**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**JEAN CARLOS CARDOSO**

# Cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

**Piracicaba**

**2012**

**JEAN CARLOS CARDOSO**

# Cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e Ambiente

Orientador: Dr. Rodrigo Rocha Latado

Co-orientador: Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli

**Piracicaba**
**2012**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Cardoso, Jean Carlos
Cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.) / Jean Carlos Cardoso; orientador Rodrigo Rocha Latado, co-orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
133f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biotecnologia de plantas 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Desenvolvimento vegetal 4. Embriogênese 5. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDU 606 : 63

# DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha esposa Fernanda

e aos meus pais João e Glace,

que nos momentos mais difíceis tiveram sabedoria,

compreensão e uma palavra otimista

para que esse trabalho fosse realizado.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me guiou no encontro das pessoas adequadas para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado pelos anos de trabalho em conjunto, dedicação na orientação para a realização desse projeto e pelo pronto auxílio, mesmo nos momentos mais difíceis de sua realização.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, que mesmo com tempo limitado e em momentos difíceis, tornou possível a realização e apoio a esse trabalho, auxiliando cientificamente e em minha carreira profissional.

Agradeço também à Dra. Maria Antonieta Germanà, pela amizade, receptividade, profissionalismo e contribuição intelectual, apresentados desde o momento do primeiro contato até a finalização do estágio e execução dos experimentos aqui apresentados.

Agradecimentos à pós-graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) que apoiou completamente a realização dessa tese de doutorado. Agradecimento ao Laboratório de Biotecnologia e Laboratório de Microscopia do CENA/USP que apoiaram e auxiliaram na realização desse trabalho com a disponibilidade de materiais, equipamentos e pessoal. Ao Laboratório de Melhoramento do CENA/USP que disponibilizaram equipamentos e pessoal para a realização das irradiações de grãos de pólens de laranja doce.

Agradecimentos ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira – CCSM/APTA/IAC, pelo estágio concedido, em especial ao laboratório de Biotecnologia e ao Dr. Marcos Machado, pela disponibilização ilimitada de infra-estrutura e pessoal para a realização desse trabalho.

Agradecimentos ao Núcleo de Apoio em Pesquisa à Microscopia Eletrônica na Agropecuária (ESALQ/USP) pela pronta disponibilidade de infra-estrutura e pessoal para a realização desse trabalho.

Agradecimentos a Facoltà di Agraria da Università degli Study di Palermo, Palermo, Itália, pela disponibilidade de infraestrutura e pessoal para a realização de parte dos experimentos conduzidos nessa tese.

Especiais agradecimentos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desse projeto e da bolsa de doutorado concedida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro aos projetos do INCT, do qual fazem parte o Centro de Citricultura Sylvio Moreira, principalmente na aquisição do equipamento citômetro de fluxo.

Agradeço à bióloga Joice Fernanda Garbin, pela amizade e auxílio nos trabalhos de partenogênese *in situ* de laranja doce e análises de marcadores moleculares. Meus agradecimentos à Engª Agrª Vanessa Voigt, à biotecnologista Maisa Curtolo e à bióloga Salete Rocha, pelo auxílio nos trabalhos com marcadores moleculares.

À bióloga Mônica Lanzoni Rossi pelo treinamento, paciência, amizade e qualidade dos trabalhos de microscopia eletrônica e de luz, que enriqueceram esse trabalho em todos os aspectos.

Agradeço também aos amigos Ahmed Abdelgalel Mohamed, Benedetta Chiancone e Fabrizio Cassales pelos momentos de amizade e de ajuda recíproca na execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto e ao amigo Paulo Cassieri, pelas conversas amigáveis e pronto atendimento para a irradiação dos grãos de pólen utilizados nos trabalhos de partenogênese.

Aos Profs. Drs. Mariângela Cristofani-Yaly, João Batista Teixeira e Antônio Vargas de Oliveira Figueira que contribuíram intelectualmente nas sugestões de modificação da direção do trabalho realizado, e que possibilitaram a obtenção de resultados promissores e avanço nas técnicas utilizadas.

À bibliotecária Marília R.G. Henyei pelo pronto atendimento no esclarecimento de dúvidas e pelo auxílio na formatação dessa tese.

Finalmente, agradeço a CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela coordenação, avaliação e fomento dos Programas de Pós-Graduação no Brasil.

**“***Se você quer fazer do mundo um lugar melhor, olhe para si mesmo e faça uma mudança. Estou começando com o homem no espelho.***”**

**Mahatma Gandhi,** interpretado e escrito por **Siedah Garrett** e **Glen Ballard**, na letra da música ‘Man in the Mirror’.

## RESUMO

CARDOSO, J. C. **Cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.).** 2012. 133f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A produção de linhagens completamente homozigotas em programas de melhoramento genético de citros é difícil e demorada, e a obtenção de plantas duplo-haplóides pode ser utilizada para aumentar a eficiência de programas de melhoramento. No entanto, muitos são os fatores associados ao sucesso na regeneração de plantas haplóides e/ou duplo-haplóides. Os objetivos deste projeto foram a obtenção de plantas haplóides e/ou duplo-haplóides de laranja doce (*Citrus sinensis*) a partir dos micrósporos, utilizando as técnicas de cultura de anteras, e/ou a partir da embriogênese induzida a partir da oosfera, por meio de técnicas de partenogênese *in situ* e *in vitro*, que resultam na obtenção de embriogênese gamética. Para tal, foram realizados estudos preliminares de biologia reprodutiva de *C. sinensis*, bem como a realização de trabalhos de cultura de anteras de laranja-doce, foram conduzidos testando-se aproximadamente 100 genótipos, além dos efeitos de tratamentos térmicos aplicados as anteras de laranja doce. Para os experimentos de partenogênese *in situ* foram testados os efeitos das doses de radiação aplicadas aos grãos de polens utilizados para a polinização e do uso de pólens de espécies consideradas distantes na obtenção de embriões e plantas haploides e duplo-haplóides de *C. sinensis*. Para a partenogênese *in vitro* foram testados os efeitos de meios de cultura na indução de embriogênese a partir de calos provenientes dos ovários. Os resultados obtidos permitiram a indução de calos, calos embriogênicos, e a regeneração de embriões a partir do cultivo *in vitro* de anteras. Também foi possível a seleção de genótipos mais responsivos a essa técnica e que permitirão a realização de trabalhos futuros para o processo de obtenção de plantas haploides e duplo-haplóides em laranja doce. Na maioria dos casos, os calos embriogênicos, embriões e plântulas obtidas da cultura *in vitro* de anteras foram diploides (2n) e molecularmente similares às plantas doadoras dos explantes. No entanto, houve a obtenção de um calo embriogênico, proveniente do cultivo *in vitro* de anteras de um híbrido (*Citrus clementina* x *C. sinensis* 'Hamlin'), que até o momento demonstrou um padrão de bandamento diferente e em homozigose para quatro conjuntos de primers microssatélites testados. A confirmação da ploidia e da origem gamética desse calo ainda é dependente da realização de análises com os embriões provenientes desses calos e de um maior número de marcadores moleculares. Nos experimentos de partenogênese *in situ* foram obtidos embriões e plântulas provenientes da polinização com polens irradiados, sendo identificadas plântulas com grande variação no nível de ploidia e com diferenças moleculares entre as progênies e os parentais, porém heterozigotas. Nas técnicas de partenogênese *in vitro* foi possível a obtenção de um protocolo para regeneração de embriões somáticos a partir de calos de ovários, no entanto, também não foram observadas a obtenção de plantas haploides e/ou duplo-haplóides. Os resultados obtidos confirmam a genótipo-dependência das respostas relacionadas à embriogênese gamética em *Citrus*, bem como do melhor entendimento dos aspectos reprodutivos de laranja doce.

Palavras-chave: Embriogênese gamética e somática. Biologia Reprodutiva. Haplóide. Duplo-haplóide. Cultivares. Homozigose.

## ABSTRACT

CARDOSO, J.C. **Anther culture and *in vitro* and *in situ* parthenogenesis of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck.) genotypes**. 2012. 133f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The production of completely homozygous lines in citrus breeding program is hard, and double-haploid plantlets (completely homozygous lines) can be used to improve these breeding programs. However, many factors are associated with the success of the regeneration of haploid or double-haploid plants. The aim of this study was the induction and regeneration of haploid and double-haploid plantlets from sweet oranges (*Citrus sinensis*) from microspores, using the techniques of anther culture and from oocyte, using *in situ* and *in vitro* parthenogenesis, that result in the production of gametic embryos. To this, there were conducted preliminary studies with reproductive biology of *C. sinensis*, as well as, experiments with anther culture of more than 100 genotypes of sweet orange and the effects temperature treatments. To experiments of *in situ* parthenogenesis there were tested the effects of genotype, doses of radiation applied to the pollen grains, and also the use of pollen grains from distant species used in crossings with the aim of obtaining haploid and double-haploid embryos from sweet oranges. To *in vitro* parthenogenesis there was tested the effects of culture media in induction of embryogenesis from ovaries. The results showed the induction of callus and regeneration of embryos from *in vitro* anther culture and obtaining some responsive genotypes to anther culture, which will be useful in future works with induction and regeneration of haploid and double-haploid plants in sweet orange. The most of embryogenic callus and embryos obtained from anther culture were diploids (2n) and molecularly similar to the donor plants. However, one embryogenic callus obtained from anther culture of a hybrid (*Citrus clementina* x *C. sinensis* 'Hamlin') showed be different from donor plants and homozygous to four pair of microsatellite primers tested. Ploidy and the gametic origin confirmation of this embryogenic callus are still dependent of the analysis of a larger number of primers and the development and regeneration of embryos. In the *in situ* parthenogenesis experiments, the embryos and seedlings obtained from the pollination with irradiated pollen grains showed a larger variation of ploidy, determined by flow cytometric analysis. The analysis with molecular markers showed that these plantlets were different from the donor plants, but were heterozygous. *In vitro* parthenogenesis techniques shows be interesting to obtaining somatic embryos from ovary culture, however, no haploid or double-haploid embryos were obtained. The results confirm the genotype-dependent responses related to the gametic embryogenesis in *Citrus*, as well as, improve the knowledge about reproductive biology of sweet orange.

Key-words: Gametic and somatic embryogenesis. Reproductive biology. Haploid. Double-haploid. Cultivars. Homozygous lines.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Classificação (LM e SEM) dos botões florais e de suas respectivas anteras de acordo com o estádio de desenvolvimento dos micrósporos (A-B) e detalhes das anteras de laranja-doce (*Citrus sinensis*). ..... 38

Figure 3.2 – Estádios de desenvolvimento das células mãe dos micrósporos (CMM) e dos micrósporos de laranja doce com solução de carmim acético 2% (A) e DAPI (4',6-diamidine-2'-phenylindole dihidrochloride) utilizando microscopia de luz acoplada com fluorescência ..... 39

Figura 3.3 - Grãos de pólen de laranja doce (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin . 42

Figura 3.4 – Comparação entre a viabilidade obtida através de método colorimétrico com carmim acético 2% e a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*) ..... 45

Figura 3.5 – Determinação da viabilidade de grãos de polen pelo método do carmim acético e germinação *in vitro* de grãos de pólen de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.) ..... 47

Figure 3.6 – Detalhes da germinação dos grãos de polen, do crescimento do tubo polínico e da fecundação dos óvulos de laranja-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv Tobias ..... 50

Figura 4.1. Cultura de anteras de diferentes genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.) ..... 59

Figura 5.1 – Análises dos micrósporos obtidos da cultura de anteras de laranja doce (*C. sinensis*) corados com DAPI utilizando microscopia de fluorescência ..... 78

Figura 5.2 **-** Cultura de anteras de diferentes genótipos de laranja doce.... 79

Figura 5.3 - Correlação entre a porcentagem de viabilidade de polens e a indução de calos embriogênicos provenientes de cultura de anteras de laranja doce ..... 80

Figura 5.4 – Histogramas de citometria de fluxo de calos embriogênicos obtidos da cultura de anteras nas cultivares Sanguinea Doppio (G1), Tarocco Ac (G2) e um híbrido entre *C. clementina* e *C. sinensis* (G3) ..... 82

Figura 5.5 – Análise com marcadores moleculares microssatélites (esquerda) e TRAPs (direita) dos calos embriogênicos obtidos do cultivo *in vitro* de anteras de genótipos de laranja doce ..... 83

Figura 5.6 - Análise com marcadores moleculares microssatélites ESTs do controle (C) e de calos embriogênicos obtidos do cultivo *in vitro* de anteras do híbrido entre *C. clementina* x *C. sinensis* (H) ..... 83

Figura 6.1 – Germinação de grãos de pólen e formação do tubo polínico em estigmas não polinizados (superior esquerda), ou polinizados com grãos de polen frescos (superior direita) e irradiados com doses de radiação γ de 100 (inferior esquerda) e 200 Gy (inferior direita) ..... 102

Figura 6.2 – Número total e por fruto de sementes grandes e abortadas, obtidos a partir da polinização com grãos de polen de laranja doce tratados com diferentes doses de radiação- γ (gama) ..... 102

Figura 6.3 – Sementes grandes (SG) e abortadas (SA), germinação *in vitro* (G) e obtenção de plântulas a partir de sementes grandes (PI) com o uso de polinizações com grãos de polen irradiados de laranja doce cv. Tobias (*Citrus sinensis* Osbeck.) ..... 103

Figura 6.4 – Histogramas de citometria de fluxo contendo os resultados de análises de DNA de planta controle diploide (Pico C) e amostras 1 e 4, grãos de polen irradiados, e análise com marcadores moleculares TRAPs (Primer 01F-P1) das amostras 1 e 10 obtidas da dose de radiação de 50 Gy e da amostra 4, obtida da dose de radiação de 100 Gy ..... 104

Figura 6.5 – Análise com marcadores moleculares SSR-ESTs (primers 159 e 164) da amostra 1 e 10, obtida da dose de radiação de 50 Gy, e da amostra 4, obtida da dose de radiação de 100 Gy ..... 104

Figura 7.1 - Calogênese, embriogênese somática e regeneração de plântulas a partir de tecidos de ovário não-polinizados de laranja-doce (*Citrus sinensis*) 'Tobias'..... 118

Figura 7.2 – A. Plantas obtidas de embriões somáticos de ovários de laranja doce 'Tobias' após a aclimatização e cultivo em estufa. B. Análise molecular com marcadores moleculares TRAPs, mostrando as similaridades moleculares com a planta de origem controle. Planta controle (C) e oito plantas aclimatizadas obtidas de cultura de ovaries (1-8). ..... 119

# LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Medidas de grãos de polens de cultivares de *Citrus sinensis* em visão equatorial e polar (PV – visão polar; EV – visão equatorial; P – diâmetro polar; E – diâmetro equatorial; A – Amplitude; x = média; PD – desvio padrão; VC – coeficiente de variação..... 41

Tabela 3.2 – Viabilidade de grãos de polens de diferentes cultivares de laranja doce utilizando o carmim acético (2%) como corante 46

Tabela 3.3 – Porcentagens de pegamento de frutos e número de sementes abortadas e grandes por fruto provenientes de diferentes cruzamentos entre cultivares ou autopolinizações em laranja doce ..... 50

Tabela 4.1. - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de diversos genótipos italianos de laranja doce, submetidos a diferentes pré-tratamentos de temperatura ..... 58

Tabela 4.2 - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de diversos genótipos brasileiros de laranja doce, submetidos a diferentes pré-tratamentos de temperatura ..... 61

Tabela 5.1 - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de oito genótipos de laranja doce do experimento 1 ..... 77

Tabela 5.2 - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de dez genótipos de laranja doce do experimento 2 ..... 80

Tabela 5.3 Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de dez genótipos de laranja doce do experimento 3 ..... 81

Tabela 6.1 – Viabilidade de grãos de polen com solução de carmim acetico 2% e germinação *in vitro* de grãos de pólen frescos de laranja doce cv. Tobias e submetidos a diferentes tratamentos de secagem ..... 99

Tabela 6.2 – Número de polinizações, frutos pegos e tamanhos de frutos obtidos a partir da polinização com grãos de pólen de laranja doce tratados com diferentes doses de radiação ..... 100

Tabela 6.3 – Número e porcentagem de germinação de sementes e obtenção de plântulas de laranja doce, obtidas a partir da polinização com grãos de polen tratados com doses de radiação γ ..... 100

Tabela 6.4 – Análise de ploidia por citometria de fluxo de embriões de laranja doce cv. Tobias obtidos da polinização com grãos de polens tratados com doses de radiação γ ……..... 101

Tabela 7.1 - Indução e multiplicação de calos, e embriogênese somática a partir de tecidos de ovários não polinizados de laranja doce cv. Tobias em diferentes meios de cultura ..... 117

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO** ..... 21
**2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... 23
2.1 Cultura de tecidos e técnicas de cultura de células gaméticas ..... 23
2.1.1 Cultura de anteras ..... 23
2.1.2 Cultura de Óvulos Não Fertilizados (Partenogênese *in situ*) ..... 28

**3 ESTUDOS DE BIOLOGIA REPRODUTIVA DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* Osbeck.)** ..... 30

**3.1 Introdução** ..... 31

**3.2 Material e Métodos** ..... 32

3.2.1 Determinação dos estádios da microsporogênese ..... 32

3.2.2 Morfologia dos grãos de pólen ..... 33

3.2.3 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen 33

3.2.4 Germinação de pólens *in vivo* em cruzamentos de laranja doce ..... 35

**3.3 Resultados e Discussão** ..... 36

3.3.1 Determinação dos estádios do micrósporo e formação do grão de pólen ..... 36

3.3.2 Morfologia dos grãos de pólen ..... 39

3.3.3 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen 42

3.3.4 Germinação dos grãos de pólen *in vivo* em cruzamentos de laranja doce ..... 48

**4 EFEITOS DE TRATAMENTOS DE CHOQUE DE TEMPERATURA NA CULTURA DE ANTERAS DE GENÓTIPOS DE LARANJA DOCE** ..... 51

**4.1 Introdução** ..... 52

**4.2 Material e Métodos** ..... 53

4.2.1 Experimento de cultura de anteras com genótipos italianos de laranja doce ..... 53

4.2.2 Experimento de cultura de anteras com genótipos brasileiros de laranja doce ..... 55

4.2.3 Determinação da origem dos calos, embriões e das plantas obtidas 55

**4.3 Resultados** ..... 57

4.3.1 Experimento de cultura de anteras com genótipos italianos de laranja doce ..... 57

4.3.2 Experimento de cultura de anteras com genótipos brasileiros de laranja doce ..... 59

**4.4 Discussão** ..... 61

**5 CULTURA DE ANTERAS DE GENÓTIPOS DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* Osbeck) E DE UM HÍBRIDO ENTRE *C. clementina* E *C. sinensis*.** ..... 68

**5.1 Introdução** ..... 69

**5.2 Material e Métodos** ..... 70

**5.3 Resultados** ..... 74

**5.4 Discussão** ..... 84

**6 BIOLOGIA REPRODUTIVA E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* Osbeck) OBTIDAS A PARTIR DE POLINIZAÇÃO COM GRÃOS DE PÓLEN IRRADIADOS COM RAIOS GAMA** ..... 88

**6.1 Introdução** ..... 89

**6.2 Material e Métodos** ..... 91

6.2.1 Estudos Prévios de Biologia Reprodutiva ..... 91

6.2.2 Experimento de polinização com pólens irradiados com diferentes doses de mutagênico ..... 93

6.2.3 Análises histológicas ..... 94

6.2.4 Ploidia e Origem das Plantas ..... 94

**6.3 Resultados e Discussão** ..... 96

6.3.1 Estudos Prévios de Biologia Reprodutiva ..... 96

6.3.2 Irradiação dos pólens, pegamento de frutos e número de sementes .... 96

6.3.3 Germinação *in vitro* das sementes obtidas ..... 97

6.3.4 Ploidia e Origem Genética das Plantas ..... 98

**6.4 Discussão**.....105

**7 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE OVÁRIOS DE LARANJA DOCE CV. TOBIAS** ..... 109

**7.1 Introdução** ..... 110

**7.2 Material e Métodos** ..... 111

**7.3 Resultados e Discussão**..... 113

**8 CONCLUSÕES GERAIS** ..... 120

**9 REFERÊNCIAS** ..... 121

# 1 INTRODUÇÃO

A família Rutaceae compreende cerca de 37 gêneros, estando entre eles os gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (USDA, 2011). Nessa família, o gênero *Citrus* é o mais importante economicamente, com destaque para a laranja doce (*Citrus sinensis*), tangerina (*Citrus reticulata*), limões (*Citrus limon*) e limas (*Citrus aurantiifolia*) e é considerado o gênero de maior importância para a fruticultura mundial devido ao valor nutritivo dos seus frutos, que servem como fontes de alimentos e de óleo essencial para uso nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (BAUSHER et al., 2006). O Brasil ocupa mundialmente o primeiro lugar em produção de laranjas com 19,1 milhões de ton produzidas em 2010, seguido pelos USA e Índia com 7,5 e 6,3 milhões de ton, respectivamente (FAOSTAT, 2012).

O gênero *Citrus* compreende aproximadamente 162 espécies (TANAKA, 1969), porém, devido à origem híbrida de muitos genótipos, a classificação de Swingle (1943) considera como espécies apenas aquelas de origem natural ou de grande importância para o gênero, totalizando cerca de 16 espécies (KHAN, 2007). O local exato do centro de origem do gênero *Citrus* é outro assunto de discussão, no entanto, sabe-se que sua origem está nas regiões tropicais e subtropicais do sudeste da Asia (SPIEGEL-ROY & GOLDSCHIMDT, 1996; KHAN, 2007). Todas as espécies cultivadas do gênero *Citrus* e outros gêneros relacionados, como *Poncirus* e *Fortunella* são diplóides, com número básico de cromossomos n = x = 9 (FROST, 1925).

Estudos morfológicos, citogenéticos, fitoquímicos e moleculares de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. suportam a teoria dessa espécie ser proveniente de um híbrido entre a toranja (*Citrus grandis*) e a tangerina (*Citrus reticulata*) (BARRET & RHODES, 1976; YAMAMOTO et al., 1993; PEDROSA et al., 2000).

A maior parte dos estudos realizados até o momento com biologia reprodutiva de *Citrus* envolveu a avaliação de viabilidade de grãos de pólen, por meio de avaliações colorimétricas ou da sua germinação em meio de cultura (DOMINGUES et al., 1999; DEL BOSCO et al., 1999). Os estudos de biologia reprodutiva de *Citrus* utilizando técnicas de microscopia são de fundamental importância para a melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento das flores, micrósporos, óvulos, do processo de fertilização e desenvolvimento

dos embriões, além de usos na taxonomia de plantas. Esses estudos são de grande importância em programas de melhoramento genético das espécies de *Citrus*, tanto pelos métodos tradicionais de melhoramento por meio da realização de cruzamentos controlados, quanto aqueles que envolvem métodos biotecnológicos como a cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro*, utilizadas para a obtenção de plantas haplóides, duplo-haplóides ou tri-haplóides (GERMANA, 2006, 2011).

Os principais problemas que dificultam o melhoramento genético utilizando cruzamentos controlados de citros e, conseqüentemente, a obtenção de variabilidade genética, são a presença de sementes poliembrônicas, longo período juvenil de plantas obtidas de sementes, autoincompatibilidade e esterilidade (FROST, 1926; FROST & SOOST, 1968). Por isso, a maioria das cultivares utilizadas atualmente comercialmente foram obtidas a partir de seleção de *seedlings* (pés-francos) envelhecidos ou a partir de mutantes espontâneos (MACHADO et al., 2005). Estes fatores contribuem para que ocorra uma maior vulnerabilidade genética no cultivo de citros, pelo limitado número de cultivares disponíveis comercialmente, que apresentam baixa diversidade genética entre si e geralmente com cultivos monoclonais em grande áreas. Esta vulnerabilidade pode ser demonstrada com o surgimento de novas pragas e doenças, como a bactéria causadora do *Huanglongbing* (HLB) (GIMENES–FERNANDES & BASSANESI, 2001), para a qual, até o momento, não se encontraram fontes de resistência genética.

Nesse contexto, as técnicas biotecnológicas têm servido como ferramentas para o estabelecimento e aceleração de programas de melhoramento genético e para sobrepor as barreiras da biologia reprodutiva dos citros. Dentre as várias técnicas existentes, as mais utilizadas em citros são as que envolvem a cultura de tecidos, como por exemplo: o cultivo e a regeneração de plantas a partir de protoplastos, a hibridação somática, a indução e/ou seleção *in vitro* e *in vivo* de mutantes, a transformação genética e a produção de plantas haplóides e duplo-haplóides (GERMANÀ, 2006).

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Cultura de tecidos e técnicas de cultura de células gaméticas

Dentre as técnicas de culturas de tecidos de plantas utilizadas para o melhoramento genético de plantas, uma das mais promissoras é a cultura de células haplóides tais como micrósporos ou óvulos não-fertilizados, tendo como finalidades: 1) obter plantas haplóides para fins de estudos de controle genético de caracteres e mapeamento genético e 2) obtenção de linhagens duplo-haplóides a partir da diploidização natural ou artificial das plantas haplóides (KASHA & MALUSZYNSKI, 2005). O cultivo de células haplóides pode gerar linhagens completamente homozigotas em apenas um ciclo de cultivo, fato de grande importância principalmente para espécies lenhosas, como *Citrus*, em que o ciclo juvenil é caracterizado por ser muito longo (GERMANÀ, 2006).

Dentre os principais métodos utilizados na obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides estão a cultura de anteras e de micrósporos isolados (KASHA & KAO, 1970; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003; GERMANÀ 2011), a partenogênese *in situ* com uso de grãos de pólen irradiados (OLLITRAUT et al., 1996; FROELICHER et al. 2007) ou grãos de pólen de espécies distantes (BERZONSKY et al., 2003) e a partenogênese *in vitro*, que se diferencia pelo cultivo *in vitro* de pistilos, ovários não-polinizados (EECKAUT et al. 2001, SLAMA-AYED & SLIM-AMARA, 2007) ou com a realização da polinização dos pistilos *in vitro* (GERMANÀ & CHIANCONE, 2001). Também o cultivo *in vitro* de óvulos isolados não fertilizados é uma alternativa de obtenção de embriões haplóides ou duplo-haplóides e tem sido utilizado em espécies que demonstram recalcitrância para a cultura *in vitro* de anteras e micrósporos (CHEN et al., 2011).

### 2.1.1 Cultura de anteras

A obtenção de plantas com origem gamética a partir do cultivo de anteras sejam essas haplóides ou com outros níveis de ploidia, já foi relatada em mais de 200 espécies vegetais, principalmente das famílias Solanaceae, Cruciferae e Gramineae, que respondem mais facilmente a androgênese. Porém, muitas espécies de leguminosas e lenhosas apresentam recalcitrância a esta técnica (BAJAJ, 1990; KASHA & MALUSZYNSKI, 2003). Este parece ser o caso dos

citros, em que poucos protocolos têm mostrado sucesso na obtenção de calos e plantas haplóides, como em *C. madurensis* Lour. (CHEN et al., 1980), *Poncirus trifoliata* e *C. aurantium* (HIDAKA et al., 1979; HIDAKA et al., 1982), *C. clementina* Hort. Ex. Tan. (GERMANÀ et al., 1994; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003) e *C. deliciosa* (GERMANÀ et al., 1994). A obtenção de embriões haplóides, porém albinos, de tangelo 'Mapo' (*C. deliciosa* x *C. paradisi*) foi relatada por Germanà & Reforgiato (1997) e embriões verdes foram obtidos de *C. limon* L. Burm. F. (GERMANÀ et al., 1991) e de *Clausena excavata* (FROELICHER & OLLITRAULT, 2000).

#### 2.1.1.1 Fatores que Afetam a Cultura de Anteras

São muitos os fatores que afetam a produção de calos e embriões haplóides a partir da cultura de anteras *in vitro*, entre eles: genótipo, aplicação e tipos de pré-tratamentos aplicados às anteras e botões florais, estádio de desenvolvimento do grão de pólen, condições ambientais de cultivo das plantas doadoras, composição do meio de cultura (macro e micronutrientes, fontes de carbono, reguladores vegetais, substâncias complexas, entre outros) e as condições de cultivo das anteras, tais como temperatura e luminosidade (GERMANÀ, 2006, 2011). Mais recentemente, o uso de tratamentos com altas ou baixas temperaturas aplicados às anteras por curto período (Ex: -20°C por 30 minutos ou 37°C por uma hora) tem demonstrado efeitos positivos na regeneração de embriões de *C. clementina* a partir dessa técnica (Germanà 2011 comunicação pessoal). Os tratamentos de choque de temperatura são considerados os pré-tratamentos mais efetivos para indução da embriogênese a partir de micrósporos (GERMANÀ, 2011). Poucos estudos têm sido conduzidos para explicar como os tratamentos de choque de temperatura influenciam a reversão da via gametofítica para a esporofítica na cultura de anteras e micrósporos. No entanto,os resultados até então obtidos indicam um efeito desses tratamentos na biossìntese de proteínas de choque térmico (HSPs) e do Ácido Abscísico (ABA), que podem estar ligados direta ou indiretamente a embriogênese gamética (SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2008)

A. Genótipo

Geraci & Starrantino (1990) testando a cultura de anteras em várias espécies *Citrus reticulata, C. deliciosa, C. sinensis, C. limon, C. paradisi* e um híbrido entre *C. deliciosa* x *C. paradisi*, obtiveram proliferação de calos apenas nas cultivares Vaniglia, de laranja doce e limão 'Femminelo' (*C. limon*) sem, no entanto, obter a regeneração de plantas.

Em cultura de anteras de cinco genótipos de limão, Germanà et al., (1992) obtiveram diferentes porcentagens de anteras que formaram calos, variando entre 9 e 76%, e de obtenção de embriões por calo variando de 2 a 10%. Resultados semelhantes demonstrando alta variabilidade de obtenção de calos e embriões utilizando diferentes genótipos foram obtidos, incluindo a não regeneração de muitas cultivares em experimentos com *C. clementina* e *C. reticulata* (GERMANÀ et al., 1994; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003).

Cao et al. (2011) obtiveram duas linhagens homozigotas de calos embriogênicos somente em laranja doce Valência cv. Rhode Red, porém sem a obtenção de calos de Valência comum.

B. Condições de Cultivo das Plantas Doadoras

As condições fisiológicas da planta doadora, resultado da interação entre a sua idade e as condições ambientais de cultivo, tais como: luminosidade, temperatura, fotoperíodo, irrigação e condições nutricionais, afetam a resposta embriogênica da cultura de anteras e de micrósporos, conseqüentemente, afetando o sucesso na regeneração de plantas *in vitro* (GERMANÀ, 2011; POWELL, 1990). Em *Citrus clementina*, calos embriogênicos e embriões regenerados, em sua maioria tri-haplóides, a partir do cultivo de anteras têm sido obtidos a partir de plantas matrizes cultivadas em bancos de germoplasma mantidos em condições de campo, com mais de vinte anos de idade (Germanà et al. 2001; Germana & Chiancone, 2003), com irrigação realizada por microaspersão e coletas realizadas nas primeiras flores obtidas na época de floração, que ocorre entre os meses de março e abril na Itália (GERMANÀ, 2011, comunicação pessoal)

C. Estádio de Desenvolvimento dos Micrósporos

A coleta dos botões florais para o resgate das anteras com os micrósporos em estádio de desenvolvimento específico é necessária para que a indução da modificação da via gametofítica para a esporofítica ocorra nos micrósporos para a obtenção da embriogênese (GERMANÀ, 2011; SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2008). Para maioria das espécies a resposta embriogênica dos micrósporos pode ocorrer entre os estádios vacuolados do micrósporo até o estádio jovem bicelular de grãos de pólen (TOURAEV et al. 2001). De fato, a escolha do melhor estádio do micrósporo varia conforme a espécie, e está diretamente correlacionado com o acúmulo de amido nos micrósporos (SEGUÍ-SIMARRO & NUEZ, 2008). Segundo NITSCH e NITSCH (1969) a embriogênese a partir de micrósporos apenas pode ser induzida antes do acúmulo de amido, sendo que a partir desse momento o micrósporo fica condicionado a seguir via gametofítica. No gênero *Citrus* o estádio uninucleado vacuolado dos micrósporos tem sido aquele utilizado para o cultivo *in vitro* de anteras e micrósporos isolados (GERMANÀ, 2006)

D. Pré-tratamentos das Anteras e Botões Florais

O uso de pré-tratamentos nas anteras e botões florais, antes do estabelecimento *in vitro* das anteras, são utilizados em várias espécies vegetais e seus efeitos comprovaram ser genótipo-dependentes (OSOLNIK et al., 1993).

Segundo Nitsch (1977), o efeito benéfico do pré-tratamento de anteras no frio está relacionado com a capacidade de aumentar o número de grãos de pólen contendo núcleos em divisão, bem como pelo estímulo na formação de embriões, devido ao atraso ou modificação das mitoses nos micrósporos, ou ainda, pelo bloqueio na produção de amido.

Em trabalho com cultura de anteras de *Citrus clementina* obteve-se melhores resultados na produção de embriões, utilizando como pré-tratamentos 4 ou 25°C, por 48h, para ‘Nules’ e ‘SRA63’ (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003) e 4°C por 14 dias para ‘Nules’ (GERMANÀ et al., 2005). Atualmente, os trabalhos de cultura de anteras realizados com essa espécie envolvem o armazenamento dos botões florais por 2 a 7 dias a 4°C (Germanà 2011). Em laranja doce (*Citrus sinensis*), o resultado obtido com a produção de linhagens homozigotas de calos

embriogênicos envolveu pré-tratamentos semelhantes aos aplicados para clementinas (CAO et al., 2011).

E. Meios de Cultura

Segundo Germanà (1997), os diversos genótipos de citros (cultivares e espécies) apresentam requerimentos diferentes com relação aos meios de cultura básicos, fontes de carbono e reguladores vegetais para a indução e regeneração de plantas a partir de cultura de anteras. Para várias espécies de citros, os diferentes trabalhos com sucesso na obtenção da indução de calos e embriões, por meio da cultura de anteras, utilizaram os meios de cultura $N_6$ de Chu (1978) e MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com algumas modificações.

Germanà & Chiancone (2003) iniciaram a cultura de anteras de *C. clementina* utilizando o meio de cultura $N_6$ modificado, pela adição de vitaminas do meio de Nitsch & Nitsch (1969), compostos orgânicos como a lactose, galactose, água de coco, caseína, L-glutamina, biotina e ácido ascórbico, e os reguladores vegetais ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina, benzilaminopurina (BAP), zeatina, tidiazuron (TDZ) e ácido giberélico ($GA_3$), melhorando significativamente o protocolo de cultura de anteras e micrósporos desta espécie em relação aos trabalhos anteriores que utilizavam como meio de cultura básico o MS (GERMANÀ et al., 1991; 1994). Os trabalhos mais recentes destes pesquisadores incluem a mesma composição do meio de cultura $N_6$ com algumas modificações adicionais realizadas, como aumento nas concentrações de fontes de carboidratos e substâncias complexas adicionados ao meio de cultura. Já, para a multiplicação dos calos embriogênicos e germinação dos embriões, foi utilizado um meio mais simples composto por sais de MS, suplementado com 5% de sacarose, além da adição de $GA_3$ e ANA (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003; GERMANÀ et al., 2005). Em laranja doce, no trabalho conduzido por Cao et al. (2011) foi utilizado o meio MS com a concentração dos sais reduzida pela metade (MS ½), adição de 2,5% de sacarose, 0,5 g $L^{-1}$ de carvão ativado e 0,1 mg $L^{-1}$ de NAA, para a obtenção de linhagens de calos embriogênicos.

F. Condições de cultivos das culturas

As temperaturas usualmente utilizadas para cultura de anteras de *Citrus* variam de 25 a 28°C (GERMANÀ, 1997), mas com preferência para cultivo à temperatura de 27±1°C, durante 15 a 30 dias, em condições de escuro (FROELICHER & OLLITRAUT, 2000; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003). Após este período, geralmente as culturas são transferidas para condições de luminosidade, utilizando-se luz branca em intensidade que varia de 27-60 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ e fotoperíodo de 16-18 h de luz (CHIANCONE et al., 2006; GERMANÀ et al., 2000; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003; GERMANÀ et al., 2005).

