2 Complexidade do gênero..... 26
2.1.3 A citricultura no Brasil..... 29
2.1.4 Melhoramento genético..... 30
2.2 Hibridação somática..... 31
2.2.1 Histórico da hibridação somática..... 32
2.2.2 A fusão de protoplastos..... 34
2.2.3 Regeneração de plantas..... 37
2.2.4 Confirmação da hibridação somática..... 39
2.3 Problemas fitossanitários relacionados aos *Citrus*..... 41
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 43
3.1 Local..... 43
3.2 Material vegetal..... 43
3.3 Hibridação somática..... 44
3.3.1 Isolamento de protoplastos..... 45
3.3.2 Purificação, fusão e plaqueamento de protoplastos..... 45
3.3.3 Cultura dos protoplastos e regeneração de plantas..... 46
3.3.4 Aclimatização..... 48
3.4 Confirmação da hibridação somática..... 48
3.4.1 Análise morfológica das plantas regeneradas..... 49
3.4.2 Determinação da ploidia por citometria de fluxo..... 49

3.4.3 Análise de DNA por marcadores moleculares SSR..... 50
3.4.4 Análise de DNA por marcadores moleculares RAPD..... 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 53
4.1 Obtenção e manutenção do material vegetal..... 53
4.2 Hibridação somática..... 55
4.2.1 Isolamento de protoplastos..... 58
4.2.2 Purificação, fusão e plaqueamento de protoplastos..... 60
4.2.3 Cultura dos protoplastos e regeneração de plantas..... 61
4.2.4 Aclimatização..... 70
4.3 Confirmação da hibridação somática..... 71
4.3.1 Análise de DNA por marcadores moleculares SSR..... 71
4.3.2 Determinação da ploidia por citometria de fluxo..... 77
4.3.3 Caracterização das plantas regeneradas dos experimentos de fusão de protoplastos..... 80
5 CONCLUSÕES..... 85
REFERÊNCIAS..... 87
ANEXOS..... 99

RESUMO

Hibridação somática visando à produção de genitores tetraplóides para o melhoramento de cultivares copa de citros

A hibridação somática via fusão de protoplastos é um método de combinação genética que agrega integralmente os dois genomas genitores, assim como suas respectivas organelas citoplasmáticas, sendo uma ferramenta alternativa aos métodos convencionais de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de híbridos somáticos interespecíficos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 'Pêra' e 'Westin' com a tangerina 'Fremont' (*C. clementina* hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), 'Thomas' (*C. reticulata* Blanco) e 'Nules' (*C. clementina* hort. ex Tan), e o tangelo 'Nova' (C*. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) visando à produção de genitores tetraplóides com características agronômicas desejáveis. Como fontes de protoplastos foram utilizados calos embriogênicos de laranja e folhas jovens de tangerina e tangelo, coletadas de plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Para o isolamento dos protoplastos, as células de ambas as fontes foram imersas em solução enzimática e incubadas no escuro por 14 horas, sob agitação. Após o isolamento, os protoplastos isolados de calos foram fundidos quimicamente (polietilenoglicol - PEG) com protoplastos não embriogênicos, isolados de mesofilo foliar. Em seguida, os protoplastos foram plaqueados nos meios de cultura líquido BH3, EME e BH3 + EME, e incubados em ausência de luz, sob temperatura de 27 ºC. Após 20 dias de incubação, foram iniciados subcultivos sequenciais para nutrição e redução do potencial osmótico do meio de cultura. Os microcalos desenvolvidos foram transferidos para meio de cultura EME + maltose (13 $g.L^{-1}$) para a indução da embriogênese somática. Os embriões desenvolvidos foram transferidos para meio de cultura EME + sacarose (25 $g.L^{-1}$) e em seguida para o meio de cultura 1500 (1,5 $g.L^{-1}$ de extrato de malte) e finalmente para o meio B+ para desenvolvimento e germinação. As plantas regeneradas foram individualizadas, enraizadas ou microenxertadas e aclimatizadas em casa-de-vegetação. A confirmação da hibridação somática foi feita por análise morfológica, determinação da ploidia, por citometria de fluxo e análise do DNA com marcadores moleculares do tipo SSR e RAPD. Foram obtidos híbridos somáticos de três combinações (‘Pêra’ + ‘Fremont’, ‘Pêra’ + ‘Nules’ e ‘Pêra’ + ‘Nova) os quais serão avaliados para utilização diretamente como copa ou como genitor tetraplóide em programas de melhoramento de citros.

Palavras-chave: Fusão de protoplastos; Embriogênese somática; Cultura de tecidos

ABSTRACT

Somatic hybridization in order to obtain tetraploid parents for citrus scion improvement

Somatic hybridization by protoplasts fusion is a method of genetic combination of two parental genomes, and their cytoplasmic organelles. It is an alternative tool to conventional breeding methods. The objective of this work was to obtain interspecific somatic hybrids of 'Pera' and 'Westin' sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with 'Fremont' (*C. clementina* hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), 'Thomas' (*C. reticulata* Blanco) and 'Nules' (*C. clementina* hort. ex Tan) mandarins and 'Nova' tangelo (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) to produce tetraploid parents with desirable agronomic characteristics. The sources of protoplasts were sweet orange embryogenic callus and mandarin and tangelo young leaves, collected from plants cultivated in screenhouses. For protoplasts isolation, cells from both sources were immersed in enzyme solution and incubated in the dark for 14 hours (40 rpm). After isolation, the protoplasts isolated from callus were fused chemically (polyethylene glycol - PEG) with non embryogenic protoplasts, isolated from leaf mesophyll. The protoplasts were cultivated in BH3, BH3 + EME and EME liquid culture media and incubated in the dark, under temperature of 27 ºC. After 20 days of incubation, subcultures were initiated in order to reduce the osmotic potential of culture medium. The microcalus developed were transferred to EME medium supplemented with maltose (13 $g.L^{-1}$) to induce somatic embryogenesis. The developed embryos were transferred into EME + sucrose (25 $g.L^{-1}$), culture medium 1500 (1.5 $g.L^{-1}$ of malt extract) or B+ culture medium for development and germination. The regenerated plants were individually rooted or micrografted, and further acclimatized in screenhouse. Somatic hybridization was confirmed by analysis of leaf morphology, ploidy determination by flow cytometry and molecular analysis by SSR and RAPD markers. Somatic hybrids were obtained of the three combinations ('Pera' + 'Fremont', 'Pêra' + 'Nules' and 'Pêra' + 'Nova) which will be evaluated for direct are as scion or as a tetraploid parent in citrus breeding programs.

Keywords: Protoplasts fusion; Somatic embryogenesis; Tissue culture

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Manutenção das culturas de calos e células em suspensão de laranja doce. a) Calos embriogênicos cultivados em meio de cultura EME ou H+H sólido. b) Suspensões celulares cultivadas em meio de cultura EME ou H+H líquido, sob agitação orbital constante..... 53

Figura 2 - Introdução e manutenção da fonte de protoplastos não-embriogênicos de tangerinas e tangelo em casa de vegetação. a) Plantas de tangerina obtidas por meio de sementes das cultivares ‘Fremont’, ‘Nules’ e ‘Thomas’ e de tangelo ‘Nova’. b) Plantas de tangerina ‘Fremont’, ‘Thomas’ e tangelo ‘Nova’ obtidas pela enxertia de borbulhas em limão ‘Cravo’..... 55

Figura 3 - Etapas do processo de isolamento de protoplastos. a) Calo embriogênico de laranja doce ‘Westin’. b) - c) Calo embriogênico em solução enzimática. d) “Seedling” de tangerina ‘Fremont’. e) Assepsia das folhas. f) Folha finamente fatiada em solução enzimática..... 59

Figura 4 - Isolamento e hibridação somática de protoplastos. a) Protoplastos isolados de calos de laranja doce após purificação (2 x 105 protoplastos.mL-1). b) Fusão dos protoplastos (seta) de laranja doce e tangerina (40x)..... 60

Figura 5 - Purificação, fusão e cultivo de protoplastos. a) Purificação dos protoplastos após filtração em peneira de nylon (protoplastos provenientes de calos com coloração acinzentada e de mesofilo foliar com coloração

esverdeada). b) Gradiente sacarose/manitol com a presença de banda intermediária contendo os protoplastos. c) ‘Pellets’ com protoplastos. d) União de protoplastos dos 2 genitores na porção central das placas de Petri. e) Fusão química de protoplastos com a presença do PEG. f) Protoplastos pós-fusão plaqueados em meio de cultura nutritivo..... 61

Figura 6 - Cultura dos protoplastos. a) Microcolônia. b) Microcalo em meio de cultura 1:2 BH3 0,7 M: EME 0,146 M (v:v) (20x).... 62

Figura 7 - Etapas do processo de desenvolvimento dos embriões somáticos. a) Transferência de calos para meio de cultura EME-Maltose. b) Detalhe de embrião somático desenvolvido a partir de calos cultivados em meio de cultura EME-Maltose. c) Transferência dos embriões somáticos para meio de cultura EME-Sacarose. d) Embrião somático..... 64

Figura 8 - Regeneração de plantas, a partir da fusão de protoplastos de laranja doce + tangerina. a) Embriões somáticos transferidos para meio de cultura B+. b) Detalhe de embrião somático em meio de cultura B+. c) Germinação de embrião somático da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'. d) Plântulas de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'..... 65

Figura 9 - Planta regenerada após fusão de protoplastos, combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'..... 66

Figura 10 - Resumo dos resultados obtidos de cada experimento de

fusão de protoplastos realizado entre as combinações de laranja doce e tangerina/tangelo..... 69

Figura 11 - Planta aclimatizada proveniente da fusão de protoplastos da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'..... 70

Figuta 12 - Micro-enxertia de brotos desenvolvidos sobre citrange ‘Carrizo’. a) Detalhe da micro-enxertia de brotação da combinação entre laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’. b) Planta micro-enxertada e aclimatizada da combinação entre laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’... 71

Figura 13 - Amplificação do DNA de plantas da combinação 'Pêra' + 'Fremont' com "primers" SSR CX6F10, CX5F38 e CX4F71 em gel de agarose. Genitor 'Pêra' (P); genitor 'Fremont' (F); amostras de possíveis híbridos (H1 e H2); branco (B). M = ladder (50 pb)..... 74

Figura 14 - Análise de SSR de plantas regeneradas de experimentos de fusão de protoplastos da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'. P: genitor 'Pêra'; N: genitor 'Nules'; H1 e H2: amostras de possíveis híbridos; B: branco..... 75

Figura 15 - Análise de SSR de plantas regeneradas de experimentos de fusão de protoplastos da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'. P: genitor 'Pêra'; F: genitor 'Fremont'; H1 e H2: amostras de possíveis híbridos; B: branco..... 76

Figura 16 - Caracterização dos produtos de fusão de protoplastos de

laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’. a) Fragmentos RAPD. Colunas 1 a 3 = “primer” A4; colunas 4 a 6 = “primer” A7; colunas 7 a 9 = “primer” AA7; e colunas 10 a 12 = “primer” A10. Colunas 1, 4, 7, e 10 = laranja doce ‘Pêra’; colunas 2, 5, 8 e 11 = produto da fusão de protoplastos; colunas 3, 6, 9 e 12 = tangerina ‘Fremont’. B = branco. P = ladder 1 Kb. b) Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’ (centro) e dos padrões diplóides de laranja doce ‘Pêra’ (esquerda) e tangerina ‘Fremont’ (direita). c) Morfologia foliar de laranja doce ‘Pêra’ (esquerda), laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’ (centro) e tangerina ‘Fremont’ (direita). Barra = 1 cm..... 82

Figura 17 - Caracterização dos produtos de fusão de protoplastos de laranja doce ‘Pêra’ + tangelo ‘Nova’. a) Fragmentos RAPD. Colunas 1 a 3 = “primer” A4; colunas 4 a 6 = “primer” A7; colunas 7 a 9 = “primer” AA7; e colunas 10 a 12 = “primer” A10. Colunas 1, 4, 7, e 10 = laranja doce ‘Pêra’; colunas 2, 5, 8 e 11 = produto da fusão de protoplastos; colunas 3, 6, 9 e 12 = tangelo ‘Nova’. B = branco. P = ladder 1 Kb. b) Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de laranja doce ‘Pêra’ + tangelo ‘Nova’ (centro) e dos padrões diplóides de laranja doce ‘Pêra’ (esquerda) e tangelo ‘Nova’ (direita). c) Morfologia foliar de laranja doce ‘Pêra’ (esquerda), laranja doce ‘Pêra’ + tangelo ‘Nova’ (centro) e tangelo ‘Nova’ (direita). Barra = 1 cm..... 83

Figura 18 - Caracterização dos produtos de fusão de protoplastos de laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’. a) Fragmentos

RAPD. Colunas 1 a 3 = “primer” A4; colunas 4 a 6 = “primer” A7; colunas 7 a 9 = “primer” AA7; e colunas 10 a 12 = “primer” A10. Colunas 1, 4, 7, e 10 = laranja doce ‘Pêra’; colunas 2, 5, 8 e 11 = produto da fusão de protoplastos; colunas 3, 6, 9 e 12 = tangerina ‘Nules’. B = branco. P = ladder 1 Kb. b) Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’ (centro) e dos padrões diplóides de laranja doce ‘Pêra’ (esquerda) e tangerina ‘Nules’ (direita). c) Morfologia foliar de laranja doce ‘Pêra’ (esquerda), laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’ (centro) e tangerina ‘Nules’ (direita). Barra = 1 cm..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Manutenção das culturas de células, calos embriogênicos e plantas in vitro provenientes dos experimentos de fusão de protoplastos..... 47

Tabela 2 - Número de plantas de tangerina e tangelo obtidas via semente (135 dias) e enxertia (75 dias), as quais foram utilizadas para fornecimento de explantes foliares..... 54

Tabela 3 - Número total de fusões de protoplastos realizada entre as variedades de citros estudadas, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009..... 56

Tabela 4 - Fusões de protoplastos realizadas e estágio de desenvolvimento da cultura e quantidade de plantas obtidas até outubro de 2010..... 57

Tabela 5 - Comparativo das fusões de protoplastos realizadas entre laranja doce e tangerina/tangelo em função do estágio de desenvolvimento apresentado até outubro de 2010..... 67

Tabela 6 - Pares de "primers" SSR (microssatélites) selecionados para confirmação hibridação somática, suas seqüências (forward/reverse) e tamanho dos alelos amplificados (TAA) em pares de bases (pb)..... 72

Tabela 7 - Análise da ploidia por citometria de fluxo das plantas genitoras diplóides (P1-P5) e das plantas regeneradas (1-18) obtidas por fusão de protoplastos..... 79

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus*, pertencente à família Rutaceae, é originário das regiões tropicais e subtropicais do sudeste asiático. Dentre as plantas cítricas destacam-se a laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), as tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex. Tan., *C. tangerina* hort. ex. Tan) e os limões (*C.limon* L. Burm, f.).

O Brasil possui condição privilegiada quanto às características edafoclimáticas, assim como, quanto aos recursos genéticos do gênero. Desse modo, há mais de cem anos a citricultura é praticada no país e atualmente emprega diretamente 400 mil pessoas, constituindo a principal atividade econômica de mais de 440 municípios paulistas e do Triângulo Mineiro, movimentando valores superiores a US$ 1 bilhão anuais. Portanto, associado às boas condições climáticas de cultivo, a citricultura nacional está consolidada na estrutura sócio-econômica, como um importante segmento agroindustrial do país, sendo cultivada em praticamente todas as regiões, com supremacia dos estados de São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais (BOTEON; NEVES, 2005; IBGE, 2009).

Dentre as variedades copas empregadas em plantios comerciais as laranjas doces se sobressaem em comparação aos demais grupos. Na maioria dos países citrícolas, as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck) apresentam maior expressividade com aproximadamente, dois terços dos plantios, seguido por tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos (POMPEU JUNIOR, 2001). A laranja doce ‘Pêra’ é a principal variedade produzida no Brasil, representando 40% do total produzido da espécie. Altamente produtiva, assim como a variedade ‘Pêra’, a laranja doce ‘Westin’ apresenta baixo número de sementes e é muito bem aceita nos mercados interno e externo de fruta fresca e indústria (LARANJEIRA; POMPEU JUNIOR, 2002). As tangerinas (C. reticulata Blanco, *C. clementina* hort. ex. Tan., *C. tangerina* hort. ex. Tan.) e seus híbridos, por sua vez, formam um grupo bastante diversificado, porém, apenas um número restrito é cultivado comercialmente em larga escala, pois apresentam curto período de maturação, abundância de sementes e são plantas muito suscetíveis à colheita. Além da tangerina ‘Ponkan’ e do tangor ‘Murcott’, principais espécies comercializadas, algumas variedades e híbridos de tangerinas estão sendo avaliados

comercialmente e ganhando espaço no mercado de citros, dentre os quais, destacam-se a clementina ‘Nules’ (*C. clementina* hort. ex Tan), uma variedade com baixíssimo número ou sem sementes; o híbrido tangerina ‘Fremont’ (*C. clementina* hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), que apresenta excelente produtividade; a tangerina ‘Thomas’ (*C. reticulata* Blanco), considerada uma variedade promissora para exportação que apresenta frutos com sabor desejável ao consumidor estrangeiro; e o híbrido interespecífico tangelo ‘Nova’ (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.), o qual apresenta frutos bastante saborosos, com alto potencial de consumo em países como Espanha, Estados Unidos e Israel (SAUNT, 1990; PIO, 2003).

Entretanto, a cultura de citros é alvo constante de inúmeras pragas e doenças que prejudicam vertiginosamente a produtividade e a qualidade dos frutos. Dentre as doenças destacam-se a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*), o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), a gomose de Phytophthora (*Phytophthora nicotianae*), o declínio dos citros, a clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), a Rubelose (*Erythricium salmonicolor*), a leprose dos citros, a morte súbita dos citros (MSC) e a pinta preta (*Guignardia citricarpa*). Mais recentemente, outra doença se tornou uma grande ameaça aos pomares, o huanglongbing (ex-greening), cujo agente causal é a bactéria *Candidatus* Liberibacter spp. a qual se desenvolve no floema, obstruindo-o e impedindo a distribuição da seiva (FUNDECITRUS, 2010). Além destas, a mancha-marrom de Alternaria encontra-se presente em diversos países produtores de citros e vem se disseminando no mundo nos últimos anos, comprometendo, sobretudo, os pomares de tangerinas e seus híbridos (TIMMER et al., 1998; PERES; AGOSTINI; TIMMER, 2003).

O melhoramento genético de plantas com interesse agronômico visa fundamentalmente obter variedades capazes de reunir características como resistência a fatores bióticos ou abióticos e elevada produtividade. No caso dos citros, o melhoramento genético é voltado para o desenvolvimento de novas variedades copa e de porta-enxerto (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005). Porém, existem obstáculos enfrentados pelos programas de melhoramento convencional, via hibridação sexual, como a apomixia, o longo período de juvenilidade, a poliembrionia, incompatibilidade,

esterilidade sexual e alta heterozigose (CRISTOFANI; MACHADO, GRATTAPAGLIA, 1999).

Com o advento e a incorporação de novas tecnologias com o intuito de superar estas dificuldades, ferramentas como a hibridação somática e a transformação genética tornaram-se importantes aos programas de melhoramento visando à produção de novas variedades com características agronômicas desejáveis (COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003). A hibridação somática consiste num processo aditivo de protoplastos produzindo híbridos alotetraplóides (GMITTER JUNIOR; GROSSER; MOORE, 1992) da maioria das combinações genitoras complementares desejáveis e sem perda significativa do vigor.

Neste sentido, buscou-se a obtenção de híbridos somáticos via fusão química de protoplastos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 'Pêra' e 'Westin' com a tangerina 'Fremont' (*C. clementina* hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), 'Thomas' (*C. reticulata* Blanco) e 'Nules' (*C. clementina* hort. ex Tan), e o tangelo 'Nova' (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) para a obtenção de genitores tetraplóide, com herança genética qualificada à produção de frutos (cultivar-copa) e à resistência a doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os *Citrus*

2.1.1 Origem e aspectos gerais

As plantas cítricas pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, a qual é subdividida nas tribos Clauseneae e Citreae. A tribo Citreae apresenta a subtribo Citrinae, a qual possui 13 gêneros e 65 espécies, com as principais espécies de interesse comercial, como as do gênero *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (SWINGLE; REECE, 1967; NICOLOSI, 2007).

Devido à grande complexidade do grupo dos citros, os sistemas de classificação comumente utilizados na sistemática ainda apresentam problemas na identificação e na conceituação de espécie. Parte da complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* está associada a peculiaridades de sua biologia reprodutiva e a sua ampla história de cultivo. Além do mais, as espécies que compõem o gênero apresentam alto grau de compatibilidade intergenérica e interespecífica (SWINGLE; REECE, 1967). Contudo, o sistema de classificação mais adotado reconhece 16 espécies, dentre as quais estão as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex. Tan., *C. tangerina* hort. ex. Tan) e limões (*C. limon* L. Burm, f.) (SWINGLE, 1943; SWINGLE; REECE, 1967).

O gênero Citrus possui ampla diversidade genética e sua estrutura pode diferir de modo significativo, a qual pode apresentar diferentes níveis de variabilidade intraespecífica e de heterosigozidade (HERRERO et al., 1996). Entre as espécies, de acordo com estudos moleculares de Fang e Roose (1997), o grupo das tangerinas é aquele que possui à maior diversidade genética, enquanto que outros representantes do subgênero *Citrus*, como os pomelos (*C. paradisi* Macf.), as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck), os limões (*C. limon* L. Burm, f.) e as limas (*C. aurantiifolia* Christm. Swingle), apresentam menor variabilidade genética, em decorrência da alta seleção artificial imposta e da propagação vegetativa realizada durante a história de cultivo.

A origem e a distribuição das diversas espécies cítricas cultivadas em todo mundo foram investigadas e relatadas por diversos autores (SWINGLE; REECE, 1967; WEBBER; REUTHER; LAWTON, 1967; SCORA, 1975; CHAPOT, 1975; SOOST; CAMERON, 1975; BARRETT, RHODES, 1976). Com base nesses estudos, acredita-se que a origem do grupo ocorreu em torno de 20 a 30 milhões de anos, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago Malaio, englobando assim o Sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do Centro da China ao Japão, e do Leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical. Dessa forma, acredita-se que especificamente a tangerina (*C. reticulata* Blanco) e a laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck), sejam nativas da Indochina e do Sul da China, com possível extensão até o Sul da Indonésia.