### 2.1.2 Cultura de Óvulos Não-fertilizados (Partenogênese *in situ*)

A cultura de óvulos não-fertilizados, também chamada de partenogênese *in situ*, é uma técnica menos estudada, mas que também possibilitou a obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides em várias espécies, tais como: *Citrus clementina* (GERMANÀ & CHIANCONE, 2001; OLLITRAUT et al., 1996), tangor 'Ellendale' e tangerina 'Fortune' (FROELICHER et al., 2007), *Populus alba* e *P. trichocarpa* (KEXIAN & NAGARAJAN, 1990), *Malus domestica* e *M. prunifolia* (ZHANG & LESPINASSE, 1991; ZHANG et al., 1990), *Actinidia deliciosa* (PANDEY et al., 1990) e *Prunus avium* (HOFER & GRAFE, 2003). Nesta técnica, o objetivo é estimular a divisão celular da oosfera e o desenvolvimento de óvulos não fertilizados, pela técnica de polinização com grãos de pólen irradiados, grãos de pólen de espécies distantes ou sexualmente incompatíveis ou ainda sem a realização da polinização. Segundo GERMANÀ (2006), o sucesso desta técnica depende basicamente da escolha da fonte de pólen ou da dose do mutagênico utilizada.

Em trabalho com partenogênese *in situ* de diferentes espécies de *Citrus*, FROELICHER et al. (2007) utilizaram grãos de pólen irradiados de limão 'Meyer' (*Citrus meyeri*) como genitor masculino. Nas sementes obtidas e classificadas como pequenas foi possível obter duas plantas haplóides no tratamento com 150 Gy e uma, com o uso de 300 Gy em que o genitor feminino era *C. clementina*. Quando o genitor feminino era o tangor 'Ellendale' ou a tangerina 'Fortune', foi obtida uma planta haplóide de cada cultivar nos tratamentos com 150 e 300 Gy, respectivamente. A origem partenogênica das plantas haplóides obtidas foi

confirmada com uso de marcadores moleculares. Resultados similares foram obtidos por ALEZA et al. (2009) com essa mesma técnica e cultivares.

### 2.1.3 Partenogênese *in vitro*

Outra possibilidade de obtenção de embriões ou plantas de origem gamética é a partenogênese *in vitro*, que consiste num processo semelhante ao de partenogênese *in situ*, porém com o uso de pistilos, ovários ou óvulos isolados e cultivados *in vitro*, seguido ou não de polinização dos pistilos (GERMANÀ & CHIANCONE, 2001; HUANG et al., 2011). Essa metodologia mostra como vantagens em relação à partenogênese *in situ*, a possibilidade de controle de todo o processo de cultivo, desde a polinização até a obtenção e aclimatização das plântulas regeneradas. Porém, a desvantagem é a grande quantidade inicial de tecidos somáticos, o que aumenta as chances de se obter somente plantas provenientes do tecido somático, sem a regeneração de plantas haploides ou duplo-haplóides (CARDOSO et al., 2012).

As técnicas de cultura de anteras e partenogênese apresentam grandes desafios, principalmente para laranja doce, em que se verificou uma grande variabilidade de resposta em função da genótipo-dependência, além da baixa taxa de indução e regeneração de embriões de origem gamética.

A hipótese principal desse trabalho foi testar a possibilidade de se induzir o desenvolvimento de embriões e/ou plântulas haplóides/duplo-haplóides de laranjas doces, utilizando técnicas de cultura de anteras e de partenogênese.

O objetivo principal do presente estudo foi a obtenção de plantas haplóides e/ou duplo-haplóides através do cultivo e regeneração de embriões de origem gamética utilizando o cultivo de anteras *in vitro*, e a partenogênese *in situ* e *in vitro* como vias de regeneração. Para isso, também foram realizados estudos prévios de biologia reprodutiva de laranja doce que permitissem aumentar as chances de sucesso das técnicas utilizadas.

Como objetivos específicos foram desenvolvidos protocolos de cultivo de pistilos e ovários *in vitro* de *Citrus sinensis* cv. Tobias, para servirem de início nos trabalhos com embriogênese somática utilizando esses tecidos, de interesse na propagação e biotecnologia de espécies cítricas, como em trabalhos de transformação genética e técnicas de produção de sementes sintéticas.

# 3 Estudos de biologia reprodutiva de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.)

## RESUMO

Os estudos de biologia reprodutiva em laranja doce (*Citrus sinensis*) são escassos e de extrema importância para estudos de taxonomia, citogenética e melhoramento genético na espécie. Ao total foram realizados quatro estudos considerando os aspectos da caracterização e do desenvolvimento dos botões florais, anteras e micrósporos, além da determinação da viabilidade e germinação dos grãos de pólen *in vitro* e *in vivo* em diferentes cultivares de laranja doce. Com os resultados obtidos foi possível a classificação dos botões florais de acordo com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos. Foram também determinadas as medidas polares e equatoriais dos grãos de pólen maduros de laranja doce, bem como caracterizada a morfologia, de interesse em trabalhos de taxonomia. Foram observadas grandes variações nas porcentagens de viabilidade de grãos de pólen entre as cultivares de laranja doce, o que permitiu classificar as cultivares de acordo com a viabilidade dos grãos de pólen. Finalmente, o uso do método com anilina azul ainda permitiu visualizar tanto a germinação *in vivo* dos grãos de pólen no estigma, quanto o crescimento do tubo polínico e fertilização dos óvulos nos pistilos, sendo uma metodologia de grande utilidade em futuros trabalhos de melhoramento genético de laranja doce.

## ABSTRACT

**Morphological and ultraestructural aspects of reproductive biology of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck.).** Reproductive biology of sweet orange (*Citrus sinensis*) are few and of great importance to taxonomy, citogenetics and breeding works in this species. In total, we conducted four studies to characterize aspects of the development of flower buds, anthers and microspores. Also, we determined the percentages of viability and *in vitro* germination of pollen grains in different sweet orange cultivars. The results allowed for the classification of flower buds according to the stage of development of the microspores. The equatorial and polar measures of pollen grains, as well as the morphology were characterized, which are important for taxonomy studies. Large variations in the

percentages of pollen viability among the sweet orange cultivars, which allowed for a classification of the cultivars according to the pollen viability. Finally, the use of the method with aniline blue facilitated the visualization of *in vivo* germination of pollen grains in the stigma and the pollen tube growth and fertilization of ovules in the pistil. This is a useful methodology for future studies in breeding programs of sweet orange.

## 3.1 Introdução

A família Rutaceae compreende cerca de 37 gêneros (USDA, 2011), dos quais o gênero *Citrus* é o mais importante economicamente (BAUSHER et al., 2006) e compreende cerca de 162 espécies (TANAKA, 1969), porém, devido a origem híbrida de muitos genótipos, a classificação de Swingle (1943) considera como espécies apenas aquelas de origem natural ou de grande importância para o gênero, totalizando cerca de 16 espécies (KHAN, 2007).O centro de origem do gênero está nas regiões tropicais e subtropicais do sudeste da Asia (KHAN, 2007; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHIMDT, 1996).

Estudos morfológicos, citogenéticos, fitoquímicos e moleculares de *Citrus* x *sinensis* (L.) Osbeck. suportam a teoria dessa espécie ser proveniente de um híbrido entre a toranja (*Citrus grandis*) e a tangerina (*Citrus reticulata*) (BARRET; RHODES, 1976; PEDROSA et al., 2000; YAMAMOTO et al., 1993).

Estudos morfológicos e ultraestruturais da biologia reprodutiva de *Citrus* são de fundamental importância para a melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento das flores, micrósporos, óvulos, do processo de fertilização e desenvolvimento dos embriões, além de oferecer subsídios para estudos taxonômicos e de melhoramento genético. O melhoramento genético tradicional das espécies de *Citrus*, pelo uso de cruzamentos, é dificultado pela ocorrência de poliembrionia nucelar e autoincompatibilidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), sendo em muitos casos necessário o uso de métodos biotecnológicos como a cultura de anteras e micrósporos, partenogênese *in situ* e *in vitro*, utilizadas para a obtenção de plantas haplóides, duplo-haplóides ou tri-haplóides (GERMANÀ, 2006). Em ambos os casos, esses trabalhos são dificultados pela falta de estudos dentro do gênero *Citrus* que proporcionem o

melhor entendimento de todo o processo de formação do micrósporo e desenvolvimento do pólen, formação do tubo polínico e fertilização.

A maior parte dos estudos até então realizados nessa área com o gênero *Citrus* envolvem a avaliação de viabilidade ou corabilidade, além de germinação de pólen em meio de cultura (DEL BOSCO et al., 1999, DOMINGUES et al., 1999;), e alguns outros estudos de contagem de cromossomos (DEL BOSCO et al., 1999). Nesse sentido o conhecimento da biologia reprodutiva do gênero *Citrus* ainda é muito deficiente.

O objetivo do presente trabalho foi a realização de estudos de biologia reprodutiva de laranja-doce (*Citrus sinensis*), em especial do desenvolvimento dos micrósporos, formação do grão de pólen e fertilização, visando subsidiar trabalhos futuros com estudos taxonômicos, de melhoramento genético e biotecnologia da espécie *Citrus sinensis*.

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Determinação dos estádios da microsporogênese

Os botões florais foram coletados dos genótipos de laranja-doce Tobias, cultivado em condições de estufa, além dos genótipos Hamlin e Pêra de Abril, cultivados em condições de campo, foram fixados em solução de Etanol e Ácido Acético 3:1 (*v/v*) e classificados de acordo com os comprimentos, tomando como medida a base da sépala ao ápice das pétalas do botão floral. As anteras provenientes de cinco botões florais em cada intervalo de comprimento foram primeiramente excisadas e colocadas em lâmina, seguido de adição de uma gota de carmim acético (2%) ou DAPI (1%) e esmagadas para a liberação dos micrósporos. Os resíduos das anteras foram retirados da lâmina e a solução corante junto aos micrósporos foi coberta por lamínula para observação em microscópio de luz, com auxílio de fluorescência (DAPI) ou não (carmim acético), e determinação dos estádios de desenvolvimento dos micrósporos. Ao final do processo, os intervalos de comprimento dos botões florais foram correlacionados com os estádios de desenvolvimento dos micrósporos.

### 3.2.2 Morfologia dos grãos de pólen

Para caracterização da morfologia polínica foram coletados grãos de pólen de botões florais no estádio de antese de três genótipos de laranja-doce: ‘Hamlin’, ‘Pêra de Abril’ e ‘Tobias’. Os grãos de pólen foram processados para acetólise em observação geral ao microscópio de luz (ML), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e para observações estruturais ao microscopio eletrônico de transmissão (MET). Os grãos de pólen foram acetolizados segundo o método de Erdtman (1960) e montados em lamina com gelatina glicerinada. As observações e medidas foram feitas utilizando 25 grãos de pólen tomados ao acaso e calculados o diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DE), média aritmética (x), desvio padrão da média (DP) e coeficiente de variabilidade (V). Para definição da forma, utilizou-se o cálculo do P/E, o maior diâmetro equatorial. As imagens em ML foram feitas ao microscópio Zeiss Akioscop2 com câmera digital, sendo imagens digitalizadas. As médias foram comparadas através do programa estatístico SAS Institute (2004).

Para a análise ao MEV os grãos de pólen foram fixados em Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2%; paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, Ph 7,2), desidratados em série etílica crescente (35%-100%), secados ao ponto crítico utilizando $CO_2$ líquido, montados em suportes metálicos (*stubs*), metalizados com ouro por 180 segundos e observados ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss LEO-VP 435. Para MET o material também foi fixado e a seguir pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, suspenso em Agar, contrastados *in bloco* com acetato de uranila 2,5%, desidratados em série crescente de acetona em água (25%-100%), sendo a infiltração e emblocagem feitas em resina *spurr*. O material foi seccionado em ultramicrótomo Porter-Blum MT2, contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), observado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

### 3.2.3 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen

Para a determinação da viabilidade de grãos de polens foram utilizados vinte genótipos de *Citrus sinensis* (Tabela 3.2) utilizando métodos de

corabilidade com carmim acético (2%), reagente de Alexsander (KEARNS & INOUYE, 1993) e DFA (Diacetato de Fluorosceína) (HU et al., 2007).

As anteras foram coletadas de flores no momento inicial da antese, quando era visível a abertura da primeira pétala. As anteras coletadas de no mínimo 20 flores foram imediatamente fixadas em solução de etanol e ácido acético (3:1) e mantidas por 24 horas até o momento de preparo das lâminas. As anteras foram então retiradas da solução fixadora e lavadas em água destilada por três minutos, sendo então sobrepostas em lâminas microscópicas com uma gota do corante e esmagadas para a liberação dos grãos de polens e visualização com auxílio de microscópio de luz. Para o método com uso do DFA foi utilizado microscopia de luz com auxílio de fluorescência.

Foram considerados viáveis aqueles grãos de polens com coloração vermelho intenso (carmim acético), coloração roxa (Alexsander) ou fluorescência nítida (DFA) e inviáveis aqueles com coloração vermelho claro ou transparente (carmim acético), coloração verde (Alexsander) e pouca ou nenhuma fluorescência (DFA).

Para a determinação das porcentagens de germinação *in vitro*, os botões florais foram obtidos de quatro variedades de *Citrus sinensis* no estádio de antese das flores, momento em que as anteras estavam visualmente abertas com liberação dos grãos de polens. As anteras foram excisadas dos botões florais e colocadas para a germinação in vitro em placas de petri descartáveis com dimensões 6.0 x 1.5 mm previamente esterilizadas, contendo meio de cultura de germinação. O meio de cultura utilizado foi o de Pio et al. (2007), composto de 800 mg $L^{-1}$ de Nitrato de Cálcio, 200mg $L^{-1}$ de Ácido Bórico, 10% de sacarose e 2,2 g $L^{-1}$ de Phytagel. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5 antes da adição do Phytagel ().

Para cada variedade foram utilizadas quatro repetições (Placa de Petri), que consistiram cada uma de cinco anteras cada, provenientes de cinco botões florais diferentes (uma antera por botão floral).

As avaliações foram realizadas 24 e 48 horas após a inoculação das anteras no meio de cultura, sendo contado o número de grãos de polen viáveis e inviáveis de quatro seqüências (campos de visão) de 25 grãos de polen por placa de petri, totalizando a avaliação de 100 unidades por placa de petri.

O teste com os métodos e a determinação de sua aplicabilidade deu-se pela capacidade de distinção de coloração entre polens viáveis e inviáveis, e também pela correlação entre as porcentagens de polens considerados viáveis e da germinação *in vitro* dos polens.

Os resultados obtidos para porcentagem de polens viáveis foram transformados através da equação $\sqrt{x+0.5}$, submetidos à ANOVA e, posteriormente, comparados pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade. Ainda, foram estabelecidas classes de cultivares de acordo com a as porcentagens de viabilidade dos grãos de pólen.

### 3.2.4 Germinação de pólens *in vivo* em cruzamentos de laranja doce

Para a avaliação da germinação *in vivo* dos grãos de polens e crescimento do tubo polínico foi utilizado metodologia com coloração com anilina azul, seguido de visualização em microscópio com auxílio de fluorescência descrita por Linskens e Esser (1957) com pequenas modificações. A metodologia consistiu primeiramente na emasculação de flores utilizadas como parental feminino e em estádio de pré-antese, seguido de polinização dos estigmas com grãos de pólen frescos, obtidos da coleta de flores recém-abertas e utilizadas para a polinização dos estigmas. Os pistilos foram coletados 6, 12, 24, 48 e 96 horas após o momento da polinização e fixados em solução de etanol absoluto e ácido acético glacial (3:1) por 24 horas em Eppendorf. Os pistilos foram então lavados em álcool 70% por 20 minutos e colocados em solução clareadora de 10% de $Na_2SO_3$ e então autoclavados a 120°C e 1 kg $cm^{-2}$ por 20 minutos para amolecimento dos tecidos. Os pistilos foram então lavados com água destilada por cerca de 10 minutos, seguido de imersão em solução corante 0,1% de anilina azul diluída em 0,1N de $K_3PO_4$ por 48 horas. Após esse período, os pistilos foram posicionados horizontalmente em laminas de microscópio e esmagados com o auxílio da lamínula. A visualização da germinação dos grãos de pólen no estigma e do crescimento do tubo polínico foram realizados em microscópio de luz Olympus BX61 acoplado com fluorescência ultravioleta.

Ao total foram avaliadas as polinizações provenientes de dois cruzamentos entre cultivares, três autopolinizações, além dos pistilos não polinizados, sendo avaliado o total de dez pistilos por cruzamento.

Foram realizadas avaliações da taxa de pegamento de frutos em cada tipo de polinização realizada, além da contagem do número de sementes abortadas e grandes obtidas por fruto de laranja doce.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Determinação dos estádios dos micrósporos e formação do grão de pólen

O tamanho dos botões florais e da antera do genótipo Tobias de laranja doce no momento da antese foram em média 1,1 ± 0,1 cm e 0,32 ± 0,04 cm, respectivamente (Figura 3.1). As cultivares Tobias, Hamlin e Pêra de Abril de *Citrus sinensis* mostraram flores contendo cinco pétalas. O número de anteras nessas cultivares mostrou pequena variação, com 19 a 25 anteras por botão floral. Os pistilos foram caracterizados por estigma grande, estilete longo e ovário súpero, sendo que em Tobias foram observados ovários contendo em média 12,3 ± 0,8 lóculos com 3,8 ± 1,1 óvulos por lóculo e 41,5 ± 13,5 óvulos por ovário.

O corante carmim acético a 2% foi util para a determinação do estádio de meiose das células mãe dos micrósporos de laranja-doce, mas mostrou limitação de sua aplicabilidade para os demais estágios de desenvolvimento dos micrósporos, dificultando a identificação do (s) núcleo (s) com esse corante. Para os estádios posteriores a meiose a coloração dos micrósporos com DAPI possibilitou melhores resultados, principalmente em relação à identificação do estádio uninucleado, de interesse para o cultivo de anteras *in vitro* de *C. sinensis*. (GERMANÀ et al., 2005).

Os resultados obtidos permitiram o estabelecimento de uma correlação dos estádios de desenvolvimento dos micrósporos de acordo com o comprimento dos botões florais de laranja-doce (*Citrus sinensis*), resultando no estabelecimento de uma classificação dos botões florais de acordo com o estádio dos micróporos contidos nas anteras, e descrito a seguir: D1– < 3,0mm, células mãe dos micrósporos em estádio de meiose; D2 – 3,1 a 4,0mm – células mãe dos micrósporos em estádio tétrade; D3 – 4,1 a 7,0mm, micrósporos no estádio uninucleado; D4 – 7,1 to 11,0 mm, estádio binucleado dos micrósporos

(Figuras 3.1 e 3.2). Esses resultados foram obtidos das avaliações das médias dos tamanhos dos botões florais de três diferentes cultivares de laranja-doce, porém tiveram aplicabilidade para todas as cultivares utilizadas nos experimentos de culturas de anteras desse trabalho, já que a coleta dos botões florais de mais de 80 cultivares dentro da faixa de comprimento de 4,1 a 7,0 mm demonstravam a maior parte dos micrósporos no estádio uninucleado.

Os resultados de classificação dos botões florais para *Citrus sinensis* foram diferentes daqueles obtidos para *Citrus clementina*, em que o estádio uninucleado dos micrósporos foi observado numa faixa de comprimento dos botões florais entre 3,5 a 4,0 mm (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003). Essa diferença observada entre as espécies deve-se principalmente ao pequeno tamanho dos botões florais de *Citrus clementina* e que raramente ultrapassam os 6 mm no momento da antese das flores.

O estabelecimento de uma correlação entre os tamanhos dos botões florais e os estádios de desenvolvimento dos micrósporos tem grande importância para o uso em trabalhos de citogenética e anatomia, já que permitem a coleta de botões florais no estádio que se deseja estudar, sem a necessidade prévia de avaliações microscópicas. Ainda, esses estudos foram de grande utilidade para os experimentos de cultura de anteras de laranja-doce. Nesses trabalhos, um dos principais fatores no sucesso da obtenção de calos, embriões ou plântulas de origem gamética é a utilização de anteras contendo a maior parte dos micrósporos no estádio uninucleado (GERMANÀ, 2006; 2011).

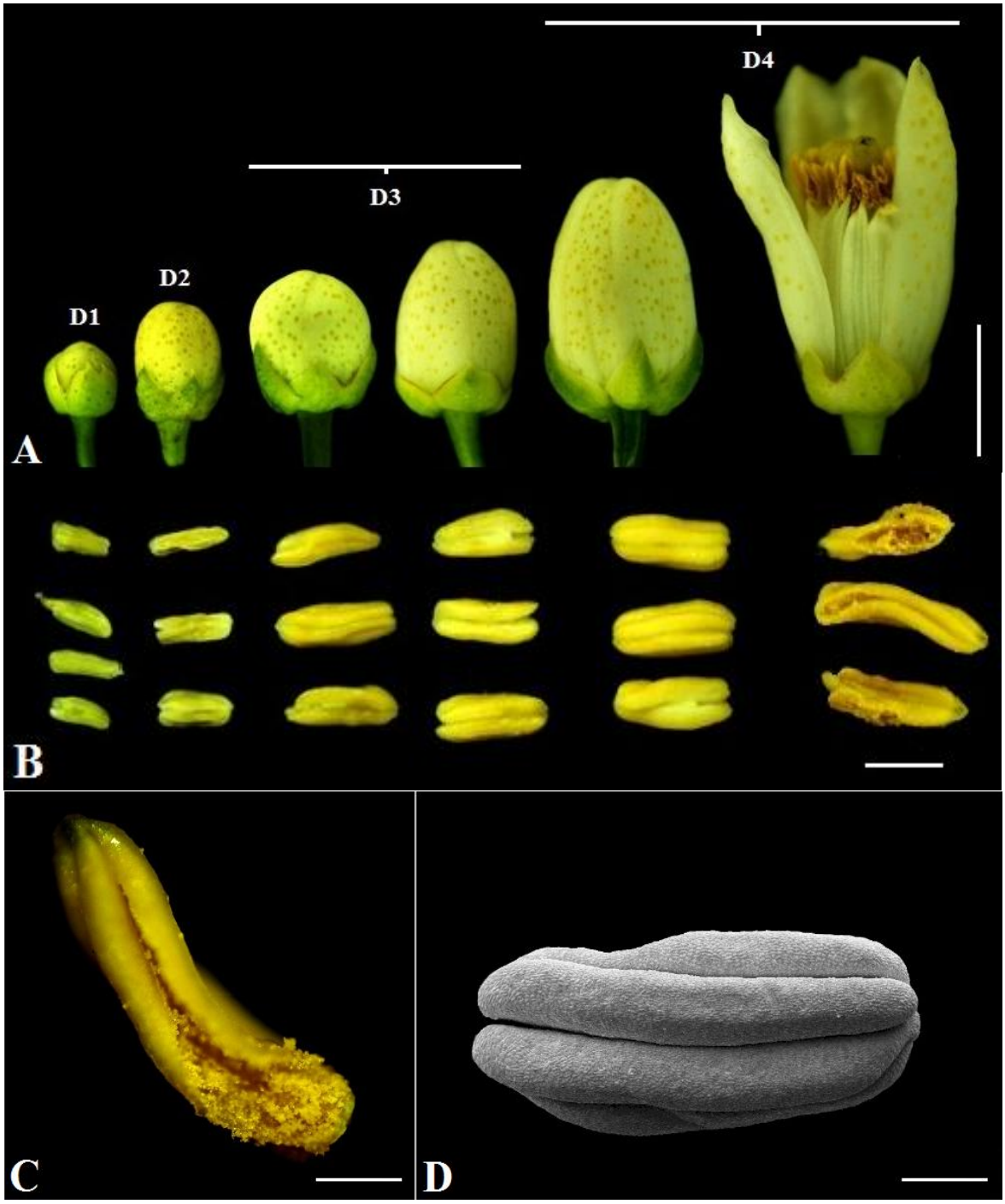



Figura 3.1 – Classificação (LM and SEM) dos botões florais e de suas respectivas anteras de acordo com o estádio de desenvolvimento dos micrósporos (A-B) e detalhes das anteras de laranja-doce (*Citrus sinensis*) (C-D). D1- meiose das células mãe do micrósporo, D2- estádio de tétrade, D3- estádio uninucleado dos micrósporos, D4- estádio binucleado dos micrósporos. A: barras - 5mm, B: barras – 2mm, C-D: barras – 1mm.

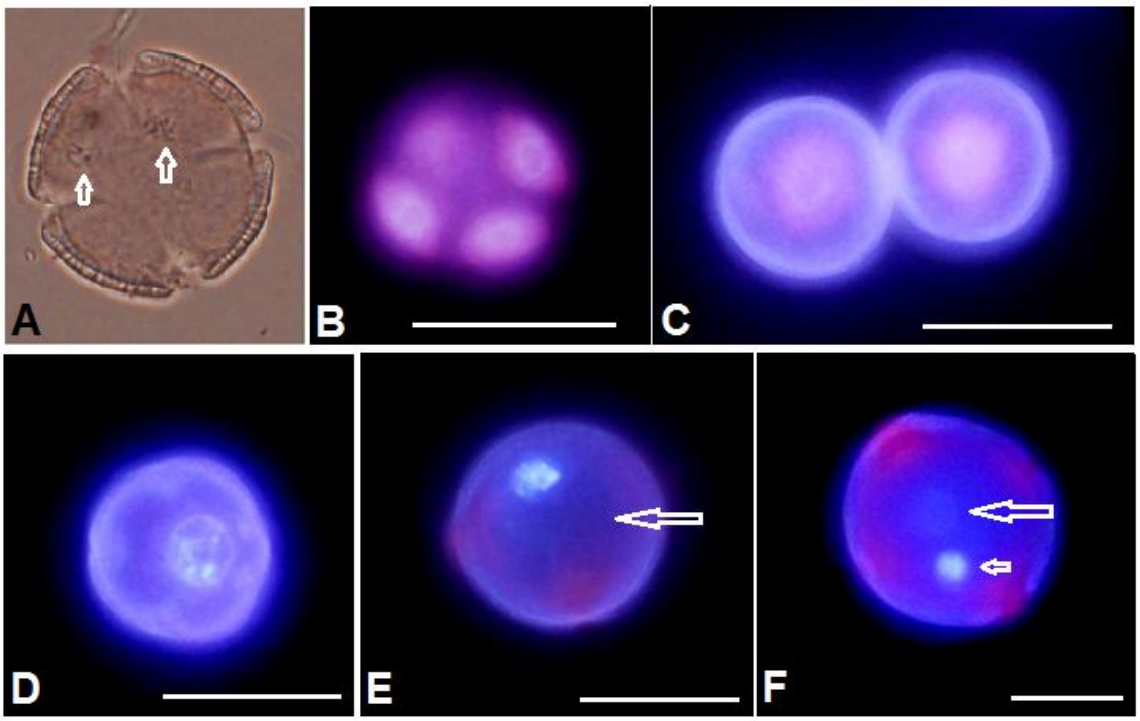



Figure 3.2 – Estádios de desenvolvimento das células mãe dos micósporos (CMM) e dos micrósporos de laranja doce com solução de carmim acético 2% (A) e DAPI (4',6-diamidine-2'-phenylindole dihidrochloride) utilizando microscopia de luz acoplada com fluorescência. A – estádio de meiose da CMM (D1), divisão dos cromossomos (setas), B – estádio de tétrade da CMM (D2), C – estádio uninucleado jovem (D3A), D – estádio uninucleado inicial para intermediário (D3B), E – estádio uniclueado tardio (D3C) caracterizado pela presença de vacúolo grande (seta), F – estádio binucleado (D4) com os respectivos núcleos vegetativo (seta maior) e generativo (seta menor).

### 3.3.2 Morfologia dos grãos de pólen

Baseado na relação entre as medidas do eixo polar (P) e equatorial (E) P/E (tabela 2.1), foi possível classificar os grãos de pólen como sendo de tamanho médio (25µm), isopolares, forma oblato-esferoidal (Pera de Abril) a prolato-esferoidal (Hamlin e Tobias), âmbito subcircular, 4-colporados, simetria radial, superfície semitectada, heterobrocada podendo ser foveolada com perfurações densamente distribuídas apresentando lúmens com diferentes diâmetros os quais são menores próximos às aberturas e em direção aos pólos. As columelas são incompletas que ora partem do teto sem atingir a nexina, ora emergem da nexina em direção ao teto. O teto é descontínuo com perfurações. Os espaços intercolumelares são ocupados, na parte voltada para nexina, por material que pode ser ainda resto da matriz ou do tapete. Os muros são largos, simples ou em geral, pluribaculados, teto parcial a completo, com columelas

espessadas de diferentes diâmetros, endoaberturas lalongadas, foi evidenciada uma membrana apertural granulada. A sexina é mais espessa que a nexina e a intina é bastante espessada sob as endoaberturas. Todos os grãos estudados apresentaram 4 aberturas (Figura 3.3).

Segundo Erdtman (1952) os grãos de pólen da família Rutaceae são do tipo euripolínicos, cujos grãos de pólen apresentam características morfológicas típicas, principalmente relacionadas à ornamentação e relaciona uma série de características com valor taxonômico que podem ser consideradas na análise dos grãos de pólen, destacando-se: comprimento do eixo polar e equatorial, forma, tamanho, número de grãos por antera e viabilidade. De acordo com Morton e Kallunki (1993) nenhuma pesquisa sobre pólen da família foi publicada e as observações publicadas normalmente aparecem como uma amostragem de taxons encontrada em regiões orientadas geograficamente para pesquisas de pólen (BARTH, 1982; 1983; 1985; HEUSSER, 1971; SELLING, 1947). Problemas associados à baixa resolução de descritores morfológicos, juvenilidade e alta capacidade de hibridação inter e intra-genérica tem dificultado a sistemática de grupos de citros e gêneros correlatos (RODRIGUES et al., 1998). Os resultados obtidos nesse trabalho em relação à forma e tamanho dos grãos de pólen foram semelhantes aos obtidos em outras espécies da família Rutaceae, como *Citrus aurantium, C. limonum* e *C. vulgaris* (BARTH, 1989). Em estudo com dez espécies de *Citrus*, incluindo *C. aurantium, C. grandis* e *C. limon* foram observadas variações no número de aberturas, diferenças na ornamentação e no tamanho de grãos de pólen entre as espécies (TRIVEDI, 1968). São escassos na literatura estudos sobre a palinologia da espécie *Citrus sinensis*, indicando que existem consistentes variações em algumas características e reforçando a importância de estudos taxonômicos da família.

Tabela 3.1 - Medidas de grãos de poles de cultivares de *Citrus sinensis* em visão equatorial e polar (PV – visão polar; EV – visão equatorial; P – diâmetro polar; E – diâmetro equatorial; A – Amplitude; x = média; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação.

| **Medidas** | | **Genótipos** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Pêra-de-Abril** | **Hamlin** | **Tobias** |
| | A | 25,44 - 35,08 | 19,05 - 31,37 | 29,33 - 33,54 |
| Diâmetro Equatorial | $\overline{x}$ | 29,32 | 26,65 | 31,4 |
| (PV) | CV (%) | 7,31 | 11,25 | 4,3 |
| | D.P. | 2,14 | 3 | 1,35 |
| | A | 25,09 - 32,97 | 24,15 - 31,04 | 29,33 - 35,44 |
| Diâmetro Polar | $\overline{x}$ | 29,08 | 28,05 | 31,97 |
| (VE) | CV (%) | 7,41 | 6,54 | 5,63 |
| | D.P. | 2,15 | 1,83 | 1,8 |
| | A | 22,7 - 34,13 | 24,9 - 30,16 | 25,25 - 34,58 |
| Diâmetro Equatorial | $\overline{x}$ | 29,1 | 27,71 | 30,97 |
| (VE) | CV (%) | 8,91 | 6,16 | 6,97 |
| | D.P. | 2,59 | 1,7 | 2,16 |
| P/E | | 0,99 | 1,01 | 1,03 |

Dados obtidos de: Rossi et al. (2010)

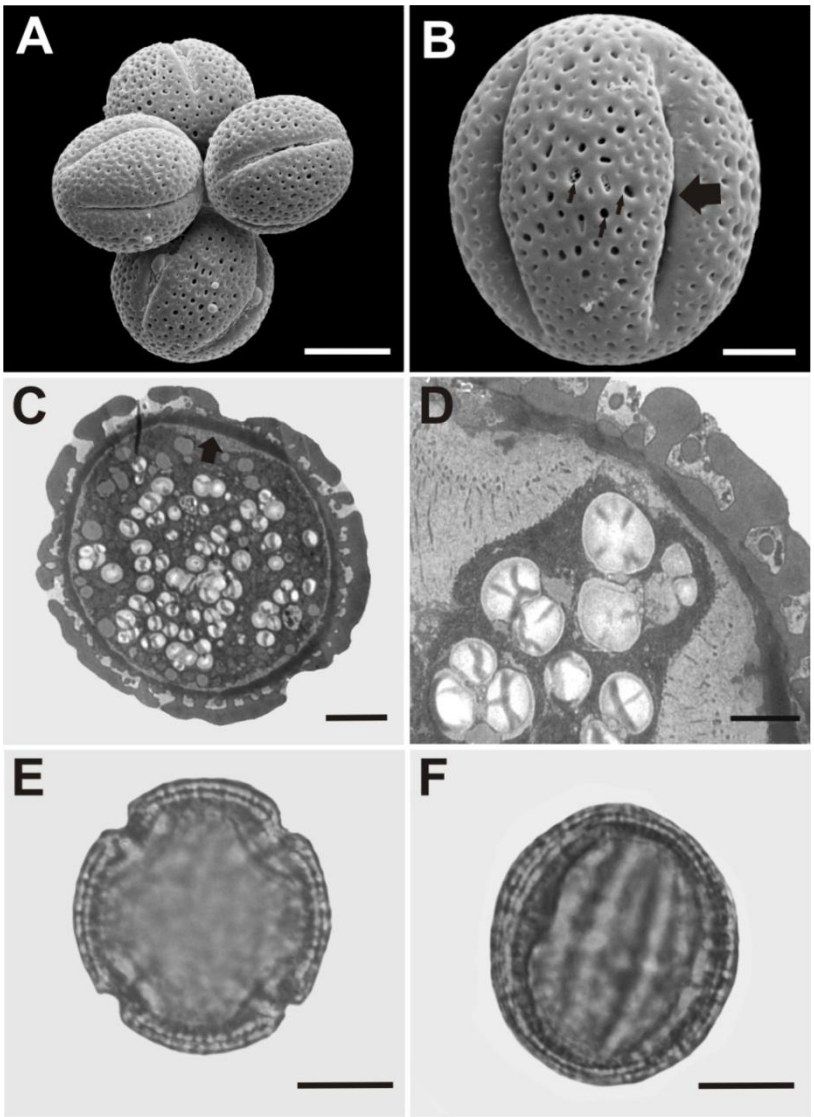



Figura 3.3 - Grãos de pólen de laranja doce (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin. A-B observações ao MEV, A- aspecto geral dos grãos de pólen; B- vista equatorial evidenciando ornamentação foveolada reticulada com lumens irregulares (setas pequenas) e endoabertura (seta); C-D Secções transversais ao MET, C- Vista geral do grão de pólen, notar o espessamento da intina na região da endoabertura (seta); D- detalhe da ornamentação; E-F – grãos acetolizados. E- vista polar mostrando as quatro aberturas; F- vista equatorial do grão prolato-esferoidal. Barras: A,E,F= 10µm; B,C= 5 µm; D= 2 µm

### 3.3.3 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen

Os resultados obtidos para os testes de viabilidade mostraram que a coloração dos polens com carmim acético (2%) foi aquele que demonstrou maior capacidade de diferenciação entre polens viáveis e não viáveis, além de permitir uma correlação mais próxima entre a determinação de viabilidade por coloração e a germinação *in vitro* de grãos de pólens (Figuras 3.4 e 3.5). No caso das

cultivares ‘Lima’ e ‘Valência’ que mostraram maiores desvios entre os valores de viabilidade e porcentagem de germinação *in vitro*, isso ocorreu pelo crescimento acelerado de colônias fúngicas nos meios de cultura que continham polens dessas cultivares, dificultando a avaliação e comparação dos resultados.

O uso da coloração com reagente de Alexsander não permitiu a caracterização e separação dos grãos de pólens considerados viáveis daqueles inviáveis. O Diacetato de Fluorosceína (DFA) permitiu a separação de pólens viáveis (com fluorescência nítida) daqueles inviáveis (sem ou com baixa intensidade de fluorescência), porém não mostrou correlação entre os resultados de viabilidade e da germinação *in vitro*, dificultando a interpretação dos resultados.

Foi possível observar diferenças significativas entre a viabilidade de grãos de pólen de diferentes cultivares de laranja-doce (Tabela 3.2). As cultivares que mostraram maior porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen foram as laranjeiras ‘Ouro’, ‘Campista’ e ‘Hamlin’, com 85,71, 76,21 e 73,11% de polens considerados viáveis. As cultivares sanguinelli ‘Moscato’ e ‘ Marrocos’ mostraram uma classe intermediária com 46,75 e 42,95% de polens viáveis, sendo similares as cultivares de polpa amarela ‘Pêra-de-Abril’, ‘Seleta Vermelha’, ‘Seleta do Rio’, ‘Elvespe’ e ‘Rubi’. As cultivares ‘Natal’, ‘Pêra’, ‘Pêra CENA 4’, ‘Tobias’, ‘Lima’ e mostraram porcentagem baixa de viabilidade dos polens, entre 21,31 e 27,76%. Por último, as cultivares ‘Salustiana’, ‘Valência Late’ e ‘Lue Gin Gong’ mostraram a menor porcentagem de viabilidade de polens, com valores entre 5,44 e 18,92% (Tabela 3.2).

Esses resultados obtidos com 20 cultivares de laranjeira doce permitiram a classificação das cultivares em quatro classes principais de acordo com a viabilidade dos polens, de acordo com o quadro 3.1. Nesse contexto, foi possível verificar que aproximadamente 60% das cultivares de laranja-doce encontram-se na classe com taxa média de viabilidade (MA e MB) e 45% encontram-se nas classes de média-baixa (MB) para baixa (B). Um aspecto interessante a se considerar nesses resultados é que praticamente todas as cultivares consideradas comerciais como ‘Valência’, ‘Natal’, ‘Pêra’, ‘Lima’ e ‘Hamlin’ encontram-se nas classes MB ou B, com baixa viabilidade dos grãos de pólens.

Os resultados obtidos nesse experimento podem ser utilizados como base e de grande utilidade em trabalhos de biologia reprodutiva, pouco estudadas em laranja-doce, e principalmente em trabalhos de melhoramento genético utilizando cruzamentos controlados, já que devido principalmente a alta heterozigosidade da maioria dos genótipos de laranja-doce e grandes semelhanças genéticas entre as cultivares (PEDROSA et al., 2000) torna possível a seleção de cultivares com maior viabilidade de polens para o uso em cruzamentos, sem prejuízo para a genética das progênies obtidas, além de diminuir os efeitos das demais barreiras genéticas associadas a espécie, como a auto-incompatibilidade e em alguns casos os aspectos relacionados a poliembrionia (GROSSER and GMITTER, 2010; GERMANÀ, 2011).

De fato, as cultivares comerciais são aquelas mais utilizadas em programas de melhoramento genético através de cruzamentos controlados (DOMINGUES; TULMANN NETO, 1999). No entanto, poucas progênies são obtidas pela germinação de sementes provenientes do cruzamento. Alguns métodos utilizando o resgate de sementes ou embriões imaturos seguido do cultivo *in vitro* aumentam a porcentagem de resgate dos embriões zigóticos híbridos (CHAGAS et al., 2003).

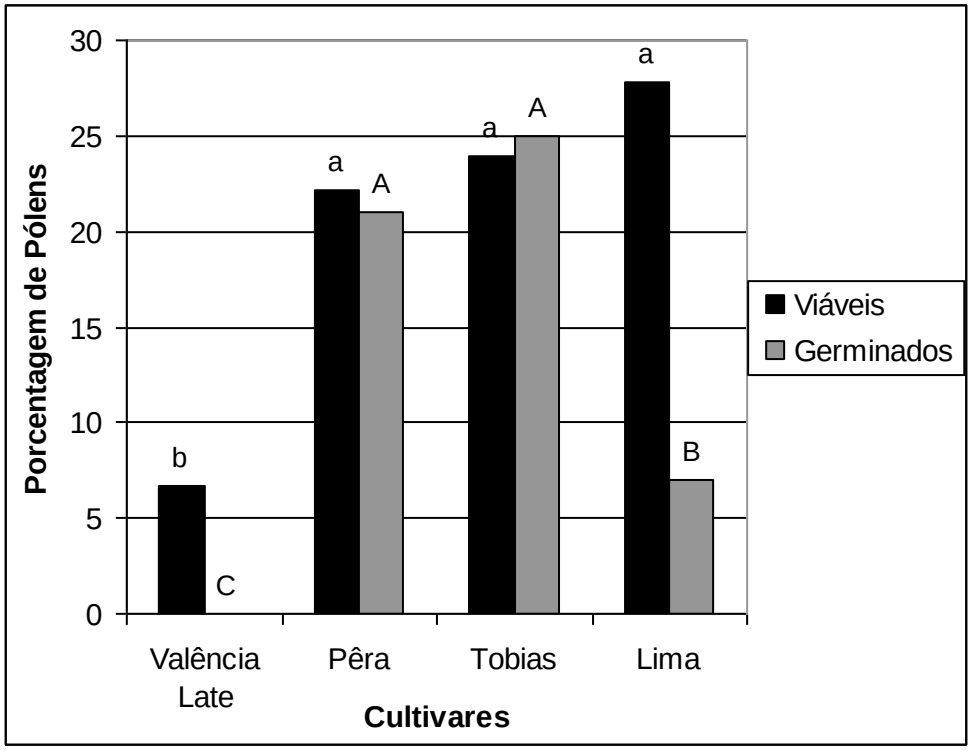



Figura 3.4 – Comparação entre a viabilidade obtida através de método colorimétrico com carmim acético 2% e a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*).

* As colunas seguidas de letras iguais em cada item avaliado não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 3.2 – Viabilidade de grãos de polen de diferentes cultivares de laranja doce utilizando o carmim acético (2%) como corante.

| **Cultivares** | **Viabilidade ± DP (%)** | **Duncan** |
|---|---|---|
| Valência Late | 6,72 ± 1,08 | f |
| Natal | 27,36 ± 2,77 | d |
| Pêra | 22,18 ± 4,83 | de |
| Tobias | 23,91 ± 1,98 | de |
| Lima | 27,76 ± 2,21 | d |
| Sanguinelli Moscatto | 46,75 ± 5,81 | c |
| Lue Gin Gong | 5,44 ± 3,38 f | f |
| Pêra-de-abril | 43,18 ± 2,04 | c |
| Laranjeira Campista | 76,21 ± 8,64 | b |
| Laranjeira Ouro | 85,71 ± 10,34 | a |
| Sanguinelli Marrocos | 42,95 ± 9,86 | c |
| Seleta do Rio 'IPEACS' | 52,27 ± 5,43 | c |
| Seleta Vermelha | 46,34 ± 5,72 | c |
| Salustiana | 14,9 ± 6,14 | e |
| Elvespe | 41,66 ± 9,55 | c |
| Pêra CENA 4 | 21,31 ± 7,57 | de |
| Hamlin | 73,11 ± 19,72 | b |
| Rubi | 53,11 ± 15,79 | c |
| Itaboraí | 62,59 ± 7,17 | bc |
| Hart’s Late | 18,92 ± 4,53 | de |
| **Tratamentos** | | 41,40 ** |
| **CV (%)** | | 14,16 |

Quadro 3.1 – Classificação de diferentes cultivares de laranja-doce de acordo com a porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen

| Classes de Viabilidade de grãos de pólen | Caracterização das Classes de Viabilidade | Cultivares de Laranjeiras | Cultivares em Cada Classe (%) |
|---|---|---|---|
| **A - Alta** | > 60% pólens viáveis | Ouro', 'Campista', 'Hamlin' e 'Itaboraí' | 20,0 |
| **MA - Média Alta** | 40 a 60% pólens viáveis | Sanguinelli Moscatto', 'S. Marrocos', 'Pêra de Abril', 'Seleta Vermelha', 'Seleta do Rio', 'Elvespe' e 'Rubi' | 35,0 |
| **MB - Média Baixa** | 20 a 40% pólens viáveis | 'Natal', 'Pêra', 'Tobias', 'Lima', 'Pêra CENA 4' | 25,0 |
| **B - Baixa** | <20% pólens viáveis | 'Harts Late', 'Salustiana', 'Lue Gin Gong', 'Valência Late' | 20,0 |

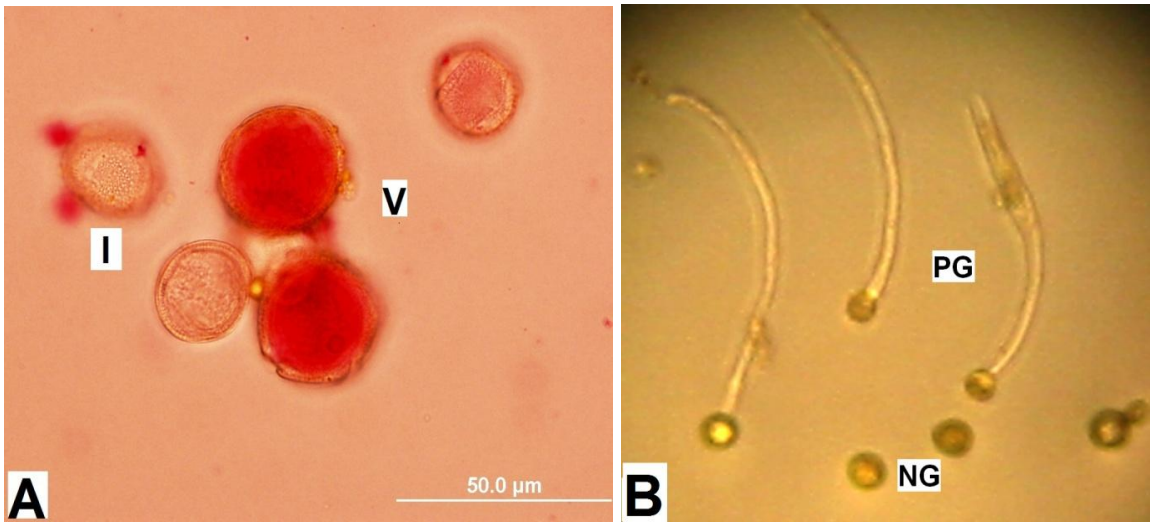



Figura 3.5 – Determinação da viabilidade de grãos de polen pelo método do carmim acético (2%) e germinação *in vitro* de grãos de polen de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck). I – Pólens inviáveis, V – Pólens viáveis, NG – Pólens não germinados, PG – Pólens germinados

### 3.3.4 Germinação de grãos de pólen *in vivo* em cruzamentos de laranja doce

O início da germinação dos polens no estigma ocorreu após 6 horas do momento da polinização. No entanto, o desenvolvimento do tubo polínico e a penetração desses no estigma foram observados apenas depois de 12 horas da polinização, observados utilizando coloração dos pistilos com azul de anilina (0.1%).

A presença de tubos polínicos na região do ovário e a fertilização dos óvulos foram observadas entre 12 e 24 horas após a polinização das flores com polens frescos de *Citrus sinensis*.

O método utilizado ainda permitiu a visualização da germinação dos grãos de pólen e a formação do tubo polínico em detalhes (Figura 3.6). Foi possível ainda observar alta taxa de germinação dos grãos de pólen no estigma de laranja-doce. No entanto, barreiras pré-zigóticas como a formação de caloses nos tubos polínicos foram detectadas a partir das polinizações realizadas, demonstrando e confirmando os problemas de autoincompatibilidade na espécie.

A coleta dos pistilos em diferentes tempos após a polinização ainda permitiu verificar que a fluorescência emitida pelos grãos de polens é intensa nos tempos 12 e 24 horas após a polinização, com perda dessa intensidade após 48 horas desse processo, dificultando os trabalhos de identificação e caracterização dos tubos polínicos (Figura 3.6).

Outro fator interessante observado nesses trabalhos foram o pegamento e desenvolvimento de frutos, independentemente da polinização ou não dos estigmas (partenocarpia), ou do tipo de cruzamento ou autopolinização realizada (Tabela 3.3). O cultivo das plantas em condições de estufa com irrigação suplementar mostrou aumento significativo da porcentagem de frutos pegos (30% de pegamento de frutos) em relação aquelas plantas cultivadas em condições de campo (2%) (Tabela 3.1). A obtenção de grandes quantidades de sementes por fruto parece estar associada mais ao genótipo utilizado que ao tipo de cruzamento ou autofecundação realizada. Ainda, é importante observar que a cultivar ‘Tobias’ possui sementes poliembriônicas e a ‘Pêra de Abril’ uma alta taxa de sementes

monoembriônicas, o que pode explicar em parte as diferenças no número de sementes grandes por fruto obtidas em cada genótipo (Tabela 3.3).

A obtenção de uma técnica que permita a contagem e germinação dos grãos de pólen, além de permitir a visualização do crescimento do tubo polínico e fertilização tem aplicações diversas dentro do melhoramento genético de plantas. No caso de *Citrus sinensis*, em que a obtenção de embriões e plantas híbridas, realizada por cruzamentos controlados é difícil, ocasionada principalmente por características reprodutivas como poliembrionia e auto-incompatibilidade, acompanhar o processo de polinização e a chegada do tubo polínico ao óvulo são necessários para a avaliação dos problemas relacionados às barreiras pré e pós-zigóticas na espécie, em especial, aquelas que levam a infertilidade e que dificultam a obtenção de híbridos.

Em estudo com híbridos entre *Citrus clementina* x *C. reticulata* utilizando a anilina azul como corante, foi possível observar as mudanças no pistilo com a germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico. Os resultados obtidos com os híbridos permitiram verificar o início da germinação do tubo polínico e fertilização dos óvulos após 2 e 12 dias do momento da polinização, respectivamente (DISTEFANO, 2011). Para *Citrus sinensis* os resultados obtidos permitiram observar que esses processos são mais rápidos, sendo que o início da germinação dos grãos de pólen e fertilização ocorrem logo após, 6 e 12 horas do momento da polinização, respectivamente.

Os trabalhos realizados com o acompanhamento dos grãos de polens desde o momento da polinização até a fertilização dos óvulos foram de grande importância para os trabalhos de partenogênese *in situ* utilizando polens irradiados, possibilitando melhor entendimento, a identificação e o estabelecimento de tratamentos dos polens e doses de radiação de acordo com os resultados obtidos destes testes de microscopia.

Tabela 3.3 – Porcentagens de pegamento de frutos e número de sementes abortadas e grandes por fruto provenientes de diferentes cruzamentos entre cultivares ou autopolinizações em laranja doce

| Tipo de Polinização | Cultivo | Pegamento de Frutos (%) | Número de Sementes/Fruto | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Abortadas | Grandes |
| Não polinizado | Estufa | 30 | 25,3 a | 0,0 b |
| Pêra de Abril x Auto | Estufa | 30 | 17,0 a | 1,5 b |
| Pêra de Abril x Auto | Campo | 2 | 15,0 a | 1,5 b |
| Tobias x Auto | Estufa | 37 | 26,3 a | 12,5 a |
| Pêra de Abril x Tobias | Estufa | 20 | 26,8 a | 1,8 b |
| Pêra de Abril x Pêra | Estufa | 26,1 | 27,0 a | 0,5 b |
| **F (tratamentos)** | | | 1,29 ns | 30,6** |
| **CV (%)** | | | 25,62 | 55,01 |

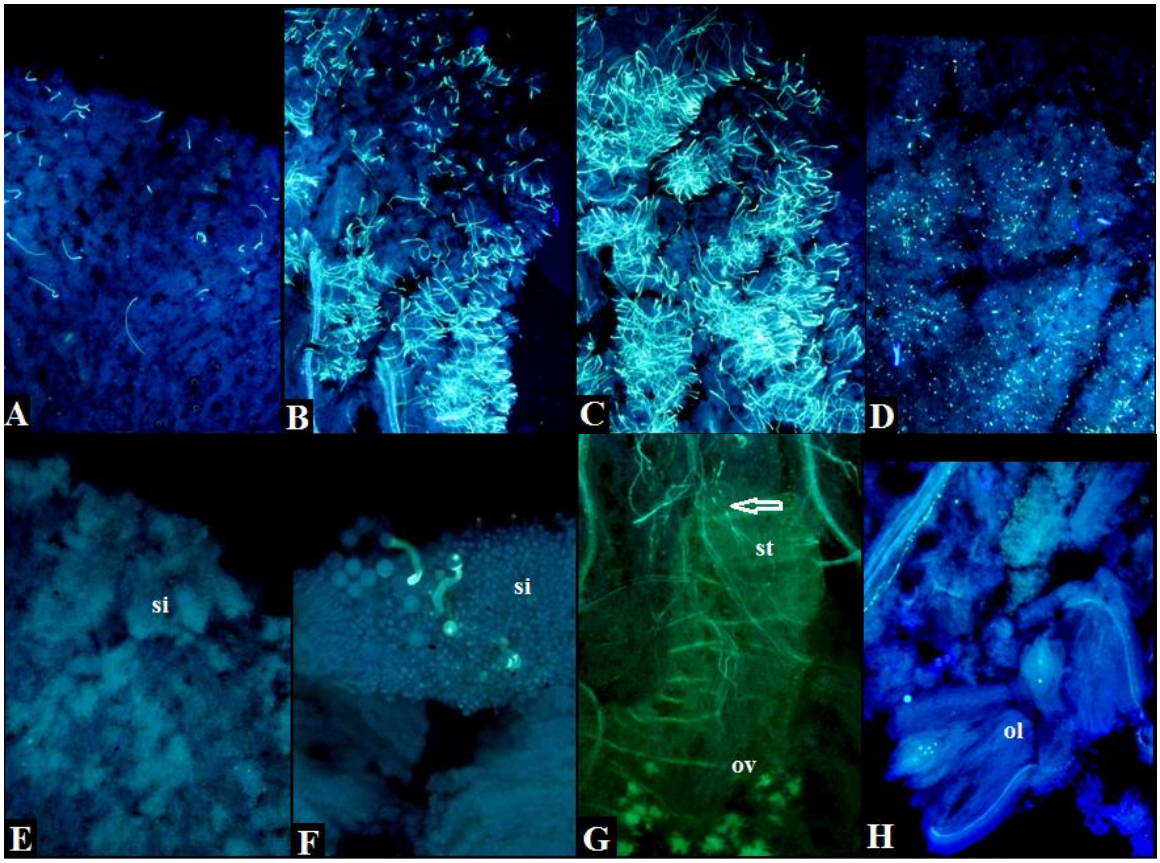



Figure 3.6 – Detalhes da germinação dos grãos de polen, do crescimento do tubo polínico e da fecundação dso óvulos de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv Tobias. A-D: Germinação dos polens no estigma após 6 (A), 12 (B), 24(C) e 48 horas (D) após a polinização**.** E: Estigma (si) não-polinizado, F: Detalhes de polens viáveis e inviáveis no estigma (si). G: Crescimento do tubo polínico (flecha) no estilete (st) e ovário (ov). H: Crescimento do tubo polínico no ovário e fertilização dos óvulos (ol)

# 4 Efeitos de tratamentos de choque de temperatura na cultura de anteras de genótipos de laranja doce


## RESUMO

A obtenção de linhagens homozigóticas num um único ciclo de cultivo pode ser de grande importância para os trabalhos de melhoramento genético e mapeamento de laranja doce. No presente estudo foram realizados dois experimentos consecutivos de cultura de anteras, um deles utilizando quatro genótipos de laranja doce obtidos no Banco do Germoplasma da Universidade de Palermo, Palermo, Itália, e outro, a partir de seis genótipos cultivados no Banco de Germoplasma do Centro de Citricultura (CCSM), Cordeirópolis, Brasil. Os tratamentos de temperatura aplicados às anteras foram a temperatura de -20 ºC, por 30 minutos, e o de 37ºC, por 60 minutos (genótipos italianos) ou 48 horas (genótipos brasileiros), além do controle (sem tratamento térmico). Foram observados efeitos significativos para genótipos em ambos os experimentos testados. Nos experimentos conduzidos na Itália, todos os genótipos resultaram em produção de calos embriogênicos e embriões. Porém, no Brasil, apenas dois dos seis genótipos testados mostraram capacidade para indução de calos embriogênicos. A exceção dos calos obtidos com a cultivar 'Lue Ging Gong' no Brasil, todos os demais calos embriogênicos obtidos cresceram vigorosamente em meio de cultura MS semisólido com 3% de sacarose e 1 mg $L^{-1}$ de $GA_3$ e 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA. As análises de citometria de fluxo dos embriões obtidos mostraram que estes eram diploides (2n) e, a partir dos testes moleculares com marcadores microssatélites, detectou-se um padrão de bandamento heterozigoto dos calos e embriões, semelhante ao observado nas plantas doadoras das anteras, comprovando a origem somática destes calos e embriões.

## ABSTRACT

**Effects of temperature treatments on anther culture of sweet oranges (*Citrus sinensis*) genotypes**. The obtaining of homozygous lines in only one growth cycle is of importance in works with breeding and mapping of sweet orange. In the present study we are conducted two similar works with anther culture, realized from four cultivars of sweet orange from Germplasm Bank of University of Palermo, Palermo, Italy, and other from six cultivar from Germplasm

Bank of Center of Citriculture (CCSM), Cordeiropolis, Brasil. The treatments with temperature consisted of the temperature of -20 ºC for 30 minuts, and of 37 ºC for 60 minuts (Italian genotypes) or for 48 hours (Brazilian genotypes), and the control without temperature treatments. We obtained strong effects of the cultivars in both experiments conducted. In the experiments in Italy, all cultivars resulted in induction of embryogenic callus and regeneration of embryos. However, in Brazil only two of six cultivars showed embryogenic callus induction. Except of the callus from Lue Gin Gong genotype, all of other embryogenic callus obtained from anther culture growth vigorously in the MS medium containing 3% of sucrose, 1,0 mg $L^{-1}$ of $GA_3$ and 0,1 mg $L^{-1}$ of ANA. The flow cytometric analysis of the embryos showed that this were diploid (2n) and, from molecular markers by microsatellite, showed an heterozygous standard banding from callus and embryos, similar to donor plants, and prove the somatic origin of callus and embryos from anther cultura of sweet orange cultivars.

## 4.1 Introdução

Os principais problemas que dificultam o melhoramento genético utilizando cruzamentos controlados de citros e, conseqüentemente, a obtenção de variabilidade genética são a presença de sementes poliembrônicas, longo período juvenil de plantas obtidas de sementes e auto-incompatibilidade (GERMANÀ, 2011; GROSSER & GMITTER, 2011). As técnicas de cultura de tecidos de plantas são úteis para a propagação, limpeza clonal e para o melhoramento genético de plantas.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos utilizadas para aceleração dos trabalhos de melhoramento genético de plantas, a cultura de anteras é uma das mais promissoras, e permite a obtenção de plantas haploides ou duplo-haplóides, de interesse para o melhoramento, em um único ciclo de cultivo (GERMANÀ, 2006).

Em citros, a maioria dos trabalhos de cultura de anteras tem sido realizadas com a espécie *Citrus clementina*, em que foi possível a obtenção de grandes quantidades de embriões com diferentes níveis de ploidia e de origem gamética (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003).

Recentemente, em trabalho com cultura de anteras de laranja doce, CAO et al. (2011) obtiveram duas linhagens de calos duplo-haplóides com a cultivar Valência Rhode Red. No entanto, os desafios na obtenção de plantas haploides e duplo-haplóides de laranja doce ainda continuam sendo limitadas pela grande genótipo dependência e pelo desconhecimento dos fatores que levam a mudança da rota gametofítica para a esporofítica em cultivares consideradas recalcitrantes.

O objetivo do presente trabalho foi o de se testar diferentes genótipos de laranja doce, bem como os efeitos de tratamentos de choques de temperatura na indução e regeneração de calos embriogênicos e embriões a partir da cultura *in vitro* de anteras de laranja doce.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Experimento de cultura de anteras com genótipos italianos de laranja doce

Os experimentos com cultura de anteras de *Citrus sinensis* foram realizados utilizando botões florais entre 4-7 mm, de acordo com os resultados obtidos nos estudos de biologia reprodutiva descritos no capítulo 3, coletados de plantas adultas cultivadas em condições de campo nos Bancos Ativos de Germoplasma da Universidade de Palermo e da Universidade da Catânia, Itália. Foram utilizadas anteras dos genótipos ‘Moro’, ‘Tarocco Melli’, ‘Tarocco S. Alfio’ e ‘Tarocco TDV’, além de anteras dos genótipos ‘Hernandina’, ‘Monreal’, ‘Corsica I’ pertencentes à espécie *Citrus clementina*, que serviram como controle para o acompanhamento do processo de embriogênese gamética a partir da técnica de cultura de anteras.

Os procedimentos de coleta, assepsia e estabelecimento das anteras *in vitro* foram semelhantes àqueles descritos por Germana e Chiancone (2003). O meio de cultura utilizado consistiu dos sais de N6 (CHU, 1978) e vitaminas de NN (NITSCH & NITSCH, 1969), porém com modificações realizadas por Germanà (2011, comunicação pessoal), citadas a seguir: ao meio básico foram adicionados 36 g $L^{-1}$ de lactose, 18 g $L^{-1}$ de galactose, 100 ml $L^{-1}$ de água de coco, 0,5 g $L^{-1}$ de caseína hidrolizada, 0,5 g $L^{-1}$ de ácido ascórbico, 0,8 g $L^{-1}$ de

glutamina, 5,0 g $L^{-1}$ de inositol, 2 mg $L^{-1}$ de glicina, 5 mg $L^{-1}$ de tiamina, 5 mg $L^{-1}$ de piridoxina, além da adição de 0,1 g $L^{-1}$ do aminoácido L-serina ao meio de indução. Como reguladores vegetais foram utilizados 0,5 mg $L^{-1}$ de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,5 mg $L^{-1}$ de cinetina, 0,5 mg $L^{-1}$ de 6-Benzilaminopurina (BAP), 0,5 mg $L^{-1}$ de zeatina, 0,1 mg $L^{-1}$ de tidiazuron (TDZ) e 0,5 mg $L^{-1}$ de Ácido Giberélico ($GA_3$). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 7,0 g $L^{-1}$ de agar (Plant Agar, Duchefa, Holanda) para solidificação do meio de cultura. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C e 1 kgf $cm^{-1}$ por 25 minutos.

Foram aplicados três tratamentos com temperatura (pré-tratamentos) logo após a inoculação das anteras *in vitro*, em todos os genótipos: 1. controle- as placas de Petri contendo as anteras foram colocadas diretamente em câmara de crescimento à temperatura 26±1°C; 2. Tratamento das anteras com alta temperatura, que consistiu na manutenção das anteras inoculadas em meio a temperatura de 37°C, durante 60 minutos, seguido de transferência para temperatura de cultivo 26±1°C; 3. Tratamento das anteras com baixa temperatura, que consistiu na manutenção das anteras inoculadas em meio a temperatura de -20°C, por 30 minutos, seguido de transferência para temperatura de cultivo 26±1°C. Logo após os pré-tratamentos, todas as placas de Petri foram transferidas para câmara de crescimento a 26±1°C e no escuro por 30 dias, seguido de transferência para condições de luminosidade (aproximadamente 35 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$) com fotoperíodo de 16 horas de luz por aproximadamente mais nove meses.

Os calos embriogênicos e embriões obtidos foram subcultivados para meio de maturação e germinação dos embriões (Meio E), descrito por Germanà e Chiancone (2003) e que consistiu de sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com adição de 34 g $L^{-1}$ de sacarose, 0,5 g $L^{-1}$ de ácido ascórbico, 0,5 g $L^{-1}$ de extrato de malte, 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA e 1,0 mg $L^{-1}$ de $GA_3$.

Para cada genótipo foram utilizados dez repetições (placas de Petri) contendo 60 anteras cada placa, sendo os tratamentos dispostos em fatorial (4 x 3), com quatro genótipos de laranja doce e três tratamentos de temperatura.

As avaliações de número de anteras sem desenvolvimento, intumescidas, com calos, calos embriogênicos e embriões foi realizada após 10 meses de

cultivo in vitro das anteras, momento a partir do qual não se tem observado importante desenvolvimento das anteras para espécies de *Citrus*.

### 4.2.2 Experimento de cultura de anteras com genótipos brasileiros de laranja doce

Para esse experimento foram utilizados seis genótipos de laranja doce: 'Lue Gin Gong' (CV159), 'Ouro' (CV97), 'Tobias' (CN1392), 'Seleta Vermelha' (CN439), 'Hamlin' (CN1422) e 'Pêra CENA4' (CN1399), todos coletados de plantas adultas cultivadas em condições de campo no Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC.

Como tratamentos de choque térmico foram aplicados três tratamentos: 1) Controle – manutenção das anteras à temperatura de 26 ± 1ºC por todo o cultivo; 2) F1 – tratamento das anteras inoculadas *in vitro* a temperatura de -20ºC por 30 minutos com posterior transferência para sala de crescimento a 26 ± 1ºC e; 3) HT – tratamento das anteras à temperatura de 37ºC por 48 horas com posterior transferência para sala de crescimento a 26 ± 1ºC.

O experimento foi conduzido em fatorial 6 (genótipos) x 3 (choques térmicos) totalizando 18 tratamentos, com quatro repetições (placas de Petri), contendo 80 anteras cada placa. Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 4.2.3 Determinação da origem dos calos, embriões e plantas obtidas

A origem dos calos, embriões e plantas regeneradas foi confirmada através da avaliação da ploidia e pela análise com marcadores moleculares microssatélites. A avaliação de ploidia dos tecidos obtidos foi determinada por citometria de fluxo utilizando o equipamento CyFlow® ploidy analyzer (Partec GmbH) com um parâmetro e lâmpada de UV-LED. As suspensões nucleares foram previamente isoladas de folhas frescas com auxílio de tampão de extração (Partec GmbH) e bisturi, filtradas através de filtros de 50 µm e coradas com solução de Cystain UV precise P (Partec GmbH), a qual utiliza o 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) como fluorocromo, de acordo com a recomendação do fabricante. Amostras com mínimo de 2.000 núcleos foram avaliadas. Os histogramas obtidos foram analisados em Software CyView (Partec GmbH). As amostras com coeficiente de variação acima de 10% foram descartadas. A

ploidia de cada amostra foi comparada com amostras de folhas da planta matriz diplóide.

As análises com uso de marcadores moleculares microssatélites (SSR) visaram determinar a origem dos calos, embriões e plântulas obtidas, se de origem somática, proveniente dos estratos parietais das anteras, ou gamética (duplo-haplóide). A extração do DNA genômico das plantas do controle e dos calos, embriões e/ou plântulas obtidas foi realizada a partir de tecidos de calos, de cotilédones ou folhas, de acordo com a metodologia descrita por MACHADO et al. (1996) com ligeiras modificações.

Os *primers* de microssatélites utilizados no presente projeto foram os genômicos, desenvolvidos por NOVELLI et al. (2006), e os *primers* de sequências de ESTs, citados por PALMIERI et al. (2007). Numa primeira etapa foram escolhidos ao menos dez *primers* SSR em que a variedade materna apresentou padrão de bandamento heterozigoto. As reações de amplificação foram preparadas para volume de 25 μL, contendo 50 ng de DNA, 1,5 U de Taq DNA polimerase, tampão da reação, $MgCl_2$ 1,0-2,0 mM, dNTP (0,2 mM) e 0,1 μM de cada “primer”. A amplificação foi conduzida em termocicladores Eppendorf, programado para 30 ciclos de 94°C por 30s, 65-56°C por 30s e 72°C por 30s. A temperatura de anelamento deu início a 65°C, decrescendo até 0,3°C a cada ciclo seguido por 3 ciclos de anelamento a 56°C. Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etidio (a 0,5 ng/ml) e fotografados sob luz ultravioleta.

A confirmação da origem das plantas regeneradas dos trabalhos de cultura de anteras e partenogênese foi realizada através do perfil molecular das plantas obtidas, sendo comparados com os da planta controle utilizando-se dez combinações de *primers* de marcadores SSR. As plantas que apresentaram padrão de bandamento idêntico aos das plantas controle, em até dez combinações de *primers* SSR foram consideradas de origem somática, e finalmente, aquelas que apresentaram todas as bandas diferentes da planta controle e em homozigose foram consideradas duplo-haplóides. Para essas, ainda foram testadas um mínimo de 20 combinações de primers para confirmação da origem gamética e homozigose dos calos e/ou indivíduos obtidos.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Experimento de cultura de anteras com genótipos italianos de laranja doce

Os tratamentos com temperatura não influenciaram o cultivo de anteras de genótipos italianos de laranja doce avaliados. No entanto, foram observados efeitos dos diferentes genótipos de laranja doce nas porcentagens de anteras sem desenvolvimento, intumescidas, com calos e embriões, além de interação significativa para o fator genótipo x tratamento térmico para os parâmetros porcentagem de anteras intumescidas e anteras que regeneraram calos embriogênicos (Tabela 4.1).

Os genótipos Moro e Tarocco TDV mostraram a maior porcentagem de anteras sem desenvolvimento, independentemente do pré-tratamento utilizado para o cultivo de anteras de laraja doce. Já em relação à porcentagem de anteras intumescidas foram observadas diferentes respostas dos genótipos a cultura de anteras, de acordo com o tratamento de exposição a diferentes temperaturas.

Foi observado que a cultivar Tarocco S. Alfio foi a que mostrou maior resposta a produção de calos a partir das anteras cultivadas *in vitro*, independentemente do pré-tratamento testado, seguido da cultivar Tarocco Melli (Tabela 4.1). Resultados semelhantes foram observados para a mesma cultivar (Tarocco S. Alfio) em relação a indução de calos embriogênicos e embriões, a partir de cultura de anteras. No entanto, para a indução de embriões e calos embriogênicos, as respostas dos genótipos foram dependentes do pré-tratamento utilizado. Para a Moro, a melhor resposta foi obtida no pré-tratamento utilizando baixa temperatura, enquanto que para os genótipos Tarocco TDV e Melli foi observada a indução de embriões somente a partir de anteras apenas no pré-tratamento com alta temperatura e no controle, respectivamente, demonstrando a genótipo-dependência em relação a condição de pré-tratamento. Em resumo, foram obtidos calos embriogênicos e embriões em todos os genótipos testados (Figura 4.1).

As análises de ploidia por citometria de fluxo mostraram que todos os embriões obtidos e regenerados a partir do cultivo de anteras de laranja doce eram diplóides (2n), independentemente da cultivar ou pré-tratamento utilizado.

A obtenção de indivíduos diplóides pode significar a regeneração a partir de tecido somático a partir de tecidos parietais presente nas anteras ou a regeneração de células gaméticas haplóides seguido de diploidizaçao espontânea dos calos obtidos.

As análises com marcadores moleculares microssatélites (SSR) realizadas com quatro amostras provenientes de embriões obtidos de cada cultivar confirmaram a origem somática, apresentando padrão heterozigoto em um ou mais *loci*.

Diferentemente dos genótipos de laranja doce, todos os genótipos de *Citrus clementina* testados demonstraram a regeneração de embriões e plântulas de origem gamética e tri-haplóides (dados não apresentados) nas mesmas condições de cultivo, mostrando a possibilidade e confirmação da embriogênese gamética e da genótipo-dependência dessa espécie para a obtenção de embriogênese a partir dos micrósporos.

Tabela 4.1. - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de diversos genótipos italianos de laranja doce, submetidos a diferentes pré-tratamentos de temperatura.

| **Genótipo** | **Tratamento** | **Anteras (% média ± DP)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Térmico** | **Não Desenvolvidas** | **Intumescidas** | **Calos** | **Calos Embriog.** |
| ‘Moro’ | Controle | 69,22 ± 19,69 | 21,89 ± 16,40 | 8,39 ± 4,59 | 0,08 ± 0,36 |
| | HT | 60,55 ± 25,60 | 27,67 ± 21,06 | 10,31 ± 5,46 | 0,21 ± 0,82 |
| | F1 | 49,66 ± 27,11 | 37,08 ± 23,21 | 10,92 ± 5,45 | 0,48 ± 1,21 |
| ‘Tarocco S. Alfio’ | Controle | 9,86 ± 4,43 | 49,49 ± 5,49 | 16,07 ± 4,12 | 1,06 ± 1,92 |
| | HT | 8,42 ± 2,06 | 51,97 ± 6,71 | 20,62 ± 8,89 | 0,83 ± 2,21 |
| | F1 | 11,47 ± 5,88 | 52,43 ± 8,06 | 14,79 ± 4,81 | 0,42 ± 0,72 |
| ‘Tarocco TDV’ | Controle | 39,59 ± 19,93 | 48,64 ± 15,73 | 8,41 ± 3,21 | 0,00 ± 0,00 |
| | HT | 47,99 ± 19,90 | 35,34 ± 16,37 | 9,40 ± 3,85 | 0,52 ± 1,14 |
| | F1 | 47,77 ± 17,14 | 37,06 ± 17,51 | 7,66 ± 2,48 | 0,00 ± 0,00 |
| ‘Tarocco Melli’ | Controle | 17,86 ± 8,78 | 54,98 ± 11,84 | 12,79 ± 3,01 | 0,65 ± 1,56 |
| | HT | 20,88 ± 4,31 | 46,58 ± 4,23 | 18,10 ± 4,25 | 0,00 ± 0,00 |
| | F1 | 9,96 ± 5,17 | 61,75 ± 6,10 | 11,88 ± 3,15 | 0,00 ± 0,00 |
| Genótipo | | ** | ** | ** | ** |
| Tratamento térmico | | ns | ns | ns | ns |
| Genótipo x tratamento | | ns | * | ns | * |

***** Médias seguidas por letras minúsculas ou maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F1 – (-20ºC por 30 minutos), HT – (37º por 60 minutos).