Quanto à morfologia, as plantas do gênero *Citrus* apresentam porte médio (arbóreo/arbustivo); flores brancas, aromáticas e com ovário apoiado sobre o disco floral (nectário); glândulas de óleo; e manchas transparentes nas folhas. Os frutos são globosos, tipo baga, contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial, com epicarpo de coloração verde, amarela ou laranja, dotado com glândulas de óleos essenciais (SWINGLE; REECE, 1967).

2.1.2 Complexidade do gênero

A maioria das espécies do gênero *Citrus* apresenta características complexas quanto a sua constituição genética, embriologia, fisiologia de desenvolvimento e biologia reprodutiva, as quais são intensamente estudadas nos programas de melhoramento das espécies de alto interesse agronômico.

Em contraste com a maioria das famílias e demais tribos da família Rutaceae, a subfamília Aurantioideae apresenta um conjunto básico cromossômico x = 9 (número básico estável e uma estrutura nuclear interfásica quase uniforme), sendo que a condição mais freqüente do gênero *Citrus* é a diploidia (2n = 2x = 18), tendo sido relatado indivíduos triplóides e tetraplóides naturais, como por exemplo, a lima ácida ‘Tahiti' (2n = 3x = 27) (ARAÚJO et al., 2005). É importante ressaltar que a notável capacidade de hibridação natural, em sua maioria interespecífica, está intimamente

associada à alta estabilidade do cariótipo das células em Aurantioideae (GUERRA, 2000). Embora a condição mais corriqueira seja a diploidia, há registros sobre indivíduos euplóides nos citros, representados por monoplóides, diplóides, triplóides, tetraplóides, pentaplóides e octoplóides (ESEN; SOOST, 1973; LEE, 1988). Os poliplóides de origem somática são classificados como autopoliplóides ou “poliplóides espontâneos” obtidos por processos naturais, como mutações de gemas e embriogênese nucelar (LEE, 1988), ou artificialmente, por meio de colchicina (JASKANI et al., 1996) e cultura de tecidos (STARRANTINO; RECUPERO, 1981). Quanto ao aspecto morfo-fisiológico das plantas tetraplóides (2n = 4x = 36), é relatado que suas folhas apresentam maior espessura e largura, além de uma tonalidade mais escura; o crescimento é mais lento; as brotações são mais vigorosas; apresentam menor número de sementes e relação embrião/semente inferior; atraso no florescimento e menor frutificação. Ainda, somam-se a essas características a sutil redução do porte, além de produzirem plantas menos eretas e mais compactas (MOREIRA; PIO, 1991).

Apesar de reunirem certas características indesejáveis sob o ponto de vista agronômico, as plantas tetraplóides são muito valiosas para o melhoramento, uma vez que, em cruzamento com diplóides, podem produzir variedades triplóides sem sementes, além da aplicação direta como porta-enxertos nanicantes (OLLITRAUT; MICHAUX-FERRIERE, 1992). Antigamente, a estratégia de produção de indivíduos triplóides por retrocruzamento era limitada em conseqüência da raridade de genótipos tetraplóides, os quais podem surgir espontaneamente na natureza, pela duplicação dos cromossomos nas células que dariam origem aos embriões nucelares. Todavia, a técnica de cultura de tecidos e, sobretudo, a hibridação somática tem-se mostrado bastante eficaz para a obtenção de poliplóides (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Além da poliploidia, outros fatores significativos no que se refere à biologia reprodutiva dos citros são a apomixia nucelar, descrita como um processo de reprodução assexual, no qual são originados embriões a partir de células pertencentes ao tecido do óvulo, não ocorrendo assim, a fusão de gametas; e a poliembrionia, que se refere à presença de mais de um embrião nas sementes, podendo ser de origem apomítica (nucelar) ou zigótica (BACCHI, 1944). A apomixia é distinta da embriogênese somática comum por ocorrer dentro de uma estrutura especializada, derivando de um

tecido localizado dentro ou próximo do gametófito feminino. Dessa forma, as plantas desenvolvidas a partir de embriões nucelares apresentam identidade genética completa com a planta-mãe, não havendo a redução meiótica durante a formação do embrião (KOLTUNOW, 1993), sendo um mecanismo de fixação de variabilidade genética (FROST, 1943; FROST; SOOST, 1968; KOLTUNOW, 1993). Além disso, nos citros, o surgimento do embrião apomítico ou nucelar é associado a uma estratégia interessante da espécie para superar problemas de incompatibilidade pós-zigótica (KOLTUNOW, 1993). Por apresentar um padrão de desenvolvimento idêntico ao do embrião sexual, fato este que prejudica a identificação e seleção de embriões, a apomixia é tratada como um dos grandes problemas enfrentados no melhoramento genético de citros via hibridação sexual, além do mais, nas sementes, os embriões nucelares concorrem por nutrientes e espaço com os embriões zigóticos (BRUCK; WALKER, 1985). Por outro lado, a poliembrionia é muito interessante para o sistema de produção de porta-enxertos e horticulturalmente vantajosa, devido à fidelidade genética da planta mãe, uniformidade de produção e facilidade de condução no viveiro (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Além das características acima citadas, o longo período juvenil ou juvenilidade, muito acentuado principalmente em laranja doce, enquadra-se em mais uma dificuldade para o melhoramento do gênero, pois promove, além da incapacidade de florescimento, uma morfologia angular do caule e folhas, altas taxas de crescimento, abundância de espinhos que variam em tamanho, crescimento vertical vigoroso, frutos mais alongados e com baixo conteúdo de suco (FROST, 1943; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Dentre outros fatores, a heterozigose elevada, caracterizada como medida indireta do grau da natureza híbrida de uma espécie e pode ser causada por mutação gênica freqüente, polinização cruzada e embrionia nucelar (MACHADO et al., 2005); e a auto-incompatibilidade, caracterizada pelo desenvolvimento de frutos sem sementes e não havendo, portanto, a fecundação cruzada (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), também representam importantes barreiras a serem superadas pelos programas de melhoramento de citros.

2.1.3 A citricultura no Brasil

Há mais de cem anos a citricultura é praticada no Brasil, porém, a indústria dos citros tornou-se importante somente a partir da década de 60, no momento em que a produção voltou-se para o mercado internacional com a exportação de suco de laranja. Atualmente, o país é o maior produtor mundial de laranja e o maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado (FCOJ – Frozen Concentrated Orange Juice), sendo esta cultura a principal responsável pelo crescimento da fruticultura brasileira (FAO, 2010; IBGE, 2009). Apesar de o FCOJ ser o principal produto da laranja, vários subprodutos, com valor comercial, são obtidos durante o processamento, tais como os óleos essenciais, d'limonene, terpenos, líquidos aromáticos e farelo de polpa cítrica (AGRIANUAL, 2010).

Hoje, a citricultura emprega diretamente 400 mil pessoas, e constitui a principal atividade econômica de mais de 440 municípios paulistas e do Triângulo Mineiro, movimentando valores superiores a US$ 1 bilhão anuais, gerando assim, um PIB equivalente a US$ 5 bilhões. Portanto, associado às boas condições climáticas de cultivo, a citricultura nacional está consolidada na estrutura sócio-econômica, como um importante segmento agroindustrial do país, sendo cultivada em praticamente todas as regiões, com supremacia dos estados de São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais (BOTEON; NEVES, 2005; IBGE, 2009). Na safra terminada em junho de 2009, a produção brasileira de laranja atingiu 18,5 milhões de toneladas numa área colhida total de 840 mil hectares. O preço médio da caixa de 40,8 kg de laranja ‘Pêra’ destinada à indústria foi de R$ 7,71 (AGRIANUAL, 2010).

Por dispor de um parque industrial voltado ao mercado externo de suco e a proximidade das metrópoles nacionais de maior poder aquisitivo, o estado de São Paulo é o principal produtor nacional de citros, concentrando em torno de 88% da produção nacional, totalizando 690 mil hectares, somando cerca de 230 milhões de pés. Com 98% da matéria prima do suco produzido e 97% das vendas externas da bebida do Brasil, o estado possui ainda o maior pomar do mundo e é também o primeiro produtor e exportador mundial de suco de laranja, seguido por Estados Unidos, União Européia e China (FUNDECITRUS, 2010; AGRIANUAL, 2010).

Muito aquém da produção de laranja, mesmo com o crescimento do consumo de frutos de tangerina, a produção nacional de tangerinas e seus híbridos somam apenas 1,2 milhão de toneladas em 2007. A China, com 17 milhões de toneladas, ocupa o primeiro lugar na produção mundial de tangerinas (FAO, 2010; AGRIANUAL, 2010).

2.1.4 Melhoramento genético

O melhoramento genético de plantas com interesse agronômico visa fundamentalmente obter variedades capazes de reunir características como resistência a fatores bióticos ou abióticos, associados a condições de adaptação e elevada produtividade. No caso dos citros, o melhoramento genético é voltado para o desenvolvimento de novas variedades copa e de porta-enxerto (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005).

Para variedades copa, o melhoramento concentra-se na produtividade, adaptações a condições climáticas adversas e condições de solo, bem como, na qualidade e características do fruto (aspecto externo, tamanho e forma, qualidade e quantidade do suco, sabor, coloração, sólidos solúveis, acidez desejável e número de sementes) e na resistência a patógenos (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1978). Já no melhoramento de variedades porta-enxerto, o objetivo dos programas visa à resistência a pragas e doenças, a tolerância a adversidades climáticas, diminuição do porte, maior sincronismo entre copa/porta-enxerto e qualidade dos frutos (GROSSER et al., 1998).

No entanto, apesar das espécies cítricas apresentarem uma grande variabilidade genética, o melhoramento genético tradicional, tanto de porta-enxerto quanto de copa, tem apresentado limitações quanto à obtenção de novas variedades, devido à descontinuidade dos programas estabelecidos e também por fatores biológicos que dificultam o melhoramento genético e a seleção de variedades (SOOST; CAMERON, 1975; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Um dos maiores obstáculos enfrentados pelos programas de melhoramento convencional, via hibridação sexual, em citros é a apomixia, também conhecida como embrionia nucelar, na qual, embriões nucelares (clones maternos) competem por espaço e nutrientes com o embrião zigótico, causando a perda do mesmo ou, muitas

vezes, dificuldade de sua identificação perante aos demais embriões nucelares (MEDINA FILHO et al., 1991; CRISTOFANI; MACHADO, GRATTAPAGLIA, 1999). Além disso, características intrínsecas ao gênero também representam dificuldades aos programas de melhoramento em citros como: longo período juvenil (SOOST; CAMERON, 1975), alta heterozigose (BARRET; RHODES, 1976), poliploidia (CRISTOFANI; MACHADO, GRATTAPAGLIA, 1999), esterilidade do grão de pólen e do óvulo e incompatibilidade sexual (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; LING; NITO; IWAMASA, 1989; VARDI; GALUN, 1989). Assim, a transposição destas adversidades é imprescindível para a manutenção da liderança brasileira na produção mundial.

Com o desenvolvimento e a incorporação de novas tecnologias, tais como a biologia molecular e a cultura de tecidos, é possível superar as barreiras impostas pelas características genéticas e reprodutivas inerentes ao citros. Assim, a hibridação somática e a transformação genética tornaram-se ferramentas notáveis e fundamentais para o melhoramento genético por meio da produção de novas variedades com características agronômicas desejáveis, contribuindo significativamente com as pesquisas, visando superar as limitações encontradas no melhoramento tradicional e aproveitar a grande variabilidade genética disponível (MENDES et al., 2002; COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003). Desse modo, programas de melhoramento que unam os métodos tradicionais juntamente com as novas biotecnologias serão capazes de identificar novas variedades copa e porta-enxerto que possuam complexas combinações de características, otimizando assim todos os recursos do processo produtivo citrícola (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; MACHADO et al. 2005).

2.2 Hibridação somática

A hibridação somática consiste num processo aditivo de protoplastos produzindo híbridos alotetraplóides (GMITTER JUNIOR; GROSSER; MOORE, 1992) e tem sido uma ferramenta efetiva e consolidada no melhoramento genético de espécies economicamente importantes como a batata, trigo, arroz e citros (JOHNSON; VEILLEUX, 2001). A técnica permite combinar genitores com características complementares, sem perda significativa do vigor, resultando na expressão aditiva das

características dominantes no híbrido, este muitas vezes não pode ser obtido através do método de melhoramento convencional. Possibilita, também, a utilização de clones estéreis nos esquemas de melhoramento, a transposição da incompatibilidade de cruzamento na obtenção de formas híbridas, previamente impossíveis entre espécies e gêneros, bem como, a diversificação de genótipos tetraplóides e a síntese direta de híbridos triplóides pela fusão de protoplastos haplóides e diplóides. Conseqüentemente, os novos genótipos gerados são potencialmente valiosos para a ampliação da base genética e no melhoramento de variedades porta-enxerto e copa de citros (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005; CAI et al., 2007; AN et al., 2008).

Além disso, entre as principais vantagens da obtenção de híbridos somáticos interespecíficos e intergenéricos de citros, destaca-se o fato de que os híbridos produzidos mantêm integralmente a complexa combinação genética de ambos os pais. Devido ao fato de não existir segregação meiótica na hibridação somática, os genes recessivos deletérios existentes nos pais, permanecem mascarados nos híbridos somáticos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

2.2.1 Histórico da hibridação somática

O primeiro registro de estudos de cultura de tecidos *in vitro* envolvendo a regeneração de plantas cítricas, foi no início da década de 70, na produção de calos embriogênicos, a partir do cultivo de óvulos de laranja doce ‘Shamouti’ (*C. sinensis* L. Osbeck) (KOCHBA; SPIEGEL-ROY; SAFRAN, 1972). Em seguida, o primeiro trabalho utilizando protoplastos isolados de citros foi realizado, os quais se demonstraram totipotentes e permitiram a obtenção de calos e o desenvolvimento de embriões somáticos (VARDI; SPIEGEL-ROY; GALUN, 1975). Tais resultados constituíram a base de estudos e, a partir de então, tornaram-se o ponto de partida para numerosos trabalhos de regeneração de plantas do gênero *Citrus* e outros da subfamília Aurantioideae a partir de protoplastos, dentre os quais, destacam-se: Vardi; Hutchison e Galun (1986); Kobayashi; Uchimiya e Ikeda, (1983); Kobayashi et al. (1988); Hidaka e Kajiura (1988); Sim; Loh e Goh (1988); Ling et. al. (1990); Tusa; Grosser e Gmitter Junior (1990) e Kunitake; Kagami e Mii (1991).

A produção de híbridos somáticos intergenéricos via fusão de protoplastos foi realizada inicialmente por Melchers; Sacristan e Holder (1978) que, após sucessivos testes quanto à composição de soluções e meios de cultivo, viabilizou a fusão de protoplastos de batata e tomate. Em seguida, o primeiro exemplo de híbrido somático entre o gênero *Citrus* com outro gênero sexualmente compatível, o *Poncirus*, por fusão de protoplastos, foi obtido por Ohgawara et. al. (1985).

Com o estabelecimento da técnica, diversos países iniciaram projetos para a produção de híbridos somáticos de *Citrus* e, sobretudo no Japão, com os trabalhos descritos por Kobayashi e Ohgawara (1988) e Kobayashi et. al. (1988), bem como nos Estados Unidos por Grosser e Gmitter Junior (1990), foram regenerados híbridos somáticos resultantes das combinações de laranja doce 'Washington (*C. sinensis* L. Osbeck) com tangerina 'Satsuma' cv. Hayashi (*C. unshiu*), o qual é considerado o primeiro híbrido interespecífico regenerado via fusão de protoplastos do gênero *Citrus*, laranja doce 'Hamlin' (*C. sinensis* L. Osbeck) com *Citropsis gilletiana* e tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reticulata* Blanco) com *C. gilletiana*.

Através da fusão de protoplastos, Grosser; Ollitraut e Olivares-Fuster (1992) e Grosser et al. (1994) contribuíram ainda mais para a produção de importantes híbridos somáticos empregados em programas de melhoramento de citros, como: laranja doce 'Hamlin' (*C. sinensis* L. Osbeck) com *Severina buxifolia* (Poir.) Tenore; tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reticulata* Blanco) com *Poncirus trifoliata* cv. 'Flying Dragon'; tangerina 'Cleópatra' (*C. reticulata* Blanco) com citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *P. trifoliata*); laranja doce 'Valência' (*C. sinensis* L. Osbeck) com limão 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush); laranja doce 'Hamlin' (*C. sinensis* L. Osbeck) com limão 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush); pomelo 'Thompson' (*C. paradisi* Macf.) com tangor 'Murcote' (*C. sinensis* L. Osbeck x *C. reticulata* Blanco); tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reticulata* Blanco) com *P. trifoliata* cv. Argentine; laranja 'Succari' (*C. sinensis* L. Osbeck) com *P. trifoliata* cv. Argentine; laranja Azeda (*C. aurantium)* com limão Cravo (*C. limonia* L. Osbeck); e 'limão Milam' (*C. jambhiri* x *C. sinensis* L. Osbeck) com tangerina 'Sun Chu Sha' (*C. reticulata* Blanco).

Nas últimas duas décadas, um impressionante progresso foi feito quanto à hibridação somática de citros, e mais de 250 híbridos intergenéricos e interespecíficos

foram produzidos para uso direto como variedades porta-enxerto e copa (GUO et al., 2004; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

Há mais de uma década, o Brasil ocupa posição de destaque no tocante ao melhoramento genético de citros por meio da híbridação somática entre genitores de gêneros ou espécies diferentes. No Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do CENA/USP, e no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, da ESALQ/USP, já foram produzidos híbridos de tangerina ‘Cleópatra’ com laranja azeda (BENEDITO, 1999), laranja ‘Caipira’ com limão ‘Cravo’ (MENDES-DA-GLÓRIA; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000), laranja ‘Caipira’ com tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ com limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ com limão ‘Rugoso da Flórida’, limão ‘Cravo’ com laranja azeda (MENDES et al., 2001), tangerina ‘Cleópatra’ com limão ‘Volkameriano’, limão ‘Cravo’ com tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Valência Ruby Blood’ com limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Valência Rohde Red’ com limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Valência’ cv. 63 com *Fortunella obovata* (COSTA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2003), laranja ‘Hamlin’ com pomelo ‘Indian red’, laranja ‘Hamlin’ com pomelo ‘Singapura’ (CALIXTO et al., 2004), e laranja doce ‘Hamlin’ com mexerica ‘Montenegrina’ (PAVAN, 2006), os quais se encontram em avaliação de campo para as características agronômicas e resistência a doenças.

2.2.2 A fusão de protoplastos

Considerado um estado celular transitório obtido em condições laboratoriais, protoplastos são células desprovidas de parede celular, propriedade que as tornam úteis em estudos de transferência gênica, extração de organelas e também no processo de obtenção de híbridos somáticos, em virtude da conservação completa das potencialidades das células vegetais (FUNGARO; VIEIRA, 1989). Desse modo, os protoplastos vêm sendo utilizados com freqüência em programas de melhoramento genético de espécies de interesse agronômico (CARNEIRO et al., 1998). No caso de espécies cítricas, o isolamento tem sido realizado a partir de calos (VARDI; SPIEGEL-ROY; GALUN, 1975; KOBAYASHI; UCHIMIYA; IKEDA, 1983), de cultura de células em suspensão (KOBAYASHI; IKEDA; UCHIMIYA, 1985; GROSSER; GMITTER JUNIOR,

1990), e de cotilédones (BURGER; HACKETT, 1982). Protoplastos também tem sido isolados de folhas (GROSSER; CHANDLER, 1987), que apesar de não serem embriogênicos, são úteis juntamente adicionados com protoplastos de calos ou células em suspensão, para o monitoramento visual da ocorrência de heterocariontes (GROSSER; CHANDLER, 1987).

A fusão de protoplastos constitui-se em nova e viável alternativa no melhoramento de citros, aplicada tanto em programas de melhoramento de cultivares copa quanto de porta-enxertos, que agrega integralmente os dois genomas genitores, assim como suas respectivas organelas citoplasmáticas (BINSFELD, 1999), fenômeno este que pode promover à produção de anfidiplóides, a superação de incompatibilidades sexuais, a transferência de parte do genoma de uma espécie para outra, permitindo a produção de plantas resistentes a pragas e doenças ou a estresses abióticos (LIU; XU; DENG, 2005).

A respeito do melhoramento de variedades copa, com base na qualidade dos frutos relatada por Guo et al. (2004) e também por Grosser e Gmitter Junior (2005; 2010), os híbridos somáticos tetraplóides podem ser empregados diretamente como copa, assim como, utilizados em programas de melhoramento no papel de genitor tetraplóide (2n = 4x = 36) em cruzamentos com indivíduos diplóides (2n = 2x = 18) gerando uma progênie triplóide (2n = 3x = 27), esta última, de extremo interesse sob o ponto de vista agronômico devido à produção de frutos sem sementes (MOURÃO FILHO; GMITTER JUNIOR; GROSSER, 1996). De acordo com Gmitter Junior; Grosser e Moore (1992), a fusão de protoplastos pode produzir híbridos somáticos potencialmente capazes de gerar variedades superiores que apresentem características complementares, contemplando as qualidades dos seus genitores, sem que ocorra segregação genética. A técnica já é conhecida e bem sucedida em programas de melhoramento de citros nos Estados Unidos, França, Itália, Israel, Japão, China e Brasil (OHGAWARA et. al., 1985; VARDI; GALUN, 1989; GROSSER; OLLITRAUT; OLIVARES-FUSTER, 2000; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010; BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000; MENDES et al., 2001).

Na hibridação somática de citros utiliza-se necessariamente protoplastos isolados de calos e suspensões celulares com propriedade embriogênica e capacidade

de regeneração, o que limita o grupo de material disponível, juntamente com protoplastos provenientes do mesofilo foliar. Diversos fatores tais como o genótipo, estado fisiológico das células, fonte de tecidos, tipo e concentração de enzimas e estabilizadores osmóticos, meios de cultura, tempo de incubação na solução enzimática, agitação, luminosidade e temperatura influenciam a viabilidade dos protoplastos e estão ligados à eficiência do isolamento. Assim, os protocolos para o isolamento de protoplastos a partir de calos e folhas devem ser estudados e maximizados para que os mesmos expressem sua totipotência e se desenvolvam em plantas férteis, pois os fatores biológicos considerados podem variar de espécie para espécie e até mesmo de variedade para variedade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010; KUNITAKE; MII, 1995; CARNEIRO et al., 1998; COSTA, 2001; DAVEY et al., 2005).

Conforme descrito por Binsfeld (1999) a eficiência da produção de híbridos somáticos por fusão de protoplastos depende do sucesso de quatro estágios seqüenciais: 1) isolamento e cultura de protoplastos; 2) indução de fusão de protoplastos com alta freqüência e sem perda de viabilidade; 3) regeneração do material vegetal; e 4) confirmação de obtenção do híbrido ou cíbrido.