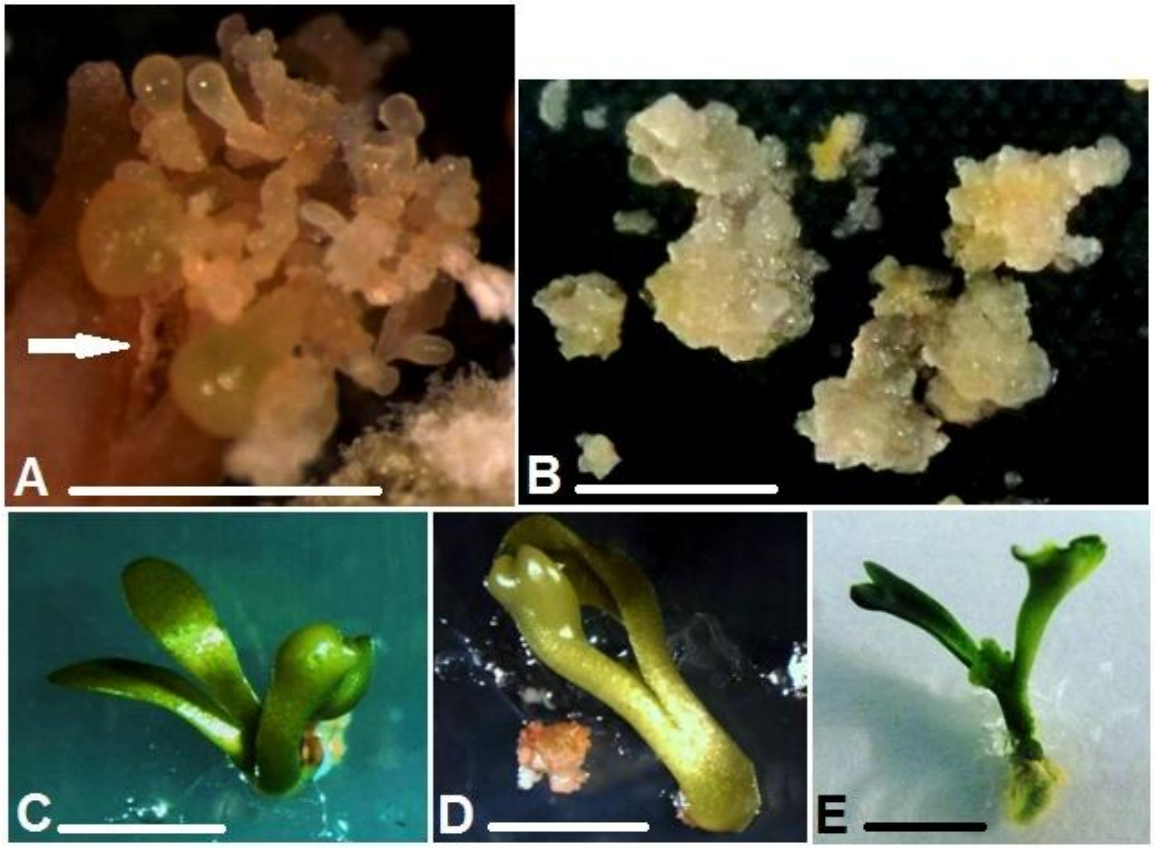



Figura 4.1. Cultura de anteras de diferentes genótipos italianos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.). A – Calos embriogênicos e embriões originários das anteras (seta) de laranja Tarocco Melli, B – Calos embriogênicos obtidos de cultura de anteras de laranja Tarocco S. Alfio, C – Embrião obtido através de embriogênese somática direta de cultura de anteras de laranja Moro, D – Embrião somático obtido de cultura de anteras de laranja Tarocco Melli, E – Embrião obtido de cultura de anteras de laranja Tarocco S. Alfio. Barras = 0,5 cm

### 4.3.2 Experimento de cultura de anteras com genótipos brasileiros de laranja doce

Nesse experimento foi observado forte efeito do genótipo na obtenção de respostas no cultivo *in vitro* de anteras de laranja doce. Os efeitos de pré-tratamento e da interação genótipo x pré-tratamento foram menos expressivos, sendo significativos somente para o parâmetro porcentagem de anteras intumescidas.

Todos os genótipos mostraram altas porcentagens de anteras não desenvolvidas, que apresentavam coloração escura ou mesmo amarelas, mas sem apresentar qualquer sinal de resposta de desenvolvimento no meio de

cultivo. A exceção ocorreu na laranja ‘Tobias’, que apresentou taxas reduzidas de anteras não desenvolvidas, compensada por uma grande porcentagem de anteras intumescidas (36,6 a 66,5%) (Tabela 4.2).

A indução de calos verdes e rígidos, considerados como não embriogênicos e/ou nao organogênicos, e dos calos de coloração creme, que apresentavam consistência macia e que podem servir de precursores de calos embriogênicos, foram menores nas laranjas ‘Tobias’ e ‘Pêra CENA4’, independentemente do tratamento de choque térmico aplicado (Tabela 4.2). Por outro lado, as laranjas ‘Lue Gin Gong’ e ‘Ouro’ foram as que apresentaram maiores respostas em termos de produçao de calos verdes e cremes (Tabela 4.2).

A obtenção de calos embriogênicos a partir de anteras cultivadas *in vitro* foi observada somente nas laranjas ‘Lue Gin Gong’ (1%) e ‘Tobias’ (0,87%), nas placas do controle e do tratamento com conservação a -20° C, durante 30 minutos.

O cultivo dos calos em meio de indução e maturação dos embriões promoveu um crescimento vigoroso dos mesmos, porém sem induzir à regeneração de embriões ou plântulas inteiras durante 10 meses de cultivo.

A avaliação precoce da ploidia de calos embriogênicos obtidos a partir das anteras utilizando a metodologia de citometria de fluxo demonstrou que o padrão apresentado por estes era semelhante ao de calos-controle diplóides, obtidos a partir de cultura *in vitro* de nucelos obtidos de laranja doce. A confirmação da origem somática desses calos foi obtida pelas análises com marcadores moleculares microssatélites.

Diferentemente da cultivar Tobias, os calos embriogênicos provenientes da cultivar Lue Gin Gong eram muito pequenos e mostravam a presença de pequenos embriões de coloração verdes (ao invés de albinos), que posteriormente morreram ao serem transferidos para o meio de maturação e germinação dos embriões, sem a possibilidade de obtenção de quantidade mínima de material genético para as análises moleculares.

As figuras dos tipos de calos obtidos de anteras e descritos nesse experimento, verdes, cremes ou embriogênicos, bem como os histogramas de citometria de fluxo e análises com marcadores moleculares estão disponíveis no

capítulo 5, já que os resultados são similares aos obtidos nesse experimento, utilizando-se genótipos brasileiros para o cultivo *in vitro* de anteras.

Tabela 4.2 - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de diversos genótipos brasileiros de laranja doce, submetidos a diferentes pré-tratamentos de temperatura.

| **Genótipo** | **Tratamento Térmico** | **Porcentagem de Anteras** | | **Anteras com Calos (%)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Nao Desenvolvidas** | **Intumescidas** | **Verde** | **Creme** | **Embriog.** |
| ‘Lue Gin Gong’ | Controle | 61,33 abcA | 12,67 cA | 9,67 aA | 14,33 aA | 1,00 aA |
| | F1 | 59,33 abcA | 18,67 bcA | 12,67 aA | 9,33 aA | 0,00 aA |
| | HT | 58,33 abcA | 17,00 cA | 12,00 aA | 12,67 aA | 0,00 aA |
| ‘Ouro’ | Controle | 53,97 bcA | 21,80 bcA | 14,97 aA | 9,30 abA | 0,00 aA |
| | F1 | 52,80 bcA | 28,80 abA | 11,23 aA | 7,13 abA | 0,00 aA |
| | HT | 62,10 bcA | 19,90 cA | 10,97 aA | 7,03 abA | 0,00 aA |
| ‘Seleta Vermelha’ | Controle | 54,83 cA | 28,30 bA | 11,00 abA | 5,90 abcA | 0,00 aA |
| | F1 | 59,03 cA | 25,00 abcA | 8,37 abA | 7,60 abcA | 0,00 aA |
| | HT | 50,60 cA | 37,93 bA | 3,70 abA | 7,80 abcA | 0,00 aA |
| ‘Tobias’ | Controle | 28,60 dA | 62,37 aA | 3,83 bA | 3,83 bcA | 0,00 aA |
| | F1 | 51,30 dA | 36,63 aB | 4,77 bA | 4,77 bcA | 0,87 aA |
| | HT | 27,23 dA | 66,53 aA | 2,93 bA | 3,37 bcA | 0,00 aA |
| ‘Pêra CENA4’ | Controle | 77,73 aA | 12,00 cB | 8,37 abA | 1,90 cA | 0,00 aA |
| | F1 | 74,33 aA | 12,53 cB | 10,27 abA | 2,87 cA | 0,00 aA |
| | HT | 62,97 aA | 30,47 bcA | 5,93 abA | 0,63 cA | 0,00 aA |
| ‘Hamlin’ | Controle | 63,57 abA | 15,23 bcA | 11,97 abA | 9,30 bcA | 0,00 aA |
| | F1 | 71,10 abA | 17,80 bcA | 8,63 abA | 2,53 bcA | 0,00 aA |
| | HT | 68,83 abA | 25,27 bcA | 3,13 abA | 2,73 bcA | 0,00 aA |
| F1 (genótipo) | | 18,72** | 41,34** | 4,12** | 5,87** | 1,44 ns |
| F2 (tratamento) | | 2,51 ns | 10,25** | 3,12 ns | 0,84 ns | 0,91 ns |
| F1 x F2 | | 1,88 ns | 4,29** | 0,75 ns | 0,59 ns | 1,97 ns |
| CV (%) | | 15,17 | 13,75 | 52,54 | 41,26 | 61,43 |
| K-S | | p>0.15 (sim) | p<0.01 (não) | p>0.15 | p<0.05 | p<0.01 |
| S-W | | p=0.18 (sim) | 0.00 (não) | p=0.20 | 0.003 | 0.00 |
| √X+0.5 | | Não | Sim | Não | Sim | Sim |
| Normalizados | | | Não | | Não | Não |

***** Médias seguidas por letras minúsculas ou maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. F1 – (-20ºC por 30 minutos), HT – (37º por 48 horas). K-S – teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov; S-W – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk; CV – Coeficiente de Variação

## 4.4 Discussão

As espécies arbóreas em geral apresentam alta taxa de recalcitrância a cultura de anteras em relação às herbáceas. De fato, até o momento, a obtenção de protocolos eficientes de indução da embriogênese gamética tem sido obtida em espécies de cereais (WEDZONY et al., 2009), brássicas (FERRIE & MÖLLERS, 2011) e algumas espécies do gênero Solanaceae (DUNWELL &

SUNDERLAND, 1973). Em *Citrus*, os trabalhos com cultura de anteras iniciaram-se a partir da década de 1970 com a obtenção de plantas regeneradas a partir de anteras de *Poncirus trifoliata* (DENG et al., 1992; HIDAKA et al., 1979), *Citrus madurensis* (CHEN et al., 1980), laranja doce (HIDAKA, 1984), laranja azeda (HIDAKA et al., 1992), híbrido Ichang Papeda (DENG et al., 1992) e *Citrus clementina* (GERMANÀ et al., 1994; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003).

Algumas alternativas como a embriogênese gamética a partir de cultivo de óvulos (fertilizados ou não), com uso das técnicas de partenogênese *in situ* têm sido testadas. Nestas, já foram obtidas plantas haplóides de *Citrus grandis*, obtidas de sementes pequenas de um cruzamento entre a cultivar Banpeiyu e o pomelo 'Ruby Red' (TOOLAPONG et al., 1996), além da obtenção de plântulas haplóides de tangerinas clementina, provenientes de sementes obtidas com o uso de pólen irradiado (FROELICHER et al., 2007), ou ainda pela técnica de partenogênese *in vitro*, que é realizado pelo resgate e cultivo *in vitro* de pistilos de *C. clementina*, seguido da polinização também *in vitro* com pólen de uma cultivar triplóide de *Citrus*. Em seguida, os ovários foram transferidos para outro meio de cultura para a indução de embriogênese gamética dos óvulos (GERMANÀ & CHIANCONE, 2001).

Em *Citrus sinensis*, diferentes tentativas de obtenção de embriogênese gamética foram realizadas sem sucesso visando a regeneração de plântulas haplóides ou duplo-haplóides a partir de anteras (HIDAKA, 1984; GERMANÀ, 2007). Apenas recentemente, Cao et al. (2011) relataram a obtenção de duas linhagens duplo-haplóides de calos embriogênicos a partir de anteras de laranja Valência Rhode Red, com posterior regeneraçao de plântulas. No entanto, as mesmas morreram precocemente ainda durante o cultivo *in vitro* e os autores mencionaram que a principal razão para tal fato foi a condição totalmente homozigota das plantas, o que resulta na existência de vários *loci* contendo alelos recessivos deletérios e na inviabilidade das plantas (CAO et al., 2011). Embora não tenha sido possível realizar as análises moleculares dos pequenos calos embriogênicos obtidos na cultivar Lue Gin Gong, é possível que tanto o desenvolvimento limitado desses calos como a morte dos embriões verdes obtidos possa estar associada a características de calos haploides ou mesmo duplo-haplóides, como os observados por CAO et al. (2011). Em plantas haploides e duplo-haplóides de *C. clementina* obtidas por partenogênese *in situ*

utilizando grãos de polen previamente irradiados apenas uma das sete plantas obtidas cresceram vigorosamente e seis morreram sem motivos aparentes, demonstrando que o sucesso da obtenção e regeneração de indivíduos de origem gamética está ligado ao controle gênico e a presença de genes homozigotos deletérios e recessivos (ALEZA et al. 2009).

A grande influência do genótipo para a cultura de anteras de laranja doce, observada nesse estudo, também foi relatada por outros autores, em trabalhos com diversas espécies de plantas (BAJAJ, 1990), incluindo as do gênero *Citrus* (GERMANÀ, 1997). Mesmo nos trabalhos com diversas espécies cítricas em que houve sucesso na cultura de anteras, apenas um ou poucos genótipos apresentavam resposta aos tratamentos utilizados, a exceção de *C. clementina,* em que um mesmo protocolo têm sido eficiente para a indução de embriogênese gamética e regeneração dos embriões em diferentes genótipos (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003; GERMANÀ et al., 2005; GERMANÀ, 2011).

Em trabalhos de cultura de anteras de *Solanum tuberosum* e *Brassica oleracea* mostraram que o controle genético para a embriogênese gamética a partir de micrósporos é controlada por mais de um gene, todos de origem recessiva (RUDOLF et al., 1999; SMYKAL, 2000), demonstrando a necessidade do uso de diferentes genótipos para a obtenção de sucesso na embriogênese gamética.

No presente trabalho, com o uso do meio N6 (CHU, 1978) modificado por Germanà & Chiancone (2003) foi possível regenerar embriões a partir da cultura de anteras das laranjas italianas Moro, Tarocco TDV, Tarocco Melli e S. Alfio, além da indução de calos embriogênicos em mais dois genótipos de laranja cultivados no Brasil.

Pelos resultados obtidos até o momento, o genótipo tem sido considerado como o principal fator associado ao sucesso do cultivo *in vitro* de anteras de citros para a obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides (GERMANÀ, 2011). No presente estudo, também foi possível determinar que o efeito de genótipo foi mais pronunciado, o que permitiu a seleção de genótipos mais responsivos a embriogênese a partir do cultivo de anteras. Resultados semelhantes foram obtidos com o cultivo de anteras de *Citrus clementina*, em que houve diferentes respostas entre os genótipos ‘Nules’, ‘SRA63’ e ‘Monreal’ na obtenção de anteras intumescidas, com calos, calos embriogênicos e

embriões, porém com a obtenção de regeneração de plântulas em todas os genótipos testados (GERMANÀ et al., 2005).

Em maçã também foram observadas diferenças significativas entre cinco genótipos testados na indução de embriões a partir do cultivo de anteras e micrósporos. A cultivar Alkmene foi aquela que mostrou maior produção de embriões totais e haplóides para a cultura de anteras. No entanto, quando a técnica utilizada foi a cultura de micrósporos, essa cultivar mostrou baixo potencial de regeneração e a cultivar Realka foi aquela em que se obteve melhores resultados (HÖFER, 2005).

Em parte, a complexidade do meio de cultura utilizado nesse experimento, bem como em outros experimentos de cultura de anteras de *Citrus* também pode ser considerado como um dos fatores predominantes para o sucesso desta técnica. Em experimentos prévios utilizando o genótipo Tobias de laranja-doce, responsivo para esse estudo, mostrou-se recalcitrante em experimentos anteriores em que foi utilizado um meio de cultura mais simples (dados não apresentados). Desta forma, embora o genótipo seja um dos principais fatores endógenos que influencia o sucesso da cultura de anteras, isso pode ser revertido por fatores externos tais como a aplicação de estresses e a composição do meio de cultura (GERMANÀ, 2011; HEBERLE-BORS, 1985).

Nesse contexto, o tratamento com choques de temperaturas aplicados aos botões florais ou as anteras é outro fator que pode influenciar significativamente o sucesso da cultura de anteras, em relação à obtenção de embriões gaméticos em muitas espécies de plantas (GERMANÀ, 2011; GERMANÀ, 2006). No entanto, de modo geral não foram observadas diferenças significativas devido aos pré-tratamentos aplicados nas anteras de laranja doce, sendo que cada genótipo respondeu diferencialmente a esse fator. Apesar disso, para os genótipos Tarocco TDV e Tarocco Melli, a produção de calos embriogênicos e/ou embriões ocorreu exclusivamente no tratamento com alta temperatura e no controle, respectivamente. O mesmo ocorreu com os genótipos Lue Gin Gong e Tobias, em que a obtenção de calos embriogênicos foi condicionada ao controle e ao pré-tratamento com baixa temperatura, respectivamente.

Em clementina ‘Nules’ também não foram observadas diferenças na obtenção de calos embriogênicos e/ou embriões a partir de anteras, quando se

comparou os pré-tratamentos de temperatura de 4 ou 25°C aplicados aos botões florais por 48 horas. No entanto, o uso da temperatura de 32°C inibiu a embriogênese gamética (GERMANÀ & CHIANCONE 2003). Em experimento com cultura de micrósporos de *Brassica napus* também foi observada a genótipo-dependência em relação a temperatura e ao tempo de tratamento utilizado (DUNWELL et al., 1983).

Os tratamentos de choques de temperatura, que utiliza altas ou baixas temperaturas por período de tempo determinado, tem se mostrado o mais efetivo em para a obtenção da embriogênese a partir de micrósporos, resultando no aumento do número de anteras responsivas a androgênese (GERMANÀ 2011). No presente estudo, apenas a laranja 'Tarocco TDV' respondeu positivamente a este tratamento, sendo considerado como essencial para a indução e formação de calos embriogênicos e de embriões a partir das anteras. Em cultura de anteras de *Cucumis sativus* foi observado um aumento significativo na produção de calos embriogênicos provenientes do cultivo de anteras de três, entre quatro genótipos testados, quando estes foram expostos a temperatura de 33°C por uma hora, em relação ao controle, mantido a 25°C (SONG et al., 2007).

O conhecimento sobre a influência dos tratamentos ligados aos estresses de temperatura aplicados aos botões florais, anteras ou micrósporos na obtenção de embriogênese gamética ainda é limitado. No entanto, já é conhecido que os tratamentos de estresse, como os de temperatura utilizados nesse experimento com laranja doce, promovem um aumento na biossíntese de proteínas de choque térmico, também chamadas de HSPs (Heat-Shock Proteins) No entanto, a atividade dessas proteínas parece estar ligada de forma indireta a embriogênese gamética, de forma que a síntese dessas proteínas pode estar associada a processos de reparo celular e tolerância ao estresse, evitando ou retardando a morte celular dos micrósporos pela inibição de eventos apoptóticos (SEGUÍ-SIMARRO et al. 2003; ZORINIANTS et al. 2005).

Outro fator direta ou indiretamente ligado a indução da embriogênese gamética por tratamentos de estresse é a biossíntese de Ácido Abscísico (ABA) e de genes ligado a sua via de biossíntese (SEGUÍ-SIMARRO et al. 2008).

Em relação a ploidia das plantas regeneradas, o cultivo de anteras de diversos genótipos de tangerina clementina resultou em mais de 80% de embriões e plântulas regeneradas triplóides (3n), mas sendo também obtidas

plantas com outros níveis de ploidia, tais como: n, 2n, 4n e 6n (GERMANÀ et al., 2005; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003). Em maçã, também foram obtidos embriões com vários níveis de ploidia, variando de n (haplóide) a 6n (hexaplóide), a partir do cultivo de anteras e micrósporos (HÖFER, 2005).

As técnicas tradicionais de obtenção de linhagens homozigotas em espécies anuais envolvem vários ciclos de autofecundação e anos para serem obtidas, sendo impraticáveis em espécies arbóreas em que o estádio juvenil é muito longo. Associado a isso, as espécies de *Citrus* apresentam outras dificuldades reprodutivas, como a auto-incompatibilidade e sementes poliembriônicas, que dificultam ainda mais esse processo, sendo necessário o uso de técnicas biotecnológicas que acelerem os programas de melhoramento genético e/ou para sobrepor barreiras reprodutivas (GROSSER & GMITTER, 2011). O uso das técnicas de cultura de células gaméticas é uma alternativa viável para esse processo, pois permite a obtenção de linhagens homozigotas em um único ciclo de cultivo.

Nesse contexto, a obtenção de híbridos $F_1$ a partir de linhagens homozigotas podem ter grande aplicabilidade no melhoramento genético de laranja doce devido a restauração da heterozigosidade. Cultivares superiores de diferentes espécies como arroz, trigo, tabaco, milho e pimenta já foram obtidas através da incorporação de plantas duplo-haplóides em programas de melhoramento genético dessas espécies (EVANS, 1989). No melhoramento genético de cevada na Europa, estima-se que mais de 50% das cultivares atuais foram obtidas utilizando-se de plantas duplo-haplóides em alguma fase dos programas de melhoramento genético (DUNWELL, 2010).

Outra importante aplicação das plantas duplo-haplóides está no mapeamento genético das espécies vegetais (FORSTER & THOMAS, 2005). Isso possui uma grande aplicabilidade, principalmente em espécies altamente heterozigotas, em que o mapeamento genético completo é dificultado pela presença de grande quantidade de alelos em heterozigose. A obtenção e uso de linhagens homozigotas por técnicas de cultura de células gaméticas permite também a identificação e mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que controlam características de alta importância econômica, como a produtividade e resistência a doenças (DUNWELL, 2010; LAPITAN et al., 2009).

As técnicas de indução e obtenção de embriões e plantas através da embriogênese gamética ainda mostram grandes dificuldades mesmo após muitos anos de pesquisa, tais como: alta dependência do genótipo e a baixa taxa de regeneração das anteras e micrósporos cultivados *in vitro*. Nesse estudo foi possível a obtenção de um protocolo para a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos a partir de anteras com resultados positivos para seis genótipos de laranja doce testados (quatro provenientes da Itália e dois do Brasil), o que representa um enorme avanço para as técnicas de cultura de anteras de laranja doce, uma espécie considerada recalcitrante para esta técnica. A observação da interação genótipo x tratamento representa um passo importante para essa técnica e pode servir de base para a aplicação da técnica em outras cultivares de laranja doce e em outras espécies arbóreas de importância econômica.

# 5 Cultura de Anteras de Genótipos de Laranja Doce (*Citrus sinensis* Osbeck) e de um Híbrido entre *C. clementina* e *C. sinensis*.


## RESUMO

O genótipo é o principal fator que afeta o sucesso da obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides na técnica de cultura de anteras de plantas superiores. Nesse trabalho, foram testados 27 genótipos distintos de laranja doce e um híbrido entre *Citrus clementina* e laranja 'Hamlin' em cultivo de anteras, divididos em três experimentos, de acordo com a época de coleta e início da cultura *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o N6, modificado por Germanà et al. (2001) para a cultura de anteras de *C. clementina*. Dentre todos os genótipos testados, dez laranjas doces e o híbrido entre *C. clementina* e laranja 'Hamlin' produziram calos embriogênicos a partir de anteras, com destaque para laranjas sanguíneas que foram 100% responsivas (seis genótipos). As análises moleculares com marcadores SSR demonstraram que vários calos embriogênicos obtidos foram heterozigotos para oito *loci*, demonstrando que provavelmente possuem origem do tecido somático proveniente da planta doadora. A exceção foi observada na planta híbrida que apresentou calos embriogênicos com vinte *loci* em homozigose, nas análises com marcadores moleculares SSR e células com ploidia variando entre triplóide e tetraplóide, pelas análises de citometria de fluxo. Ainda, um maior número de marcadores SSR deve ser testados para a confirmação da origem gamética dos calos.

## ABSTRACT

**Anther culture of genotypes of sweet oranges (***Citrus sinensis***) genotypes and of a hybrid between** *C. clementina* **and** *C. sinensis*. The genotype is a key factor that affects the success to obtain haploid and double-haploid embryos and plantlets from anther culture techniques in higher plants. In this work we are tested anther culture of 27 different genotypes of sweet orange and one hybrid between *C. clementina* and sweet orange cv. Hamlin, divided in tree experiments, according to the time of establishment of the anther culture of sweet orange. The culture medium used was the N6 modified by Germanà et al. (2001) to anther culture of *C. clementine*. Among all tested genotypes, ten of sweet

orange and the hybrid between *C. clementina* showed the induction of embryogenic callus from anther culture. The blood oranges showed 6/6 of cultivars with embryogenic callus and sweet orange. The molecular markers analysis with SSR showed that the most of embryogenic callus were heterozygous for 8 *loci*, similar to donor plants. In except, the embryogenic callus from the hybrid showed homozygous to twenty *loci* with SSR markers. The flow cytometric analysis showed triploid and tetraploid cells from this embryogenic callus. Although, a major number of SSR molecular markers will be tested to confirm the gametic origin of this embryogenic callus.

## 5.1 Introdução

O melhoramento genético dos citros é dificultado por diferentes barreiras reprodutivas, em principal a alta heterozigosidade, poliembrionia nas sementes e o ciclo juvenil longo (GROSSER & GMITTER, 2010; GERMANÀ, 2011).

As ferramentas biotecnológicas são de grande aplicabilidade para o melhoramento genético de *Citrus*, com destaque para o isolamento e fusão de protoplastos (GROSSER & GMITTER, 2010), obtenção de plantas transgênicas (BARBOSA-MENDES et al., 2009) e a cultura *in vitro* de células haplóides (GERMANÀ, 2011).

Dentre os principais métodos utilizados na obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides estão a cultura de anteras e de micrósporos isolados (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003; GERMANÀ, 2011; KASHA & KAO, 1970).

Dentre todos os fatores testados e que afetam a cultura de anteras, o genótipo é o mais expressivo (GERMANÀ, 2011) e a seleção de genótipos mais responsivos é condição essencial para o sucesso na obtenção de calos e plantas de origem gamética (GERMANÀ, 2011; HÖFER, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar 28 genótipos de laranja doce e um híbrido entre *Citrus clementina* e laranja ‘Hamlin’ em cultivo de anteras, na busca de genótipos mais responsivos, principalmente considerando os parâmetros relacionados a obtençao de calos embriogênicos e embriões.

## 5.2 Material e Métodos

No total foram avaliados 27 genótipos de laranja doce e um híbrido entre *Citrus clementina* e laranja 'Hamlin', todos provenientes de plantas mantidas no BAG do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, localizado em Cordeirópolis, SP. Todas as plantas foram enxertadas em tangerina Cleópatra, apresentam mais de 20 anos, sendo mantidas a campo e sem irrigação suplementar.

Os experimentos com cultura de anteras de laranja doce e do híbrido foram baseados na metodologia descrita por Germanà et al. (2001), Germanà e Chiancone (2003) e Germanà et al. (2005) para a cultura de anteras de tangerina clementina, sendo realizadas algumas pequenas modificações na metodologia e meio de cultura, como as descritas a seguir.

Os botões florais entre 4 e 7 mm de comprimento foram coletados entre os meses de junho a agosto e utilizados para o resgate e cultivo *in vitro* das anteras.

Previamente, em cada experimento a confirmação do estádio dos micrósporos contidos nas anteras foi avaliado por meio de coloração com DAPI e visualização em microscópio ótico acoplado com luz fluorescente. Para isto, aproximadamente vinte anteras de cada genótipo foram coletadas de cerca de 20 botões florais (uma antera por botão floral) e foram utilizados nas análises. As anteras foram ligeiramente maceradas sobre lâminas de vidro na presença de 50 μl de tampão de coloração DAPI (PARTEC Gamble Ltda, Alemanha), sendo a seguir cobertas com lamínulas de vidro. Em seguida, realizaram-se as observações em microscópio óptico com auxílio de fluorescência para a confirmação do estádio uninucleado dos micrósporos (Figura 5.1A).

O pré-tratamento das anteras consitiu de armazenamento dos botões florais à temperatura de 5 ± 1 ºC, por 2-7 dias, antes do isolamento e cultivo *in vitro*.

A assepsia das anteras consistiu na imersão dos botões florais entre 4-7 mm em solução de álcool 70% por 5 minutos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 50% (1,00-1,25% de cloro ativo) por 20 minutos, seguido de três lavagens em água destilada autoclavada. As pétalas foram então removidas em condições assépticas e as anteras foram retiradas com auxílio de bisturi e pinça,

sendo transferidas para meio de indução de calos e embriogênese, acondicionados em placas de Petri de 60 x 15 mm.

O meio de cultura utilizado consistiu dos sais de N6 (CHU, 1978) e vitaminas de NN (NITSCH & NITSCH, 1969), porém com modificações realizadas por Germanà (2011, comunicação pessoal), citadas a seguir. Ao meio básico foram adicionados 36 g $L^{-1}$ de lactose, 18 g $L^{-1}$ de galactose, 100 ml $L^{-1}$ de água de coco, 0,5 g $L^{-1}$ de caseína hidrolizada, 0,5 g $L^{-1}$ de ácido ascórbico, 0,8 g $L^{-1}$ de glutamina, 5,0 g $L^{-1}$ de inositol, 2 mg $L^{-1}$ de glicina, 5 mg $L^{-1}$ de tiamina, 5 mg $L^{-1}$ de piridoxina, além da adição de 0,1 g $L^{-1}$ do aminoácido L-serina ao meio de indução. Como reguladores vegetais foram utilizados 0,5 mg $L^{-1}$ de 2,4-D, 0,5 mg $L^{-1}$ de cinetina, 0,5 mg $L^{-1}$ de BAP, 0,5 mg $L^{-1}$ de zeatina, 0,1 mg $L^{-1}$ de TDZ e 0,5 mg $L^{-1}$ de $GA_3$. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição de 7,0 g $L^{-1}$ de agar (Plant Agar, Duchefa, Holanda) para solidificação.

**Experimento 1** – Nesse experimento foram utilizados oito genótipos de laranja doce, descritos a seguir: Hart's Late (CV166), Lue Gin Gong (CV159), Sanguinelli Marrocos (CN73), Elvespe (CN458), Seleta do Rio (CN420), Seleta Vermelha (CN439), Salustiana (CN446) e Ouro (CV97).

Nesse experimento a viabilidade de grãos de polén destes genótipos foi previamente avaliada utilizando-se a coloração com carmim acético (1%). As anteras foram ligeiramente maceradas sobre laminas de vidro na presença de soluçao de carmim acético a 1%, sendo a seguir cobertas com lamínulas de vidro. Em seguida realizaram-se as observações em microscópio óptico para a contagem do número de grãos de pólen viáveis. Foram considerados grãos de pólen viáveis aqueles que apresentavam interior com coloração vermelho intenso, enquanto os inviáveis apresentavam coloração clara ou rósea.

**Experimento 2 –** Nesse experimento foram utilizados 10 genótipos de laranja doce, descritos a seguir: Rubi (CN425), Lanceta Barão (CV54), Diva (CV58), Campista (CV59), Itaboraí (CV66), Rosa (CV95), Boa Vista (CV110), Caipira Doce (CV138), Ibicaba (CV84), Melrose (CV89) e Shamouti (CV146).

**Experimento 3 -** Nesse experimento foram utilizados 10 genótipos de laranja doce, descritos a seguir: João Nunes (CV109), Moro Acireale (CN45), Moro

Acireale 3 (CN47), Sanguinea Doppio Israel (CN59), Tarocco Acireale (CN65), Tarocco (CN67), Sanguinelli Polidari (CN74), Pêra CENA4 (CN1399), Hamlin (CN1422) e um híbrido entre *Citrus clementina* e *C. sinensis* cv. Hamlin (CN1441).

Os experimentos tiveram duração de 10 meses de cultivo após a inoculação das anteras no meio de indução, sendo avaliadas nesse período as porcentagens de anteras sem desenvolvimento, intumescidas, com calos e com calos embriogênicos e embriões.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com uso do teste F, seguido da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Também foram utilizados para testar a normalidade dos dados, os testes de Kolgomorov-Smirnov (K-S) e Shapiro-Wilk (S-W). Aqueles dados que não apresentaram normalidade foram transformados pela equaçao $\sqrt{X}+0,5$.

A viabilidade dos grãos de pólen foi obtida de flores em estádio de pré-antese e coletadas no mesmo momento dos botões florais utilizados para os exprimentos de cultura *in vitro* de anteras do experimento 1. As anteras foram maceradas em lâmina microscópica e coradas com solução de carmim acético 1% para visualização em microscópio. Os dados de viabilidade de grãos de pólen (%) foram então correlacionados com os dados de porcentagem de anteras com calos embriogênicos obtidos aos dez meses de cultivo *in vitro* das anteras.

O meio utilizado para o cultivo e propagação dos calos embriogênicos foi o mesmo descrito no capítulo 4.

Para as analyses histológicas das anteras com calos, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 0.001M $CaCl_2$, 0.05M de tampão de cacodilato de sódio, pH 7.2) por 48 h, desidratados em uma série gradativa de etanol (35 to 100%). Após, as amostras foram transferidas para propanol 100% por 8 horas, seguido por butanol 100% ‘overnight’. A infiltração foi feita gradativamente utilizando butanol: historesina (Leica, Heidelberg, Germany) (2:1, 1:1, 1:2), à temperatura de 4°C e finalmente em historesina or 5 dias. A polimerização foi conduzida a temperatura ambiente por 48 horas. Os cortes histológicos (5 µm) foram obtidos utilizando o micrótomo Leica RM2155 (Heidelberg, Germany) e corados com 1% de azul de toluidina

(FEDER & O'BRIEN, 1968). Os cortes foram montados em lâminas microscópicas com uma gota de Entelan© e cobertas com lamínula de vidro. As amostras foram observadas com o microscópio Zeiss Axioscop2 (Axioplan, Zeiss, Jena, Germany) e as imagens obtidas digitalizadas.

A origem genética dos calos embriogênicos, embriões e plantas obtidas do cultivo *in vitro* de anteras foram avaliados pelas técnicas de microssatélites (Sequências Simples de Repetição – SSR), assim como as análises de ploidia foram feitas pelo método de citometria de fluxo, de acordo com o descrito no experimento anterior (capítulo 4).