Os protoplastos diplóides empregados na técnica geralmente seguem o modelo da fusão de células de calos embriogênicos com células derivadas do mesofilo foliar, com protocolo bem estabelecido para o gênero *Citrus* (GROSSER; OLLITRAUT; OLIVARES-FUSTER, 2000).

No processo de obtenção de protoplastos, a digestão da parede celular e o estabelecimento da condição de recém isolamento são realizados por soluções enzimáticas constituídas de celulases e pectoliases, juntamente com estabilizadores osmóticos (manitol, sorbitol, sacarose, glicose, galactose e celobiose) e estabilizadores de membrana (cálcio e fósforo), sendo o método mais usado para degradação da parede celular (CARNEIRO et al., 1998).

O processo de fusão propriamente dito é resultante de tratamentos químicos ou físicos comuns. A membrana plasmática dos protoplastos, após a etapa de isolamento, possui carga elétrica negativa e, no caso da fusão química, para induzir o contato íntimo entre as membranas plasmáticas, é necessário a neutralização das cargas da

superfície por meio de soluções de pH elevado ou pelo uso de policátions, como o polietilenoglicol (PEG), o qual é extensivamente empregado em muitos laboratórios como agente aglutinador e tem se mostrado um método simples, eficiente, e não interfere na viabilidade do protoplasto (MOURÃO FILHO, GMITTER JUNIOR; GROSSER, 1996; BINSFELD, 1999). Por sua vez, o método físico consiste na aplicação de um campo de corrente alternada, de baixa voltagem e a subseqüente aplicação de um ou mais pulsos de corrente contínua de alta intensidade, gerando poros temporários nas membranas e conseqüentemente a fusão entre os protoplastos sob contato (CARNEIRO et al., 1998; COSTA, 2001). Contudo, métodos mais refinados, como a fusão eletroquímica, aliaram os dois procedimentos através da indução química via PEG, juntamente à aplicação de pulsos de corrente elétrica com o intuito de desestabilizar, entrelaçar e realizar a fusão das membranas dos protoplastos (OLIVARES-FUSTER; DURAN-VILA; NAVARRO, 2005).

Após o processo, três resultados são possíveis: a fusão completa dos núcleos de ambos os genitores ou cariogamia (híbrido completo ou simétrico); a perda cromossômica de um ou de ambos os núcleos (híbrido assimétrico); e a perda total do núcleo de um dos genitores (cíbrido) (BENGOCHEA; DODDS, 1986). Segundo Guo et al. (2000), grande parte das plantas de *Citrus* regeneradas em experimentos de fusão com células somáticas geralmente apresentam cariogamia, o que denota o grande vigor e alta capacidade embriogênica e de regeneração do híbrido somático.

2.2.3 Regeneração de plantas

Os protoplastos são cultivados na densidade final recomendada equivalente a 2.10^5 protoplastos.mL^{-1} em meio de cultura que induz a formação de uma nova parede celular e, em seguida, a divisão celular e a regeneração de plantas. Necessariamente, um dos genitores deve apresentar alto potencial embriogênico, permitindo assim que a formação de embriões ocorra espontaneamente logo após a fusão (CARNEIRO et al., 1998; MENDES-DA-GLÓRIA; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000). Após o plaqueamento dos protoplastos fusionados, é necessário oferecer condições ambientais para que se inicie o processo de regeneração a partir da unidade celular.

Os tecidos vegetais cultivados *in vitro* possuem capacidade para formar gemas, raízes ou embriões somáticos. Gmitter Junior; Grosser e More (1992) relatam que a regeneração de plantas, via organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro*, é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento de espécies cítricas.

A embriogênese somática consiste na regeneração de plantas no cultivo *in vitro*, na qual células somáticas ou haplóides desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos, formando estruturas e padrões de desenvolvimento semelhantes a embriões zigóticos, sem que haja fusão de gametas. Este sistema é baseado na capacidade dos calos, massas de células em diferentes estágios de diferenciação que podem ser induzidos e diferenciados de acordo com o estímulo ambiental e/ou químico, em adquirir novas competências morfogenéticas, dentre as quais, o potencial embriogênico para regeneração de plantas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; FIORE et al., 2002).

Para favorecer a cultura de protoplastos e a formação de microcolônias de citros, Grosser e Chandler (1987) e Costa (2001) recomendam o meio BH3, o qual apresenta uma composição bastante complexa, contendo um grande número de vitaminas, açúcares e ácidos orgânicos. No tocante ao cultivo dos microcalos, calos e embriões somáticos, os meios de cultura utilizados na regeneração são baseados nas formulações dos meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969); bem como os de formulações derivadas do MT, como os meios de cultura EME, 1500 e B+ (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

A embriogênese somática é altamente dependente da composição do meio de cultura, principalmente dos reguladores de crescimento e das fontes de carboidratos, sendo a sacarose a mais comumente utilizada. O cultivo das microcolônias, microcalos e calos no processo de regeneração de citros deve ser otimizado para cada variedade em estudo (KOCHBA et al., 1982). É importante salientar que dificulades na regeneração de plantas cítricas por embriogênese somática podem ocorrer devido ao surgimento de embriões somáticos com desenvolvimento anormal (embriões assimétricos), e morfologicamente mal-formados (MENDES-DA-GLÓRIA; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000).

Entretanto, mesmo após a regeneração e obtenção de plantas, os híbridos somáticos podem apresentar flores com desenvolvimento anormal ou não ser férteis, especialmente os que combinam genitores geneticamente distantes. Outra possível conseqüência é a inibição da recombinação genética nos híbridos somáticos, devido ao pareamento preferencial dos cromossomos. Diferentemente da hibridação sexual, a ausência de segregação e recombinação significa que somente uma combinação híbrida pode ser produzida por qualquer par de genitores e, portanto, não será obtida nenhuma variação de caracteres sobre a qual deva ser aplicada uma pressão de seleção (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

2.2.4 Confirmação da hibridação somática

Avaliações morfológicas, citológicas e análises moleculares são normalmente realizadas nas plantas após a aclimatização, com 8 a 18 meses após a fusão de protoplastos. Muitos métodos foram desenvolvidos para a confirmação da hibridação somática de *Citrus*, incluindo análises comparativas da morfologia vegetativa das plantas regeneradas, quantificação da ploidia por citometria de fluxo e, principalmente, testes de paternidade utilizando marcadores moleculares (RFLP, RAPD e SSR) (GROSSER et al., 1996; OLLITRAULT et al., 1996). Associações de diferentes técnicas são comuns, pois eles não podem confirmar definitivamente a natureza híbrida das plântulas obtidas a partir de experiências de fusão de protoplastos.

De forma geral, os híbridos somáticos apresentam fenótipo similar e intermediário quando comparado aos seus genitores. Características peculiares como a presença e tamanho do pecíolo alado e da lâmina foliar, aumento da espessura do limbo foliar e folhas com coloração mais intensa (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). A morfologia foliar variável, tais como folhas trifolioladas (GROSSER et al., 1998) ou asas do pecíolo (BALLVÉ; MEDINA-FILHO; BORDIGNON, 1997) são comumente usadas como marcadores morfológicos para identificar potenciais híbridos. No entanto, a análise morfológica não garante a ocorrência da hibridação, pois tais diferenças podem ser muito sutis, sobretudo no caso de combinações interespecíficas, sendo assim, um procedimento complementar de avaliação.

Juntamente com a análise morfológica, a quantificação da ploidia é igualmente uma avaliação complementar. A citometria de fluxo é uma técnica confiável que envolve a dispersão da luz e fluorescência de partículas em uma suspensão líquida contendo o DNA da planta híbrida, extraído de folhas, produzindo um histograma com um pico dominante que corresponde aos núcleos que se encontram na fase G_1 do ciclo celular e um pico menor que corresponde aos núcleos na fase G_2. A intensidade relativa da fluorescência é comparada às das plantas diplóides (padrões genitores) (DOLEZEL, 1997). Embora a análise do número de cromossomos seja eficaz e amplamente empregada para a determinação do número total de cromossomos ou nível de ploidia de híbridos, ainda se faz necessária a avaliação molecular para a confirmação da fusão entre ambos os genitores, por se tratar de um processo não dirigido de recombinação aleatória e da grande semelhança entre os cromossomos dos citros (GUERRA, 2000; BINSFELD; SCHNABL, 2002; LIU; DENG, 2002).

Os marcadores moleculares podem ser úteis se o polimorfismo é obtido. Quanto aos marcadores moleculares utilizados para a análise de DNA e confirmação da hibridação, destacam-se o RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), que se baseia na amplificação de DNA, sendo possível detectar polimorfismo em todo o genoma estudado, e o SSR (seqüencias simples repetidas ou microssatélites), o qual compreende seqüências curtas de oligonucleotídeos, com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem, que ocorrem muito freqüentemente em genomas eucariotos, além de altamente distribuídos ao acaso, formando locos genéticos bastante polimórficos (LAGERCRANTZ; ELLEGREN; ANDERSSON, 1993). Ambos são amplamente distribuídos no DNA genômico e as suas regiões podem ser amplificadas individualmente via PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Dessa forma, os marcadores do tipo RAPD e SSR são ferramentas ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, estudos de genética de populações e, sobretudo, para identificação e discriminação de genótipos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.3 Problemas fitossanitários relacionados aos *Citrus*

Apesar da importância do Brasil no cenário econômico mundial de produção de citros, diversos problemas fitossanitários comprometem a sua produtividade, como anormalidades fisiológicas, o surgimento de inúmeras pragas e doenças capazes de causar danos irreversíveis que ameaçam quantitativamente e/ou qualitativamente a produção de frutos e pela ausência de maior número de variedades de copa e porta-enxerto (FUNDECITRUS, 2010).

Dentre as doenças destacam-se a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*), o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora nicotianae*), o declínio dos citros, a clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), a Rubelose (*Erythricium salmonicolor*), a leprose dos citros, a morte súbita dos citros (MSC) e a pinta preta (*Guignardia citricarpa*). Mais recentemente, outra doença se tornou uma grande ameaça aos pomares, o huanglongbing (ex-greening), cujo agente causal é a bactéria *Candidatus* Liberibacter spp. a qual se desenvolve no floema, obstruindo-o e impedindo a distribuição da seiva (FUNDECITRUS, 2010).

Além das doenças acima citadas, a mancha-marrom ou mancha de *Alternaria*, cujo agente causal é o fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. encontra-se presente em diversos países produtores de citros e vem se disseminando no mundo nos últimos anos (TIMMER et al., 1998). As laranjas doces, limas, limões e laranja azeda são resistentes ao fungo em condições normais de cultivo (SOLEIL; KIMCHI, 1997). Porém, nos pomares de tangerinas e híbridos, a doença tem sido considerada a mais séria na atualidade, causando lesões e queda de folhas novas, frutos, ramos e tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento (WHITESIDE, 1976; KOHMOTO et al., 1993; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000; PERES; AGOSTINI; TIMMER, 2003; FUNDECITRUS, 2010). Segundo Peres e Timmer (2005), o controle da doença se baseia principalmente na aplicação fungicidas cúpricos durante os três a quatro meses de suscetibilidade dos frutos após a florada, o que torna a atividade praticamente inviável em decorrência do valor do produto e do alto número de aplicações, podendo chegar a 15 aplicações (TIMMER et al., 2003). Na produção de tangerina

“convencional”, o custo com fungicidas atinge R$1156,29/ha, o que representa cerca de 35% do custo de insumos (AGRIANUAL, 2010).

Entretanto, Reis (2006) relatou que a tangerina ‘Fremont’ (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco) não apresentou respostas sintomáticas à doença, a laranja doce ‘Pêra’ e a lima ácida ‘Tahiti’ também mostraram-se resistentes. Em condições normais de cultivo, as tangerinas ‘Nules’ e ‘Thomas’, bem como a tangerina ‘Cleópatra’ também não apresentaram sintomas à doença (FEICHTENBERGER, 2000; REIS, 2006). Com base nisso, considerou-se a possibilidade do uso dessas variedades como fontes de genótipos genitores em programas de melhoramento genético visando à obtenção de híbridos com características que preservem a resistência à mancha marrom de *Alternaria*, identificada nas variedades estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal, e no Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ambos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), todos situados na cidade de Piracicaba-SP.

3.2 Material vegetal

As fusões de protoplastos foram realizadas com os cultivares de laranja doce ‘Pêra’ e ‘Westin’, como genitor embriogênico, e tangerinas ‘Fremont’, ‘Thomas’, ‘Nules’ e tangelo ‘Nova’, como genitor não embriogênico.

Os calos embriogênicos e suspensões celulares de laranja doce foram obtidos da coleção de calos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, cuja manutenção foi realizada através de subcultivos alternados, nos meios de cultura EME 0,146 M e H+H (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010), suplementados com carvão ativado (500 $mg.L^{-1}$) e isentos de regulador vegetal. Os calos embriogênicos foram subcultivados a cada 30 dias em meio de cultura sólido e incubados no escuro, a 27 ºC. As culturas de células em suspensão foram subcultivadas a cada 14 dias, nos meios de cultura EME 0,146 M e H+H líquidos, e incubadas sob agitação orbital constante (150 rpm), à temperatura de 27 ºC.

Os frutos maduros de tangerina ‘Fremont’, ‘Nules’ e ‘Thomas’ e de tangelo ‘Nova’ e borbulhas de ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nova’ foram cedidos pelo Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"- IAC. Imediatamente após o recebimento do material, procedeu-se a extração das sementes dos frutos, totalizando 140 sementes por cultivar. As sementes foram secas e semeadas em substrato Plantmax® citros em tubetes de 250 mL, em casa-de-vegetação. Após 4 meses, os ‘seedlings’ obtidos foram transferidos para sacos

plásticos de 1 L com o mesmo substrato, porém, suplementado com a incorporação, antes do transplante, de adubo Osmocote® 22-4-8 (N-P-K) na proporção de 2 kg do adubo por metro cúbico de substrato. Em casa-de-vegetação, as borbulhas foram enxertadas em mudas de limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), totalizando 20 enxertos por cultivar. Após 20 dias, foi retirado o fitilho (parafilme) e feita a verificação do pegamento das borbulhas.

As plantas obtidas via semeadura ou enxertia de borbulhas das variedades de tangerinas/tangelo utilizadas como genitores não embriogênicos nos experimentos de fusão de protoplastos, estão sendo submetidas aos tratamentos descritos abaixo:

- podas rasas para renovação foliar, a cada 90 dias;
- adubação granulada: fórmula 22-4-8 (N-P-K; Osmocote®), a cada 60 dias;
- adubação líquida na água de irrigação: fórmula 20-8-8 (N-P-K; 0,8 g L^{-1}; Kristalon® lilás) + nitrato de cálcio (0,8 g L^{-1}) + fórmula 24-8-16 (N-P-K; 0,8 g.L-1; Peters Pofessional Tropical Foliage®), a cada 15 dias; e
- controle fitossanitário do ácaro-branco: aplicação de solução de acaricida Vertimec® 18CE (0,8 mL.L^{-1} de água) + óleo vegetal Stoller do Brasil S/A (8 mL.L-1 de água) a cada 15 dias.

3.3 Hibridação somática

Os protoplastos foram isolados a partir de calos embriogênicos e suspensões celulares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e de mesofilo foliar de plantas de tangerina (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex Tan) e tangelo (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) cultivadas em casa-de-vegetação.

A metodologia empregada no isolamento, fusão, cultura de protoplastos e regeneração de plantas, a partir de células embriogênicas, derivadas de calos ou culturas de suspensões celulares, com protoplastos não-embriogênicos de mesofilo foliar foi descrita por Grosser e Gmitter Junior (1990) e modificado por Mendes-da-Glória; Mourão Filho e Mendes (2000) (Tabela 1).

3.3.1 Isolamento de protoplastos

Para o isolamento de protoplastos, em câmara de fluxo laminar, calos embriogênicos (500 mg) foram transferidos para placas de Petri (58 x 15 mm), contendo 2 mL do meio de cultura BH3 0,7 M e 2 mL da solução enzimática composta por:

- 1% de Cellulase Onozuka R.S. (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.);
- 1% de Macerase R10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.); e
- 0,2% de Pectoliase Y-23 (Seishin).

Para o isolamento de protoplastos de mesofilo foliar, folhas jovens e vigorosas foram coletadas e desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (2%), contendo 3 gotas de detergente neutro ou outro surfactante, por 20 minutos, seguido por 3 lavagens com água destilada estéril em condições assépticas, de 5 minutos cada. Em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de bisturi, foi retirada a nervura central. As folhas finamente fatiadas foram transferidas para frasco tipo Erlenmeyer (250 mL), contendo 5 mL do meio de cultura BH3 0,7 M e 2 mL de solução enzimática descrita acima. O material, tanto de calos quanto de folhas, foi incubado no escuro, por 14 - 16 horas, sob agitação constante (40 rpm).

3.3.2 Purificação, fusão e plaqueamento de protoplastos

A purificação dos protoplastos foi iniciada após 14 - 16 horas de incubação, verificando-se em microscópio óptico invertido a ocorrência de digestão da parede celular. A suspensão de isolamento foi filtrada em peneira de nylon (45 µm) e, em seguida, recolhida em tubo de centrífuga (15 mL). Após a centrifugação (100g, 5 minutos), o sobrenadante foi retirado e descartado. O 'pellet' precipitado foi ressuspendido em 5 mL da solução CPW 25 M (FREASON; POWE; COCKING, 1973), sobre o qual foi adicionado, delicadamente, 3 mL da solução CPW 13 M (FREASON et al., 1973), gerando um gradiente de densidade entre os meios, em decorrência da relação de concentração sacarose/manitol. Após centrifugação (100 g, 8 minutos), as bandas formadas por protoplastos na interface dos meios, de ambos os genitores, foram coletadas com o auxílio da pipeta de Pasteur e transferidas em igual volume para

um novo tubo contendo 5 mL do meio BH3 0,7 M. Após nova centrifugação (100 g, 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e o 'pellet' precipitado foi diluído em meio BH3 0,7 M.

Para a fusão, foram transferidas duas gotas da solução de protoplastos para o centro de uma placa de Petri (58 x 15 mm) descartável, sobre as quais foram adicionadas duas gotas da solução 26,6 mM de polietilenoglicol (PM = 1450) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010). Após a incubação por 8 minutos em ausência de luz, foram adicionadas duas gotas da solução de eluição, formada por 2 mL da solução de lavagem “A”, para cada quatro gotas da solução de lavagem “B” (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010), incubando-se por 12 minutos. Em seguida, foi realizada a tríplice lavagem (10 minutos cada) dos protoplastos com 15 a 20 gotas do meio de cultura BH3 0,7 M.

Os protoplastos foram então plaqueados nos meios de cultura líquido BH3 0,7 M, EME 0,7 M ou na mistura de BH3 0,7 M + EME 0,7 M e incubados no escuro, a 27ºC.

3.3.3 Cultura dos protoplastos e regeneração de plantas

Aos 20 dias de cultivo, foi iniciada a redução da pressão osmótica do meio de cultura pela adição de 10 a 12 gotas da mistura 1:1:1 de BH3 0,7 M: EME 0,6 M: EME 0,146 M (v:v:v) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010). Nos cultivos posteriores, o mesmo volume foi adicionado, no entanto, empregou-se a mistura 1:2 de BH3 0,7 M: EME 0,146 M (v:v) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

Os microcalos desenvolvidos foram transferidos para placas de Petri (100 x 15 mm), contendo meio EME, modificado pela substituição da sacarose por 13 $g.L^{-1}$ (37 mM) de maltose (BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000). O material foi incubado sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a 27 ºC.

Os embriões desenvolvidos no meio EME-Maltose foram transferidos para meio de cultura EME suplementado com sacarose (25 $g.L^{-1}$) e posteriormente para o meio de expansão 1500 (meio EME modificado pela adição de 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de malte) em placas de Petri (100 x 20 mm), sendo subcultivados a cada 15 dias.

Após a germinação do embrião, o material foi transferido para o meio de cultura B+ (meio 1500 modificado pela adição de 0,02 mg.L^{-1} de ácido naftaleno acético, 14,6 mg.L^{-1} de cumarina e 20 mL de água de coco), inicialmente em placas de Petri (100 x 20 mm) e depois transferidos para frasco tipo Magenta (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010). Transcorridos cerca de 20 dias no meio de cultura B+, as plântulas desenvolvidas e alongadas foram transferidas para o meio de cultura de enraizamento RMAN (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010), por 30 dias.

Tabela 1 – Manutenção das culturas de células, calos embriogênicos e plantas *in vitro* provenientes dos experimentos de fusão de protoplastos

CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO	AMBIENTE FÍSICO	ESTÁGIO DA REGENERAÇÃO	MATURAÇÃO	PERÍODO DE INCUBAÇÃO (DIAS)	MEIO DE CULTURA	COMPOSIÇÃO DO MEIO
Escuro	Placa de Petri (58 x 15 mm)	Divisão Celular	Protoplastos	15 - 20	BH3 / BH3+EME / EME	BH3 0,7 / EME 0,7
			Microcolônias	20	1:1:1	BH3 0,7 / EME 0,6 / EME 0,146
		Calogênese	Microcalos	15	1:2	BH3 0,7 / EME 0,146
			Calos	15	1:2	
Luz (Sala de Crescimento)	Placa de Petri (100 x 15 mm)	Embriogênese	Formação do embrião	25	EME Maltose	EME 0,146 + Maltose (13 g.L^{-1})
			Proliferação	15	EME Sacarose	EME 0,146 + Sacarose (30 g.L^{-1})
	Placa de Petri (100 x 20 mm)		Expansão	15	1500	EME 0,146 + Ext. Malte (1,0 g.L^{-1})
	Frascos tipo Magenta		Germinação	15 - 20	B+	1500 + ANA (0,02 mg.L^{-1}) + Cumarina (14,6 mg.L^{-1}) + Água de Coco (20 mL)
			Alongamento / Brotação	15 - 20	B+	
			Enraizamento	30	RMAN	MT + ANA (2,01mg.L^{-1}) + carvão ativado (0,5g.L^{-1})

3.3.4 Aclimatização

As plantas com desenvolvimento monopodial de parte aérea e sistema radicular vigoroso, cultivadas nos meios de cultura B+ e RMAN, foram cuidadosamente aclimatizadas em vasos plásticos (500 mL), contendo substrato estéril (Plantmax® citros) suplementado com a fórmula 22-4-8 (N-P-K; Osmocote®) e sulfato de amônio ($(NH4)_2SO_4$). Os vasos foram cobertos com saco plástico estéril para manutenção de alta umidade relativa.

As plantas em processo de aclimatização foram mantidas, inicialmente, em sala de crescimento, sob condições de luz e temperatura controladas. Para a manutenção de alta umidade relativa no ambiente de aclimatização das plantas, o saco plástico foi umedecido duas a três vezes por dia, sendo retirado por um período de 5 minutos. Ao longo do tempo, gradativamente este período foi aumentado até a completa retirada do saco plástico dos vasos. Finalmente, as plantas totalmente aclimatizadas foram transferidas para casa-de-vegetação.

Numa alternativa ao enraizamento das plantas *in vitro* foram feitas micro-enxertias *in vitro* de brotações desenvolvidas de embriões cultivados no meio de cultura B+ das combinações laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont', laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova', laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Thomas' e laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules', em porta-enxertos citrange 'Carrizo' (*C. sinensis* L. Osbeck. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) germinados *in vitro*. Após 30 dias, com o 'pegamento' da enxertia *in vitro*, as plantas micro-enxertadas com desenvolvimento foliar consistente foram aclimatizadas, seguindo o procedimento descrito acima.

3.4 Confirmação da hibridação somática

A confirmação da hibridação somática foi realizada pela análise morfológica, determinação da ploidia por citometria de fluxo e avaliação molecular por marcadores do tipo microssatélites (sequencias simples repetidas) e RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso).

3.4.1 Análise morfológica das plantas regeneradas

Transcorridos 18 meses após a fusão de protoplastos, foi feita a análise morfológica por meio de comparação das características foliares, como forma e dimensão, coloração, espessura e conformação do pecíolo, dos genitores e da planta aclimatizada obtida.

3.4.2 Determinação da ploidia por citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"- IAC, em Cordeirópolis-SP.

Amostras das plantas obtidas nos experimentos de fusão de protoplastos de laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’, laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Thomas’, laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’ e laranja doce ‘Pêra’ + tangelo ‘Nova’, assim como os padrões de genomas diplóides de laranja doce e tangerina/tangelo (genitores), foram analisadas por citometria de fluxo.

As amostras foram constituídas por segmentos foliares de 1 cm^2 derivados de folhas jovens verdes e vigorosas de cada uma das plantas. Em seguida, em placa de Petri, foi adicionado 100 µL de buffer de extração (CyStain UV Precise – Nuclei Extraction Buffer) e, com o auxílio de bisturi, as amostras foram fragmentadas 100x. Após a divisão, foi adicionado 400 µL de fluorocromo DAPI (CyStain UV Precise – Staining Buffer) e 600 µL de água Milli-Q. O volume total (1100 µL) foi recolhido e filtrado em membrana de nylon (45 µm) presente em cilindro Partec®; e realizada a leitura no citômetro de fluxo (CyFlow - Control UV 100209 Partec®) com a seguinte calibração: L-L (Low Level) 0,64; Gain 597; velocidade equivalente a 0,2-0,4 $\mu L.s^{-1}$ e leitura de 1500 a 2000 partículas. Os histogramas com os picos de leitura das massas foram gerados pelo software CyView 2.2.

3.4.3 Análise de DNA por marcadores moleculares SSR

A identificação e seleção dos "primers" SSR foi realizada com base nas informações apresentadas por Chen et al. (2006 ; 2008), Corazza-Nunes et al. (2002), Novelli et al. (2006), Palmieri et al. (2007), Ruiz e Asins (2003) e Talon e Gmitter Junior (2008). Foram selecionados 14 pares de "primers" de *C. sinensis* e *P. trifoliata*, visando a ampla amostragem do genoma de *Citrus* e a obtenção de bandas polimórficas através da escolha de sítios SSR distantes no mesmo cromossomo (distância mínima de 50 cM) ou presentes em cromossomos diferentes, conforme mapa genético apresentado e descrito por Chen et al. (2006; 2008).

Foram realizados ensaios de otimização do protocolo para utilização dos "primers" SSR selecionados, envolvendo ajustes quanto à temperatura de anelamento, número de ciclos, quantidade ótima de DNA genômico (20, 30, 40, 60 ou 100 ng) e de oligonucleotídeos através da amplificação do DNA via PCR (Polymerase Chain Reaction). Em seguida, foi definido o volume total da reação para 15 µL, contendo água milli-Q, 7,5 µL de PCR Master Mix (Promega®), 0,3 µM de cada oligonucleotídeo e 20 ng μL^{-1} de DNA genômico. A amplificação foi estabelecida seguindo o programa: 1) 94 ^{o}C por 1 minuto; 2) 94 ^{o}C por 30 segundos; 3) 56 ^{o}C por 30 segundos; 4) 72 ^{o}C por 1 minuto; e 5) 72 ^{o}C por 5 minutos. As etapas de 2 a 4 foram repetidas por 36 ciclos.

O DNA genômico das plantas aclimatizadas foi extraído de folhas jovens das combinações de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont' e laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules', e de plantas genitoras mantidas em casa-de-vegetação, utilizando o método descrito por Murray e Thompson (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al. (1996). Após a extração, o DNA foi quantificado (NanoDrop 1000 – Spectrophotometer - Thermo Scientific) e diluído em água Milli-Q (10 ng.μL^{-1}).

A amplificação foi realizada através da técnica de reação em cadeia polimerase (PCR). A técnica consiste fundamentalmente em três passos:

- Desnaturação, que permite a separação das duas cadeias de DNA;
- Hibridação, que conduz à ligação dos "primers" ao molde de DNA; e
- Extensão, que corresponde à síntese de novos fragmentos de DNA pela polimerase do DNA.

A amplificação do DNA foi feita seguindo o protocolo estabelecido no processo de otimização. Foram feitas 5 reações de PCR com o genoma extraído e os produtos da reação foram visualizados em géis de agarose purificada 2,5% (Bio-Rad®). Como marcador de peso molecular, utilizou-se o padrão DNA de 50 pb (Promega®), sendo a corrida eletroforética feita em tampão TBE 10x, corados pelo SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen™) por, aproximadamente, 2 horas a 60 V. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Em seguida, foram realizadas mais 4 reações de PCR para a visualização em gel de poliacrilamida (7,5%), constituído de 160 mL de acrilamida, 16 mL de bisacrilamida, 420 g de uréia, 160 µL de TEMED e 1100 µL de persulfato de amônio (10%). A placa maior do gel (Bind) foi preparada segundo o procedimento: (1) limpeza da placa com álcool 70%; (2) aplicação da solução de Bind-Silane (1 mL de etanol absoluto, 5 µL de ácido acético glacial e 1 µL de Bind-Silane) com uma pipeta Pasteur sobre a placa; e (3) distribuição da solução sobre toda a superfície. Por sua vez, a placa menor (Repel) foi preparada segundo o procedimento: (1) limpeza da placa com álcool 70%; (2) aplicação de 1 mL de Repel-Silane; e (3) distribuição da solução sobre toda a superfície. Após o preparo, a placa Bind foi seca a temperatura ambiente por 30 minutos e a Repel por 10 minutos.

A separação dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada em cuba vertical e utilizou-se uma potência de 65 W até o aquecimento das placas a 50 °C, de maneira a permitir a manutenção das condições de desnaturação das amostras. Após o aquecimento, as amostras de DNA foram aplicadas, sendo a potência diminuída para 60 W por cerca de 3 horas a 50 °C.

Após amplificação por PCR, 15 µL de cada amostra, foram misturados com 6 µL de uma solução desnaturante Formamida e desnaturados a 94 °C durante 10 minutos em termociclador, sendo imediatamente conservados em gelo.

Os fragmentos amplificados foram revelados mediante coloração por nitrato de prata, empregando-se as seguintes soluções: imersão por 10 minutos sob agitação em solução fixadora (50 mL de etanol + 5 mL de ácido acético glacial para 945 mL de água destilada); lavagem por 1 minuto sob agitação em água destilada; imersão por 2 minutos e 40 segundos sob agitação em solução de ácido nítrico (15 mL de ácido

nítrico para 985 mL de água destilada); lavagem por 1 minuto sob agitação em água destilada; imersão por 20 minutos sob agitação em solução de nitrato de prata (2 g de nitrato de prata dissolvidos em 1000 mL de água destilada); dupla lavagem por 30 segundos sob agitação em água destilada; imersão em solução reveladora (30 g de carbonato de sódio em 1000 mL de água destilada e adição de 1500 µL de solução 37% de Formaldeído no momento da imersão da placa) até o surgimento das bandas; e imersão por 5 minutos sob agitação em solução “Stop” 5% (50 mL de ácido acético glacial em 950 mL de água destilada).

A confirmação da hibridação resultante da fusão de protoplastos foi realizada mediante a comparação dos padrões de bandas das amostras de DNA extraídas das plantas regeneradas dos experimentos de fusão de protoplastos com as amostras de DNA extraídas dos genitores.

3.4.4 Análise de DNA por marcadores moleculares RAPD

O DNA genômico das plantas regeneradas e de seus genitores foi extraído a partir de folhas, utilizando-se a método de Doyle e Doyle (1990). A quantificação foi realizada por fluorometria pelo kit Quant-iT DNA-BR (Qubit™ Fluorometer). A escolha dos “primers” RAPD polimórficos A4, A7, AA7 e A10 (Invitrogen™) foi realizada com base no trabalho de Pavan (2007). As amostras foram preparadas com volume total da reação de 25 µL, contendo água milli-Q, 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega®), 2,5 µM de cada “primer” e 30 ng μL^{-1} de DNA genômico. A reação de amplificação do DNA (PCR) foi realizada em termociclador (MJ Research®) com o programa descrito por Pavan (2006): 1) 93 ^{o}C por 2 minutos; 2) 92 ^{o}C por 1 minuto; 3) 37 ^{o}C por 1 minuto; 4) 72 ^{o}C por 2 minutos; e 5) 72 ^{o}C por 5 minutos. As etapas de 2 a 4 foram repetidas por 45 ciclos. A análise do padrão de bandas de DNA foi realizada em gel de agarose a 1,5%, em solução tampão TBE 0,5x (TRIS-HCl, 45 mM; ácido bórico, 45 mM; EDTA pH 8,0, 1 mM), à temperatura ambiente. A eletroforese da reação de PCR foi conduzida a corrente elétrica de 70 volts, durante 5 horas. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg de brometo/100 ml de TEB 1x) e a visualização foi feita com a utilização de luz ultravioleta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e manutenção do material vegetal

Os subcultivos realizados nos calos embriogênicos e nas suspensões celulares de laranja doce, tanto da variedade 'Pêra' quanto 'Westin', permitiram a o desenvolvimento de culturas de coloração clara, friável e de rápida multiplicação, disponibilizando assim uma fonte eficiente de células para os ensaios de isolamento de protoplastos (Figura 1). O procedimento e a qualidade do material são determinantes para o sucesso do processo de regeneração de plantas após a fusão de protoplastos, pois calos compactos, de coloração amarelada e aparência aquosa não apresentam capacidade de diferenciação (HIDAKA; KAJIURA, 1988).

Figura 1 – Manutenção das culturas de calos e células em suspensão de laranja doce. a) Calos embriogênicos cultivados em meio de cultura EME ou H+H sólido. b) Suspensões celulares cultivadas em meio de cultura EME ou H+H líquido, sob agitação orbital constante

Em relação à obtenção de plantas para o fornecimento de tecido foliar tanto para o isolamento de protoplastos como para as análises moleculares, as sementes introduzidas apresentaram uma taxa média de germinação equivalente a 94%, exceto a variedade de tangerina ‘Thomas’, a qual apresentou uma taxa de germinação de 28% (Tabela 2).

Respondendo satisfatoriamente ao trato cultural empregado, após 135 dias do plantio das sementes, as plantas obtidas de todas as variedades já apresentavam folhas saudáveis e vigorosas o bastante para a utilização como fontes de explantes não embriogênicos (Figura 2).

Após 75 dias da introdução do material, as plantas enxertadas já estavam aptas para fornecer folhas para o processo de isolamento de protoplastos (Figura 2). As tangerinas ‘Fremont’ e ‘Thomas’ apresentaram 100% de pegamento da enxertia e tangelo ‘Nova’ apresentou somente 15%. A diferença da eficiência de enxertia observada pode ser explicada devido à qualidade e maturação das borbulhas, ocasionando numa baixa compatibilidade com o porta-enxerto utilizado e ‘pegamento’ aquém do desejado.

Em virtude do bom desenvolvimento das plantas e do tratamento de manutenção em casa-de-vegetação, garantindo a oferta contínua de folhas para o projeto, não foi necessária a germinação e cultivo *in vitro* de plantas para a coleta de folhas.

Tabela 2 – Número de plantas de tangerina e tangelo obtidas via semente (135 dias) e enxertia (75 dias), as quais foram utilizadas para fornecimento de explantes foliares

Fontes de explantes foliares		Nº de plantas
“Seedlings”	Tangerina 'Fremont'	140
	Tangerina 'Thomas'	39
	Tangerina 'Nules'	132
	Tangelo 'Nova'	127
Plantas enxertadas	Tangerina 'Fremont'	12
	Tangerina 'Thomas'	12
	Tangelo 'Nova'	3

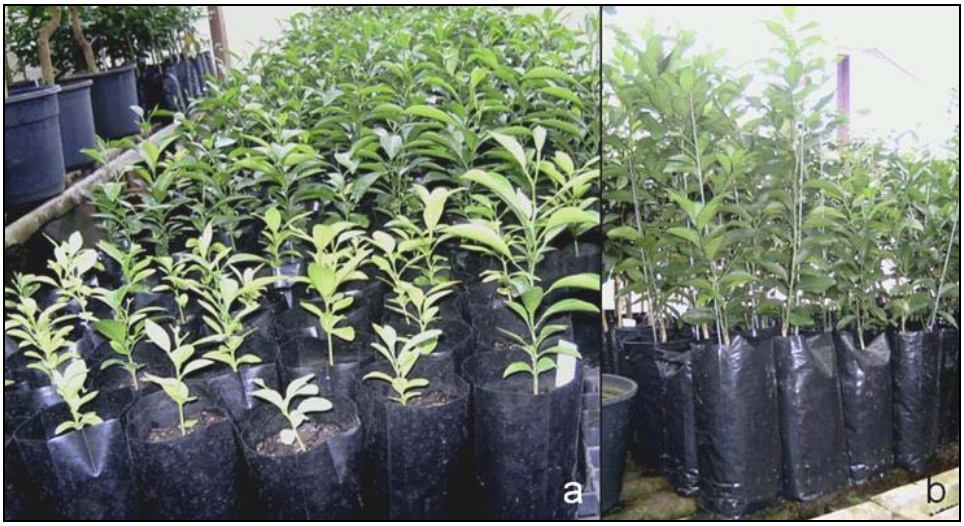

Figura 2 – Introdução e manutenção da fonte de protoplastos não-embriogênicos de tangerinas e tangelo em casa de vegetação. a) Plantas de tangerina obtidas por meio de sementes das cultivares 'Fremont', 'Nules' e 'Thomas' e de tangelo 'Nova'. b) Plantas de tangerina 'Fremont', 'Thomas' e tangelo 'Nova' obtidas pela enxertia de borbulhas em limão 'Cravo'

4.2 Hibridação somática

No período de 13 de novembro de 2008 a 13 de agosto de 2009 foram realizadas 62 fusões de protoplastos, envolvendo as combinações de laranja doce (fonte de protoplastos embriogênicos) e tangerinas/tangelo (fonte de protoplastos não embriogênicos) (Tabelas 3 e 4).

Foi verificado que, sobretudo nos 3 primeiros meses de trabalho, um volume maior de material *in vitro* não foi responsivo. Este resultado está provavelmente associado a erros de metodologia possivelmente relacionados ao período de aprendizado e familiarização com a técnica de fusão de protoplastos.

Tabela 3 – Número total de fusões de protoplastos realizadas entre as variedades de citros estudadas, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009

Fonte de Protoplastos		**Número de Fusões**
Embriogênica	**Não embriogênica**	
Laranja doce 'Pêra'	Tangerina 'Fremont'	9
	Tangerina 'Thomas'	6
	Tangerina 'Nules'	7
	Tangelo 'Nova'	8
Laranja doce 'Westin'	Tangerina 'Fremont'	9
	Tangerina 'Thomas'	7
	Tangerina 'Nules'	6
	Tangelo 'Nova'	10
TOTAL		62

Do total de experimentos de fusão de protoplastos, 27 (43,4%) apresentaram baixo potencial mitótico e germinativo e mantiveram-se no estágio inicial de desenvolvimento (micocolônias, microcalos, calos, embriões e brotações), interrompendo o processo regenerativo, mesmo submetidos às etapas descritas. Desse modo, todo o material não responsivo, proveniente dos experimentos de fusão de protoplastos foram descartados.

Tabela 4 – Fusões de protoplastos realizadas e estágio de desenvolvimento da cultura e quantidade de plantas obtidas até outubro de 2010

Número do experimento	**Data**	**Genitor embriogênico (laranja doce)**	**Genitor não embriogênico (tangerina/tangelo)**	**Estágio de desenvolvimento em outubro/2010**	**Quantidade de plantas obtidas**
1	nov/08	Pêra	Nova	Material descartado*	0
2	nov/08	Westin	Nova	Material descartado	0
3	dez/08	Westin	Fremont	Microcolônias	-
4	dez/08	Pêra	Nova	Plantas**	6
5	dez/08	Pêra	Fremont	Plantas	1
6	jan/09	Pêra	Thomas	Embriões	-
7	jan/09	Westin	Nova	Material descartado	0
8	jan/09	Pêra	Fremont	Microcolônias	-
9	jan/09	Pêra	Fremont	Material descartado	0
10	jan/09	Westin	Thomas	Material descartado	0
11	jan/09	Pêra	Fremont	Material descartado	0
12	fev/09	Pêra	Nova	Embriões	-
13	fev/09	Pêra	Nules	Plantas	1
14	fev/09	Westin	Fremont	Plantas *in vitro*	3
15	fev/09	Westin	Thomas	Microcolônias	-
16	fev/09	Pêra	Nova	Plantas *in vitro*	3
17	fev/09	Pêra	Thomas	Calos	-
18	fev/09	Westin	Fremont	Embriões	-
19	fev/09	Westin	Nules	Embriões	-
20	fev/09	Pêra	Thomas	Microcalos	-
21	fev/09	Pêra	Nules	Plantas *in vitro*	32
22	fev/09	Westin	Nova	Material descartado	0
23	fev/09	Westin	Fremont	Microcalos	-
24	mar/09	Westin	Nules	Microcolônias	-
25	mar/09	Westin	Thomas	Microcolônias	-
26	mar/09	Pêra	Thomas	Plantas *in vitro*	5
27	mar/09	Pêra	Nules	Plantas *in vitro*	27
28	mar/09	Westin	Nova	Microcalos	-
29	mar/09	Westin	Nules	Microcalos	-
30	abr/09	Westin	Thomas	Plantas *in vitro*	3
31	abr/09	Westin	Nules	Microcolônias	-
32	abr/09	Pêra	Fremont	Plantas *in vitro*	5
33	abr/09	Pêra	Nova	Microcolônias	-
34	abr/09	Pêra	Fremont	Plantas	1
35	abr/09	Pêra	Nules	Microcolônias	-
36	abr/09	Westin	Nova	Material descartado	0

Tabela 4 – Fusões de protoplastos realizadas e estágio de desenvolvimento da cultura e quantidade de plantas obtidas até outubro de 2010

(conclusão)

Número do experimento	Data	Genitor embriogênico (laranja doce)	Genitor não embriogênico (tangerina/tangelo)	Estágio de desenvolvimento em outubro/2010	Quantidade de plantas obtidas
37	abr/09	Westin	Thomas	Material descartado	0
38	mai/09	Westin	Fremont	Plantas *in vitro*	3
39	mai/09	Westin	Thomas	Calos	-
40	mai/09	Pêra	Thomas	Plantas *in vitro*	5
41	mai/09	Westin	Nova	Plantas *in vitro*	4
42	mai/09	Pêra	Nules	Plantas	7
43	mai/09	Westin	Fremont	Embriões	-
44	jul/09	Pêra	Nules	Plantas	7
45	jul/09	Westin	Nova	Plantas *in vitro*	3
46	jul/09	Pêra	Fremont	Plantas	12
47	jul/09	Westin	Nules	Microcolônias	-
48	jul/09	Westin	Fremont	Plantas *in vitro*	4
49	jul/09	Westin	Nova	Plantas *in vitro*	3
50	jul/09	Westin	Nova	Microcalos	-
51	jul/09	Westin	Fremont	Embriões	-
52	jul/09	Westin	Thomas	Embriões	-
53	jul/09	Westin	Nules	Material descartado	0
54	jul/09	Westin	Nova	Embriões	-
55	jul/09	Pêra	Fremont	Plantas	3
56	jul/09	Pêra	Thomas	Plantas	1
57	jul/09	Pêra	Nules	Material descartado	0
58	jul/09	Pêra	Nova	Plantas *in vitro*	8
59	ago/09	Pêra	Nova	Plantas *in vitro*	4
60	ago/09	Pêra	Fremont	Embriões	-
61	ago/09	Westin	Nova	Brotações	-
62	ago/09	Westin	Fremont	Embriões	-

* Material descartado devido contaminação bacteriana e/ou fúngica ou oxidação dos calos.

** Plantas micro-enxertadas ou em processo de aclimatização em sala de crescimento e casa-de-vegetação.

(-) Material com desenvolvimento interrompido e descartado.

4.2.1 Isolamento de protoplastos

O procedimento de desinfestação das folhas coletadas mostrou-se eficaz no controle fitossanitário, sem comprometer a viabilidade das células do mesofilo.

Obedecendo rigorosamente o período de agitação orbital e com base nas visualizações em microscópio óptico invertido que precedem a etapa de purificação, foi possível a observação da digestão da parede celular. Deste modo, a técnica de isolamento de protoplastos utilizada foi satisfatória tanto para calos embriogênicos quanto para o tecido foliar, produzindo um volume representativo de material para o processo de fusão (Figura 3).