As análises com marcadores moleculares TRAPs (Polimorfismo Amplificado de Regiões Alvo) para os calos creme e verdes obtidos nesse experimento foi realizada com PCR a um volume final de 15 µL contendo os seguintes componentes: 50 ng de DNA genômico, PCR buffer 1X, $MgCl_2$ (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM de cada), primers arbitrários e fixo (0.1 µM de cada) e *Taq* DNA polymerase (1 U). O PCR foi realizado com ciclo inicial de 94 °C por 2 min, seguido de cinco ciclos de 94 °C por 45 s, 35 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 45 s e 72° C por 1 min, e com um ciclo final de 72 °C for 7 min.

Os primers fixos foram desenhados a partir das seqüências de genes de laranja-doce: 01F-ACC Synthase (5'-TCCCCGAGGCACAGCATC-3') e 05F-NADP glyceraldehyde 3-phosphate (5'-ACGCGTCCGCCACTCTCA-3'). As seqüências dos primers arbitrários foram obtidas de LI e QUIROS (2001): P1 (5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'), P3 (5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'), P5 (5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3') e P6 (5'-GACTGCGTACGAATTGCA- 3').

Os produtos amplificados foram desnaturados pela adição de igual volume de formamida (15 µL (99,8%), EDTA-0.5 M-pH8,0 (0.15%) e azul de bromofenol (0.05%), antes do aquecimento a 94 $^{o}$C por 4 min. A eletroforese foi realizada em gél de poliacrilamida a 6% e contendo ureia 5M em sistema vertical de eletroforese (modelo Sequi-Gen, BioRad Lab), sob suplemento constante de energia (70 W), por 2 horas. Os géis foram corados com Nitrato de Prata, de acordo com Creste et al. (2001).

As análises com marcadores TRAPs tiveram o objetivo de detectar possíveis diferenças genéticas entre os calos obtidos do cultivo *in vitro* das anteras e as plantas doadoras das anteras.

## 5.3 Resultados

Dentre os 28 genótipos avaliados os que mostraram as maiores porcentagens de anteras intumescidas foram as laranjas Salustiana e Sanguinea Marrocos com 37,4% e 35,4% no primeiro experimento, laranja Itaboraí (49,4%) no segundo experimento e Tarocco (36,1%), no terceiro experimento.

O número de anteras intumescidas pode ser considerado como um ótimo referencial inicial para a cultura de anteras, pois demonstra que o genótipo é responsivo a indução hormonal e às condições do cultivo *in vitro,* mas não possui elevada correlação com a capacidade de formar calos embriogênicos. Isto porque cortes histológicos destas anteras intumescidas demostraram que este desenvolvimento parece estar mais associado à divisão e crescimento de células da dos estratos parietais das anteras e não necessariamente relacionado ao desenvolvimento de calos originados de micrósporos (Figura 5.2B). Nessas análises, também não foi possível estabelecer para nenhum genótipo uma elevada correlação entre o número de anteras intumescidas e o número de anteras com calos e com calos embriogênicos.

Nas observações dos micrósporos, com o uso de microscopia de fluorescência e utilizando como corante o DAPI, realizadas após seis meses do cultivo *in vitro* das anteras, foram observados diferentes tipos de divisões celulares dos micróporos, com a presença de micrósporos com divisão celular assimétrica (Figura 5.1B), característica da formação do grão de pólen (via gametofítica) e também a presença de alguns micrósporos com divisões simétricas (Figura 5.1C) e presença de micrósporos multinucleados (Figura 5.1D), que são considerados os primeiros sinais da alteração do desenvolvimento gametofítico para o esporofítico, e que resultam na formação de calos e embriões de origem gamética, posteriormente.

No primeiro experimento, a porcentagem de anteras não desenvolvidas após a cultura de anteras de oito genótipos de laranja doce variou entre 41,5%, obtido na cultivar Salustiana, e 70,7% para a cultivar Hart’s Late (Tabela 5.1). Estas anteras apresentavam em alguns casos coloração escura, demonstrando

haver oxidação ou coloração amarela natural, porém sem sinais aparentes de desenvolvimento. Resultados similares em relação às variações de porcentagens de anteras não desenvolvidas foram obtidos também nos outros dois experimentos (Tabelas 5.2 e 5.3).

Foram observados três diferentes tipos de calos obtidos das anteras cultivadas *in vitro* quanto à coloração e a consistência dos tecidos (Figura 5.2A). O primeiro tipo apresentava coloração variando entre a cor branca e a verde e de consistência rígida (compacto), o segundo tipo apresentava coloração creme e consistência macia, e o terceiro (embriogênico) mostrou coloração branco a creme e consistência friável (Figura 5.2C).

As porcentagens de anteras com calos verdes e cremes apresentaram variação com intervalo definido em todos os 28 genótipos avaliados, sendo que a soma das duas categorias raramente ultrapassou o valor de 25% do total de anteras cultivadas *in vitro*. A exceção foi a laranja 'Melrose', que mostrou alta resposta a produção de calos cremes e de consistência macia (Tabela 5.2). Os calos cremes obtidos com o cultivo de anteras desse genótipo e os das laranjas 'Lue Gin Gong', 'Seleta do Rio', 'Ouro' e 'Hart's Late' do experimento 1 foram transferidos para meio de cultura de multiplicação. No entanto, mesmo após 10 meses de cultivo *in vitro*, não se observou nenhuma capacidade organogênica ou embriogênica desses calos.

As análises de ploidia dos calos verdes e creme, realizadas pelo método de citometria de fluxo, mostraram haver a presença somente de células diplóides (2n), semelhantes ao das plantas maternas. A confirmação da origem somática das células destes calos foi obtida com o uso de marcadores moleculares TRAPs, pois elas apresentaram grande similaridade com as amostras de DNA das plantas doadoras das anteras (Figura 5.3). Já as análises moleculares com uso de marcadores microssatélites (SSR) demonstraram que estes calos verdes e creme possuiam vários *loci* em heterozigose, do mesmo modo que as plantas maternas (Figura 5.3). Diante destes resultados, conclui-se que eles tiveram origem somática, provavelmente, do endotécio e/ou camada média dos estratos parietais das anteras (Figura 5.2B).

A obtenção de calos embriogênicos foi limitada a alguns genótipos de laranja doce. No primeiro experimento foi possível a indução de calos embriogênicos em três genótipos, dentre oito testados (37,5% do total). Os calos

embriogênicos obtidos nas laranjas ‘Harts Late’ (0,23%), ‘Lue Gin Gong’ (0,60%) e ‘Salustiana’ (0,15%), provenientes do primeiro experimento, tinham tamanho muito pequeno e coloração verde, similares a aglomerados de pequenos embriões, e não puderam ser avaliados quanto a sua origem e ploidia (Figura 5.2D). Nesse primeiro experimento também foi possível observar a existência de alta correlação ($R^2$ = 0,90) entre a capacidade de obtenção de calos embriogênicos e a viabilidade de grãos de pólen das flores desses genótipos (Figura 5.3). Diferentemente, os calos embriogênicos obtidos no segundo e terceiro experimento eram friáveis e tinham coloração branco-creme ou esverdeados e crescimento vigoroso no meio de cultura de indução, mantendo estas características quando transferidos para meio de cultura de maturação e germinação dos embriões (Figura 5.2C). Até o momento não foi possível regenerar os embriões provenientes desses calos obtidos.

O segundo experimento foi aquele que mostrou as menores porcentagens de anteras responsivas, resultando na indução de calos embriogênicos apenas na laranja ‘Shamouti’. No entanto, ela foi a mais responsiva de todas as laranjas, produzindo calos embriogênicos em aproximadamente 4,1% do total de anteras inoculadas. No experimento três, 70% dos genótipos foram responsivos a produção de calos embriogênicos a partir das anteras, sendo que as laranjas ‘Tarocco’ e ‘Moro Ac.2’ foram aquelas com as maiores porcentagens de indução e produção de calos embriogênicos neste experimento (Tabela 5.3).

A avaliação da ploidia das células de calos embriogênicos provenientes dos experimentos dois e três mostrou que, para todos os genótipos testados, os calos apresentavam ploidias similares às de calos embriogênicos nucelares diplóides, utilizados como controle (Figura 5.4). As análises com marcadores moleculares SSR e TRAP mostraram que estes apresentavam o mesmo padrão de bandamento heterozigoto dos calos embriogênicos obtidos das plantas controle, em quase todos os genótipos utilizados nesse experimento (Figura 5.5).

A exceção ocorreu para um calo proveniente de anteras do híbrido entre *Citrus clementina* x laranja ‘Hamlin’, que após a análise de vinte pares de primers SSR (*loci* diferentes) demonstraram possuir todos os *loci* avaliados com apenas um alelo (superior ou inferior), dando uma indicação de que tais calos possuem padrão homozigoto para todos os *loci* avaliados (Figura 5.6). A confirmação da origem androgênica do calo embriogênico obtido desse genótipo

ainda deve ser avaliada com um maior número de marcadores moleculares microssatélites.

Também as análises preliminares de determinação de ploidia por citometria de fluxo do calo embriogênico de *Citrus clementina* x laranja 'Hamlin' foram realizadas e os resultados demonstraram a presença de células com ploidia diferente e com picos de maiores valores de média e mediana, quando comparados ao da planta doadora das anteras, em valores próximos ao pico 3C ou 4C, sendo este triploide ou tetraplóide (Figura 5.4). Sendo assim, a próxima etapa experimental deverá ser a tentativa de indução de embriões e regeneração de plântulas com o objetivo de se obter melhor avaliação e a contagem de cromossomos de ápices radiculares que permitam a confirmação da ploidia.

Em relação a todos os demais calos embriogênicos obtidos dos outros genótipos testados de laranja doce foram observados um pico diplóide (2C) e outro próximo ao haplóide (1C), para as análises de citometria de fluxo. No entanto, as análises com marcadores mostraram padrão de bandamento heterozigoto, muito similar as plantas doadoras das anteras, demonstrando uma provável instabilidade da divisão celular de calos obtidos de anteras, e não necessariamente uma possível origem gamética dos tecidos obtidos da cultura *in vitro* de anteras de genótipos de laranja doce.

Tabela 5.1 - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de oito genótipos de laranja doce do experimento 1.

| **Genótipos** | **Porcentagem de Anteras** | | **Anteras com Calos (%)** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Não Desenvolv** | **Intumescidas** | **Verdes** | **Creme** | **Embriogênicos** |
| Hart's Late | 70,66 a | 12,50 d | 7,75 ab | 8,64 ab | 0,23 a |
| Lue Gin Gong | 59,00 ab | 14,60 cd | 11,60 ab | 13,60 a | 0,60 a |
| Sang. Marrocos | 50,81 ab | 35,44 ab | 11,31 ab | 2,44 b | 0,00 a |
| Elvespe | 66,37 a | 16,48 cd | 10,15 ab | 7,01 ab | 0,00 a |
| Seleta do Rio | 59,52 ab | 24,49 bcd | 5,56 b | 10,43 ab | 0,00 a |
| Seleta Verm. | 56,93 ab | 26,65 abc | 9,69 ab | 6,74 ab | 0,00 a |
| Salustiana | 41,49 b | 37,36 a | 15,38 a | 5,62 ab | 0,15 a |
| Ouro | 57,20 ab | 23,76 bcd | 12,02 ab | 7,03 ab | 0,00 a |
| F (genótipos) | 4,94** | 11,02** | 2,37* | 2,03 ns | 0,91 ns |
| CV (%) | 11,95 | 14,59 | 23,17 | 36,89 | 27,05 |

* Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade. CV = coeficiente de variação.

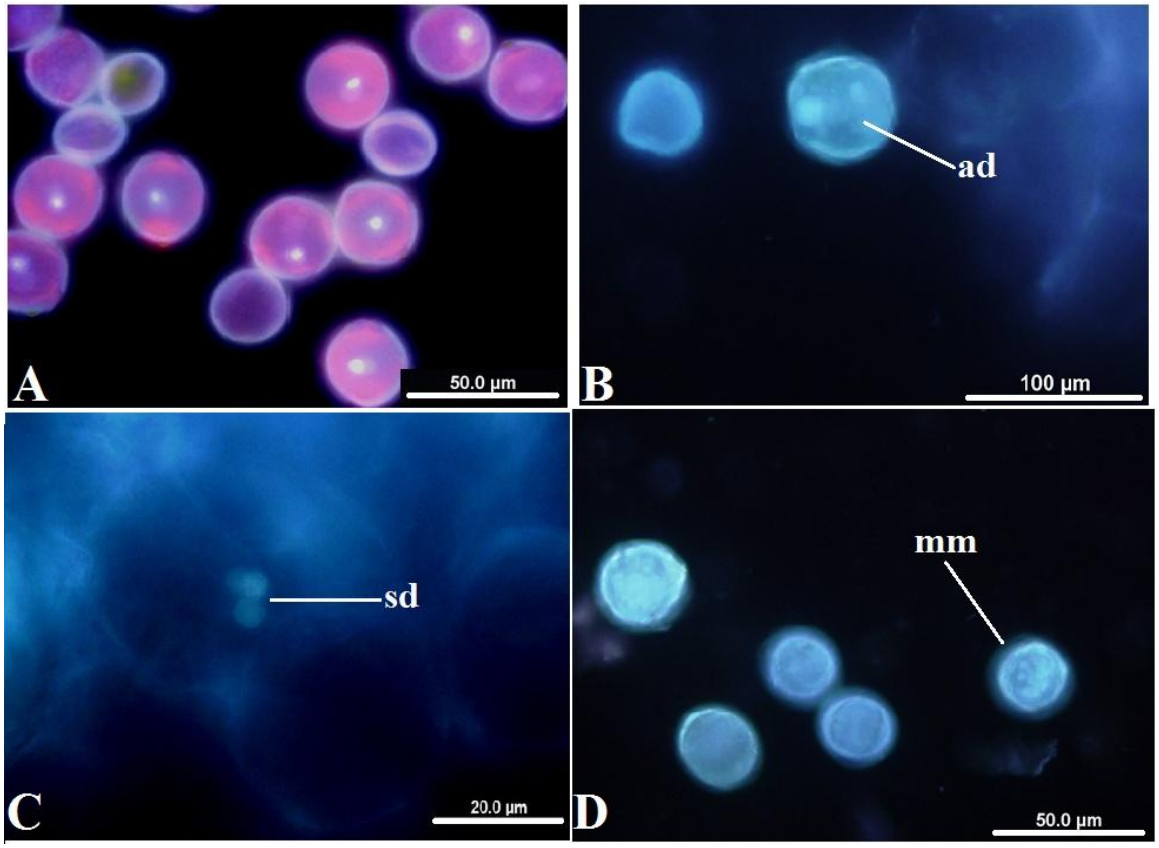



Figura 5.1 – Análises dos micrósporos obtidos da cultura de anteras de laranja doce (*C. sinensis*) corados com DAPI utilizando microscopia de fluorescência. A – micrósporos em estádio uninucleado utilizados no estabelecimento do experimento de cultura de anteras, B – Divisão assimétrica (ad) do núcleo do micrósporo após 6 meses de cultivo *in vitro* das anteras, C – Divisão simétrica (sd) dos micrósporos após 6 meses de cultivo *in vitro* das anteras, D – Micrósporos multinucleados observados após 6 meses do cultivo in vitro das anteras.

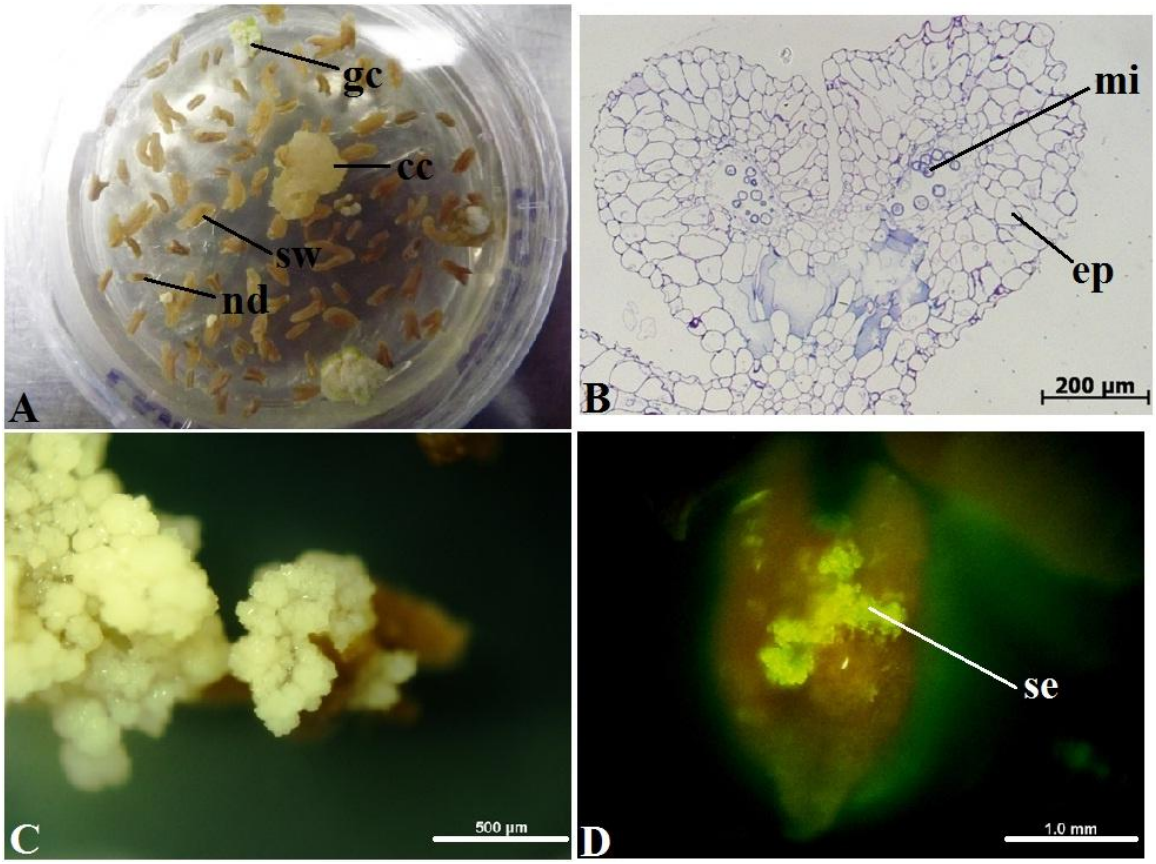



Figura 5.2 **-** Cultura de anteras de diferentes genótipos de laranja doce. A – cultura de anteras de cv. 'Hamlin', nd – anteras não desenvolvidas, sw – anteras intumescidas, gc – calos verdes, cc – calos creme. B – Corte transversal de anteras intumescidas de laranja 'Hamlin', ep – estratos parietais das anteras, mi – micrósporos. C – Calos embriogênicos de anteras de laranja 'Shamouti'. D – calos embriogênicos com pequenos embriões (se) de laranja 'Harts Late'.

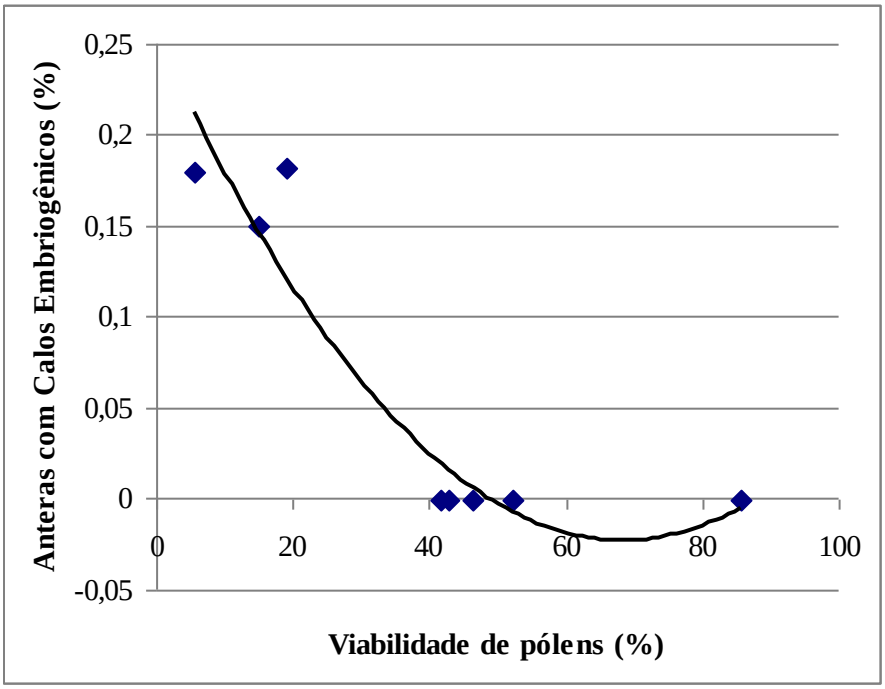



Figura 5.3 - Correlação entre a porcentagem de viabilidade de polens e a indução de calos embriogênicos provenientes de cultura de anteras de laranja doce. $y = 0{,}0006x^2 - 0{,}0081x + 0{,}255$, $R^2 = 0{,}90$

Tabela 5.2 - Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de dez genótipos de laranja doce do experimento 2.

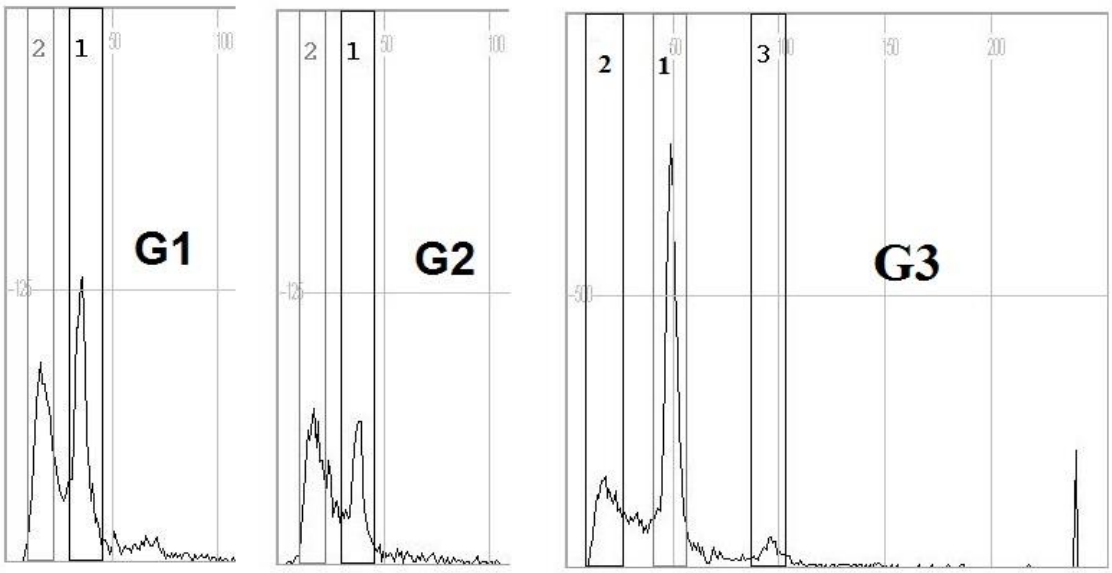
| Genótipos | Porcentagens de Anteras | | Anteras com Calos (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Não Desenvolvidas | Intumescidas | Verde | Creme | Embriogênico |
| Rubi | 73,58 a | 19,50 bc | 5,55 ab | 1,37 c | 0,00 b |
| Lanceta Barão | 76,04 a | 13,40 c | 8,34 ab | 2,22 bc | 0,00 b |
| Diva | 70,82 ab | 28,60 b | 0,58 b | 0.00 c | 0,00 b |
| Campista | 70,42 ab | 12,92 c | 12,52 a | 4,17 bc | 0,00 b |
| Itaboraí | 44,50 c | 49,35 a | 2,47 b | 3,67 bc | 0,00 b |
| Ibicaba | 73,49 a | 22,86 bc | 2,89 b | 0,79 c | 0,00 b |
| Melrose | 48,20 bc | 19,17 bc | 3,27 ab | 29,33 a | 0,00 b |
| Boa Vista | 75,95 a | 13,55 bc | 8,13 ab | 2,38 bc | 0,00 b |
| Caipira Doce | 81,32 a | 12,27 c | 4,87 ab | 1,50 c | 0,00 b |
| Shamouti | 51,44 bc | 26,74 bc | 8,02 ab | 9,74 b | 4,10 a |
| F (genótipos) | 8,64** | 11,13** | 3,68** | 10,39 ** | 141,5** |
| CV (%) | 15,58 | 20,28 | 46,56 | 50,09 | 10,26 |
| K-S | s (p>0.05) | s | n | n | n |

* Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade. CV = coeficiente de variação, K-S = teste de normalidade dos dados de Kolmogorov-Smirnov. √+0.5 = fórmula utilizada para transformação de dados não normais.

Tabela 5.3 Porcentagem de anteras não desenvolvidas, intumescidas, com calos e calos embriogênicos de nove genótipos de laranja doce e um híbrido de *C. clementina* x laranja 'Hamlin' do experimento 3**.**

| **Genótipos** | **Porcentagem de Anteras** | | **Anteras com Calos (%)** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Não Desenvolvidas** | **Intumescidas** | **Verde** | **Creme** | **Embriogênico** |
| João Nunes | 73,45 ab | 13,78 c | 9,90 a | 2,87 b | 0,00 b |
| Moro Ac.1 | 66,36 abc | 25,5 abc | 5,48 ab | 2,11 b | 0,56 ab |
| Moro Ac.2 | 68,12 abc | 23,96 abc | 4,96 ab | 1,58 b | 1,40 ab |
| Sang. Doppio | 58,66 bc | 29,26 ab | 7,84 ab | 2,5 b | 1,11 ab |
| Tarocco Ac. | 74,02 ab | 11,82 c | 7,16 ab | 5,72 ab | 1,35 ab |
| Tarocco | 52,32 c | 36,06 a | 5,66 ab | 2,4 b | 3,50 a |
| Sang. Polidari | 71,7 abc | 13,34 c | 13,94 a | 0,78 b | 0,26 ab |
| Pêra CENA4 | 72,2 abc | 14,12 c | 7,40 ab | 6,26 ab | 0,00 b |
| Hamlin | 67,33 abc | 16,52 bc | 10,3 a | 10,3 a | 0,00 b |
| Híbrido | 82,65 a | 17,12 bc | 0,00 b | 0 b | 0,27 ab |
| F (genótipos) | 3,9** | 6,43** | 2,80** | 4,11** | 2,13* |
| CV (%) | 15,14 | 36,82 | 47,16 | 50,78 | 53,12 |
| K-S | p>0.05 sim | p<0.01 | p<0.01 | p<0.01 | p<0.01 |

* Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (*) e 1% (**) de probabilidade. Híbrido = *Citrus clementina* x *C. sinensis* 'Hamlin' CV = coeficiente de variação, K-S = teste de normalidade dos dados de Kolmogorov-Smirnov. √+0.5 = fórmula utilizada para transformação de dados não normais.




| Genótipo | Amostra | Pico 1C | | | Pico 2C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Média | Mediana | CV (%) | Média | Mediana | CV (%) |
| Controle | 1 | NO | NO | NO | 39,9 | 37 | 8,4 |
| Shamouti (CV146) | P1A1 | 20 | 16 | 14,4 | 37,64 | 35 | 7,5 |
| Moro Acireale (CN45) | P1A1 | 19,9 | 17 | 14,2 | 37,52 | 35 | 7,1 |
| Moro Acireale 3 (CN47) | P1A1 | 20,52 | 17 | 16,7 | 37,34 | 35 | 7,3 |
| Moro Acireale 3 (CN47) | P1A2 | 20,79 | 18 | 16,2 | 38,03 | 35 | 6,7 |
| Sanguinea Doppio (CN59) | P1A1 | 20,91 | 18 | 15,9 | 36,53 | 34 | 6,8 |
| Sanguinea Doppio (CN59) | P1A2 | 20,58 | 18 | 15,8 | 37,32 | 35 | 7,4 |
| Tarocco Acireale (CN65) | P1A1 | 19,6 | 17 | 15,7 | 37,84 | 35 | 7,1 |
| Tarocco (CN67) | P1A6 | 20,37 | 17 | 16 | 39,65 | 37 | 6,5 |
| Tarocco (CN67) | P3A2 | 21,06 | 18 | 15,9 | 38,19 | 36 | 6,2 |

| Genótipo | Amostra | Pico 2C | | | Pico 3C ou 4C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Média | Mediana | CV (%) | Média | Mediana | CV (%) |
| Controle | 1 | 32,28 | 29 | 11,8 | NO | NO | NO |
| C. clem. x C. sinensis 'Hamlin' | P1A1R1 | NO | NO | NO | 51,6 | 49 | 6,2 |
| C. clem. x C. sinensis 'Hamlin' | P1A1R2 | NO | NO | NO | 50,61 | 48 | 6,2 |

Figura 5.4 – Histogramas de citometria de fluxo de calos embriogênicos obtidos da cultura de anteras nas cultivares Sanguinea Doppio (G1), Tarocco Ac (G2) e um híbrido entre *C. clementina* e *C. sinensis* (G3). Pico 1 – equivalente ao pico obtido de células diploides (2n) de laranja doce, Pico 2 – equivalente ao pico obtido de células haploides (n), e Pico 3 – equivalente ao pico obtido de células triplóides ou tetraploides de laranja doce.

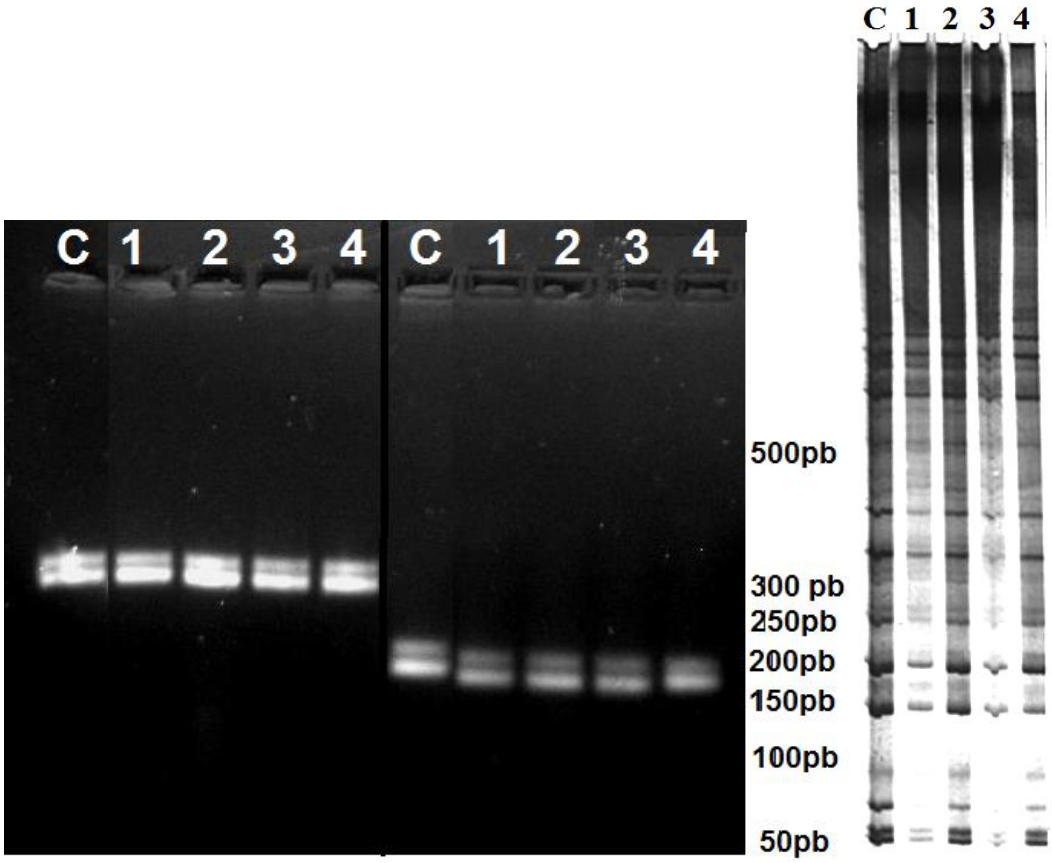



Figura 5.5 – Análise com marcadores moleculares microssatélites (esquerda) e TRAPs (direita) dos calos embriogênicos obtidos do cultivo *in vitro* de anteras de genótipos de laranja doce. Esquerda – Primers EST159 e EST164, C = controle, 1 = Moro, 2 = Tarocco, 3 = Sanguinelli Doppio e 4 = Sanguinelli Polidari. Direita – Primer TRAP 01FP1, com a mesma sequência de amostras.

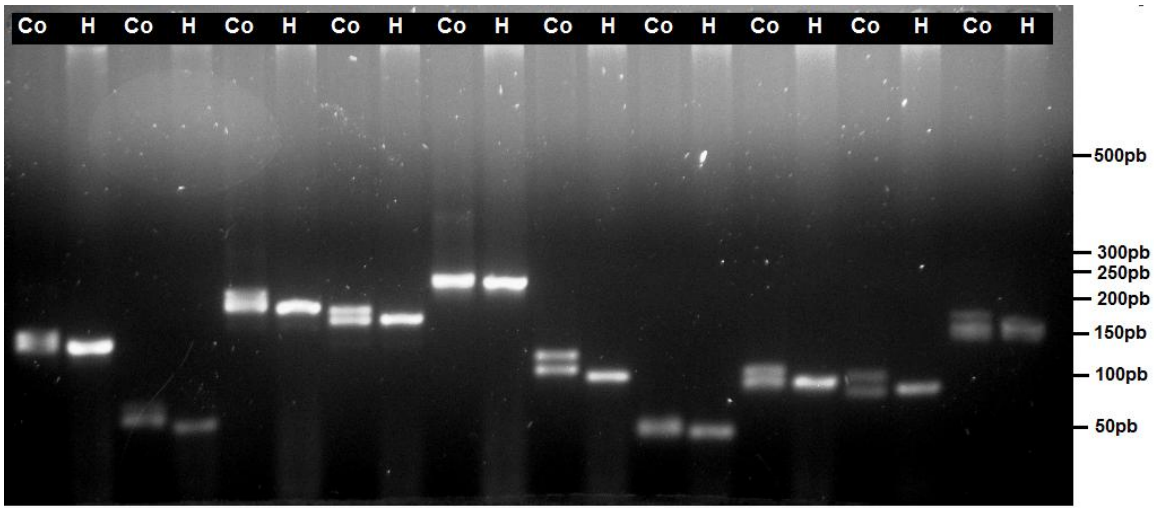



Figura 5.6 - Análise com marcadores moleculares microssatélites ESTs do controle (C) e de calos embriogênicos obtidos do cultivo *in vitro* de anteras do híbrido entre *C. clementina* x *C. sinensis* (H). Sequências de Primers ESTs (Expressed Sequence Tags) utilizados: 13, 58, 102, 107, 120, 126, 147, 151, 159 e 162.

## 5.4 Discussão

A obtenção de protocolos eficientes de indução da embriogênese gamética já foi obtida com sucesso em espécies de cereais (WEDZONY et al., 2009), brássicas (FERRIE & MÖLLERS, 2011) e algumas espécies de Solanaceae (DUNWELL & SUNDERLAND, 1973). Em *Citrus*, os trabalhos com cultura de anteras iniciaram a partir da década de 1970 com a obtenção de plantas a partir de anteras de *Poncyrus trifoliata* (DENG et al., 1992; HIDAKA et al., 1979), *Citrus madurensis* (CHEN et al., 1980), laranja doce (HIDAKA, 1984), laranja-azeda (HIDAKA et al., 1982), Ichang Papeda Hybrid (DENG et al., 1992) e *Citrus clementina* (GERMANÀ et al., 1994; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003).

Em *Citrus sinensis*, diferentes tentativas de obtenção de embriogênese gamética foram realizadas sem sucesso na regeneração de plântulas a partir de anteras (GERMANÀ, 1997; HIDAKA, 1984) e, apenas atualmente foram obtidas duas linhagens duplo-haplóides de calos embriogênicos a partir de anteras de laranja Valência Rhode Red (CAO et al., 2011).