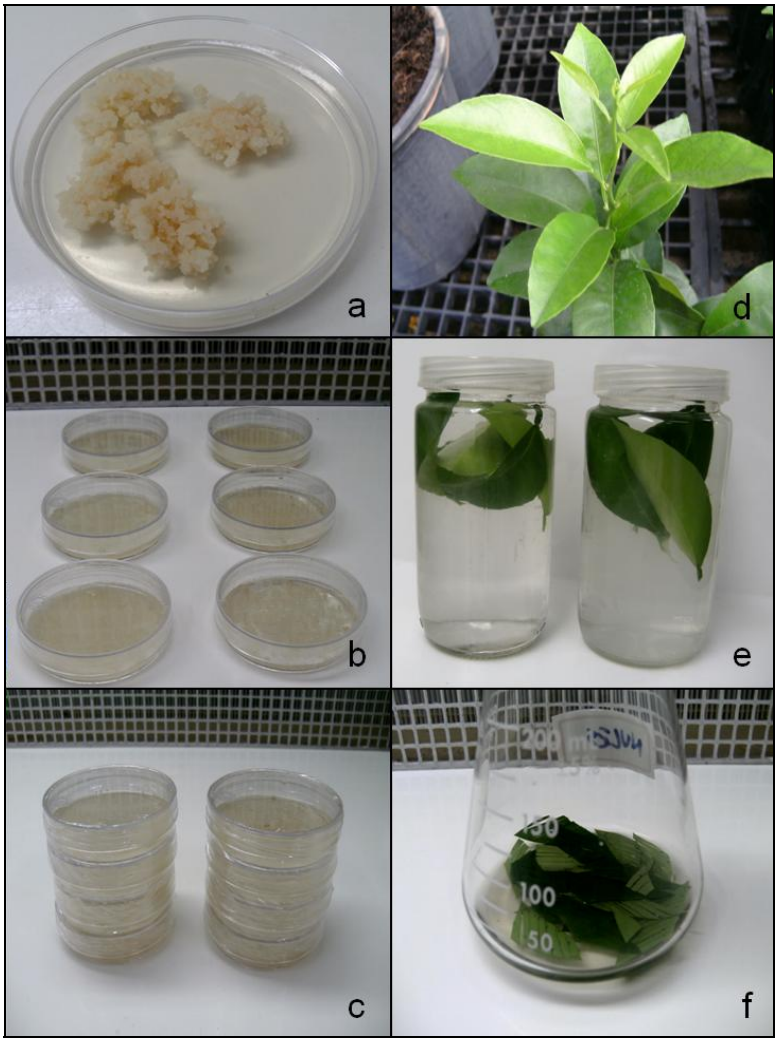

Figura 3 – Etapas do processo de isolamento de protoplastos. a) Calo embriogênico de laranja doce ‘Westin’. b) - c) Calo embriogênico em solução enzimática. d) “Seedling” de tangerina ‘Fremont’. e) Assepsia das folhas. f) Folha finamente fatiada em solução enzimática

4.2.2 Purificação, fusão e plaqueamento de protoplastos

Após a digestão enzimática, a suspensão contendo os protoplastos isolados foi purificada por filtração e centrifugação de maneira a separar os protoplastos de restos celulares, fragmentos de mesofilo e da solução enzimática. Após a purificação, a concentração da suspensão de protoplastos foi ajustada para 2 x 10^5 protoplastos.mL^{-1} (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010). Esta densidade pôde ser ajustada a todos os cultivares de citros estudadas, cuja disponibilidade de protoplastos foi evidenciada durante a formação de bandas espessas na interface dos meios CPW 25 M e CPW 13 M (FREASON; POWE; COCKING, 1973).

Mesmo não se tratando de um processo dirigido, após a fusão química ocorrida durante 8 minutos de incubação na ausência de luz, foi possível observar, com auxílio de microscópio óptico invertido, a fusão dos protoplastos dos genitores, confirmando a ocorrência da hibridação e eficiência do protocolo empregado (Figura 4).

No final de cada experimento de fusão de protoplastos, respeitando-se a densidade celular utilizada, os protoplastos foram cultivados em meio de cultura líquido, em 4 placas de Petri (58 x 15 mm) (Figura 5).

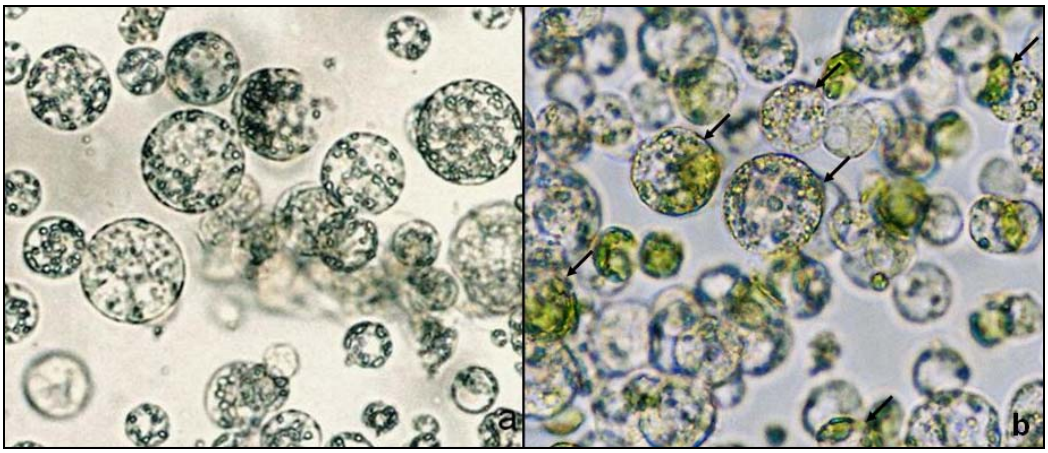

Figura 4 – Isolamento e hibridação somática de protoplastos. a) Protoplastos isolados de calos de laranja doce após purificação (2 x 10^5 protoplastos.mL^{-1}). b) Fusão dos protoplastos (seta) de laranja doce e tangerina (40x)

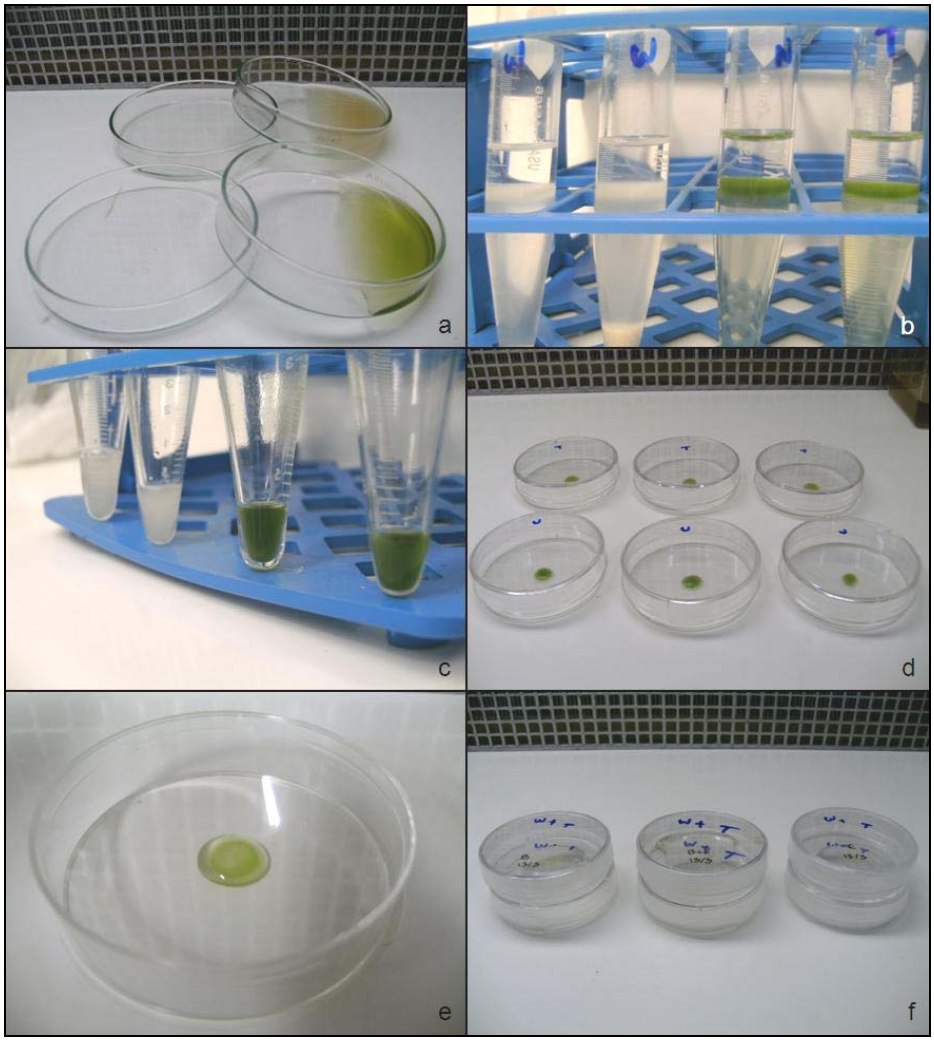

Figura 5 – Purificação, fusão e cultivo de protoplastos. a) Purificação dos protoplastos após filtração em peneira de nylon (protoplastos provenientes de calos com coloração acinzentada e de mesofilo foliar com coloração esverdeada). b) Gradiente sacarose/manitol com a presença de banda intermediária contendo os protoplastos. c) 'Pellets' com protoplastos. d) União de protoplastos dos 2 genitores na porção central das placas de Petri. e) Fusão química de protoplastos com a presença do PEG. f) Protoplastos pós-fusão plaqueados em meio de cultura nutritivo

4.2.3 Cultura dos protoplastos e regeneração de plantas

Após 7-10 dias de cultivo *in vitro*, já era possível observar o início das divisões celulares. A formação de microcolônias e microcalos foi verificada 20-40 dias após a fusão de protoplastos (Figura 6). Porém, tendo em vista a elevada concentração de açúcares dos meios de cultura utilizados e a alta umidade, foi verificada a ocorrência de taxas consideráveis de contaminação bacteriana e fúngica, muitas vezes

comprometendo um experimento de fusão de protoplastos por completo. Em média, por fusão, cerca de 20% das placas com meio de cultura líquido apresentaram contaminação fúngica e/ou bacteriana.

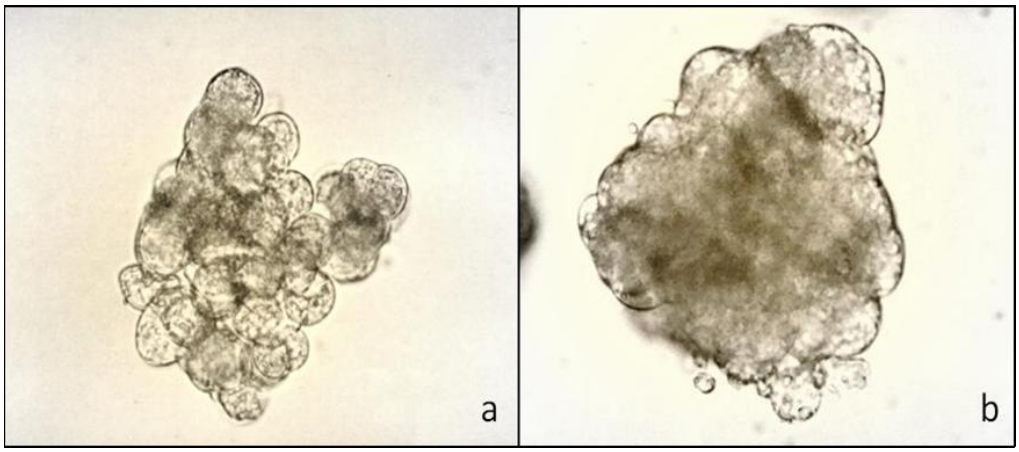

Figura 6 – Cultura dos protoplastos. a) Microcolônia. b) Microcalo em meio de cultura 1:2 BH3 0,7 M: EME 0,146 M (v:v) (20x)

Após 65 dias de cultivo, para indução da embriogênese somática, os microcalos originados foram transferidos para o meio de cultura EME-Maltose sólido, o qual proporcionou a proliferação das células, sobretudo nas combinações cujo genitor embriogênico referem-se à variedade ‘Pêra’. Aos 25 dias após a transferência, os calos desenvolvidos, principalmente as combinações laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules', bem como laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Thomas' e laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont', responderam ao estresse nutricional gerado pela dificuldade de assimilação de maltose em relação à sacarose, ocorrendo à indução da embriogênese somática e a formação de embriões (BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000) (Figura 7).

As combinações laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Thomas’, bem como laranja-doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’ apresentaram elevado potencial para a formação de calos pró-embriogênicos. Mesmo assim, embora tenham sido realizadas sucessivas renovações do meio de cultura, algumas culturas perderam a viabilidade e oxidaram, não permitindo o desenvolvimento de embriões somáticos.

De maneira geral, não houve uma padronização no número de embriões somáticos desenvolvidos por placa. Os embriões foram transferidos para o meio de cultura EME-Sacarose na medida em que se diferenciavam nos calos, por volta de 25

dias de cultivo. Em cada placa de EME-Sacarose, foram transferidos de 4 a 7 embriões e, esta densidade de embriões/placa foi obedecida nos subcultivos e transferências posteriores (Figura 7).

Após 15 dias no meio de cultura EME-Sacarose, os embriões foram transferidos para o meio de cultura 1500 (meio suplementado com 50 $g.L^{-1}$ de sacarose), com o intuito de aumentar a disponibilidade de carbono para as células. Desta forma, o meio 1500 mostrou-se eficiente no desenvolvimento e expansão celular dos embriões.

Para germinação dos embriões, alongamento dos brotos e emissão das primeiras folhas, após 15 dias de cultivo no meio 1500, os embriões foram transferidos para o meio de cultura B+ (Figura 8). Neste meio de cultura, os embriões completaram as fases de sua ontogenia, germinaram e apresentaram brotações, com a emissão das primeiras folhas. O sucesso do desenvolvimento de plantas no meio de cultura B+, a partir de embriões somáticos anormais, foi também citada por Mendes-da-Glória; Mourão Filho e Mendes (2000). Neste meio, os embriões apresentaram considerável aumento de volume e modificações morfológicas (assimetrias) dentre as quais destacam-se: cotilédones despigmentados e fusionados, e perda do eixo bipolar. Tais características foram similarmente relatadas por Perez et al. (1998), Ricci et al. (2002), Niedz et al. (2002) e Pavan (2006), os quais associaram a ocorrência destas anormalidades à ausência de sincronismo celular, divisão aleatória durante o desenvolvimento de embriões somáticos de *Citrus*, inicialmente ocorrida no meio EME-Maltose.

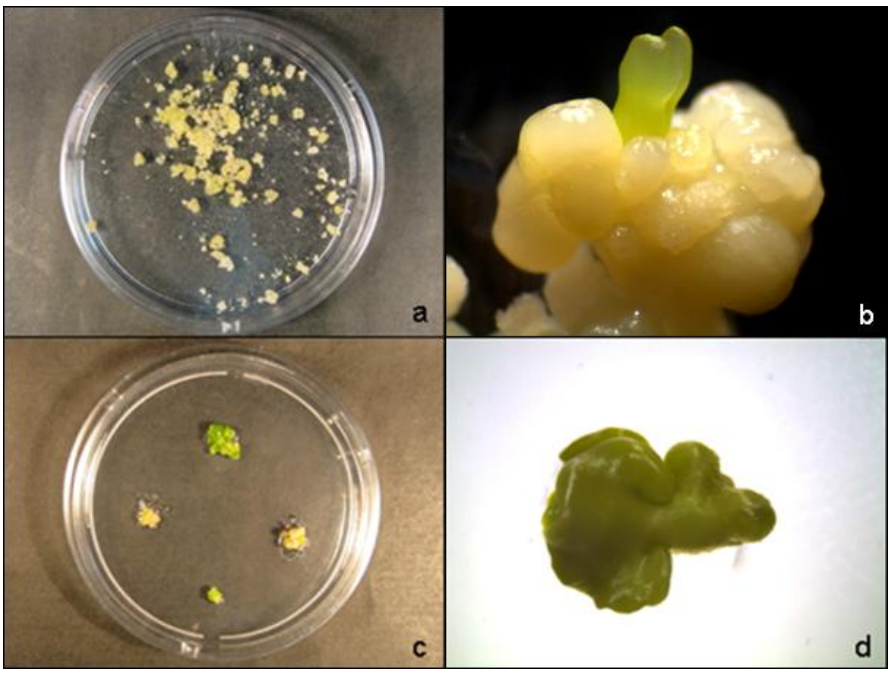

Figura 7 – Etapas do processo de desenvolvimento dos embriões somáticos. a) Transferência de calos para meio de cultura EME-Maltose. b) Detalhe de embrião somático desenvolvido a partir de calos cultivados em meio de cultura EME-Maltose. c) Transferência dos embriões somáticos para meio de cultura EME-Sacarose. d) Embrião somático

No meio de cultura B+, foi também verificado o desenvolvimento de raízes nas brotações. Provavelmente, o processo de formação radicular é estimulado pela auxina ANA (ácido naftaleno acético) (Figura 8). No entanto, plantas cultivadas no meio de cultura B+, que não apresentaram o desenvolvimento de raízes foram transferidas para meio de cultura RMAN (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010), o qual contém uma concentração de ANA (2,01 $mg.L^{-1}$) superior ao meio de cultura B+, sendo assim, caracterizado como um meio de cultura especializado à indução da rizogênese (MELO et al., 2001). Além de uma concentração mais elevada de auxina, o meio de cultura RMAN apresenta em sua composição o carvão ativado que, além de sua ação antioxidativa, promove o escurecimento do meio sólido, simulando um ambiente subterrâneo, induzindo assim o fototropismo negativo radicular.

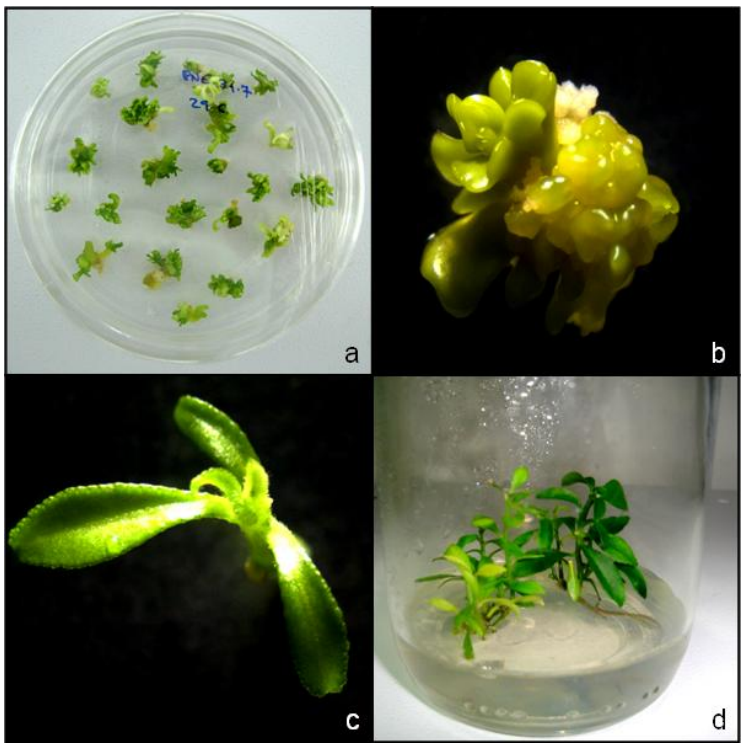

Figura 8 – Regeneração de plantas, a partir da fusão de protoplastos de laranja doce + tangerina. a) Embriões somáticos transferidos para meio de cultura B+. b) Detalhe de embrião somático em meio de cultura B+. c) Germinação de embrião somático da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'. d) Plântulas de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'

Até o presente momento, foram obtidas 141 plantas *in vitro* e 10 em processo de aclimatização. Do número de plantas *in vitro*, somente 23 pertencem às combinações com o genitor embriogênico laranja doce 'Westin', cerca de 16%. Em contrapartida, as combinações com o genitor embriogênico 'Pêra' somaram 118 plantas *in vitro* (83%), além das 10 aclimatizadas.

De acordo com a comparação exposta na Tabela 5, todas as combinações envolvendo o genitor embriogênico laranja doce 'Pêra' produziram plantas com êxito no desenvolvimento de parte aérea vigorosa e na formação de raízes, em meio de cultura B+ (Figura 9) ou RMAN *in vitro* as quais foram aclimatizadas. Por outro lado, nenhuma das combinações com laranja doce 'Westin' atingiu o estágio final do processo, com o desenvolvimento de plantas normais.

Figura 9 – Planta regenerada após fusão de protoplastos, combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'

Embora 7 das 8 combinações estudadas tenham conseguido atingir estágios finais do processo de desenvolvimento *in vitro*, foi possível verificar a supremacia da combinação 'Pêra' + 'Nules' sobre as demais, quanto ao número de plantas, pois, 49% do total de plantas *in vitro* e aclimatizadas pertencem a esta combinação (Tabela 2). Todavia, a combinação 'Westin' + 'Nules' não foi bem sucedida, produzindo ao longo do período de avaliação somente embriões deformados, fato que indica a forte influência de um genitor altamente embriogênico e a sua necessidade para o sucesso da regeneração.

Kunitake e Mii (1995), juntamente a Matos et al. (2005), ressaltam a importância do estado fisiológico da planta, idade do explante, solução enzimática adequada para digestão da parede, tempo de incubação na solução enzimática, agitação, concentração e tipos de estabilizadores osmóticos, densidade de cultivo, métodos de cultivo, meios de cultura, luminosidade, temperatura e, sobretudo, do genótipo do material estudado no sucesso da cultura de protoplastos. Todos estes elementos citados atuam de forma sinérgica, contribuindo efetivamente para garantir a totipotência da célula a ser regenerada *in vitro*. A determinação e a escolha de uma fonte de protoplastos embriogênica contribui para a eficácia do processo de regeneração de citros (BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000).

Tabela 5 – Comparativo das fusões de protoplastos realizadas entre laranja doce e tangerina/tangelo em função do estágio de desenvolvimento apresentado até outubro de 2010

Combinações / Estágio de desenvolvimento	Pêra + Fremont	Pêra + Thomas	Pêra + Nules	Pêra + Nova	Westin + Fremont	Westin + Thomas	Westin + Nules	Westin + Nova
Plantas aclimatizadas	4	1	3	1	0	0	0	0
Plantas *in vitro*	1	2	1	3	3	1	0	3
Brotos	0	0	0	0	0	0	0	1
Embriões	1	1	0	1	4	1	1	1
Calos	0	1	0	0	0	1	0	0
Microcalos	0	1	0	0	1	0	1	2
Microcolônias	1	0	1	1	1	2	3	0
Sem resposta	0	0	0	1	0	0	0	1
Material descartado	2	0	2	1	0	2	1	2
Total de fusões	9	6	7	8	9	7	6	10

Assim, fica evidente o maior potencial embriogênico, totipotência e capacidade de regeneração da variedade 'Pêra' comparada à 'Westin', a qual apresentou baixa multiplicação celular, em todas as etapas *in vitro*, além da má formação de embriões quando presentes em meio B+.

Em resumo, a Figura 10 mostra que a maioria das combinações estudadas apresentou desenvolvimento satisfatório com a obtenção de plântulas *in vitro*, exceto a combinação laranja doce 'Westin' + 'Nules'. Contudo, houve combinações que apresentaram resposta mitótica inferior à esperada, impossibilitando a formação de microcolônias e microcalos, como a combinação 'Westin' + 'Nova' e, principalmente 'Westin' + 'Nules'. Pierik (1990) relata que fatores como a espécie, o genótipo e o

estado de diferenciação das células dominantes estão estritamente ligados ao sucesso da regeneração de uma planta a partir de uma célula isolada. Em outros casos, como na combinação laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova', o processo de regeneração foi comprometido devido à má formação dos embriões durante o seu desenvolvimento nos meios de cultura EME-Sacarose, 1500 e B+.

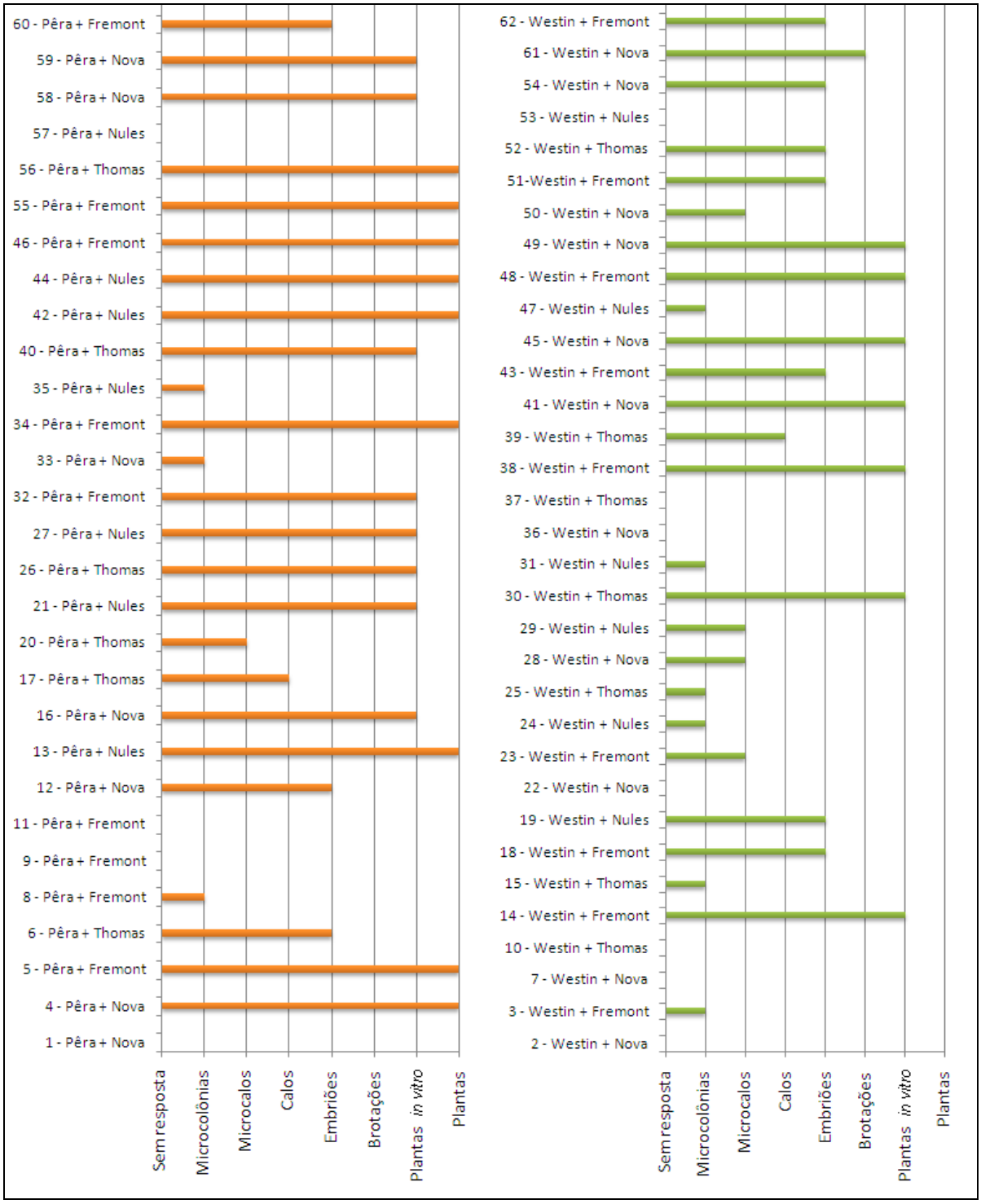

Figura 10 – Resumo dos resultados obtidos de cada experimento de fusão de protoplastos realizado entre as combinações de laranja doce e tangerina/tangelo

4.2.4 Aclimatização

Plantas com 5 a 7 cm de altura foram transferidas para vasos para aceleração. Após o primeiro procedimento realizado até o presente momento, o número de plantas aclimatizadas em vasos totalizou 26 plantas. Contudo, a planta desenvolvida exclusivamente num ambiente *in vitro* apresenta sérias limitações para adaptar-se ao ambiente natural, ou seja, ao substrato, às variações de temperatura, à exposição luminosa e eventuais déficits hídricos. Dessa forma, embora a metodologia de aclimatização aplicada tenha sido a mesma para todas as plantas, muitas não resistiram. O processo de aclimatização é considerado um estágio crítico da regeneração de plantas e as perdas em decorrência da baixa taxa de sobrevivência foi também relatada por Costa (2001). Assim, permanecem em sala de crescimento ou em casa-de-vegetação as plantas: 2 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'; 2 laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova'; 1 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Thomas'; e 5 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules' (Figura 11).

Figura 11 – Planta aclimatizada proveniente da fusão de protoplastos da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'

O procedimento adotado da micro-enxertia, visando facilitar o processo de aclimatização das plantas com a utilização de um porta-enxerto compatível e com alto vigor, mostrou-se bastante eficaz, com rendimento aproximado de 80%. Das 47 micro-enxertias realizadas em todas as combinações com o genitor ‘Pêra’, 38 foram bem

sucedidas e apresentaram compatibilidade entre a brotação e o porta-enxerto citrange ‘Carrizo’ (Figura 12).

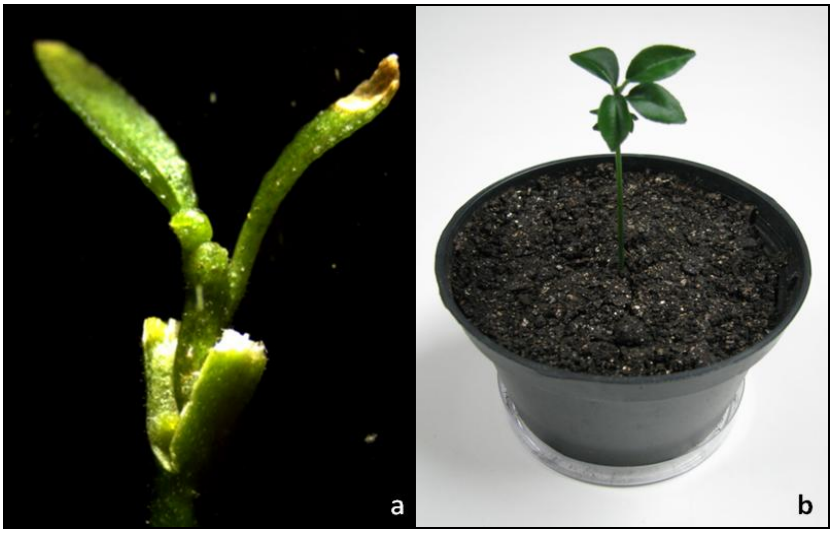

Figura 12 – Micro-enxertia de brotos desenvolvidos sobre citrange ‘Carrizo’. a) Detalhe da micro-enxertia de brotação da combinação entre laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’. b) Planta micro-enxertada e aclimatizada da combinação entre laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’

4.3 Confirmação da hibridação somática

As 10 plantas enraizadas *in vitro* (2 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'; 2 laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova'; 1 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Thomas'; e 5 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules') e 8 micro-enxertadas (2 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'; 2 laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova'; 4 laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules') foram aclimatizadas e avaliadas pela morfologia foliar, número de cromossomos (ploidia) e por marcadores moleculares, para confirmação da hibridação somática.

4.3.1 Análise de DNA por marcadores moleculares SSR

Dos 56 marcadores EST-SSR descritos por Chen et al. (2006; 2008) a partir de 2.295 sequências ESTs para mapear uma família intergenérica F1 de *C. sinensis* e *P. trifoliata*, foram escolhidos 14 pares de "primers" SSR (sequencias simples repetidas ou

microssatélites) (Tabela 6). Destes, 7 foram sintetizados para uma primeira análise (CX4F88, CX6F19, CX6F07, CX6F10, CX6F32, CX4F71 e CX5F38) e os demais pares de "primers" (CX6F04, CX5022, CX6F03, CX4F81, CX6F23, CX5F50 e CX5F56) serão analisados posteriormente.

Tabela 6 – Pares de "primers" SSR (microssatélites) selecionados para confirmação hibridação somática, suas seqüências (forward/reverse) e tamanho dos alelos amplificados (TAA) em pares de bases (pb)

Nome	Forward primer	Reverse primer	TAA (pb)
CX4F88	GTTCGCTCCACGCGATTTAT	TGTGAAGAAAGATTTGGTGGGTTT	85
CX6F19	ATTCTCATGTCATGCGTACCTCG	TGAATCGTGAGAGACGAGTTGAAG	150
CX6F07	CTGTTACCGTTGAGGAAACCAAAG	CTCTTCAGCTGGTTTCTCTTCCTG	98
CX6F10	CCTCAGCTCTAGCAAAAGCACATT	AGAGGCTATAGATCGTGGATGCAG	160
CX6F32	ACCCTCTCTTAGTGGGCAGTCTTT	ACAAAGAAAGGGATTGTGACGGTA	146
CX4F71	TACCATGTGCCCTTTCTGCTATTT	AGCTATGGCTTTGGTTGAGTTCTG	153
CX5F38	TAGCTGCTGCCATAATTTTTCACA	AAAAGGGTTGATTTTTGTTCCCTC	130
CX6F04	AGTGAACTGTCCATTGGATTTTCG	GTGTTGAATCCCGACCTTCTACC	155
CX5022	CACCAGCCAAGCAATCTAACAAC	TGCAACTCATCTCTCAGCTTCTTG	232
CX6F03	CGAGGATGACTCAAGTGATGAAGA	TCTTGGTCTTTGGCTTTTTCTCAG	123
CX4F81	CCCGTTAAAATTGTAAACCCACAG	TTTATAATACGGAACGTTGGGAGG	85
CX6F23	TTTTAGGAAATTTCAATCACCCGA	TCATTGTCATCACCATCACCATC	160
CX5F50	AGGACGATTTCAGGTTCAGACTTG	GAGCAAAAATCGAAGAGATCAAGC	142
CX5F56	CCATTAACGAGAAAACCAAACACTG	GGGGTTGCAAAGAAATGTAAAGAA	160

A partir dos ensaios de otimização das reações de PCR realizados, foi definido o seguinte protocolo para utilização dos "primers" SSR selecionados:

- Concentração do "primer": 0,3 µM;
- 1x Master Mix;

- Quantidade de DNA genômico: 30 ng μL^{-1};

- Volume final da reação: 15 µL; e

- Programa empregado no termociclador: 1) 94 ^{o}C por 1 minuto; 2) 94 ^{o}C por 30 segundos; 3) 56 ^{o}C por 30 segundos; 4) 72 ^{o}C por 1 minuto; e 5) 72 ^{o}C por 5 minutos. As etapas de 2 a 4 repetidas por 36 ciclos. A Tm (Temperatura de Melting) foi ajustada de acordo com a recomendação de síntese específica de cada "primer":

- CX4F88 (Tm 55,7 ºC);
- CX6F19 (Tm 56,9 ºC);
- CX6F07 (Tm 56,2 ºC);
- CX6F10 (Tm 57,6 ºC);
- CX6F32 (Tm 59,6 ºC);
- CX4F71 (Tm 56,7 ºC); e
- CX5F38 (Tm 55,4 ºC).

A extração e a quantificação do DNA genômico de folhas jovens das combinações de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont' e laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules' aclimatizadas, e de plantas genitoras mantidas em casa-de-vegetação, foi bem sucedido e os mesmos foram utilizados nas análises moleculares.

Após o ajuste e realização de 5 reações de PCRs, conforme o preparo e programação descritos para os "primers" escolhidos, a verificação da amplificação dos 7 pares de "primers" com o DNA genômico dos genitores e de plantas das combinações laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont' e laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules' nos géis da agarose, não foram conclusivas, pois nenhum dos "primers" testados apresentou bandas que evidenciassem polimorfismo entre os genitores e os possíveis híbridos analisados. O resultado pode ser atribuído à proximidade dos alelos amplificados pelos pares de oligonucleotídeos iniciadores (Figura 13).

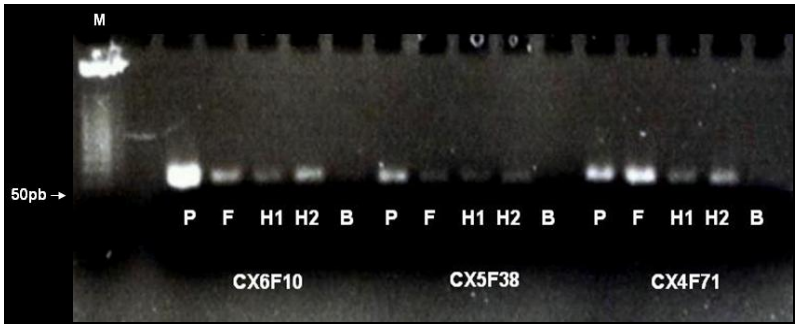

Figura 13 – Amplificação do DNA de plantas da combinação 'Pêra' + 'Fremont' com "primers" SSR CX6F10, CX5F38 e CX4F71 em gel de agarose. Genitor 'Pêra' (P); genitor 'Fremont' (F); amostras de possíveis híbridos (H1 e H2); branco (B). M = ladder (50 pb)

Segundo Weiler et al. (2010) a utilização de gel de poliacrilamida é necessária quando a diferença no tamanho dos alelos for muito pequena (menos de 15 pb) ou quando a amplificação em gel de agarose acarrete dúvidas quanto à nitidez de bandas. Outro ponto é o tipo de marcador genético, levando em consideração o número de locos que pode ser detectado, grau de polimorfismo entre e dentro de acessos e características de dominância (JOSHI; RANJEKAR; GUPTA, 1999).

Neste sentido, foram realizadas 4 reações de PCR para visualização em gel de poliacrilamida, cuja separação do DNA ocorre de forma mais detalhada e precisa, podendo-se observar o tamanho dos alelos em cada loco com base no marcador de DNA (50 pb). A partir das imagens dos géis de poliacrilamida pode ser avaliada a presença e ausência de cada alelo por loco.

Assim, na tentativa de visualizar bandas polimórficas entre as amostras, foram feitos 4 géis de poliacrilamida com o DNA genômico dos genitores e de plantas das combinações laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont' e laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'. Contudo, mais uma vez, não foi possível confirmar a hibridação com os pares de "primers" testados (Figuras 14 e 15).

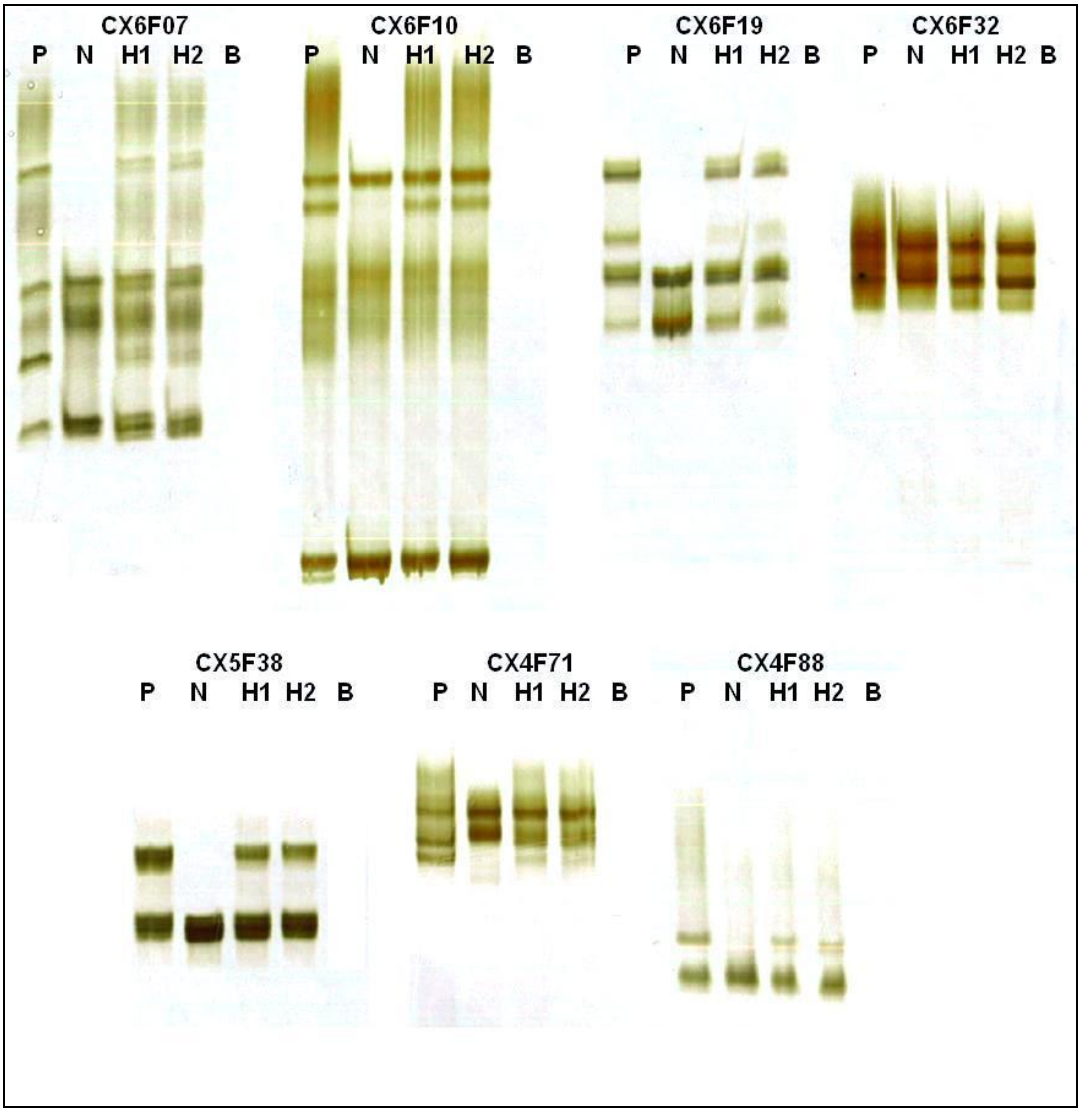

Figura 14 – Análise de SSR de plantas regeneradas de experimentos de fusão de protoplastos da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'. P: genitor 'Pêra'; N: genitor 'Nules'; H1 e H2: amostras de possíveis híbridos; B: branco

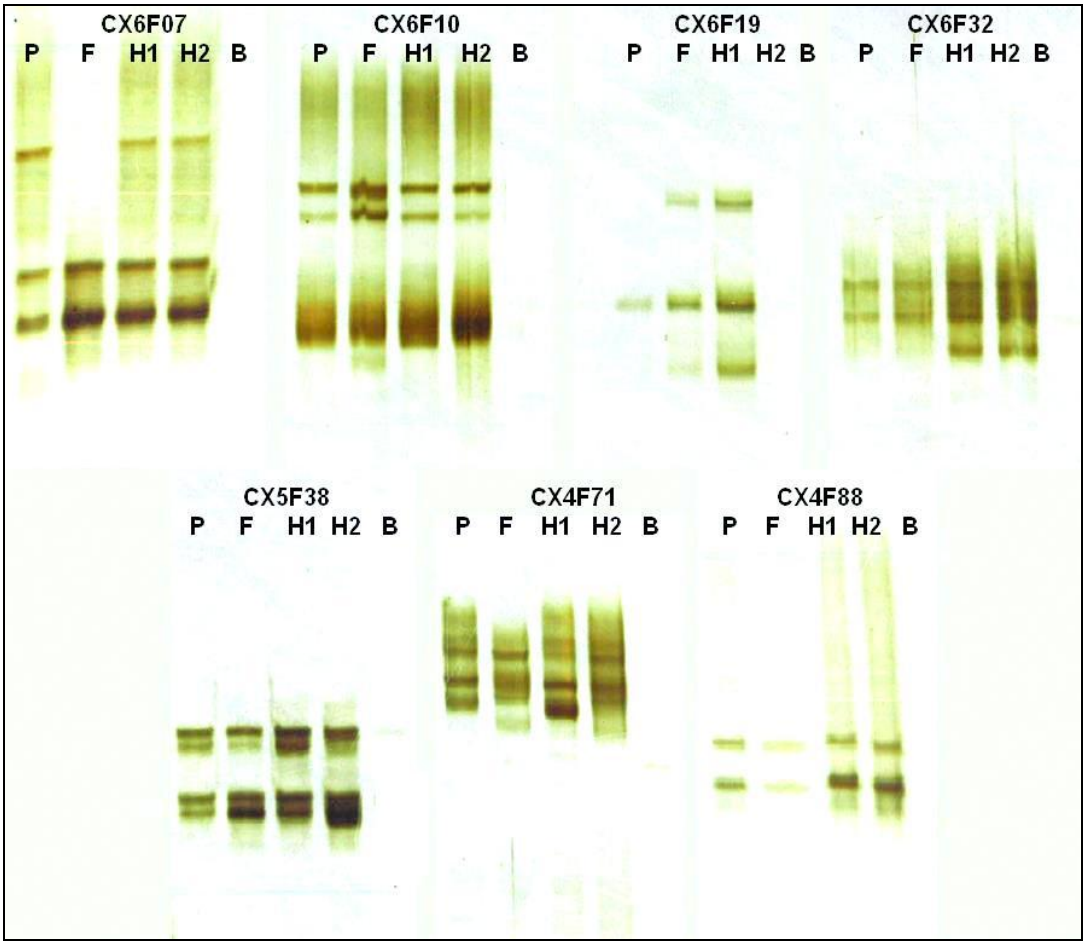

Figura 15 – Análise de SSR de plantas regeneradas de experimentos de fusão de protoplastos da combinação laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'. P: genitor 'Pêra'; F: genitor 'Fremont'; H1 e H2: amostras de possíveis híbridos; B: branco

Com base nas amplificações de DNA em gel de poliacrilamida, expostas nas Figuras 14 e 15, é possível concluir que a configuração alélica das bandas das 2 combinações analisadas apresentam semelhanças. Nos fragmentos amplificados, sobretudo com os "primers" CX6F07, CX6F10 e CX5F38, houve a integração completa do genoma da laranja doce 'Pêra'. Por outro lado, não está clara a origem da segunda banda diplóide, se a mesma provém do genitor laranja doce ou tangerina, pois se observa bandas monomórficas entre os genitores (homozigose para o alelo amplificado), fator que indica a inserção deste fragmento do genoma de tangerina em laranja doce nas plantas estudadas. O "primer" CX5F38 na combinação 'Pêra' + 'Nules'

evidencia a heterozigose da laranja doce e a sobreposição da banda monomórfica, presente em todos os indivíduos analisados.