Entre os fatores endógenos, a alta influência do genótipo para a cultura de anteras de laranja doce foi observada nesse experimento, e também foi relatada por outros autores em muitas espécies de plantas (BAJAJ, 1990), incluindo as do gênero *Citrus* (GERMANÀ, 2007), em que foram possíveis a indução de embriogênese gamética e regeneração de plântulas a partir de somente um ou poucos genótipos. A exceção é a espécie *C. clementina,* em que a obtenção de protocolos eficientes para a indução de embriogênese gamética foi obtida para vários genótipos (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003; GERMANÀ et al., 2005; GERMANÀ, 2011). Trabalhos de cultura de anteras de *Solanum tuberosum* e *Brassica oleracea* demostraram que o controle genético para a embriogênese gamética a partir de micrósporos é controlada por mais de um gene, todos de origem recessiva (RUDOLF et al., 1999; SMYKAL, 2000), demonstrando a necessidade de se testar diferentes genótipos para maximizar as chances de obtenção de sucesso na embriogênese gamética. Outra evidência que fortalece a existência de genes que controlam a capacidade do genótipo para a embriogênese gamética é a transmissão da capacidade de resposta de progênies à cultura *in vitro* de micrósporos, demonstrada em *Brassica oleraceae* (RUDOLF et al. 1999).

No presente trabalho, o uso do meio de cultura N6 (CHU, 1978) modificado por Germanà e Chiancone (2003) possibilitou a indução de calos embriogênicos em 11 genótipos de laranja doce em três experimentos independentes, com destaque para as laranjas do grupo das sanguíneas, que mostraram maior resposta para a embriogênese somática a partir das anteras cultivadas *in vitro*. Apesar de ainda não ter sido possível regenerar haplóides ou duplo-haplóides de laranja doce, foi possível identificar calos embriogênicos de um híbrido de *Citrus clementina* x *C. sinensis* com DNA contendo um mínimo de 20 *loci* em homozigose e ploidia diferente da planta doadora das anteras.

O genótipo é de fato, até o momento, o principal fator associado ao sucesso do cultivo *in vitro* de anteras para a obtenção de plantas haplóides e duplo-haplóides (GERMANÀ, 2011). Os testes realizados no atual trabalho com vários genótipos de laranja doce permitiram a seleção de genótipos mais responsivos a embriogênese a partir do cultivo de anteras. Germanà et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes com o cultivo de anteras de *C. clementina*, demonstrando diferentes respostas entre os genótipos ‘Nules’, ‘SRA63’ e ‘Monreal’ na obtenção de anteras intumescidas, com calos, calos embriogênicos e embriões, mas com a regeneração de plântulas em todos os genótipos testados.

Em maçã também foram observadas diferenças significativas entre cinco genótipos testados na indução de embriões a partir do cultivo de anteras e micrósporos. A variedade Alkmene foi aquela que mostrou maior produção de embriões totais e haplóides para a cultura de anteras. No entanto, quando a técnica utilizada foi a cultura de micrósporos, essa cultivar mostrou baixo potencial de regeneração e a cultivar Realka foi aquela em que se obteve melhores resultados (HÖFER, 2005).

Em parte, a complexidade do meio de cultura utilizado pode ser referenciada como um dos fatores predominantes para o sucesso desta técnica, e embora o genótipo seja um dos principais fatores endógenos que influencia o sucesso da cultura de anteras, isso pode ser parcialmente revertido por fatores externos como a temperatura e a composição do meio de cultura (GERMANÀ, 2011; HEBERLE-BORS, 1985).

A regeneração de plantas de origem gamética é outra dificuldade encontrada no estabelecimento de técnicas de cultura de anteras e micrósporos.

Dificuldades na regeneração de embriões e plantas verdes são observadas em diferentes espécies de plantas, e em sua maioria, associada ao acúmulo de genes recessivos com efeitos deletérios (GERMANÀ 2011) ou mesmo problemas com a formação dos embriões que impedem o desenvolvimento e regeneração das plantas, como as observadas em cultura de anteras de *C. reticulata* (BENELLI et al., 2010). Em experimento com cultura de anteras de laranja doce cv. Valência Rhode Red foram obtidas duas plântulas provenientes dos calos embriogênicos, porém as plantas morreram durante o cultivo *in vitro* sem motivos aparentes. Segundo os autores, a causa mais provável da morte foi a condição completamente homozigota das plantas, o que resultou no acúmulo de genes recessivos com efeitos deletérios, resultando na sua inviabilidade (CAO et al., 2011).

As variações na ploidia de calos embriogênicos, observadas nos experimento 3 com cultura de anteras de citros, também foi observada por Hao e Deng (2002) e resultou na obtenção variações somaclonais, porém não puderam ser observadas por marcadores moleculares RAPD.

Diferentemente de laranjas doces, em *Citrus clementina*, uma espécie em que a cultura de anteras foi estabelecida com sucesso, os resultados de vários trabalhos com diferentes genótipos mostraram que mais de 80% dos embriões e plântulas regeneradas e obtidas por essa técnica eram tri-haplóides (3n), porém também foram obtidas plantas com outros níveis de ploidia como n, 2n, 4n e 6n (GERMANÀ et al., 2005; GERMANÀ & CHIANCONE, 2003). Em maçã, também foram observadas a obtenção de embriões a partir do cultivo de anteras e micrósporos com vários níveis de ploidia diferentes, variando de n (haplóide) a 6n (hexaploide) (HÖFER, 2005). De fato, a confirmação da genótipo-dependência para a regeneração de tecidos de origem gamética e com diferentes níveis de ploidia, também observadas nesse estudo, está associada a espécie *Citrus clementina*, já que em praticamente todos os experimentos de cultura de anteras com o gênero *Citrus*, as respostas efetivas na obtenção de embriões gaméticos foi proveniente dessa espécie. No atual experimento com genótipos de laranja doce, essa evidência ficou ainda mais clara, com a obtenção de calos embriogênicos de origem gamética a partir do híbrido entre laranja doce e *C. clementina*. Em experimento prévio realizado na Itália com o uso de cultivares de laranja doce e de *C. clementina* também foram observados

o mesmo comportamento entre as duas espécies, sendo que a regeneração de calos embriogênicos e embriões foi possível nas duas espécies, mas a obtenção de embriões gaméticos (tri-haplóides) foi observada apenas em clementinas (dados não apresentados).

O uso de técnicas de cultura de células gaméticas é uma alternativa viável para a produção de linhagens homozigotas de citros com diferentes níveis de ploidia em um único ciclo de cultivo, representando uma nova fonte de recursos genéticos para o melhoramento de *Citrus*. Nesse contexto, a obtenção de híbridos $F_1$ a partir de linhagens homozigotas pode ter aplicabilidade no melhoramento genético de laranja doce e de outras espécies de *Citrus*. Cultivares superiores de diferentes espécies como arroz, trigo, tabaco, milho e pimenta já foram obtidas através da incorporação de plantas duplo-haplóides em programas de melhoramento genético dessas espécies (EVANS, 1989). No melhoramento genético de cevada na europa, estima-se que mais de 50% das cultivares atuais foram obtidas utilizando-se de plantas duplo-haplóides em programas de melhoramento genético (DUNWELL, 2010).

Outra importante aplicação das plantas haploides ou duplo-haplóides está no mapeamento genético das espécies vegetais (FORSTER & THOMAS, 2005). Isso é possível e representa grande aplicabilidade, principalmente para espécies altamente heterozigotas, em que o mapeamento de cromossomos é dificultado pela presença de grandes quantidades de genes com os alelos em heterozigose. A obtenção e uso de linhagens homozigotas por técnicas de cultura de células gaméticas permitirão mais facilmente a identificação e mapeamento de QTLs (Quantitative Trait Loci) que controlam características de importância econômica, como a produtividade e resistência a doenças (DUNWELL, 2010; LAPITAN et al., 2009).

# 6 Biologia Reprodutiva e germinação *in vitro* de sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.), obtidas a partir de polinização com grãos de pólen irradiados com raios gama


## RESUMO

Os efeitos biológicos da radiação podem trazer benefícios ao melhoramento genético de plantas. Nos citros, em que a maioria das espécies é altamente heterozigota, a radiação aplicada aos grãos de polens pode levar a homozigose em alguns genes após a fecundação, resultando na produção de cultivares mutantes, além de promover alterações estruturais importantes que podem levar ao desenvolvimento do óvulo sem a necessidade de fecundação e a obtenção de plantas haplóides e/ou duplo-haplóides, técnica chamada de partenogênese, e de extremo interesse no gênero *Citrus*. Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os principais efeitos biológicos de diferentes doses de irradiação aplicadas aos grãos de polens na biologia reprodutiva de laranja-doce. Ainda foi possível estabelecer uma metodologia para obtenção de grandes quantidades de embriões germinados *in vitro* utilizando sementes abortadas e grandes como primeiro passo na realização de trabalhos de obtenção de mutagênese e gametogênese, utilizando a técnica de partenogênese *in situ* com polens irradiados de laranja doce. Os resultados das análises por citometria de fluxo mostraram a presença de embriões com reduções importantes nos níveis de ploidia, causados pelo uso de polens irradiados. O uso de marcadores moleculares TRAPs permitiu a identificação de algumas variações nos *loci* de plantas obtidas de $F_1$ em relação à planta doadora.

## ABSTRACT

**Reproductive biology and *in vitro* seed germination of sweet orange obtained from pollination of gama-irradiated pollen grains.** The biological effects of radiation can be use to breeding programs. In *Citrus*, in that the most of species presents high levels of heterozygosity, the radiation treatments of pollen grains can led to homozygosis in some genes after the fecundation with this pollen, resulting in a mutant cultivars. Also, the pollination with this kind of pollen can result in obtaining of haploid and double-haploid plants from ovules, because the strong effects of radiation in important structural modification in chromosomes. This technique is called parthenogenesis, and the aim is the

development of the ovule in embryos without the necessity of fertilization, and has a big interest in *Citrus* breeding. This experiment was developed with the aim to evaluate the main effects of pollen irradiation on reproductive biology of *Citrus sinensis*. Also, with this developed technique, was possible to obtaining numerous quantities of plantlets from aborted and big seeds growth *in vitro*, as first step in induction of mutagenesis and haploid and double-haploid plantlets from *in situ* parthenogenesis using pollen grains treated with radiation γ. The results from flux cytometric analysis showed the production of embryos with an important reduction in level of ploidy, cause by the use of pollen irradiation. The use of molecular markers TRAPs allowed the identification of $F_1$ embryos with genetic differences from the donor plants.

## 6.1 Introdução

As laranjas-doces (*Citrus sinensis* Osbeck.) estão entre as frutas mais consumidas do mundo, e sua produção totalizou mais de 63.0 milhões de ton de frutos no ano de 2010 (FAOSTAT, 2012). As laranjas-doces são aquelas com maior representatividade econômica, principalmente para o processamento e produção de suco de laranja.

Na última década, o surgimento de novas doenças de grande impacto para a citricultura como um todo tem alertado para a grande susceptibilidade das espécies do gênero *Citrus*, principalmente devido ao cultivo monoclonal e a pouca variabilidade genética encontrada para o melhoramento genético convencional. Um exemplo recente é o surgimento da doença Huanglongbing, causada pela bactéria *Candidatus* Liberibacter, do qual ainda não foram encontrados genes de resistência (MANJUNATH et al., 2008).

Além disso, o melhoramento genético tradicional é dificultado por fatores intrínsecos relacionados a espécie, como a presença de autoincompatibilidade, poliembrionia, alta heterozigosidade e ciclo juvenil longo (GERMANÀ, 2011; GROSSER & GMITTER, 2011). Em espécies de *Citrus* o período juvenil de plantas obtidas de sementes pode durar de 6 a 20 anos (ENDO et al., 2005).

Nesse contexto, o uso de técnicas biotecnológicas tem sido uma solução viável nas tentativas de obtenção de novas cultivares e para o mapeamento genético de *Citrus* (GERMANÀ, 2011). Entre as técnicas biotecnológicas mais utilizadas nesse importante gênero estão a fusão de protoplastos (GROSSER &

GMITTER, 2011), a obtenção de plantas autotetraplóides (LATADO et al., 2007), a obtenção de plantas a partir de embriogênese gamética através de técnicas de cultura de anteras (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003) e partenogênese *in situ* (FROELICHER et al., 2007) e *in vitro* (GERMANÀ & CHIANCONE, 2001), indução de mutações (MOHAN JAIN, 2005) e transformação genética (BARBOSA-MENDES et al., 2009).

O melhoramento genético através da indução de mutações tem auxiliado na indução de variabilidade genética para uso em programas de melhoramento de plantas, bem como auxiliado no mapeamento genético e no entendimento das funções de genes e cromossomos em espécies modelo e de importância econômica, possibilitado pelo avanço das técnicas moleculares (NOVAK & BRUNNER, 1992; PETERS et al., 2003; VIZIR & MULLIGAN, 1999).

Diferentes tipos de propágulos podem ser utilizados em trabalhos de mutagênese induzida (NOVAK & BRUNNER, 1992), com destaque para o uso de sementes em espécies anuais, seguido da obtenção de mutantes completos na geração $F_1$ ou $F_2$ (DENWARD, 2011). No entanto, o uso de sementes ou propágulos vegetativos para a indução de mutações em espécies arbóreas tem sido praticamente inviável, devido principalmente a produção de plantas quiméricas na geração M1, obtidas logo após as primeiras divisões celulares das células tratadas com o mutagênico, e também ao longo ciclo juvenil dessas espécies para a obtenção de plantas $F_1$ não-quiméricas (ROOSE & WILLIAMS, 2007; SHU, 2009).

Devido a esses problemas com o uso de mutagênicos em espécies arbóreas e de propagação vegetativa que mostram alto nível de heterozigosidade, como no gênero *Citrus*, o uso de micrósporos ou grãos de polens maduros para o tratamento com mutagênicos se apresenta como uma alternativa, e tem como vantagens a obtenção de mutantes sólidos na geração M1, resultado do embrião proveniente união do pólen mutado e dos óvulos. Isso porquê o uso de mutagênicos levam frequentemente a indução de alelos recessivos (Aa para aa) (SPIEGEL-ROY, 1990). Esse método ainda apresenta a vantagem da obtenção de diferentes eventos de mutações em uma ou poucas polinizações, já que cada pólen tratado contém uma informação genética e/ou mutação diferente do outro. Recentemente, o uso de polens irradiados tem sido

utilizado com sucesso no melhoramento genético de diferentes espécies cultivadas, como em batata e trigo (DENWARD, 2011).

Em espécies arbóreas, o uso de plantas mutadas espontâneamente com floração precoce pode ser uma solução para resolver os problemas do longo periodo juvenil na obtenção de mutantes em programas de melhoramento de laranja doce. Recentemente, a cultivar de laranja doce 'Tobias' tem mostrado essas características, florescendo um ano após a germinação das sementes.

O uso da radiação, além de causar mutações, também mostram um série de efeitos fisiológicos, dentre eles: redução de crescimento de ramos, morte de propágulos e plantas, redução na produção de frutos e de sementes, entre outros. Em grãos de pólen, a radiação pode causar redução e atraso na germinação, podendo chegar a inativação completa do desenvolvimento nos pistilos (MIRANDA et al., 2009).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de irradiação aplicado aos grãos de polen, na biologia reprodutiva de laranja doce e estabelecer os primeiros passos na utilização da técnica de indução de mutações e de partenogênese *in situ* utilizando grãos de pólen irradiados, para a obtenção de embriões e plântulas mutantes ou provenientes de ginogênese.

## 6.2 Material e Métodos

Vinte plantas adultas de laranja doce cv. 'Tobias', variedade com sementes poliembriônicas e florescimento precoce, provenientes do Banco de Germoplasma do Centro APTA de Citricultura Sylvio Moreira, localizado em Cordeirópolis, São Paulo, Brazil, foram usadas nos experimentos para os trabalhos de polinização com grãos de pólen tratados com diferentes doses de irradiação. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 20 L, com uso de substrato comercial e em condições de estufa protegidas com plástico agrícola e telas anti-afídeos para prevenção da entrada de insetos pragas ou polinizadores.

### 6.2.1 Estudos Prévios de Biologia Reprodutiva

Previamente aos experimentos com uso de radiação gama, foram realizados dois testes, um com os grãos de pólen de laranja doce visando a determinação do melhor tipo de pré-tratamento do pólen e outro considerando a

melhor idade de coleta dos frutos para a obtenção de maior porcentagem de germinação de sementes *in vitro*, dois importantes fatores a serem utilizados no experimento com irradiação dos grãos de pólens. Para determinar o melhor tipo de pré-tratamento dos grãos de pólen foram coletados anteras de laranja doce 'Tobias' e submetidos a diferentes tratamentos de secagem: Controle - pólen fresco e sem secagem; GR24 – pólen seco a 25ºC por 24 horas; DS24 – pólen seco em dissecador à vácuo com sílica gel, a 25ºC por 24 horas; LF24 – pólen seco em liofilizador a temperatura de 0ºC, por 24 horas e LF48 – pólen seco em liofilizador a temperatura de 0ºC, por 48 horas.

A eficiência dos pré-tratamentos foi avaliada usando dois métodos: 1) por meio da determinação da viabilidade dos grãos de pólen utilizando o método de coloração com solução de carmin acético a 1% e; 2) o método de germinação de grãos de pólen em meio de cultura. Para cada tratamento foram utilizadas cinco placas de Petri (repetições), cada uma contendo grãos de pólen de 20 flores.

Para a determinação da viabilidade foram avaliadas cinco lâminas com grãos de pólen provenientes de vinte flores diferentes. De cada lâmina foram contados um total de 200 pólens, entre viáveis e não-viáveis, sendo considerados como viáveis aqueles que apresentavam núcleo com coloração vermelho intenso e uniforme e, os inviáveis, aqueles sem coloração ou coloridos parcialmente.

Para o método de germinação, os grãos de pólen de cada tratamento foram distribuídos em placas de Petri contendo meio de cultura composto por 800 mg $L^{-1}$ de $Ca(NO_3)_2$, 200 mg $L^{-1}$ de $H_3BO_3$, 100 g $L^{-1}$ de sacarose, 2,2 g $L^{-1}$ de Phytagel e pH ajustado para 6,5. As placas foram mantidas durante 24 horas, na temperatura de 25ºC e luz fornecida por lâmpadas frias brancas. A avaliação da porcentagem de germinação foi realizada em microscópio invertido sendo contados cinco repetições de 200 grãos de polens cada.

Para determinação do melhor estádio de coleta dos frutos foram feitas coletas de frutos em três estádios: aos 60, 120 e 180 dias de desenvolvimento após a polinização. Para cada estádio de desenvolvimento dez frutos foram coletados e submetidos a assepsia com lavagem em água corrente, seguido de imersão em álcool 70%, por cinco minutos, e imersão solução de hipoclorito de sódio (2.0-2.5% de cloro ativo), por vinte minutos. Os frutos foram abertos em câmara de fluxo laminar e as sementes, resgatadas com auxílio de pinça e

bisturi, sendo inoculadas em meio de cultura contendo sais de MS na metade da concentração (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 50 g $L^{-1}$ de sacarose, 0,5 g $L^{-1}$ de extrato de malte e solidificado com 6,0 g $L^{-1}$ de Agar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da esterilização por autoclavagem.

As sementes obtidas foram classificadas em duas classes: sementes pequenas – tamanho inferior ou igual a 3 mm, sem sinais de preenchimento por estruturas cotiledonares (abortadas); sementes grandes –tamanho grande, maior que 5 mm, com preenchimento visível por cotilédones (fertilizadas).

As sementes foram então cultivadas em placa de petri dispostas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1ºC, luminosidade de 35 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

As sementes germinadas foram então transferidas para meio de cultura semelhante ao descrito anteriormente, a exceção da redução de sacarose para 30 g $L^{-1}$.

As plântutas desenvolvidas foram microenxertadas *in vitro* sobre plântulas estioladas de citrange Troyer, de forma semelhante ao descrito por Peña et al. (1995). Cerca de 30 a 60 dias após a microenxertia, o conjunto foi enxertado sobre limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) e mantido em câmara úmida em estufas, para a aclimatização ao meio ambiente durante 30 a 60 dias.

### 6.2.2 Experimento de polinização com pólens irradiados com diversas doses de mutagênico

Para o processo de irradiação dos grãos de pólen foi utilizado o sistema de autofecundação para as polinizações. Os polens utilizados neste experimento não foram submetidos a nenhum processo de secagem, de acordo com os resultados dos pré-testes realizados e descritos anteriormente. As anteras contendo os grãos de pólen foram coletadas de flores recém-abertas, acondicionadas em Eppendorfs e logo após, submetidas ao procedimento de irradiação, utilizando raios-γ (gama) emitidos pelo equipamento Gamma-Cell (Cobalto 60), CENA-USP, localizado em Piracicaba – SP.

Os polens foram tratados com as doses de radiação de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 Gy, além do uso de polens frescos, coletados e imediatamente utilizados para a polinização das flores (controle) e pistilos não polinizados (controle negativo). Em todos os tratamentos a polinização das flores foi realizada no

estádio de pré-antese, momento em que os estigmas eram receptivos e as anteras ainda não estavam abertas, evitando-se contaminações com pólen indesejado. As flores foram então emasculadas, sendo mantido apenas o pistilo, onde foram realizadas as polinizações com os pólens irradiados ou controle não irradiados.

Os efeitos da radiação aplicada nos grãos de polens foram avaliados através da germinação *in vitro* de grãos de polen e de análises histológicas da germinação dos grãos de pólen no estigma, além da porcentagem de pegamento de frutos, tamanho dos frutos obtidos, número total de sementes pequenas e grandes, número de sementes por fruto, além da porcentagem de germinação das sementes e obtenção de plântulas.

### 6.2.3 Análises histológicas

Os pistilos polinizados foram coletados após 24 horas do momento da polinização e fixados em solução de Carnoy 3:1 (v/v) de etanol e ácido acético glacial por 48 horas. Os pistilos foram então lavados com água destilada, seguido de adição de sulfito de sódio ($NaSO_3$) a 10% e autoclavagem a 121°C por 20 minutos, para clareamento e amolecimento dos tecidos. Após esse processo os pistilos foram lavados com água destilada por três minutos e em seguida adicionada solução de Anilina Azul 0.01% diluída em $K_3PO_4$. Os pistilos foram mantidos nessa solução por pelo menos 48 horas antes da montagem das lâminas para a microscopia. Os pistilos foram então dispostos em lâminas microscópicas com uma gota da solução de anilina azul 0.01% e esmagados com auxílio da lamínula. A visualização da germinação dos grãos de polen e com crescimento do tubo polínico foram realizadas em microscópio óptico (Model BX61, Olympus, Germany) acoplado com fluorescência. As imagens obtidas foram então digitalizadas.

### 6.2.4 Ploidia e Origem das Plantas

A origem das plantas foi confirmada através da avaliação da ploidia das plantas por citometria de fluxo. A ploidia de 10 plantas por tratamento foi determinada por citometria de fluxo usando o equipamento CyFlow® ploidy analyzer (Partec GmbH) com um parâmetro e lâmpada de UV-LED. As suspensões nucleares foram previamente isoladas de folhas frescas com auxílio

de tampão de extração (Partec GmbH) e bisturi, filtradas através de filtros de 50 µm e coradas com solução de Cystain UV precise P (Partec GmbH), a qual utiliza o 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) como fluorocromo, de acordo com a recomendação do fabricante. Amostras com mínimo de 2.000 núcleos foram avaliadas. Os histogramas obtidos foram analisados em Software CyView (Partec GmbH). As amostras com coeficiente de variação acima de 10% foram descartadas. A ploidia de cada amostra foi comparada com amostras de folhas da planta matriz diplóide.

Para a confirmação da origem das plântulas obtidas da polinização com grãos de polen irradiados foram realizadas análises de heterozigosidade dos embriões obtidos por marcadores microssatélite (SSR), utilizando metodologia idêntica a descrita no capítulo 4 (p. 54). Posteriormente foram utilizados marcadores moleculares TRAPs para a detecção de polimorfismos entre a planta doadora (pais) e os embriões e plântulas obtidas da polinização (progênies).

Para as análises com marcadores moleculares TRAPs e SSR, o DNA genômico das plantas foi extraído a partir de folhas frescas coletadas de calos, embriões ou plântulas de laranja-doce, de acordo com metodologia de Doyle e Doyle (1990).

A PCR para os marcadores moleculares TRAPs foi realizada com um volume final de 15 µL contendo os seguintes componentes: 50 ng de DNA genômico, PCR buffer 1X, $MgCl_2$ (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM de cada), primers arbitrários e fixo (0.1 µM de cada) e *Taq* DNA polymerase (1 U). O PCR foi realizado com ciclo inicial de 94 °C por 2 min, seguido de cinco ciclos de 94 °C por 45 s, 35 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 45 s e 72° C por 1 min, e com um ciclo final de 72 °C for 7 min.

Os primers fixos foram desenhados a partir das seqüências de genes de laranja-doce: 01F-ACC Synthase (5'-TCCCCGAGGCACAGCATC-3') e 05F-NADP glyceraldehyde 3-phosphate (5'-ACGCGTCCGCCACTCTCA-3'). As seqüências dos primers arbitrários foram obtidas de Li e Quiros (2001): P1 (5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'), P3 (5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'), P5 (5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3') e P6 (5'-GACTGCGTACGAATTGCA- 3').

Os produtos do PCR amplificado foram desnaturados pela adição de igual volume de formamida (15 µL (99.8%), EDTA-0.5 M-pH8.0 (0.15%) e bromofenol

azul (0.05%), antes do aquecimento a 94 $^{o}$C por 4 min. A eletroforese foi realizada em gél de poliacrilamida a 6% e contendo ureia 5M em sistema vertical de eletroforese (modelo Sequi-Gen, BioRad Lab), sob suplemento constante de energia (70 W), por 2 horas. Os géis foram corados com Nitrato de Prata, de acordo com Creste et al. (2001).

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Estudos Prévios de Biologia Reprodutiva

O pólen fresco (controle) foi aquele que mostrou melhores resultados de viabilidade e germinação em meio de cultura e *in vivo*, sendo selecionado esse tipo de pólen para os tratamentos de irradiação dos grãos de polens com raios γ. Os testes com diversos métodos de secagem dos polens foram pouco efetivos, pois resultaram em redução da viabilidade e na capacidade de germinação dos polens em meio de cultura e in vivo, independentemente da técnica utilizada (Tabela 6.1). Os melhores tratamentos de secagem ocorreram utilizando temperatura ambiente ou em dessecador a vácuo por 24 horas, com germinação entre 16 e 14%, respectivamente.

O melhor estádio para a coleta de frutos e que mostrou maior taxa de obtenção de sementes germinadas *in vitro* foi o de 60 dias após a polinização, sendo este o tempo de coleta utilizado para o resgate de sementes a partir dos experimentos com grãos de polen irradiados.

As análises microscópicas de pistilos após 24 horas de polinização, utilizando fluorescência, demonstrou que houve uma diminuição do número de grãos de polen germinados e atraso no crescimento do tubo polínico, em função do aumento das doses de radiação (Figure 6.1).

### 6.3.2 Irradiação dos pólens, pegamento de frutos e número de sementes

A porcentagem de pegamento dos frutos obtidos no tratamento com pistilos não polinizados (31.3%) foi estatisticamente semelhante aquela obtida com grãos de polen frescos (37%) ou grãos de polen com dose zero de radiação (33.3%) (Tabela 6.2).

O uso da radiação γ teve efeitos diretos no incremento da porcentagem de pegamento de frutos até a dose de 150 Gy, em que foram obtidos aproximadamente 88% de frutos pegos, seguido de redução acentuada (ou drástica) nas doses de 200 e 250 Gy, com porcentagens de 29 e 20%, respectivamente (Tabela 6.2). É possível que esses dados observados possam estar correlacionados ao estímulo causado pela irradiação dos polens ou mesmo na redução da autoincompatibilidade, comum em espécies cítricas.

O tamanho dos frutos não foi influenciado pela não polinização dos pistilos e nem pelo uso de radiação nos grãos de pólen previamente a polinização (Tabela 6.2).

Uma mesma tendência foi observada para os parâmetros número de sementes grandes e de sementes abortadas, com aumento do número de sementes até a dose de 150 Gy de raios-gama, seguido de redução nas doses subsequentes (200 e 250 Gy). Estes dados mostraram uma correlação significativa entre o número de sementes e a dose de radiação, com tendência a função quadrática (Figura 6.2).

No presente estudo observou-se a necessidade da polinização para a obtenção de sementes grandes. Nos frutos obtidos de pistilos não polinizados, não foi possível a obtenção de sementes grandes, sendo que os números médios de sementes grandes por fruto com o uso de pólen fresco e na dose zero foram de 11.7 e 9.7, respectivamente. As diferentes doses de irradiação não influenciaram o número de sementes grandes obtidas por fruto. Diferentemente, o número de sementes pequenas por fruto foi influenciado pelas doses de irradiação, sendo observada uma redução gradativa no numero de sementes abortadas por fruto até a dose de 150 Gy, seguido de posterior aumento desse item nas doses de 200 e 250 Gy, com obtenção de valores similares ao pólen fresco e na dose zero de irradiação.

### 6.3.3 Germinação *in vitro* das sementes obtidas

A germinação *in vitro* de sementes pequenas ocorreu independentemente do uso ou não da polinização e não foram influenciadas pelas doses de irradiação aplicadas aos grãos de polen de laranja-doce. As médias de porcentagem de germinação de sementes pequenas tiveram uma variação entre 23.05 e 39.68%, obtidas no controle positivo e no tratamento com 200 Gy de

irradiação, respectivamente (Tabela 6.3, Figura 6.3). Em relação às sementes grandes, a germinação *in vitro* teve uma variação de 0 a 43,81% obtidas no controle negativo e na dose de 100 Gy de radiação, respectivamente. O número de plântulas obtidas de sementes pequenas variou de 31 a 120 no controle negativo (não-polinizados) e na dose de 150 Gy e o de sementes grandes variou de 0 a 87 nos tratamentos sem polinização e 100 Gy, respectivamente.

### 6.3.4 Ploidia e Origem Genética das Plantas

O uso da irradiação de grãos de polens com radiação gama levou a obtenção de plântulas com importantes variações nos níveis de ploidia analisadas por citometria de fluxo. A análise de cerca de 10% das plantas obtidas permitiu a identificação de plântulas com variações de até metade do tamanho do genoma das plantas obtidas no controle positivo (Tabela 6.4, Figura 6.3). As maiores variações de ploidia foram obtidas com os embriões obtidos de polens tratados com doses de radiação de 50, 100 e 250 Gy. Nesses tratamentos foram observados embriões com aproximadamente a metade da ploidia das plantas obtidas com o uso de pólen fresco (controle). Os menores valores de médias de ploidia foram obtidas nos tratamentos de 100 e 250 Gy, o que representa um maior número de plantas com ploidia abaixo do valor diplóide (2n) comum dos embriões obtidos no controle. De fato, a maior porcentagem de plantas com níveis de ploidia abaixo ou igual a 1.1n, 30 e 20%, foram obtidas nos tratamentos de 100 e 250 Gy, respectivamente. No tratamento de 50 Gy foram observados 10% dos embriões nessa classe de ploidia. À exceção dos embriões obtidos com o pólen controle, todos os demais tratamentos mostraram algum tipo de redução de ploidia em menor ou maior intensidade, com destaque para os polens irradiados com diferentes doses de raios γ (Tabela 6.4 e Figura 6.4).

As análises com marcadores moleculares SSRs mostrou que as amostras 4 da dose de 50 Gy e 1 e 10 da dose de 100 Gy, que mostraram maior variação na ploidia por citometria de fluxo, mostraram bandas heterozigotas semelhantes a planta controle para quatro conjuntos de primers testados (Figura 6.5), demonstrando a origem híbrida dos embriões obtidos com o uso de grãos de polen irradiados.

Porém, as análises moleculares com marcadores TRAPs das plantas com menor nível de ploidia, obtidas da polinização com polens irradiados nas doses de 50 e 100 Gy, mostraram polimorfismo para diferentes bandas observadas em gel de acrilamida (Figura 6.4).