Embora os microssatélites sejam tipicamente de natureza co-dominante e com alta heterozigose, sendo amplamente utilizados como marcadores moleculares a fim de determinar o nível de polimorfismo em locos de espécies intimamente relacionadas geneticamente (BROWN et al., 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), neste caso específico de citros, porém, os 7 "primers" selecionados e amplificados não foram efetivos para confirmação da hibridação somática.

Sendo assim, os "primers" SSR analisados não apontaram polimorfismo entre as espécies genitoras estudadas, sendo insuficiente para aferir a junção de ambos os genomas. Para confirmação da hibridação, é necessário o polimorfismo igualmente evidente em laranja doce e tangerina (bandas heteromórficas), sem sobreposição alélica.

Ainda é possível verificar a presença de bandas satélites ou bandas secundárias, como por exemplo, nos "primers" CX6F07, CX6F10, CX6F19, as quais são constituídas por fragmentos inespecíficos, repetidos e muito longos do DNA que foram amplificadas. Como resultado, observa-se mais de duas bandas por indivíduo diplóide e, por conta disso, as bandas satélites são desconsideradas da avaliação (GRIFFITHS et al., 2000).

4.3.2 Determinação da ploidia por citometria de fluxo

As 18 plantas aclimatizadas regeneradas dos experimentos de fusão de protoplastos foram analisadas quanto à ploidia por citometria de fluxo. A análise consiste basicamente no isolamento dos núcleos (em geral de tecido foliar), coloração com um fluorocromo e leitura da fluorescência emitida por estes núcleos. A fluorescência é proporcional ao conteúdo de DNA. Segundo Schifino-Wittmann (2001), primeiramente, é necessário aferir um padrão interno, isto é, um material cuja quantidade de DNA é conhecida, permitindo que os valores relativos sejam convertidos em valores absolutos. Normalmente são verificados dois picos de fluorescência, aquele dos núcleos 2C (células no estágio G_0 e G_1) e aquele dos núcleos 4C (células em G_2 e mitose). As suspensões nucleares extraídas das folhas produziram picos de leitura

referentes à quantidade de DNA em G_1, após a coloração com DAPI (diamidino-2-fenilindol) (CyStain UV Precise – Staining Buffer), e histogramas com resolução suficiente para a confirmação da ploidia.

Porém, uma vez constatada a ploidia e a fusão total dos 2 núcleos celulares (2n = 4x = 36 cromossomos), ainda se faz necessário análises complementares para a confirmação da origem genitora dos núcleos, através de avaliações moleculares, caracterizando desta forma o indivíduo como homocarionte (núcleos iguais ou do mesmo genitor) ou heterocarionte (núcleos diferentes ou ambos os genitores).

A Tabela 7 mostra os resultados da leitura do número de partículas (1500-2000 partículas) e o comportamento diplóide (2n = 2x = 18 cromossomos), definido pela média da fluorescência emitida pelos núcleos celulares (valores próximos de 34 a 40), a partir das amostras padrões, representado pelas plantas genitoras (P1 a P5). Com base neste padrão estabelecido, das 18 plantas analisadas, 7 apresentaram o dobro do valor padrão, comportamento este típico de natureza tetraplóide (2n = 4x = 36 cromossomos), são elas: ‘Pêra’ + ‘Fremont’ – amostras 2 e 3; ‘Pêra’ + ‘Nova’ – amostras 6 e 8; e ‘Pêra’ + ‘Nules’ – amostras 10, 11 e 16.

De acordo com Cabasson et al. (2001), as 11 plantas analisadas que apresentaram padrões próximos aos genitores de natureza diplóide, podem ser definidas como plantas clone de um dos genitores, geralmente proveniente da fonte de protoplastos embriogênica; ou caracterizadas como um híbrido aloplásmico (cíbrido). Neste último caso, apenas o genoma nuclear de um dos genitores foi preservado, enquanto que o material citoplasmático do outro genitor foi incorporado pelo processo de fusão de protoplastos. A regeneração destas plantas diplóides é possível mesmo após a fusão de protoplastos entre duas espécies 2n, muitas vezes em decorrência de falhas na fusão nuclear ou pela perda de material genético, devido ao não sincronismo dos ciclos celulares em que se encontram os protoplastos no ato da fusão (GROSSER et al., 1996; LIU; DENG, 2002).

Tabela 7 – Análise da ploidia por citometria de fluxo das plantas genitoras diplóides (P1-P5) e das plantas regeneradas (1-18) obtidas por fusão de protoplastos

Número da amostra	Genitor / Combinação	Nº Partículas	Média da leitura
P1	Padrão - Laranja doce 'Pêra'	1973	39,18
P2	Padrão - Tangerina 'Fremont'	1789	34,85
P3	Padrão - Tangerina 'Thomas'	1829	36,15
P4	Padrão - Tangerina 'Nules'	1902	35,87
P5	Padrão - Tangelo 'Nova'	1882	36,19
1	'Pêra' + 'Fremont'	1714	39,42
2	**'Pêra' + 'Fremont'**	**1856**	**69,90**
3	**'Pêra' + 'Fremont'**	**1890**	**72,36**
4	'Pêra' + 'Fremont'	1712	35,26
5	'Pêra' + 'Nova'	1667	33,42
6	**'Pêra' + 'Nova'**	**1847**	**71,12**
7	'Pêra' + 'Nova'	1845	42,17
8	**'Pêra' + 'Nova'**	**1967**	**79,69**
9	'Pêra' + 'Thomas'	1922	36,45
10	**'Pêra' + 'Nules'**	**1590**	**69,43**
11	**'Pêra' + 'Nules'**	**1762**	**68,50**
12	'Pêra' + 'Nules'	1823	40,18
13	'Pêra' + 'Nules'	1732	38,27
14	'Pêra' + 'Nules'	1628	35,87
15	'Pêra' + 'Nules'	1758	32,74
16	**'Pêra' + 'Nules'**	**1673**	**76,78**
17	'Pêra' + 'Nules'	1882	36,40
18	'Pêra' + 'Nules'	1574	32,58

Contudo, a produção de cíbridos via fusão de protoplastos é também considerada uma alternativa ao melhoramento genético de plantas visando potencializar o desempenho celular ao manter o genoma alvo intacto e introduzir organelas de interesse, sobretudo cloroplastos e mitocôndrias altamente competitivas quanto ao desempenho assimilatório e energético, respectivamente (GROSSER; OLLITRAUT; OLIVARES-FUSTER, 2000). Com base no valor celular agregado no cíbrido por meio da fusão de protoplastos, posteriormente, as plantas diplóides produzidas nos experimentos realizados neste trabalho serão identificadas quanto a sua natureza cíbrida e avaliadas quanto ao seu desempenho fisiológico, em comparação às plantas genitoras.

4.3.3 Caracterização das plantas regeneradas dos experimentos de fusão de protoplastos

As fusões de protoplastos envolvendo laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’ resultaram em 4 plantas (amostras 1-4 – Tabela 7). As plantas 2 e 3 (amostras 2 e 3) confirmaram a presença de 36 cromossomos (4x) via citometria de fluxo das suspensões nucleares extraídas de folhas, cujos picos de leitura da quantidade de DNA em G_1, após a coloração com DAPI, resultaram histogramas com resolução suficiente para identificar as plantas diplóides (genitores-padrão com média de leitura entre 34-40) e tetraplóides (4x com média de leitura entre 69-73) (Figura 16-b). Das 2 plantas tetraplóides, apenas 1 (amostra 2) foi escolhida para análise molecular com marcadores tipo RAPD, sendo que a mesma foi confirmada ser um híbrido somático heterocarionte pela análise morfológica, apresentando características morfológicas intermediárias de ambos os genitores como formato foliar e coloração, além da presença de pequeno pecíolo alado (Figura 16-c); e principalmente pela análise molecular, cujos ‘primers’ que apresentaram polimorfismo envolvendo os genitores de laranja doce ‘Pêra’ e tangerina ‘Fremont’ foram: A4, A7, AA7 e A10 (Figura 16-a).

As fusões de protoplastos envolvendo laranja doce ‘Pêra’ + tangelo ‘Nova’ resultaram em 4 plantas (amostras 5-8 – Tabela 7). Da mesma forma que a combinação laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’, as plantas 2 e 3 (amostras 6 e 8) confirmaram a presença de 36 cromossomos (4x) via citometria de fluxo das suspensões nucleares extraídas de folhas, com picos de leitura da quantidade de DNA em G_1 que resultaram histogramas em que foi também possível identificar as plantas diplóides (genitores-padrão com média de leitura entre 34-40) e tetraplóides (4x com média de leitura entre 71-80) (Figura 17-b). Das 2 plantas tetraplóides identificadas, apenas 1 (amostra 6) foi escolhida para análise molecular com marcadores tipo RAPD. Após a visualização em gel de agarose, a planta 2 (amostra 6) foi confirmada como um híbrido somático heterocarionte, por conta do polimorfismo envolvendo os genitores de laranja doce ‘Pêra’ e tangelo ‘Nova’ amplificados pelos “primers”: A4 e A7 (Figura 17-a). Quanto à análise morfológica, o híbrido apresenta folhas com características morfológicas das 2 espécies de citros estudadas, bem como algumas características típicas de híbridos

somáticos tais como o aumento da espessura do limbo foliar e folhas com coloração mais intensa (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), além de um formato foliar ovalado, diferenciado de ambos os genitores (Figura 17-c).

As fusões de protoplastos envolvendo laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’ resultaram em 9 plantas (amostras 10-18 – Tabela 7). Nesta combinação, 3 das 10 plantas avaliadas por citometria de fluxo (amostras 10, 11 e 16 – Tabela 7) apresentaram configuração cromossômica equivalente a 4x (média de leitura entre 68-77), sendo portanto, tetraplóides em relação ao padrão diplóide estabelecido (genitores-padrão com média de leitura entre 34-40) (Figura 18-b). Das 3 plantas tetraplóides identificadas, apenas 1 (amostra 10) foi escolhida para análise molecular, na qual, de acordo com o polimorfismo entre os genitores, evidenciado pela amplificação dos “primers” A4, A7, AA7 e A10. A planta analisada foi caracterizada como um híbrido somático heterocarionte (Figura 18-a). Em complementação às análises de ploidia e molecular, na avaliação morfológica foi possível identificar com clareza características peculiares aos híbridos somáticos, tais como formato foliar intermediário, pecíolo alado bem evidente, folhas mais escuras e bastante espessadas (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990) (Figura 18-c).

As fusões de protoplastos envolvendo laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Thomas’ resultaram em 1 planta aclimatizada até o momento (amostra 9 – Tabela 7), a qual foi analisada quanto a sua ploidia por citometria de fluxo. O resultado da leitura do fluxo das suspensões nucleares extraídas de folhas apontou a presença de 18 cromossomos, com média de leitura igual a 36,45, em comparação aos genitores-padrão que apresentaram média de leitura entre 34-40, definindo-a, assim, como uma planta diplóide. Entretanto, as plantas *in vitro* desta combinação que estão concluindo o processo de regeneração, serão aclimatizadas e posteriormente avaliadas quanto à ploidia, morfológicamente e através de marcadores moleculares do tipo SSR e RAPD, visando à identificação de um híbrido somático.

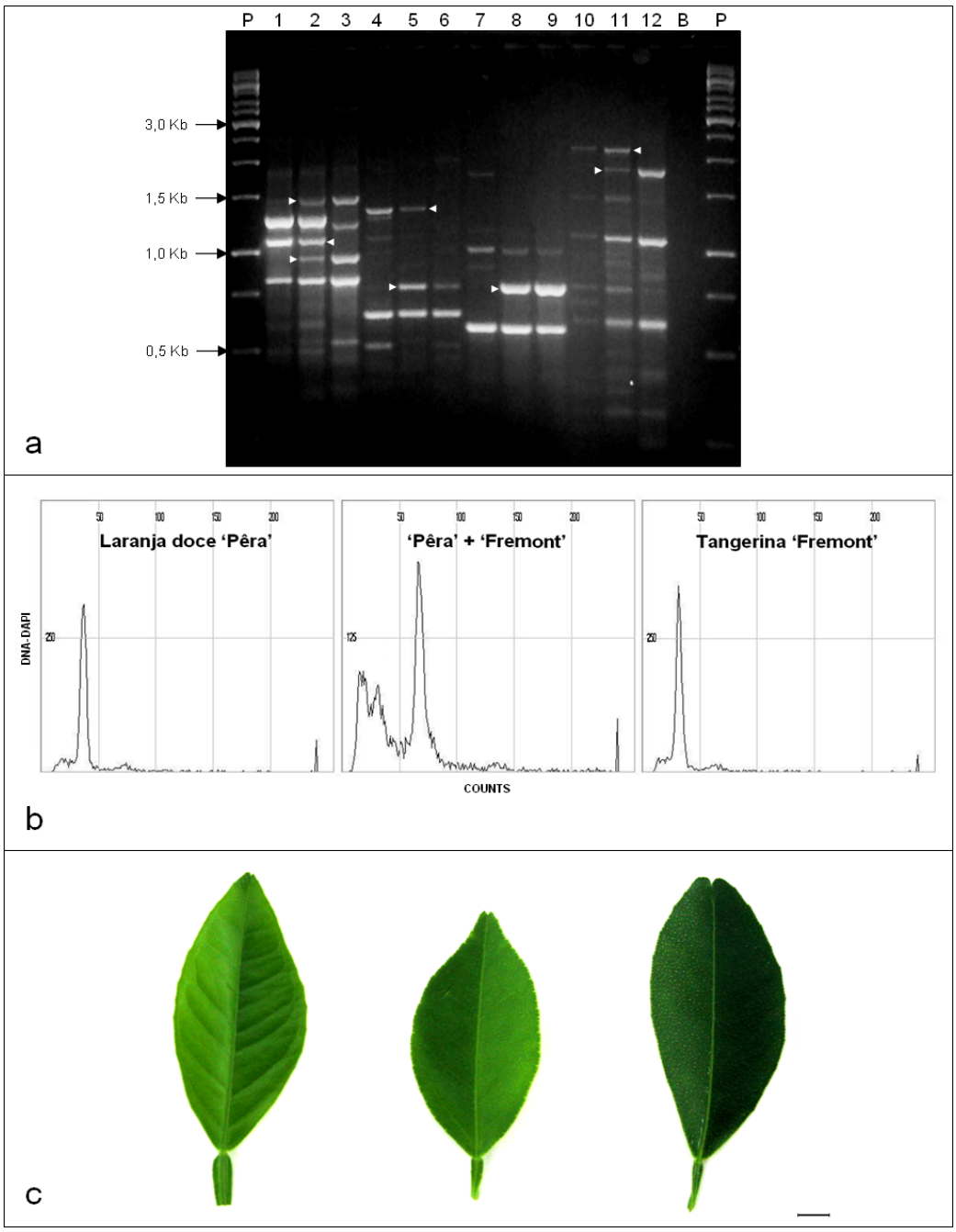

Figura 16 – Caracterização dos produtos de fusão de protoplastos de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont'. a) Fragmentos RAPD. Colunas 1 a 3 = "primer" A4; colunas 4 a 6 = "primer" A7; colunas 7 a 9 = "primer" AA7; e colunas 10 a 12 = "primer" A10. Colunas 1, 4, 7, e 10 = laranja doce 'Pêra'; colunas 2, 5, 8 e 11 = produto da fusão de protoplastos; colunas 3, 6, 9 e 12 = tangerina 'Fremont'. B = branco. P = ladder 1 Kb. b) Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont' (centro) e dos padrões diplóides de laranja doce 'Pêra' (esquerda) e tangerina 'Fremont' (direita). c) Morfologia foliar de laranja doce 'Pêra' (esquerda), laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Fremont' (centro) e tangerina 'Fremont' (direita). Barra = 1 cm

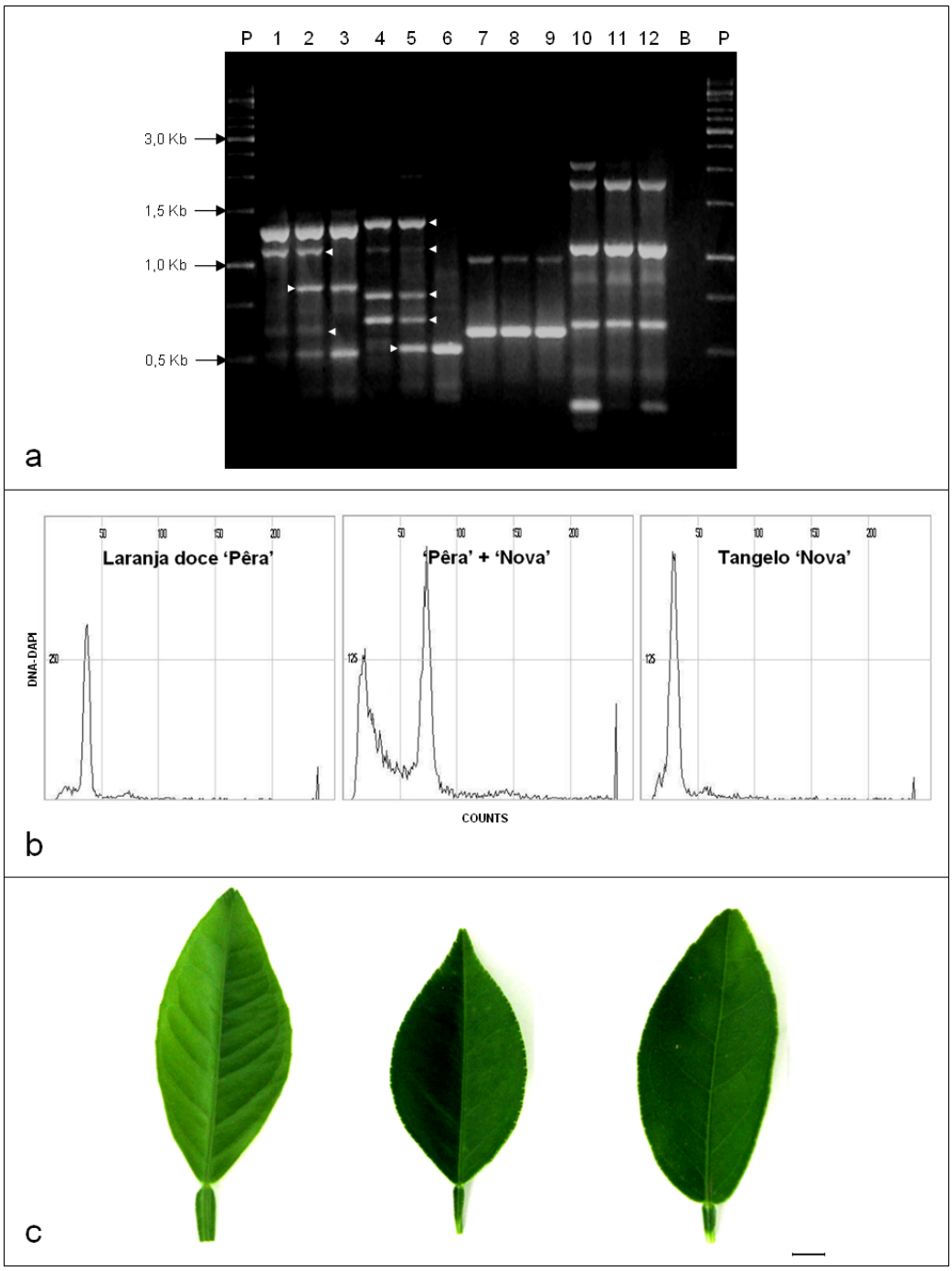

Figura 17 – Caracterização dos produtos de fusão de protoplastos de laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova'. a) Fragmentos RAPD. Colunas 1 a 3 = "primer" A4; colunas 4 a 6 = "primer" A7; colunas 7 a 9 = "primer" AA7; e colunas 10 a 12 = "primer" A10. Colunas 1, 4, 7, e 10 = laranja doce 'Pêra'; colunas 2, 5, 8 e 11 = produto da fusão de protoplastos; colunas 3, 6, 9 e 12 = tangelo 'Nova'. B = branco. P = ladder 1 Kb. b) Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova' (centro) e dos padrões diplóides de laranja doce 'Pêra' (esquerda) e tangelo 'Nova' (direita). c) Morfologia foliar de laranja doce 'Pêra' (esquerda), laranja doce 'Pêra' + tangelo 'Nova' (centro) e tangelo 'Nova' (direita). Barra = 1 cm