Tabela 6.1 – Viabilidade de grãos de pólen com solução de carmim acetico 2% e germinação *in vitro* de grãos de pólen frescos de laranja doce cv. Tobias e submetidos a diferentes tratamentos de secagem.

| **Tratamentos** | **Pólen** | |
|---|---|---|
| | **Viabilidade (%)** | **Germinação (%)** |
| Pólen Fresco | 69.3 a | 26.5 a |
| 25° for 24h | 46.0 b | 16.0 b |
| Dessecador a vácuo 24h | 43.3 b | 14.0 b |
| Liofilizador 24h | 44.0 b | 7.5 c |
| Liofilizador 48h | 36.0 c | 1.0 d |
| F (Tratamentos) | ** | ** |
| CV (%) | 3,75 | 10,37 |

** Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. CV = coeficiente de variação

Tabela 6.2 – Número de polinizações, frutos pegos e tamanhos de frutos obtidos a partir da polinização com grãos de pólen de laranja doce tratados com diferentes doses de radiação.

| Polinizações | Numero de Polinizações | Frutos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Número | Pegamento (%) | Diâmetro ↔ | Diâmetro ↕ |
| Não polinizados | 16 | 5 | 31.3 ± 12.5 c | 2.50 ± 0.32 | 2.66 ± 0.40 |
| Pólen Fresco | 27 | 10 | 37.0 ± 8.1 c | 2.92 ± 0.59 | 2.92 ± 0.62 |
| 0 Gy | 30 | 10 | 33.3 ± 7,7 c | 2.74 ± 0.59 | 2.85 ± 0.68 |
| 50 Gy | 33 | 15 | 45.5 ± 6.1 bc | 2.84 ± 0.38 | 2.90 ± 0.35 |
| 100 Gy | 32 | 23 | 71.9 ± 12.0 ab | 2.77 ± 0.63 | 2.89 ± 0.72 |
| 150 Gy | 33 | 29 | 87.9 ± 6.1 a | 2.88 ± 0.62 | 3.08 ± 0.66 |
| 200 Gy | 31 | 9 | 29.0 ± 19.4 c | 3.01 ± 0.36 | 3.14 ± 0.48 |
| 250 Gy | 30 | 6 | 20.0 ± 7.7 c | 2.53 ± 0.67 | 2.62 ± 0.78 |
| Tratamentos | | | ** | ns | ns |
| CV (%) | | | 16.97 | 20.17 | 22.03 |

** Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. CV = coeficiente de variação, ns = não significativo

Tabela 6.3 – Número e porcentagem de germinação de sementes e obtenção de plântulas de laranja doce, obtidas a partir da polinização com grãos de pólen tratados com doses de radiação γ.

| Tratamentos | Sementes Abortadas | | | Sementes Grandes | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Número | % Germinação | Plântulas | Número | % Germinação | Plântulas |
| Não poliniz. | 101 | 31.03 ± 18.80 | 31 ± 19 | 0 | 0.00 ± 0.00 | 0 ± 0 |
| Pólen fresco | 258 | 23.05 ± 16.09 | 59 ± 42 | 117 | 32.24 ± 21.54 | 38 ± 25 |
| 0 | 186 | 38.78 ± 19.52 | 72 ± 36 | 97 | 31.08 ± 25.86 | 30 ± 25 |
| 50 | 289 | 35.10 ± 39.80 | 101 ± 115 | 165 | 38.86 ± 46.51 | 64 ± 77 |
| 100 | 333 | 29.13 ± 19.70 | 97 ± 66 | 198 | 43.81 ± 34.76 | 87 ± 69 |
| 150 | 416 | 28.77 ± 19.08 | 120 ± 79 | 293 | 24.84 ± 12.39 | 73 ± 36 |
| 200 | 221 | 39.68 ± 28.30 | 88 ± 63 | 91 | 13.07 ± 17.18 | 13 ± 16 |
| 250 | 141 | 30.16 ± 30.37 | 43 ± 43 | 41 | 3.05 ± 6.10 | 1 ± 2 |
| F (Trat.) | | ns | | | ns | |
| CV (%) | | 49,35 | | | 72,72 | |

** Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. CV = coeficiente de variação, ns = não significativo

Tabela 6.4 – Análise de ploidia por citometria de fluxo de embriões de laranja doce cv. Tobias obtidos da polinização com grãos de pólen tratados com doses de radiação γ.

| **Tratamentos** | **Ploidia** | | **% de Embriões com Ploidia** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Grupo (n)** | **Média ± SD** | **≤ 1.10** | **1.11 ≤ 1.74** | **≥ 1.75** |
| Não polinizado | 1.52 - 1.89 | 1.78 ± 0.17 | 0 | 10 | 90 |
| Pólen Fresco | 1.78 - 2.20 | 2.00 ± 0.25 | 0 | 0 | 100 |
| 0 Gy | 1.34 - 2.01 | 1.82 ± 0.28 | 0 | 10 | 90 |
| 50 Gy | 1.04 - 2.20 | 1.74 ± 0.43 | 10 | 30 | 60 |
| 100 Gy | 0.92 - 2.14 | 1.62 ± 0.49 | 30 | 20 | 50 |
| 150 Gy | 1.34 - 2.14 | 1.78 ± 0.31 | 0 | 40 | 60 |
| 200 Gy | 1.40 - 2.01 | 1.62 ± 0.21 | 0 | 30 | 70 |
| 250 Gy | 1.10 - 1.89 | 1.44 ± 0.36 | 20 | 40 | 40 |

** SD = Desvio Padrão

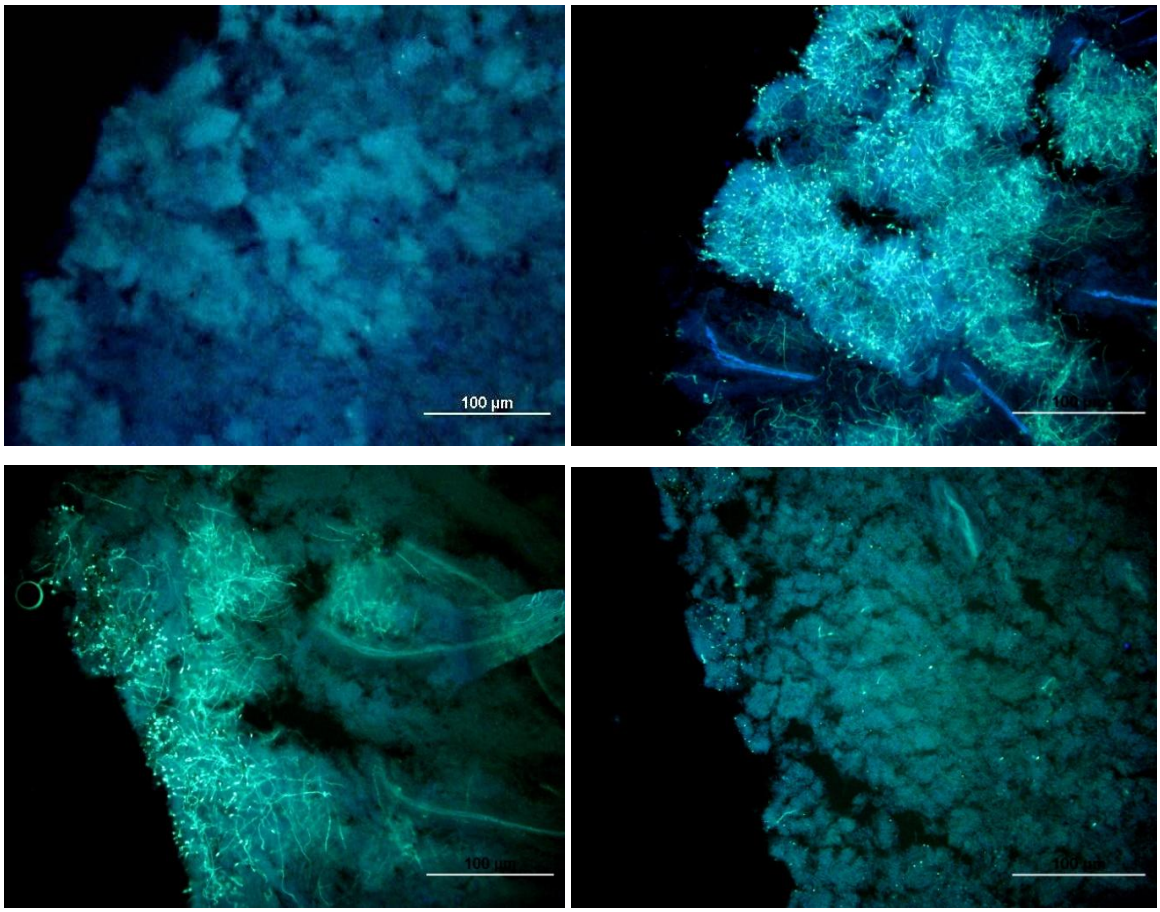



Figura 6.1 – Germinação de grãos de pólen e formação do tubo polínico em estigmas não-polinizados (superior esquerda), ou polinizados com grãos de polen frescos (superior direita) e irradiados com doses de radiação γ de 100 (inferior esquerda) e 200 Gy (inferior direita). Barras = 100 µm

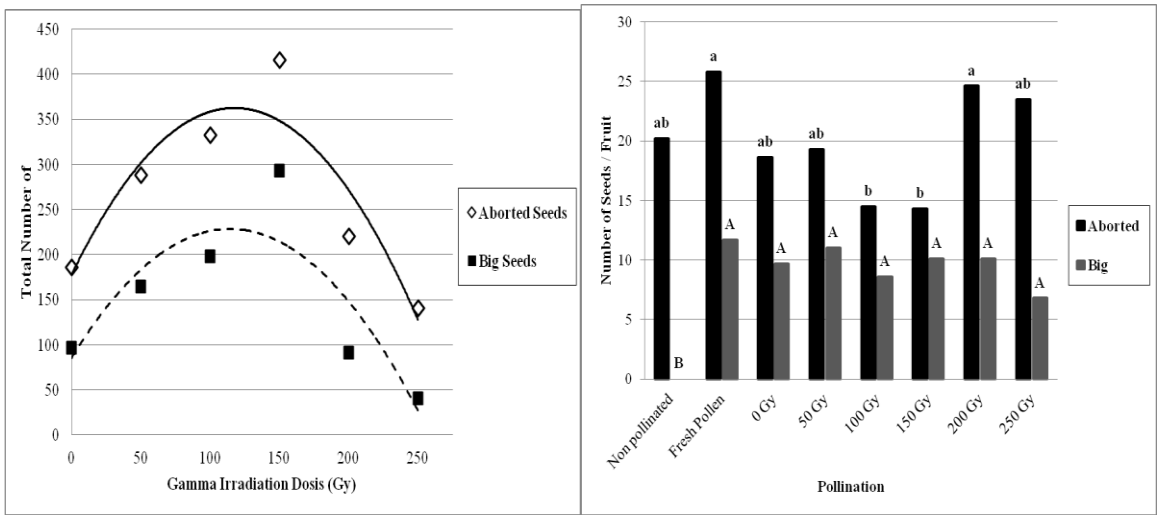



Figura 6.2 – Número total e por fruto de sementes grandes e abortadas, obtidos a partir da polinização com grãos de pólen de laranja doce tratados com diferentes doses de radiação-γ (gama). sementes abortadas $Y = -0{,}0134x^2 + 3{,}1434x + 177{,}68$, $R^2 = 0{,}8416$**, sementes grandes $y = -0{,}0109x^2 + 2{,}4996x + 85{,}5$, $R^2 = 0{,}7354$*.

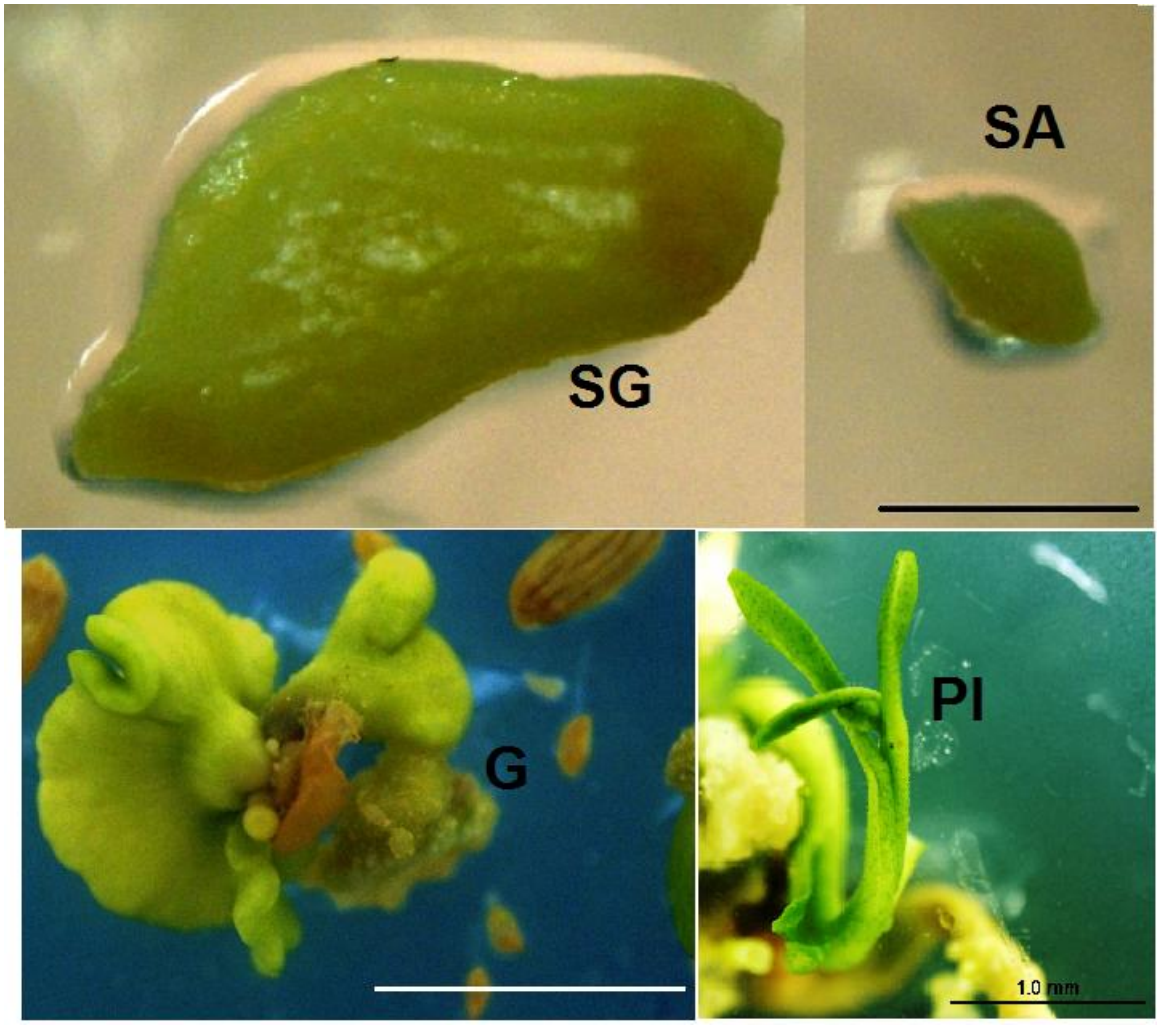



Figura 6.3 – Sementes grandes (SG) e abortadas (SA), germinação *in vitro* (G) e obtenção de plântulas a partir de sementes grandes (Pl) com o uso de polinizações com grãos de pólen irradiados de laranja doce cv. Tobias (*Citrus sinensis* Osbeck.), Barras = 2,0 mm.

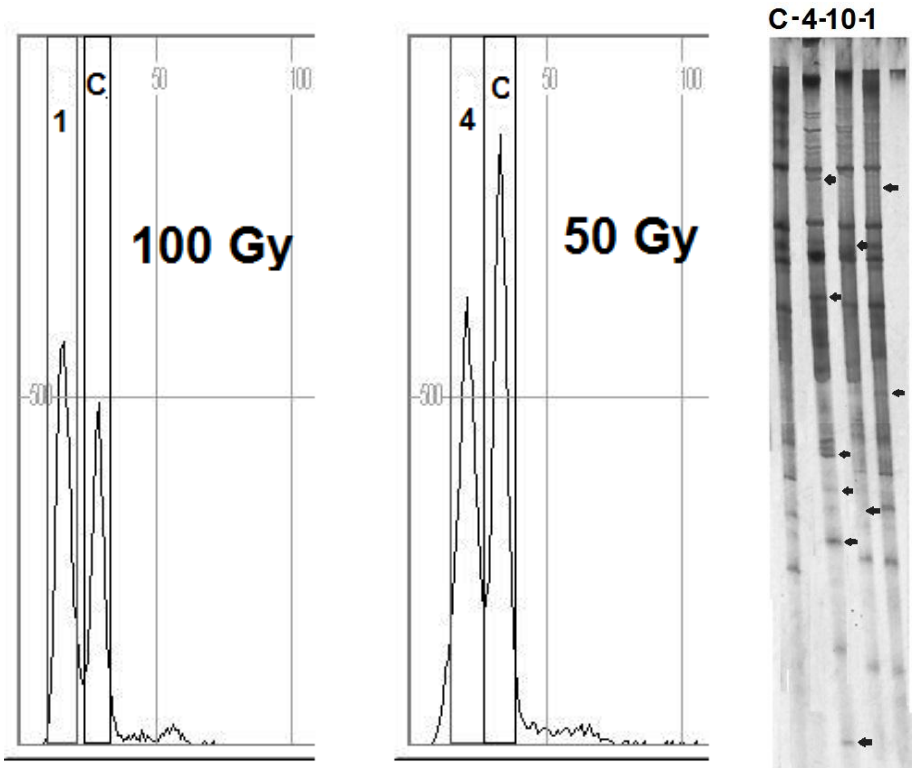



Figura 6.4 – Histogramas de citometria de fluxo contendo os resultados de análises de DNA de planta controle diploide (Pico C) e amostras 1 e 4, grãos de pólen irradiados, e análise com marcadores moleculares TRAPs (Primer 01F-P1) das amostras 1 e 10 obtidas da dose de radiação de 50 Gy e da amostra 4, obtida da dose de radiação de 100 Gy, setas = polimorfismos encontrados entre as amostras e o controle.

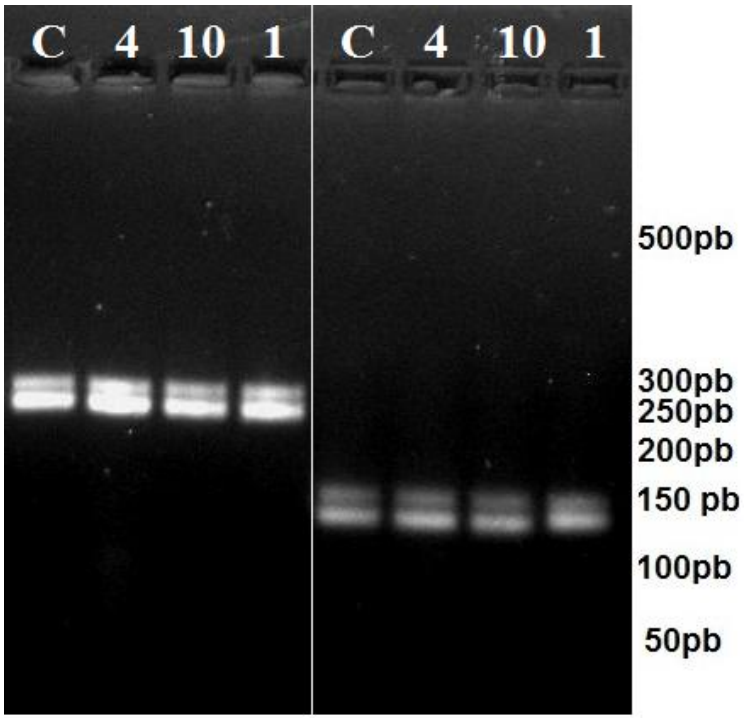



Figura 6.5 – Análise com marcadores moleculares SSR-ESTs (primers 159 e 164) da amostra 1 e 10, obtida da dose de radiação de 50 Gy, e da amostra 4, obtida da dose de radiação de 100 Gy.

## 6.4 Discussão

Os estudos prévios de biologia reprodutiva realizados e que permitiram selecionar grãos de pólen frescos para a irradiação e seleção do estádio fisiológico de coleta dos frutos após dois meses de polinização permitiram aumentar significativamente a quantidade de sementes abortadas e grandes, além de melhorar a obtenção de sementes viáveis e germinadas, com a obtenção de embriões de origem zigótica, de interesse para o melhoramento genético utilizando indução de mutações através de raios-γ (gama).

Em laranja-doce, a polinização parece não ser um fator determinante para o pegamento de frutos. Os resultados obtidos nesse experimento confirmaram essa hipótese, sendo que o pegamento de frutos foi semelhante na presença ou na ausência de polinização. No entanto, diferentemente do obtido com outras espécies, em que normalmente se observa uma redução no pegamento de frutos e obtenção de sementes com o uso de polens irradiados e com o aumento das doses de irradiação (YANG et al., 2004), nesse experimento foi observado um aumento gradativo do pegamento de frutos, número de sementes abortadas e grandes com o aumento das doses de irradiação na faixa de 0-150 Gy e posterior redução nas doses de 200 e 250 Gy. Coincidentemente, o número de sementes abortadas por fruto foi menor nos tratamentos na faixa de 0-150 Gy e maior nas doses de 200 e 250 Gy, além do número de sementes grandes por fruto não ter sido influenciado pelas doses de irradiação. Isso demonstra que a irradiação dos grãos de polen teve efeito determinante na complexa fase entre a polinização e o crescimento do tubo polínico, o que aumentou o pegamento de frutos de laranja-doce, mas teve pouca influência para a fertilização e obtenção de sementes.

A taxa de germinação de sementes abortadas não foi influenciada pela irradiação dos grãos de polen. No entanto, os resultados obtidos mostraram uma redução no número de sementes grandes germinadas nas doses acima de 100 Gy. Esses resultados podem estar associados ao fato de que o efeito da irradiação dos pólens está diretamente ligado à obtenção de sementes grandes, e em que a fertilização foi obrigatoriamente concluída, levando nas doses maiores de radiação gama a um aumento no número de embriões com mutações deletérias. Os resultados obtidos nesse experimento estão de acordo

com os observados com a irradiação de polens de milho, em que foram verificadas reduções drásticas e gradativas na germinação de sementes obtidas com polens irradiados nas doses de 36 e 72 Gy. Essa redução na germinação foi acompanhada de reduções na altura de plantas, e aumentos na presença de esterilidade e mortalidade das plantas germinadas (VICCINI & CARVALHO, 2002). Também foram observadas reduções drásticas na germinação de sementes de trigo com o aumento das doses de irradiação (DENWARD, 2011).

De fato, o uso do melhoramento convencional representa um desafio em espécies de citros, principalmente pela poliembrionia, alto nível de heterozigosidade e longo período juvenil em plantas provenientes de (GROSSER & GMITTER, 2011). O uso da polinização associada com o resgate de sementes nos estadios iniciais do desenvolvimento dos frutos e o cultivo *in vitro* das sementes e embriões imaturos pode representar uma alternativa rápida para melhorar as porcentagens de obtenção de embriões zigóticos. O uso de grãos de polen irradiados para a polinização pode ser utilizado para a indução e obtenção de mutantes sólidos, sem quimerismo, e com a expressão direta dos alelos heterozigotos dominantes ou co-dominates atingidos nos embriões zigóticos da população M1 (YANG et al., 2004), principalmente em plantas com alta heterozigosidade, como em laranja doce. Os efeitos da radiação sobre a mutação do DNA do polen e a expressão direta do alelo nas progenies M1 resultam em uma importante ferramenta para o melhoramento genético dessas espécies. No atual experimento foram observadas importantes variações de ploidia a partir dos embriões obtidos, em todas as doses de radiação aplicadas aos grãos de polens e utilizados para a polinização, demonstrando e comprovando esse efeito direto da radiação de grãos de polen logo na geração M1.

Vários tipos de alterações gênicas e cromossômicas já foram observados em embriões provenientes de grãos de polen tratados com radiação-γ em outros experimentos. Froelicher et al. (2007) observou a produção de híbridos diplóides e triplóides a partir de cruzamentos entre tangerina e limão, utilizando o tratamento de pólens de limão ‘Meyer’ com doses de radiação-γ para a polinização. No melhoramento genetico de trigo foram observados aumentos na frequência de obtenção de híbridos intergenéricos entre essa espécie e *Leymus angustus* (LI et al., 1999). O uso da irradiação dos polens aumentou o número de

aberrações cromossômicas causadas por translocações e recombinações do genoma, bem como a presença de minicromossomos em calos provenientes de sementes obtidas a partir da polinização com polens irradiados a dose de 9 Gy (LI et al., 2000). Esses tipos de efeitos da radiação também foram observados no atual experimento com laranja doce, principalmente pela presença de plantas com diferentes valores de ploidia.

Em *Arabidopsis* também foram detectadas deficiências transmissíveis e não transmissíveis em populações F1 e F2 obtidas a partir do uso de polens irradiados com radiação γ (VIZIR et al., 1994). As deficiências nos cromossomos, como as deleções, são de grande utilidade para o melhoramento genético, principalmente nos trabalhos de mapeamento, construção de mapas genéticos, além da identificação e isolamento de genes de interesse (SHIRLEY et al., 1992). Também as deficiências causadas por sobreposições viáveis são uma via para análises funcionais em regiões dos cromossomos (VIZIR et al., 1994). Nesse contexto, o uso de baixas doses de irradiação no tratamento de polens com radiação γ (200 Gy) teve sua eficiência comprovada como um eficiente metodo para a indução de deleções no genoma de *Arabidopsis*, resultando em mutações alvo nessa espécie (YANG et al., 2004). Nos resultados obtidos nesse experimento com laranja doce, o uso de doses similares as aplicadas no experimento anteriormente citado (200Gy) mostrou ser suficiente para a ocorrência de grandes variações cromossômicas nos embriões obtidos da polinização com polens previamente tratados com radiação-γ.

O uso de grãos de polen irradiados ainda pode ser uma alternativa na obtenção de embriogênese gamética e produção de linhagens homozigotas, de grande interesse para o melhoramento genético de plantas, principalmente em espécies arbóreas e com barreiras reprodutivas, como é o caso do gênero *Citrus* (GERMANÀ, 2006). A técnica é conhecida como partenogênese *in situ* e consiste no desenvolvimento e obtenção de embriões a partir dos óvulos sem a ocorrência da fertilização ou através de eliminação dos cromossomos de origem paterna do genoma após a fertilização. Chalak e Legave (1997) observaram uma redução na viabilidade de sementes e na indução de plântulas tri-haplóides em kiwi (*Actinidia deliciosa*) após a polinização com doses muito altas de radiação-γ (500-1500 Gy) utilizadas para o tratamento dos grãos de pólen. A indução de haplóides ginogênicos foi possível em tangerina pelo uso de polens irradiados de

limão ‘Meyer’ com doses de 150 e 300 Gy. No entanto, os resultados obtidos nesse experimento com o uso de grãos de polen irradiados, embora tenham demonstrado a produção e germinação de embriões com nível de ploidia reduzido, com até a metade do nível de ploidia comum na espécie, esses eram de origem híbrida e heterozigota, não sendo observada embriogênese de origem gamética ou a ginogênese de laranja doce a partir de pólens irradiados. Nesse contexto, são necessários mais estudos com diferentes cultivares, doses de irradiação e uso de grãos de pólen de outras espécies na tentativa de obtenção de ginogênese em laranja-doce.

O atual trabalho desenvolvido com a polinização de laranja doce com polens irradiados permitiu avaliar os efeitos da radiação sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, principalmente com respeito aos efeitos da radiação na germinação e crescimento dos tubos polínicos, pegamento de frutos, obtenção e germinação de sementes. O trabalho ainda permitiu a obtenção de plântulas mutantes e com diferentes níveis de ploidia de uma cultivar precoce de laranja doce ‘Tobias’ logo na geração M1, com destaque para a obtenção de plântulas com até a metade do número de cromossomos normal da espécie, demonstrando aplicabilidade da técnica para futuros estudos de mapeamento genético e de cromossomos no gênero *Citrus*. Ainda, os estudos de biologia reprodutiva e efeitos da radiação na germinação de grãos de polen podem servir de base para trabalhos de obtenção de técnicas de partenogênese e embriogênese gamética na espécie *Citrus sinensis*.

# 7 Embriogênese somática a partir de ovários de laranja doce cv. Tobias


## RESUMO

A calogênese, embriogênese somática e a regeneração de embriões de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.) foi obtida a partir de tecidos de ovários não fertilizados e cultivados *in vitro*. Foram testados dois meios de cultura de estabelecimento dos pistilos e multiplicação dos calos obtidos dos ovários, WPM e $N_6$ com modificações. Foi observada alta taxa de calogênese nos pistilos de laranja doce em ambos os meios de cultura. Para a multiplicação dos calos e obtenção de embriões, o estabelecimento inicial dos pistilos em meio de cultura WPM, seguido de transferência dos calos para o meio de cultura $N_6$ e posteriormente para MS ½ apresentou os melhores resultados, obtendo-se 125 embriões com 72% de germinação em seis meses de cultivo. Essas plantas foram posteriormente microenxertadas in vitro e aclimatizadas. A ploidia das plantas obtidas foi determinada por citometria de fluxo e o uso de marcadores moleculares TRAPs possibilitou a identificação da origem materna das plantas.


**Palavras-chave:** *Citrus sinensis,* cultura de pistilos, calos, meio de cultura, regeneração de plantas


## ABSTRACT

**Somatic embryogenesis from ovary culture of sweet orange cv. Tobias.** Callogenesis, somatic embryogenesis, and regeneration were obtained from tissues of unfertilized ovaries of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck.) cv. Tobias. The influence of two modified basal media, woody plant medium (WPM) and N6 medium, to induce callus formation from pistils was determined. Overall, high frequencies of callogenesis were observed when either medium was used. However, initial culture of explants in WPM medium followed by transfer of callus to N6 medium resulted in higher frequency of callus induction (of 2.30 callus per explant that were larger than 0.5 cm in size), and of subsequent development of embryogenic callus (10%). A total of 125 somatic embryos were obtained. After six months of culture, 72% of somatic embryos germinated into plantlets. These plantlets were subsequently micrografted *in vitro*, and then acclimatized. Ploidy of

these plants was determined using flow cytometry and TRAPS molecular markers were used to confirm their maternal origin.

**Key-words:** *Citrus sinensis*, pistil culture, callus, culture medium, plantlet regeneration

## 7.1 Introdução

O melhoramento genético tradicional de *Citrus*, incluindo as laranjas doces, têm sido pouco explorado devido aos problemas associados a biologia reprodutiva da espécie (GERMANÀ, 2011). Por isto, nestas espécies, a utilização de ferramentas biotecnológicas tem despertado maior interesse.

A embriogênese somática é uma técnica que apresenta várias aplicações para o melhoramento de laranjas doces, incluindo a produção de híbridos somáticos (GROSSER et al., 2007) e transformação genética (CAI et al., 2006). Para seu uso mais intenso é necessário o estabelecimento de protocolo eficiente de obtenção de calos, indução e cultivo de embriões e regeneração de plantas. Calos embriogênicos de citros já foram obtidos em várias espécies e diferentes explantes tais como nucelos (RANGAN et al., 1968), óvulos não-fertilizados (FROELICHER et al. 2007) e abortivos (BITTERS et al., 1970), estiletes e estigmas (CARIMI et al. 1999), anteras (GERMANA & CHIANCONE 2003), segmentos de epicótilos (DE ALMEIDA et al., 2006) e hipocótilos (TAVANO et al., 2009), além de folhas, cotilédones e segmentos de raízes (GILL et al. 1995). Embora a embriogênese somática de citros possa variar em função do cultivar e do tipo de explante utilizado, tem sido demonstrado que os calos de origem ovular (óvulos ou nucelos) geralmente são os que proporcionam melhores resultados (FIORE et al., 2002), a exceção de variedades de *Citrus* contendo sementes monoembriônicas, que em alguns casos não foi possível induzir embriões a partir do cultivo *in vitro* de óvulos (KOBAYASHI et al. 1981), e as variedades contendo frutos sem sementes, pela inexistência de óvulos e nucelos. Para estes dois casos a indução de embriogênese somática a partir de cultura de órgãos florais femininos (estigmas, estiletes e ovários) pode ser a solução (CARIMI et al., 1999; FIORE et al., 2002). Carimi et al. (1999), trabalhando com explantes de camada fina de células (TCL) de estigma, estilete e ovário obtiveram respostas diferenciadas a indução de embriogênese somática em cinco espécies de citros, mas não conseguiram regenerar embriões de

laranja doce a partir de cultura de ovários. Na verdade, não há relatos na literatura de sucesso na indução de embriogênese somática em *C. sinensis*, a partir do cultivo de ovários.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para a calogênese e embriogênese somática a partir de ovários não polinizados de laranja doce cv. Tobias cultivados *in vitro*, utilizando diferentes meios de cultura.

**7.2 Material e Métodos**

Os botões florais de laranja doce cv. Tobias, em estádio de pré-antese e com as anteras ainda fechadas, foram submetidos à assepsia, por meio de imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e lavagem por três vezes em água destilada autoclavada.

Foram retiradas as pétalas, sépalas e estames com as anteras (Figura 7.1a), realizando-se um corte logo abaixo do ovário. Os pistilos (ovário contendo os óvulos, estilete e estigma) foram cortados ao meio, no sentido longitudinal, originando duas partes iguais que serviram de explantes (½ pistilos). Os ½ pistilos foram cultivados em placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura semi-sólido.

Foram utilizados os meios de cultura $N_6$ (CHU et al., 1978), com adição de 18 g $L^{-1}$ de lactose e 9 g $L^{-1}$ galactose, e o meio de cultura WPM (LLOYID & MCCOWN, 1980), com adição de 31.2 g $L^{-1}$ sacarose. Ambos os meios de cultura foram suplementados com vitaminas de NITSCH E NITSCH (1969), glutamina 200 mg $L^{-1}$, myo-inositol 100 mg $L^{-1}$, Ácido Ascórbico 500 mg $L^{-1}$, Benzilaminopurina (BAP) 1,0 mg $L^{-1}$, Ácido Naftalenoacético (ANA) 0.05 mg $L^{-1}$, Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) 0.05 mg $L^{-1}$ e Ágar 6.0 g $L^{-1}$.

Aos 40 dias de cultivo no escuro, os calos obtidos dos pistilos foram repicados, isolando-se para o subcultivo apenas aqueles obtidos dos tecidos do ovário (Figura 7.1b).

Os calos obtidos dos ovários em meio de cultura $N_6$ foram cortados em segmentos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, sendo a metade inoculada no mesmo meio e a outra metade em meio de cultura WPM para a multiplicação dos calos. O mesmo foi feito para os calos obtidos em meio de cultura WPM, que foram transferidos para o meio de cultura $N_6$ ou WPM. Os calos foram mantidos em meio de multiplicação dos calos durante 40 dias no escuro.

O experimento foi realizado com delineamento fatorial 2x2, totalizando quatro tratamentos, dois meios de cultura de estabelecimento e dois de multiplicação dos calos. Cada tratamento era composto por quatro placas de Petri contendo cinco explantes cada.

Aos 40 dias de cultivo foi avaliada a porcentagem de pistilos com formação de calos e aos 80 dias avaliou-se o número de calos com tamanho maior que 0.5cm de diâmetro e a massa fresca dos calos em gramas.

Para a indução da embriogênese a partir dos calos obtidos foi utilizado o meio de cultura contendo a metade da concentração de $NH_4NO_3$, $KNO_3$ e $CaCl_2.2H_20$ do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e com a manutenção das concentrações de $MgSO_4$ e $KH_2PO_4$, além da adição de vitaminas de Nitsch e Nitsch (1969), 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 100 mg $L^{-1}$ mio-inositol, 500 mg $L^{-1}$ de extrato de malte, 1.0 mg $L^{-1}$ de $GA_3$ e 0.1 mg $L^{-1}$ de ANA (meio de cultura MSSE). A indução de calos embriogênicos foi feita em condições de luminosidade fornecidas por lâmpadas frias brancas fluorescentes com densidade de fluxo de fótons de 35 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo.

Foram escolhidos 50 embriões germinados em meio de cultura MSSE para a microenxertia *in vitro*. A microenxertia foi realizada utilizando-se ápices dos embriões germinados com aproximadamente 0.5 cm de comprimento e microenxertados em porta-enxertos de citrange ‘Carrizo’. Os explantes microenxertados foram cultivados em meio de cultura MS com a concentração de nutrientes reduzidos pela metade (sais e vitaminas) e adição de 30g $L^{-1}$ de sacarose, 100mg $L^{-1}$ de myo-inositol e 6.0g $L^{-1}$ de agar (meio de cultura MSME).

O pH de todos os meios de cultura foram ajustados para 5.8 antes da esterilização por autoclavagem a 121°C, com 1 Kgf $cm^{-2}$ por 20 minutos.

A temperatura utilizada para todos os estádios do cultivo *in vitro* foi de 26±1°C.

A porcentagem de calos embriogênicos e o número total de embriões somaticos regenerados foram avaliados aos 120 dias. Foram considerados calos embriogênicos aqueles que apresentavam coloração branca, friáveis e com início de formação de embriões. Aos 160 dias foi avaliada a porcentagem de embriões germinados e aos 200 dias, o número de plântulas microenxertadas e em desenvolvimento.

A exceção dos dados de porcentagem, todos os demais dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com os testes F e de Tukey, este último usado para a comparação das médias dos tratamentos.

As avaliações de ploidia de 50 plantas regeneradas do processo foram realizadas por citometria de fluxo, bem como a metodologia para análise com marcadores moleculares TRAPs foram realizadas de acordo com o descrito para os experimentos de cultura de anteras (capítulo 3).

## 7.3 Resultados e Discussão

Houve formação de calos a partir dos pistilos de laranja doce 'Tobias' em ambos os meios de cultura testados (WPM e $N_6$) (Figura 7.1b). Aos 14 dias de cultivo dos pistilos foi observado grande intensidade de calos provenientes de tecidos da região do ovário. Os calos tinham coloração creme e aspecto não-friável.

A multiplicação e a massa dos calos obtidos em meios alternados ocorreram de forma diferenciada, observando-se melhores resultados quando os explantes foram inicialmente cultivados em meio de cultura WPM seguido de transferência dos calos obtidos dos ovários para meio de cultura $N_6$. Neste tratamento observou-se maior porcentagem de pistilos que induziram calos (97,5%), maior número de calos acima de 0,5 cm de diâmetro (46/20) e calos com maior massa fresca (3.52 g) (Tabela 7.1).

O cultivo dos calos derivados de ovários no meio de cultura $N_6$ na fase de multiplicação foi essencial para a indução de embriogênese somática (Figura 7.1c), sendo que as combinações de meios de cultura $N_6$-$N_6$ e WPM-$N_6$ foram as únicas em que se observou a formação de embriões, nas freqüências de 8 e 10.9%, respectivamente (Tabela 7.2). No entanto, aos 120 dias de cultivo, a combinação WPM-N6 foi a que induziu o maior número de embriões (125) na fase final de desenvolvimento (embriões torpedos e cotiledonares) (Tabela 7.1, Figura 7.1E-H).

Já foi amplamente demonstrado que a composição do meio de cultura (sais, substâncias orgânicas e reguladores vegetais) pode exercer grande influência sobre a calogênese e embriogênese em diferentes tecidos de plantas. O meio de cultura WPM é utilizado para espécies arbóreas e foi testado com sucesso na regeneração de plântulas de laranja doce, obtidas a partir de

segmentos internodais de plantas adultas (KOBAYASHI et al., 2003). O meio de cultura $N_6$, elaborado por Chu (1978) para a cultura de anteras de arroz, atualmente tem sido utilizado com algumas alterações na produção de calos e embriões a partir de anteras de *Citrus* (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003).

A concentração total de nitrogênio (N) e calcio (Ca) e a proporção nitrato:amônio são as maiores diferenças entre os meios WPM e N6 utilizados nesse experimento. O N e Ca totais são aproximadamente duas e quatro vezes maiores, respectivamente, no meio WPM comparado ao N6. A proporação nitrato:amônio no meio de cultura WPM e N6 são 2,1:1 e 4,3:1, respectivamente. As diferenças nas quantidades totais e proporções dos nutrients no meio de cultura aumentaram as massas fresca e seca de cultura de calos e da indução da empbriogênese somática em laranja doce 'Valência'. Em *Linum usitatissimum* L. foi observado que a alta relação nitrato:amônio aumentou o crescimento de calos, e a redução dessa taxa aumentou a embriogênese somática e o desenvolvimento dos embriões (CUNHA & FERNANDES-FERREIRA, 1999).

As diferentes fontes de carboidratos utilizadas nos meios de cultura WPM (sacarose) e N6 (Lactose e Galactose) nesse experimento e que resultaram na indução da embriogênese somática em ovários de laranja doce 'Tobias'. Diferentes fontes de carboidratos no meio de cultura mostra diferentes respostas para a indução da embriogênese somática in protoplastos de *Citrus* (GROSSER & GMITTER JR., 2011), calos derivados de nucelos (TOMAZ et al., 2001) e calos provenientes de óvulos (KAYIM & KOC, 2006). O meio de cultura N6 suplementado com lactose e galactose mostrou os melhores resultados para a regeneração de embriões gaméticos a partir da cultura de anteras de *Citrus clementina* (GERMANÀ & CHIANCONE, 2003).