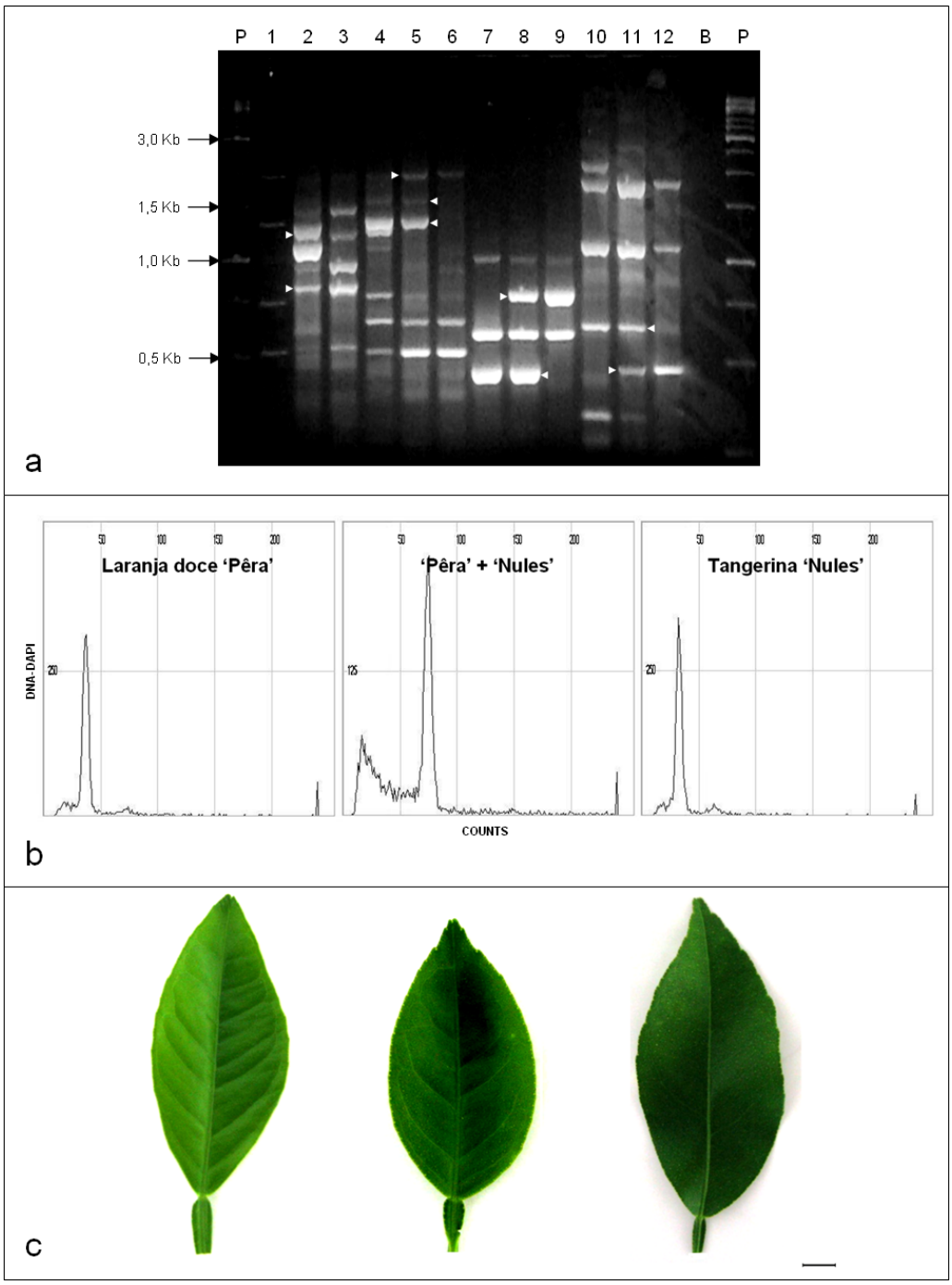

Figura 18 – Caracterização dos produtos de fusão de protoplastos de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules'. a) Fragmentos RAPD. Colunas 1 a 3 = "primer" A4; colunas 4 a 6 = "primer" A7; colunas 7 a 9 = "primer" AA7; e colunas 10 a 12 = "primer" A10. Colunas 1, 4, 7, e 10 = laranja doce 'Pêra'; colunas 2, 5, 8 e 11 = produto da fusão de protoplastos; colunas 3, 6, 9 e 12 = tangerina 'Nules'. B = branco. P = ladder 1 Kb. b) Histogramas obtidos das análises por citometria de fluxo de laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules' (centro) e dos padrões diplóides de laranja doce 'Pêra' (esquerda) e tangerina 'Nules' (direita). c) Morfologia foliar de laranja doce 'Pêra' (esquerda), laranja doce 'Pêra' + tangerina 'Nules' (centro) e tangerina 'Nules' (direita). Barra = 1 cm

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste trabalho concluiu-se que:

- O processo de fusão de protoplastos demonstrou ser viável, bem como o protocolo da cultura e regeneração de plantas empregado;
- A variedade de laranja doce ‘Pêra’ apresentou maior potencial embriogênico do que a ‘Westin’, somado a uma alta capacidade de regeneração; e
- Os marcadores moleculares do tipo RAPD empregados confirmaram a hibridação somática das plantas tetraplóides regeneradas a partir da fusão de protoplastos entre laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Fremont’, laranja doce ‘Pêra’ + tangelo ‘Nova’ e laranja doce ‘Pêra’ + tangerina ‘Nules’.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Instituto AgraFNP, p.271-306, 2010.

AN, H.J.; JIN, S.B.; KANG, B.C.; PARK, H.G. Production of somatic hybrids between Satsuma mandarin (Citrus unshiu) and navel orange (*Citrus sinensis*) by protoplast fusion. **Journal of Plant Biology**, v.51, n.3, p.186-191, 2008.

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

BACCHI, O. Observacões citológicas em citrus: VI. Resultados preliminares do efeito da colchicina sobre sementes em germinação. **Bragantia**, Campinas, v.4, n.11, p.679-91, 1944.

BALLVÉ, R.M.L.; MEDINA-FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing. **Brazilian Journal of Genetics**, Sociedade Brasileira de Genética, v.20, n.4, p.697-702, 1997.

BARRET, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, v.1, n.2, p.105-136, 1976.

BENEDITO, V.A. Hibridação somática entre tangerina 'Cleópatra' e laranja 'Azeda' por fusão de protoplastos, 62p. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, p.33-38, 2000.

BENGOCHEA, T.; DODDS, J.H.A. **Plant protoplast**: a biotechnological tool for plant improvement. London: Lord, 1986. 90 p.

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

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

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. 926 p.

BROWN, S.M.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; SÊNIOR, M.L.; WANG, T.Y.; DUNCAN, R.R.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; KRESOVICH, S. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSR) in sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, Amsterdam, v.93, p.190-198, 1996.

BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v.146, n.2, p.188-195, 1985.

BURGER, D. W.; HACKETT, W. P. The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.56, p.324-328, 1982.

CABASSON, C.M.; LURO, F.; OLLITRAULT, P.; GROSSER, J.W. Nonrandom inheritance of mitochondrial genomes in *Citrus* hybrids produced by protoplast fusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, n.7, p.604–609, 2001.

CAI, X.D.; FU, J.; DENG, X.X., GUO, W.W. Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seed Citrus cultivars. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.90, p.275-283. 2007.

CALIXTO, M.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; VIEIRA, M.L.C. Somatic hybridiation between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.721-724, jul. 2004.

CARNEIRO, V.T.C.; CONROI, T.; BARROS, L.M.G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p.413-458.

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

CHEN, C.; BOWMAN, K. D.; CHOI,Y. A.; DANG, P. M.; RAO, M. N.; HUANG, S.; SONEJI, J. R.; MCCOLLUM, T. G.; GMITTER JUNIOR., F. G. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliate*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v.4, p.1-10, 2008.

CHEN, C.; ZHOU, P.; CHOI, Y. A.; HUANG, S.; GMITTER JUNIOR, F.G. Mining and characterizing microsatellites from *Citrus* ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, Amsterdam, v.112, p.1248-1257, 2006.

CORAZZA-NUNES, M. J.; MACHADO, M. A.; NUNES, W. M. C.; CRISTOFANI, M.; TARGON, M. L. P. N. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.126, p.169-176, 2002.

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

COSTA, M.A.P.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Somatic hybridisation for improvement of citrus rootstock: production of five new combination with potencial for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Cambridge, v.43, p.1151-1156, 2003.

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

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

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithesburg, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

ESEN, A.; SOOST, R.K. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy rations in Citrus, **Actos del I Congresso: mundial de citricultura**. Spain: Murcia; 1973.

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Amsterdam, v.95, p.408-417, 1997.

FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em: http://faostat.org.br. Acesso em: 8 ago. 2010.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças de citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.288-295, 2000. Suplemento.

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

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

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

FROST, H.B. Genetics and breeding. In: H.J. Webber & L.D. Batchelor (Eds.). **The citrus industry**, v.1, p.817–913. University California Press, Berkeley, Los Angeles, 1943.

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**, v.2, p.290-324. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 1968.

FUNDECITRUS. Disponível em: http://www.fundecitrus.com.br. Acesso em: 19 abr. 2010.

FUNGARO, M. H. P.; VIERA, M. L. C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.41, n.12, p.1151-1159, 1989.

GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perenial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. p. 335-369.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **An introduction to Genetic Analysis**. 7 ed. New York: W H Freeman & Co. 2000.

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Applications of somatic hybridization and cybrization in crop improvement, with citrus as a model. **In Vitro Cell Development Biology**, Gaithersburg, v.41, p.220-225, 2005.

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.1., p.1-15, 2010

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; SESTO, F.; DENG, X.X.; CHANDLER, J.L. Six new hybrids somatics and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.1, p.169-173, 1992.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; TUSA, N.; REFORGIATO RECUPERO, G.; CUCINOTTA, P. Further evidence of a cybridization requeriment for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.15, p.672-676, 1996.

GROSSER, J.W.; JIANG, J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization, an integral component of citrus

cultivar improvement: I. Scion improvement. **HortScience**, St Joseph, v.33, n.6, p.1057-1059, 1998.

GROSSER, J. W.; LOUZADA, E. S.; GMITTER, F. G.; CHANDLER, J. L. Somatic hybridizationo f complementaryc itrus rootstocks: five new hybnds. **HortScience,** St Joseph, v.29, n.1, p.812-813, 1994.

GROSSER, J.W.; OLLITRAUT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Invited review: somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilite variety improvement. **In Vitro Cell Developmental Biology**, Gaithersburg, v.36, p.434-449, 2000.

GUERRA, M. P. A citogenética de citrus e alguns outros grupos de plantas cultivadas no nordeste. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17, 2000, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p.11-18.

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

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

GUO, W.W.; ZHOU, C.H.; YI, H.L.; DENG, X.X. Intergeneric somatic hybrid plants between Citrus and Poncirus trifoliata and evaluation of their root rot resistance, **Acta Botanica Sinica**, v.42, p.668-672, 2000.

HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.599-609, 1996.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://ibge.gov.br. Acesso em: 7 de mai. 2010.

JASKANI, M.J.; SAGHIR-UL-HASNAIN, M.A.; BASHIR, M.A.; KHAN, I.A. Morphological description of citrus colchiploids. In Proceedings of 8th International Citrus Congress, v.1. International Society of Citriculture, Sun City, p.130-132, 1996.

JOHNSON, A.A.T.; VEILLEUX, R.E.Somatic hybridization and application in plant breeding. **Plant Breeding Reviews**, New York, v.20, p.167-225, 2001.

JOSHI, S.P.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Molecular markersin plant genome analysis. **Current Science**, Bangarole, v.77, n.2, p.230-240, 1999.

KOBAYASHI, S.; FUJIWARA, K.; OIYAMA, T.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Somatic hybridization between navel orange and 'Murcott' tangor. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1988, New York. **Proceedings**... New York, 1988. v. 1, n.1, p. 135-140.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; UCHIMIYA, H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.4, p.249-259, 1985.

KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T. Production of somatic hybrid plants through protoplast fusion of citrus. **Japan Agricultural Research Quartely**, Tsukuba, v.22, p.181-188, 1988.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H.; IKEDA, I. Plant regeneration from 'Trovita' orange protoplasts. **Japanese Journal of Breeding**, Bunkyo-Ku, v.33, p.119-122, 1983.

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

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

KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.;NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, St Paul, v.83, p.495-502, 1993.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell,** Rockville, v.5, p.1245-1437, 1993.

KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.47, p.27-33, 1991.

KUNITAKE, H.; MII, M. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.) **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.280-298. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30).

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plant and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, p.1111-1115, 1993.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.23, p.401-411, 2002.

LEE, L.S. Citrus polyploidy - origins and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.39, p.735-747, 1988.

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

LING, J-T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.39, p. 325-333, 1989.

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

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

MACHADO, M. A; COLETTA FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; POMPEU JÚNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranian mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.321-326, 1996.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. 926 p.

MATOS, G. V. C.; PASSOS, I. R. S.; BINSFELD, P. C.; DORNELAS, M. C.; COTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C. Hibridação somática em *Passiflora spp.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. Resumos... Águas de Lindóia: SBG, 2005. 1 CD-ROM.

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

MELCHERS, G.; SACRISTAN, M.D.; HOLDER, A.A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated fromfused protoplasts. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v.43, p.203-218, 1978.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.17, n.1, p.49-59, 2001.

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

MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; FARIAS, P. C. M.; BENEDITO, V. A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v.37, n.4, p.256-261, 2001.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplast of Brazilian *Citrus* cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.727-732, 2000.

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

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1 p.116-152.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, University Park, v.50, n.2, p.76-80, 1996.

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

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

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.

NICOLOSI, E. Origin and taxonomy. In: KHAN, I. A. (Ed.) **Citrus genetic, breeding and biotechnology**. Oxford: CAB International, 2007. p.18-44.

NIEDZ, R. P.; HYNDMAN, S. E.; WYNN, E. T.; BAUSHER, M.G. Normalizing sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck) somatic embryogenesis with semi-permeable membranes. ***In Vitro* Cellular Developmental Biology-Plant**, London, v.38, p.552-557, 2002.

NOVELLI, V. M., CRISTOFANI, M., SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.90-96, 2006.

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

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

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

OLLITRAULT, P.; MICHAUX-FERRIERE, N. Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. In: Proceedings of the 7th international citrus congress, vol 1, International Society of Citriculture, Acireale, Italy, p.193-198, 1992.

PALMIERI, D. A.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E. F.; OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, M. A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of *Citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.1009-1018, 2007.

PAVAN, A. Fusão de protoplastos de citros e avaliação da resistência do híbrido somático laranja ‘Hamlin’ + mexerica ‘Montenegrina’ a *Xanthomonas axonopodis* pv. citri e *Xylella fastidiosa*. 2006. 80p. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PAVAN, A.; CALIXTO, M.C.; CARDOSO, S.C.; MENDES, B.M.J.; BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, J.R.S.; CARVALHO, C.R.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Evaluation of ‘Hamlin’ sweet Orange + ‘Montenegrina’ mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomons axonopodis* pv*. citri* and *Xylella fastidiosa*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.113, p.278-285, 2007.

PERES, N.A.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreakers of alternaria brown spot of citrus in Brazil and Argentine. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.6, p.750, 2003.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of Alternaria brown spot on Murcott tangor in Brazil. **Crop Protection**, Guildford v.25, p.454-460, 2005.

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

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundiprensa, 1990. 258 p.

PIO, R.M. A qualidade e as exigências do mercado de tangerinas. **Revista Brasileira**

de Fruticultura. Cruz das Almas, v.25, n.3, 2003.

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo. In: INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001. Ribeirão Preto. **Proceedings**... Ribeirão Preto: [s.n.], 2001. p.75-82.

REIS, R.F.; GOES, A.D.E.; MONDAL, S.M.; TIMMER, L.W. Effectiveness of fungicides and susceptibility of fruit and leaves of tangerine, tangor and tangelos to infection by *Alternaria alternata*, the cause of brown spot. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.3, p.1-12, 2006.

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

RUIZ, C.; ASINS M. J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.826-36, 2003.

SAUNT, J. Citrus varieties of the world: an illustrated guide. **Norwick: Sinclair International**, 1990. 128p.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.897-902, 2001.

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

SIM, G.E.; LOH, C.S.; GOH, C.J. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of Citrus mitis Blanco. **Plant Cell Reports**, v.7, p.418-420. 1988.

SOLEIL, Z.; KIMCHI, M. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.145, p.389-391, 1997.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

STARRANTINO, A.; RECUPERO, G.Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females 9 4x males. In: Proceedings 4th International Citrus Congress, v.1. International Society of Citriculture, Tokyo, p.31-32, 1981.

SWINGLE, W.T. The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subf. Aurantioideae). In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1943. v.1, p.129-474.

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

TALON, M.; GMITTER JUNIOR., F. G. *Citrus* genomics. Review Article - **International Journal of Plant** Genomics, Cairo, v.2008, n.1, p.528-361, 2008.

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

TIMMER, L.W., SOLEL, Z., GOTTWALD, T.R., IBANEZ, A.M., ZITKO, S.E. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of Alternaria alternata, the cause brown spot of citrus. **Phytopathology**, v.88, p.1218-1223, 1998.

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

TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEL, Z.; AZUYA, K. Alternaria diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v.42, p.99-112, 2003.

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

VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of citrus protoplasts. In: BAJAJ, P.S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engeneering I**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. cap. 2, p. 147-159. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 8).

VARDI, A.; HUTCHISON, D.J.; GALUN, E. A protoplast-to-tree system in Microcitrus based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus. **Plant Cell Reports**, v.5, p.412-414, 1986.

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

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1967. v.1, p.1-39.

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E. C.; SCHWARZ, S. F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Caracterização molecular de uma progênie de

tangerineira ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, jul, p.1523-1529, 2010.

WHITESIDE, J.O. A newly recorded Alternaria-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, St, Paul, v.60, p.326–329, 1976.

ANEXOS

Composição das soluções e meios de cultura para protoplastos, calos, embriões e plântulas de citros

1. EME Regular (0,146M)	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	1,65
KNO_3	1,90
$MgSo_4.7H_2O$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose*	50,00
Extrato de malte	0,50
Ágar	8,00
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

- Para cultura de calos e células em suspensão, autoclavar por 20 minutos a 15 psi.
* Para cultura de protoplastos, adicionar a sacarose nas seguintes proporções:
  para EME 0,6M = usar 205,38 $g.L^{-1}$
  para EME 0,7M = usar 239,61 $g.L^{-1}$
  para EME 0,8M = usar 273,84 $g.L^{-1}$, e esterilizar em filtro de 0,2 μm.

2. H+H	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	0,825
KNO_3	0,95
$MgSo_4.7H_2O$	0,185
KH_2PO_4 (monobásico)	0,075
K_2HPO_4 (dibásico)	0,01
$MgSO_4$	0,185
KH_2PO_4 (monobásico)	0,075
K_2HPO_4 (dibásico)	0,01
KCl	0,75
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01

Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose*	50,00
Extrato de malte	0,50
Glutamina	1,55
Ágar	8,00

Ajustar o pH para 5.8 com KOH
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

3. BH_3	**$g.L^{-1}$**
$MgSO_4$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
KCl	1,50
Pantotenato de cálcio	0,05
Ácido ascórbico	0,10
Cloreto de colina	0,05
Ácido p-aminobenzóico	0,001
Ácido fólico	0,02
Riboflavina	0,01
Biotina	0,001
Retinol (vitamina A)	0,00001
Colecalciferol (vitamina D_3)	0,00002
Vitamina B_{12}	0,00004
KI	0,00075
Piruvato de sódio	0,02
Ácido cítrico	0,04
Ácido málico	0,04
Ácido fumárico	0,04
Frutose	0,25
Ribose	0,25
Xilose	0,25
Manose	0,25
Ramose	0,25
Celobiose	0,25
Galactose	0,25
Manitol	0,25
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744

Extrato de malte	1,00
Sacarose*	-
Manitol	81,99
Glutamina	3,10
Caseína hidrolisada	0,25
Adicionar 20 mL de água de côco	
Ajustar o pH para 5.7 com KOH	

* Adicionar a sacarose nas seguintes proporções:
para BH_3 0,6M = usar 51,35 $g.L^{-1}$
para BH_3 0,7M = usar 85,56 $g.L^{-1}$
para BH_3 0,8M = usar 119,77 $g.L^{-1}$, e esterilizar em filtro de 0,2 μm.

4. 1500	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	1,65
KNO_3	1,90
$MgSo_4.7H_2O$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose	50,00
Extrato de malte	1,50
Ágar	8,00
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

5. B+	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	1,65
KNO_3	1,90
$MgSo_4.7H_2O$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005

Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose*	25,00
Extrato de malte	1,50
Cumarina	14,60
Ácido naftaleno acético	0,02
Ágar	8,00
Adicionar 20 mL de água de côco	
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

6. RMAN	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	0,825
KNO_3	0,95
$MgSo_4.7H_2O$	0,185
KH_2PO_4 (monobásico)	0,075
K_2HPO_4 (dibásico)	0,01
H_3BO_3	0,0031
$MnSO_4.H_2O$	0,0084
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0043
KI	0,000415
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,000125
$CuSO_4.5H_2O$	0,0000125
$CoCl_2.6H_2O$	0,0000125
Mio-inositol	0,05
Tiamina-HCl	0,005
Piridoxina-HCl	0,005
Ácido nicotínico	0,0025
Glicina	0,001
$CaCl_2.2H_2O$	0,215
Na_2EDTA	0,01862
$FeSO_4.7H_2O$	0,01372
Sacarose	25,00
Ácido naftaleno acético	2,01
Carvão ativado	0,50
Ágar	8,00
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

7. CPW	**$g.L^{-1}$**
KH_2PO_4	0,0272
KNO_3	0,10
$MgSO_4$	0,25
KI	0,00016
$CuSO_4$	0,0000025
$CaCl_2.2H_2O$	0,15
- Para CPW 13M, adicionar 13 g.100 mL^{-1} de manitol	
- Para CPW 25M, adicionar 25 g.100mL^{1} de sacarose	
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

8. Solução Enzimática	**$g.L^{-1}$**
Manitol (0,7M)	128,00
$CaCl_2$ (24,5mM)	3,60
NaH_2PO_4 (0,92mM)	0,11
MES (6,15mM)	1,20
Celulase a 1% (Onozuka RS)	10,00
Macerase a 1%(R 10)	10,00
Pectolyase Y-23 a 0,2%	2,00
Ajustar o pH para 5.6 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

9. Solução de PEG	**$g.L^{-1}$**
Polietilenoglicol (PM = 1450)	400,00
$CaCl_2.2H_2O$	9,70
Glicose	54,10
Ajustar o pH para 6.0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

10. Solução de lavagem "A"	**$g.L^{-1}$**
Glicose	72,00
$CaCl_2.2H_2O$	9,70
Adicionar 100 mL de DMSO	
Ajustar o pH para 6.0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

11. Solução de lavagem "B"	**$g.L^{-1}$**
Glicina	22,50
Ajustar o pH para 10.5 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

12. 1:1:1
1 parte de BH_3 0,6M
1 parte de EME 0,6M
1 parte de EME regular (0,146M)
Ajustar o pH para 5.7
Esterilizar em filtro de 0,2 μm

13. 1:2
1 parte de BH_3 0,6M
2 partes de EME Regular (0,146M)
Ajustar o pH para 5.7
Esterilizar em filtro de 0,2 μm