Em trabalho com seis espécies de *Citrus*, as frequências de formação de calos e de obtenção de embriões somáticos apresentaram diferenças em função da espécie, tipo de explante e meio de cultura utilizado. O meio de cultura MS suplementado com 500 $mg.L^{-1}$ de extrato de malte e 13.3µM de BAP mostrou melhores resultados na obtenção de embriogênese somática em *Citrus limon* e *C. medica,* a partir de cultura de TCL de estilete e de estigma e em *C. madurensis* e *C. sinensis*, a partir de TCL de estigma. As espécies *Citrus sinensis*, *C. medica* e *C. limon* não apresentaram formação de embriões somáticos a partir de TCL de ovários em nenhum dos meios de cultura testados

(CARIMI et al., 1999). Os autores ainda associaram os resultados positivos da embriogênese somática aos altos níveis de atividade de peroxidases presentes no estigma e estilete, e a não obtenção de embriões a partir de ovários aos baixos níveis de peroxidases nesse tecido (SAJEVA et al. 2008).

CARIMI et al. (1998), trabalhando com 11 variedades de laranja doce navel, também obtiveram os melhores resultados para a indução de embriões somáticos utilizando o meio de cultura MS contendo 500 mg $L^{-1}$ de extrato de malte e 13.3µM de BAP, para o cultivo de estilete/estigma e óvulos imaturos.

Com o protocolo desenvolvido no presente experimento para laranja doce, tanto o uso dos meios de cultura adequados quanto a sequência de disposição dos calos nos meios de cultura $N_6$-$N_6$-MT e WPM-$N_6$-MT promoveram o desenvolvimento de calos com potencial embriogênico nos ovários. Um fator a ser investigado é a necessidade do estilete e estigma para o início da formação de calos em ovários de laranja. Experimentos com o cultivo inicial dos ovários em meios de cultura com e sem a presença do estilete e de estigma estão sendo conduzidos para efetivar a importância destes tecidos na indução de calos embriogenicos.

A embriogênese somática tem demonstrado vantagens em relação a outras técnicas utilizadas para a regeneração *in vitro* de plântulas de *Citrus*. Além da obtenção de grandes quantidades e altas taxas de germinação dos embriões, a técnica possibilita a obtenção de plantas livres de vírus (D'ONGHIA et al., 2001). Ainda nesse contexto, o uso da técnica de embriogênese somática a partir de ovários pode ter aplicação para a regeneração *in vitro* e transformação genética de espécies de *Citrus* sem sementes.

Um potencial também a ser explorado com a indução de embriogênese a partir do cultivo de ovários de citros é a possibilidade de se obter plântulas haplóides ou duplo-haplóides a partir da divisão celular e desenvolvimento da oosfera (n), contidas nos óvulos. Em trigo (*Triticum durum*) foram obtidas plantas haplóides e duplo-haplóides a partir de calos e embriões obtidos de ovários não-polinizados e cultivados *in vitro*, possibilitando a obtenção de linhagens homozigóticas em curto período de tempo (SLAMA-AYED & SLIM-AMARA, 2007). GERMANÀ E CHIANCONE (2001) conseguiram obter plantas haplóides de *Citrus clementina* a partir de cultura de pistilos polinizados *in vitro*.

Os embriões transferidos para meio de germinação resultaram em plântulas com desenvolvimento regular e bom desempenho (Figura 7.1E-H), sem diferenças significativas entre os tratamentos. As taxas de germinação dos embriões se situaram entre 62.5%, para os embriões obtidos no tratamento $N_6$-$N_6$ e 72%, para os obtidos no tratamento WPM-$N_6$. (Tabela 7.1).

Este foi o primeiro relato de embriogênese somática a partir de ovários não polinizados de laranja doce.

As análises de citometria de fluxo de 50 plantas obtidas do experimento mostrou que 100% das plantas eram diploides (2n). Não houve a indução de plantas haplóides ou mixoplóides nesse estudo, sendo esse fato relatado para a cultura de ovários *in vitro* de outras espécies (ALAN et al. 2003, GERMANÀ & CHIANCONE 2001). Resultados similares aos obtidos nesse estudo foram observados com a cultura de ovários de *Azadirachta indica* (SRIVASTAVA et al. 2009) e *Aechmea fasciata* (HUANG et al. 2011) onde somente plantas 2n foram obtidas. Esses resultados, associado a observações em microscópio estereoscópio, reiteram a probabilidade desses calos e embriões serem de origem da parede dos ovários (Figura .

Os resultados obtidos com marcadores moleculares TRAPs com vinte plantas provenientes da embriogênese somáticas dos calos de ovários mostraram um padrão de bandamento semelhante ao das plantas doadoras dos explantes para 56 *loci* (Figura 7.2B). Esse fato confirmou a origem somática dos tecidos e plantas obtidas.

Tabela 7.1 Indução e multiplicação de calos, e embriogênese somática a partir de tecidos de ovários não polinizados de laranja doce cv. Tobias em diferentes meios de cultura.

| **Meio de cultura** | **Indução de Calos (Média ± SD)** | | **Proliferação de Calos (Média ± SD)** |
|---|---|---|---|
| **Indução de Calos - Proliferação** | **Porcentagem de Pistilos com Calos** | **Calos maiores que 0.5 cm** | **Massa Fresca de Calos (g)** |
| N6-N6 | 90.0 ± 0.0 b | 1.56 ± 0.14 b | 1.29 ± 0.23 b |
| N6-WPM | 90.0 ± 0.0 b | 1.40 ± 0.08 b | 1.17 ± 0.12 b |
| WPM-WPM | 97.5 ± 2,5 a | 1.79 ± 0.09 a | 3.00 ± 0,17 a |
| WPM-N6 | 97.5 ± 2,5 a | 2.30 ± 0.10 a | 3.52 ± 0,28 a |

| **Meio de Cultura** | **Embriogênese Somática (Mean ± SD)** | | |
|---|---|---|---|
| **Indução de Calos - Proliferação** | **Porcentagem** | **Número de embriões** | **Porcentagem de embriões germinados** |
| N6-N6 | 8.0 ± 2.0 a | 40 ± 5.2 b | 62.5 ± 8.3 a |
| N6-WPM | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 c | 0.0 ± 0.0 b |
| WPM-WPM | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 c | 0.0 ± 0.0 b |
| WPM-N6 | 10.9 ± 3.0 a | 125 ± 11.8 a | 72.0 ± 7.9 a |

$N_6$ (Chu 1978), suplementado com lactose (18 g $L^{-1}$) e galactose (9 g $L^{-1}$); WPM (Lloyd and McCown, 1980) suplementado com 31.2 g $L^{-1}$ de sacarose. Números seguidos de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os valores das medias foram calculados a partir de 4 repetições com cinco explantes por tratamento. Dados obtidos de observações a cada 40 dias.

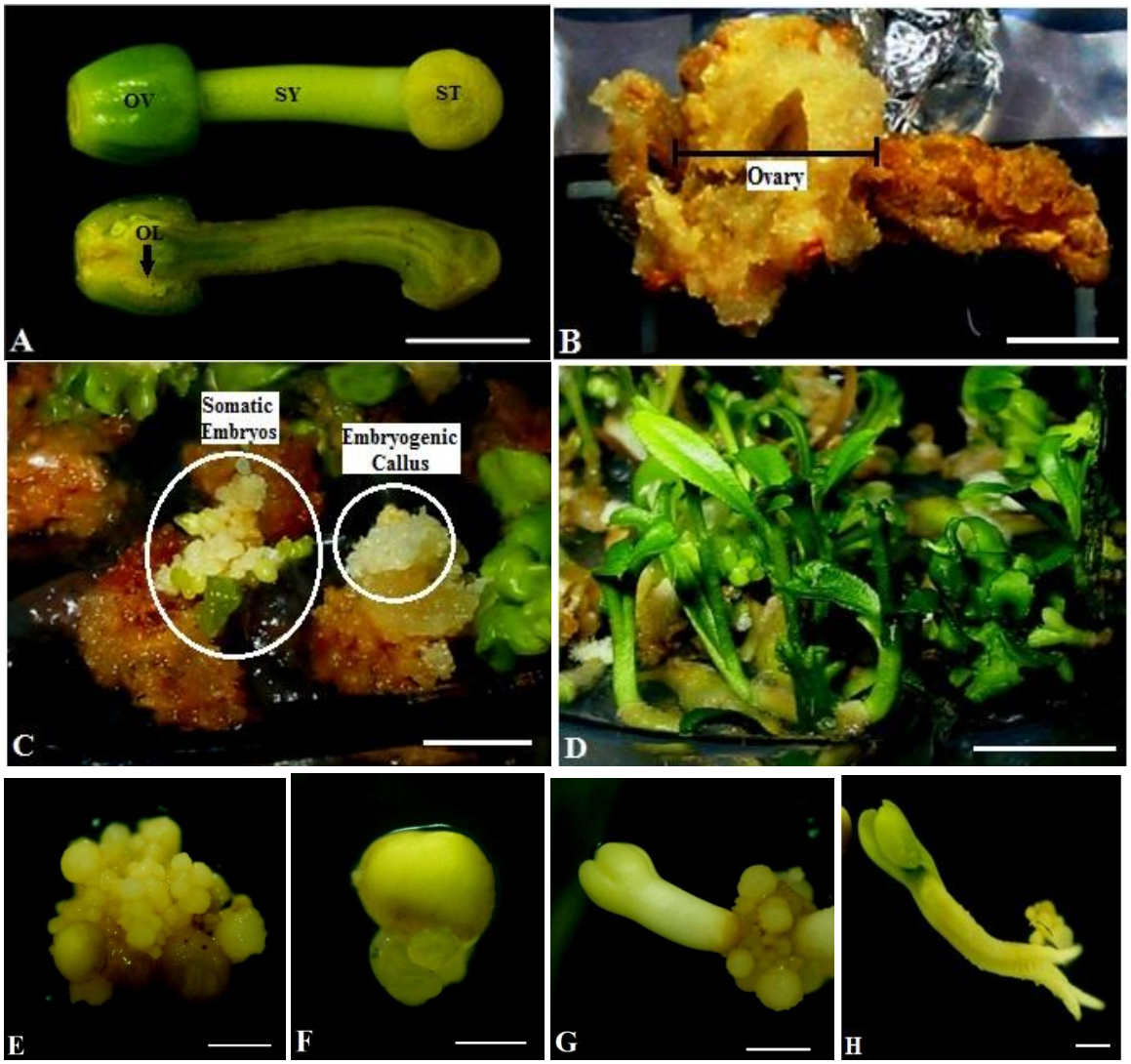



Figura 7.1 **–** Calogênese, embriogênese somática e regeneração de plântulas a partir de tecidos de ovário não-polinizados de laranja-doce (*Citrus sinensis*) 'Tobias': A. Pistilos não-polinizados utilizados para o estabelecimento *in vitro*; B. ½ pistilo cultivado *in vitro* e indução de calos nos tecidos do ovário; C. Calos embriogênicos e embriões obtidos a partir de calos de tecidos do ovário e; D. Germinação dos embriões somáticos; E-H – sequência de desenvolvimento de embriões somáticos obtidos a partir de calos: estádio globular (E); estádio cordiforme (F); estádio de torpedo (G); Embrião germinado (H); OV = ovário, ST = estigma, SY = estilete. Barras: A-D: 0.5 cm; E-H = 0.1 cm.

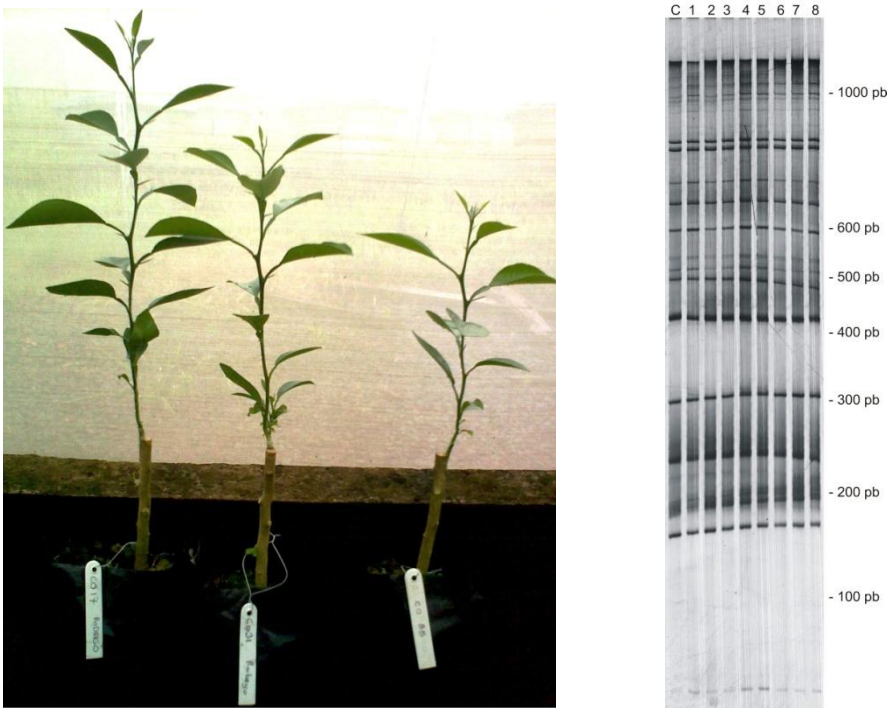



Figura 7.2 – A. Plantas obtidas de embriões somáticos de ovários de laranja doce ‘Tobias’ após a aclimatização e cultivo em estufa: B. Análise molecular com marcadores moleculares TRAPs, mostrando as similaridades moleculares com a planta de origem controle. Planta controle (C) e oito plantas aclimatizadas obtidas de cultura de ovários (1-8).

# 8 CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos com biologia reprodutiva de *Citrus sinensis*, principalmente aqueles relacionados a microsporogênese e de visualização da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico *in vivo* permitiram a obtenção de informações fundamentais como a determinação do estádio uninucleado para os experimentos de cultura de anteras e do tipo de pólen a ser utilizado nos trabalhos de partenogênese de laranja doce.

Foram obtidos calos, calos embriogênicos e embriões somáticos por meio do cultivo *in vitro* de anteras em alguns genótipos de laranja doce em meio de cultura N6 modificado por Germanà. No entanto, a obtenção de calos embriogênicos de origem gamética (microsporogênese) foi observada apenas em genótipos de *C. clementina* e no híbrido entre *C. clementina* e *C. sinensis*. Os genótipos de laranja doce mostraram uma forte recalcitrância à obtenção de calos e embriões de origem gamética nas condições de cultivo utilizadas, embora se tenha obtido a embriogênese somática a partir de tecidos das anteras. Ainda foi possível observar um início de mudança da via gametofítica para a esporofítica de parte dos micrósporos provenientes do cultivo de anteras de laranja doce.

As técnicas de partenogênese *in situ* utilizando grãos de pólen irradiados para a polinização permitiram a obtenção de grandes quantidades de embriões e plântulas verdes, quando as sementes foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS semi-sólido contendo 5% de sacarose e 0,5 g $L^{-1}$ de extrato de malte. Essa técnica, embora possa ser utilizada para a obtenção de plantas mutantes e com variações de ploidia, não permitiu a obtenção de plantas haplóides ou duplo-haplóides de laranja doce até momento.

O cultivo *in vitro* de pistilos e calos de ovários de laranja doce em meios WPM e N6 permitiram a indução de embriogênese e a regeneração dos embriões, no entanto, esses eram de origem somática e diplóides (2n). Esse foi o primeiro relato de embriogênese somática a partir de tecidos dos ovários de laranja doce. Finalmente, os trabalhos aqui realizados permitiram avanços no processo de desenvolvimento de protocolos para a obtenção de calos embriogênicos, embriões e plântulas de laranja doce a partir das técnicas de cultivo *in vitro* de anteras e de partenogênese e são de importância para o

avanço na indução e regeneração de plantas haplóides e duplo-haplóides de laranja doce.

## 9 REFERÊNCIAS

ALAN, A.R.; MUTSCHLER, M.A.; BRANTS, A.; COBB, E.D.; EARLE, E.D. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. **Plant Science**, v.165, p.1201-1211, 2003.

ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO-FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. Agrobacterium-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, v.60, p.23-29. 2003.

BAJAJ, Y.P.S. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed) **Biotechnology in agriculture and forestry**, part I. Haploids in crop improvement, v.12, Springer, Berlin, pp. 1-44, 1990.

BARRET, H. C.; RHODES, A. M. A numeric taxonomical study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany,** Notre Dame, v.1, p.105, 1976.

BARTH, O. M. Variações polínicas em espécies brasileiras da família Rutaceae. **Boletim do IGc USP**, São Paulo, v. 13, p. 129-134, 1982.

BARTH, O. M. Pollen morphology of Brazilian Rutaceae: *Dictyoloma and Hortia*. **Pollen et Spores**, Paris, v. 25, p. 409-419, 1983.

BARTH, O. M. Pollen morphology of Brazilian Rutaceae: *Pilocarpus*. **Pollen et Spores**, Paris, v. 27, p. 145-154, 1985.

BARTH, O. M. **O pólen no mel Brasileiro.** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1989. 150 p.

BAUSHER, M. G.; SINGH, N. D.; LEE, S.; JANSEN, R. K.; DANIELL, H. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. **BMC Plant Biology**, London, v. 6, p. 21, 2006.

BENELLI, C.; GERMANÀ, M.A.; GANINO, T.; BEGHE, D.; FABBRI, A. Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of *Citrus reticulate*. **Biolologia Plantarum**, v.54, p.224-230, 2010

BERZONSKY, W.A.; KLEVEN, S.L.; LEACH, G.D. The effects of parthenogenesis on wheat embryo formation and haploid production with and without maize pollination. **Euphytica**, v.113, p.285-290, 2003.

BITTERS, W.P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T.S.; NAUER, E. Investigations on established virus-free plants through tissue culture. **California Citrus Nursery Society Bull.**, v.9, p.27-30, 1970.

CABRAL, G.B.; CARNEIRO, V.T.C.; LACERDA, A.L.; DO VALLE, C.B; MARTINELLI, A.P.; DUSI, D.M.A. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachyaria brizantha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.2, p.271-282, 2011.

CAI, X.D.; LIU, X.; GUO, W.W. GFP expression as an indicator of somatic hybrids between transgenic Satsuma mandarin and calamondin at embryoid stage. **Plant Cell Tissue and Organ Culture,** v.87, p.245-253, 2006.

CAO, H.; BISWAS, M.K.; LU, Y.; AMAR, M.H.; TONG, Z.; XU, Q.; XU, J; GUO, W; DENG, X. Doubled haploid callus lines of Valencia sweet orange recovered from anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.415–423, 2011.

CARDOSO, J.C.; MARTINELLI, A.P.; LATADO, R.R. Somatic embryogenesis from ovaries of sweet orange cv. Tobias. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.109, n.1, p.171-177, 2012.

CARIMI, F. **Somatic embryogenesis protocol: *Citrus***. In: JAIN, S.M. AND GUPTA, P.K. (eds.) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants, Springer, Netherlands, pp. 321-343. 2005.

CARIMI, F.; DE PASQUALE, L.; CRESCIMANNO, F.G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. **Plant Cell Reports,** v.18, p.935-940, 1999

CARIMI F, TORTORICI MC, PASQUALE FD, CRESCIMANNO FG Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.54, p.183-189, 1998.

CEREZO, S.; MERCADO, J.A.; PLIEGO-ALFARO, F. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.106, p.337–344, 2011.

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; DA SILVA, A. B.; CAZETTA, J. O.; SANTOS, F. C.; CARDOSO, P. Desempenho de diferentes estádios embrionários no cultivo *in vitro* de ‘Pêra Rio’ x ‘Poncã’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 523-525, 2003.

CHALAK L, LEGAVE JM. Effects of pollination by irradiated pollen in Hayward kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. **Scientia Horticulturae**, v.68, p.83-93, 1997.

CHEN, J.; CUI, L.; MALIK, A.A.; MBIRA, K.G. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.104, p.311-319, 2011.

CHEN, Z.; WANG, H.; LIAO, H. The induction of Citrus pollen plants in artificial media. **Acta Genetica Sinica, v**.7, p.189–192,1980.

CHIANCONE, B.; TASSONI, A.; BAGNI, N.; GERMANÀ, M.A. Effect of polyamines on *in vitro* anther cultures of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.145-153, 2006.

CHU, C. The $N_6$ medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: **Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture**. Science Press, Peking, p. 43–50, 1978.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeats polymorphisms in denaturating polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reports,** v.19, p.299-306, 2001.

CUNHA, A.; FERNANDES-FERREIRA, M. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.): effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p.591-597, 1999.

DEL BOSCO, S. F.; TUSA, N.; CONICELLA, C. Microsporogenesis in a citrus interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. **Heredity**, Sheffield, UK, v. 83, p. 373-377, 1999.

DENG, X.X.; DENG, Z.A.; XIAO, S.Y.; ZHANG, W.C. Pollen derived plantlets from anther culture of Ichang papeda hybrids No.14 and Trifoliate orange. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v.1, p.190–192, 1992.

DENWARD, T. Pollen irradiation and variability in plant breeding materials. **Barley Genetics Newsletter**, v.41, p.1-9, 2011.

DHEKNEY, S.A.; LI, Z.T.; GRAY, D.J. Factors influencing induction and maintenance of *Vitis rotundifolia* Michx. embryogenic cultures. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v.105, p.175-180, 2011.

DISTEFANO, G.; GENTILE, A.; HERRERO, M. Pollen-Pistill interaction and early fruiting in parthenocarpic citrus. **Annals of Botany**, Oxford, v. 108, p. 499-509, 2011.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN-NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen em variedades de laranja-doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 265-272, 1999.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN-NETO, A. Influência da polinização e da morfologia floral na frutificação de variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 163-170, 1999.

D'ONGHIA, A.M.; CARIMI, F.; DE PASQUALE, F.; DJELOUAH, K.; MARTELLI, G.P. Elimination of citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. **Plant Pathology,** v.50, p.266–269, 2001.

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

DUNWELL, J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v.8, p.377-424, 2010.

DUNWELL, J.M.; CORNISH, M.; DE COURCEL, A.G.L.; MIDDLEFELL-WILLIAMS, J.E. Induction and growth of 'microspore-derived' embryos of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. **Journal of Experimental Botany,** v.34, p.1768-1778, 1983.

DUNWELL, J.M.; SUNDERLAND, N. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. **Euphytica** 22:317-323, 1973.

EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; DENDAUW, J.; BOCKSTAELE, E.V.; DEBERGH, P. Induction of homozygous *Spathiphyllum wallisii* genotypes through gynogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.67, p.181-189, 2001.

ENDO, M., NAKAMURA, S., ARAKI, T., MOCHIZUKI, N., AND NAGATANI, APhytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing *FLOWERING LOCUS T* expression in *Arabidopsis* vascular bundles. **Plant Cell,** v.17**,** p.1941–1952, 2005.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy**: Angyosperms. Stockholm: Chronica Botanica Co., 1952. 539 p.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk**

**Tidskrift**, Uppsala, v.54, p.561-564, 1960.

EVANS, D.A. Somaclonal variation – genetic basis and breeding applications. **Trends in Genetics,** v.5, p.46-50, 1989.

FAOSTAT. **Production Quantity Statistics**. 2012. Disponível em: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor. Acessado em 13 de Maio 2012.

FERRIE, A. M. R.; MÖLLERS, C. Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.104, p.375-386, 2011.

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

FORSTER, B.P.; THOMAS, W.T.B. Double haploids in genetics and plant breeding. **Plant Breeding Review**, v.25, p.57-88, 2005.

FROELICHER, Y.; BASSENE, J.B.; JEDIDI-NEJI, E.; DAMBIER, D.; MORILLON, R.; BERNARDINI, G.; CONSTANTINO, G.; OLLITRAUT, P. Induced parthogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analyses of plantlets. **Plant Cell Reports**, New York, v.26, p.937-944, 2007.

FROELICHER, Y.; OLLITRAULT, P. Effects of the hormonal balance on Clausena excavata androgenesis. Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology. Goren R, Goldschmidt E.E., Eilat, Israel, **Acta Horticuturae** 535: 139–146, 2000.

FROST, H.B. Polyembriony, heterozigosis and chimeras in *Citrus*. **Hilgardia,** v.1, p.365-402, 1926.

FROST, H.B. The chromosomes of *Citrus*. **Journal of Washington Academy Science,** v.15:p.1–3. 1925.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed Reproduction: Development of Gamets and Embryos. In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L. D. (Eds.). **The citrus industry**, v.2. Berkeley: University of California Press, p. 290-324. 1968.

GERACI, G.; STARRANTINO, A. Attempts to regenerate haploid plants from *in vitro* culturaes of *Citrus* anthers. **Acta Horticulturae**, v.280, p.315-320, 1990.

GERMANÀ, M. A. Double haploid production in fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, v. 86, p. 131-146, 2006.

GERMANÀ, M.A. Haploidy in Citrus. In: Jain, S.M., Sopory, S.K. & Veilleux, R.E. (eds) **In Vitro Haploid Production in Higher Plants**, pp. 195–217, 5th edn. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 1997.

GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and double haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, p. 283-300, 2011.

GERMANÀ, M.A.; CHIANCONE, B.; CALOGERO, I.; ROSÁRIO, M. The effect of light quality on anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, n°4B, p. 717-721, 2005B.

GERMANA, M. A.; CHIANCONE, B. Improvement of *Citrus Clementine* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid production and regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 181-187, 2003.

GERMANÀ, M.A; CHIANCONE, B. Gynogenetic haploids of *Citrus* after *in vitro* pollination with triploid pollen grains. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p.59-66, 2001.

GERMANÀ, M. A.; CHIANCONE, B.; LAIN, O.; TESTOLIN, R. Anther culture in *Citrus clementina*: a way to regenerate trihaploids. **Australian Journal of Agriculture Research**, Collingwood, v. 56, p. 839–845, 2005.

GERMANÀ, M.A.; CRESCIMANO, F.G.; RECUPERO, G.R.; RUSSO, M.P. Preliminary characterization of several doubled haploids of *Citrus clementina* cv. Nules. **Acta Horticulturae**, 535, p.183-190, 2000.

GERMANÀ, M.A.; CRESCIMANNO, F.G.; DE PASQUALE, F.; WANG, Y.Y. Androgenesis in 5 cultivars of *Citrus limon* L. Burm. f. **Acta Horticulture,** 300: p.315–324, 1991

GERMANÀ, M.A; WANG, Y.Y.; BARBAGALLO, M.G.; IANNOLINO, G.; CRESCIMANNO, F.G. Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. **Journal of Horticultural Science**, v.69, n.3, p.473-480, 1994.

GILL, M.I.S.; SINGH, Z.; DHILLON, B.S.; GOSAL, S.S.. Somatic embryogenesis and plant regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Scientia Horticulturae**, v.63, p.167-174, 1995.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.1, p.93, 2001.

GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L.; DUNCAN, L.W. Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. **Scientia Horticulturae**, v.113, p.33–36, 2007.

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

GROSSER, J. W.; GMITTER JÚNIOR, F. G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootsctock breeding in *Citrus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, v. 104, n. 3, p. 343-357, 2011.

HAO, Y.; DENG, X. Occurrence of chromossomal variations and plant renegeration from long term-cultured citrus callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology,** v.38, n.5, 2002.

HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Theorical and Applied Genetics**, v.71, p.361-374, 1985.

HEUSSER, C. J. **Pollen and spores of Chile.** Tucson: University of Arizona Press, 1971. 167 p.

HIDAKA, T. Induction of Plantlets from anthers of 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Journal Japanese Society of Horticultural Science**, v.53, n.1, p.1-5, 1984.

HIDAKA, T.; YAMADA, Y.; SHICHIJO, T. *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.). **Raf Japanese Journal of Breeding**, v.29, p.248–254, 1979

HIDAKA, T.; YAMADA, Y., SHICHIJO, T. Plantlet formation by anther culture of *Citrus aurantium* L. **Japanese Journal of Breeding**, v.32, p.247-252, 1982.

HÖFER, M. Regeneration of androgenic embryos in apple (*Malus* x *domestica* Borkh.) via anther and microspore culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.27, p.709-716. 2005.

HU, Z.; ZHANG, M.; WEN, Q.; WEI, J.; YI, H.; DENG, X.; XU, X. Abnormal microspore development leads to pollen abortion in a seedless mutant of 'Ougan' mandarin (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka). **Journal of American Society of Horticulture Science**, v.132, p.777-782, 2007.

HUANG, P.; LIAO, L.; TSAI, C.; LIU, Z. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.105, p.73-78. 2011.

JAIN, S.M. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/ IAEA. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.82, p.113-123, 2005.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-238, 1965.

KASHA, K.J.; KAO, K.N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Nature**, v.225, p.874-876, 1970.

KASHA, K.J.; MALUSZYNSKI, M. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In Maluszynski, M.; Kasha, K.J.; Forster, B.P.; Szarejko, I., ed. **Doubled Haploid Production in Crop Plants**, Dordrecht, The Netherlands, p.1-4, 2003.

KEARNS, C.A.; INOUYE, D.W. **Techniques for pollination biologists.** University Press of Colorado, Boulder, Colorado, USA. 1993.

KESHIAN, W.; NAGARAJAN, P. Poplars (*Populus spp.*): *In vitro* production of haploids. In: Bajaj, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry**, v.11, Haploids in crop improvement, Springer, Berlin Heidelberg, New York, p.237-249, 1990.

KHAN, I. A. **Citrus genetics, breeding and biotechnology**. Wallingford: CAB International, 2007. 370 p.

KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.74, p.99–102, 2003.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in *Citrus*. **Proceedings of Intenrnational Society for Citriculture**, v.1, p.44–48,1981.

KOORNNEEF, M.. **Classical mutagenesis in higher plants.** In: Gilmartin, P.M.; Bowler, C. (eds) Molecular Plant Biology, v.1, pp.1-11, Oxford: Oxford University Press, 2002.

LAPITAN, V.C.; REDONA, E.C.; ABE, T.; BRAR, D.S. Molecular characterization and agronomic performance of DH lines from the F1 indica and japonica cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Research**, v.112, p.222-228, 2009.

LATADO, R. R.; YALY, M. C.; CARVALHO, C. R.; MACHADO, M. A. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1429-1435, 2007.

LI, G.Y.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.

LI, G.; WANG, L.; SHI, J. Enhancement of intergeneric hybridization between common wheat and *Leymus angustus* by means of pollen irradiation. **Acta Agriculturae Nucleatae Sinica**, v.6, n1, 1999. Disponível em: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-HNXB199906001.htm. Acessado em 16 de Maio de 2012.

LI, G.; WANG, L.; SHI, J. Cytological effects of pollen irradiation on wheat x *Leymus angustus* hybrid. **Acta Agriculturae Nucleatae Sinica**, v.14, p.6-11, 2000.

LINSKENS, H. F.; ESSER, K. Über eine spezifische Anfa¨rbung der Pollenschla¨uche in Griffel und die Zahl der Kallossepfropten nach elbstung und Fremdung. **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v. 44, p. 16, 1957.

LLOYD G, MCCOWN B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v.30, p.421-427.

MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU JÚNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, 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 JÚNIOR, J. Citros. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. p. 243-246.

MANJUNATH, K.L.; HALBERT, S.E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R.F. Detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. **Phytopathology**, v.98, p.387-396, 2008.

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOLCAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, Brisol, v.59, n.1, p.68-75, 2010.

MIRANDA, H. L. C.; BOBROWSKI, V. L.; TILLMANN, M. A. A.; et al. Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas à radiação gama. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, p.1320-1326, 2009.

MORTON, C. M.; KALLUNKI, J. A. Pollen morphology of the subtribe Cuspariinae (Rutaceae). **Brittonia**, Heidelberg, v. 45, n. 4, p. 286-314, 1993.

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

NITSCH, C. Culture of isolated microspores. In: Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. (eds) **Applied and fundamental aspects of plant cell,tissue and organ culture**. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p. 268-278, 1977.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science,** v.163, p.85–87, 1969.

NOVAK, F.J.; BRUNNER, H. Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. **IAEA Bulletin 4**, Austria: IAEA, 1992.

NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Development and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetic and Molecular Biology**, v.29, p.90-96, 2006.

OLLITRAULT, P.; ALLENT, V.; LURO, F. Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* 'Blanco') after *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. **Proceedings of International Society of Citriculture**. South Africa, v.2, p.913–917, 1996.

OSOLNIK, B.; BOHANEC, B.; JELASKA, S. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capatata*) anthers by low temperature and anther dissection. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 32, p. 241–246, 1993.

PALMIERI, D.A; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, N.; CRISTOFANI-YALI, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E.F.; OLIVEIRA, A.C.; MACHADO, M.A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. **Genetic and Molecular Biology**, v.30, n.3, 2007.

PANDEY, K.K.; PRZYWARA, L.; SANDERS, P.M. Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. **Euphytica**, v.51, p.1-9, 1990.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozigosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 361-367, 2000.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUAREZ ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus*. **Plant Science,** v.104, p.183-191, 1995.

PETERS, A.D.; HALLIGAN, D.L.; WHITLOCK, M.C; KEIGHTLEY, P.D. Dominance and overdominance of mildly deleterious induced mutations for fitness traits in Caenorhabditis elegans. **Genetics**, v.165, p.589–599, 2003.

PIO, L.A.S.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência Agrotécnica**, v.31, p.147-153, 2007.

POWELL, W. **Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry**. V.12: Haploids in Crop Improvement. Ed. Y.P.S. BAJAJ. Berlin,Springer-Verlag, pp.45–65, 1990.

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

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208–212, 1963.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, S. A. Microscopia eletrônica de varredura de pólen de algumas espécies de citros e gêneros correlatos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 20, n. 3, p. 382-386, 1998.

ROOSE, M.L.; WILLIAMS T.E. **Mutation breeding in *Citrus***. In: Khan, I. A. (ed.). Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. CAB International, Wallingford, U.K., pp 345-352. 2007.

ROSSI, M. L.; PERON, R.; CARDOSO, J. C.; MARTINELLI, A. P. Pollen morphology in four varieties of the *Citrus sinensis* species from Rutaceae. In: INTERNATIONAL MICROSCOPY CONGRESS, 17., 2010, Rio de Janeiro, RJ.

**Anais…** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010. 1 CD- ROM.

RUDOLF, K.; BOHANEC, B.; HANSEN, M. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. **Plant Breeding**, v.118, p.237-241, 1999.

SAJEVA, M.; CARRA, A.; DE PASQUALE F.; CARIMI, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil transverse thin cell layers of lemon (*Citrus limon*). **Plant Biosystems**, v.142, p.199-203, 2008.

SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; NUEZ, F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microsporederived embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v.134, p.1-12, 2008.

SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; TESTILLANO, P.S.; RISUEÑO, M.C. Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. cv Topas. **Journal of Structural Biology**, v.142, p.379–391, 2003.

SELLING, O. **Studies in Hawaiian pollen statistics**. Part II. The pollens of the Hawaiian phanerogams. Gothenburg: Bishop Museum, 1947. p. 319. (Special Publication, 38).

SHIRLEY, B.; HANLEY, S.; GOODMAN, H. Effects of ionising radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. **Plant Cell**, v.4, p.333–347, 1992.

SHU, Q.Y. **Induced plant mutations in genomics era.** Rome: FAO & IAEA, 2009. 458p. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/012/i0956e/i0956e00.htm. Acessado em 16 de Maio de 2012.

SLAMA-AYED O, SLIM-AMARA H Production of doubled-haploids in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) through culture of unpolinnated ovaries. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.9, p.125-133, 2007.

SMYKAL, P. Pollen embryogenesis – the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. **Biologia Plantarum**, v.43, p.481-489, 2000.

SONG, H.; LOU, Q.F.; LUO, X.D.; WOLUKAU, J.N.; DIAO, W.P.; QIAN, C.T.; CHEN, J.F. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture,** v.90, p.245-254, 2007.

SPIEGEL-ROY, P. Economic and agricultural impact of mutation breeding in fruit trees. **Mutation Breeding Review**, Viena, n.5, p.215-235, 1990.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230 p.

SRIVASTAVA P, SINGH M, MATHUR P, CHATURVEDI R In vitro organogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary cultures of *Azadirachta indica.* **Biolologia Plantarum**, v.53, p.360-364, 2009.

SWINGLE, W. T. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. **The citrus industry**. Berkeley, v. 1, p. 129-474, 1943.

TANAKA, T. Misunderstanding with regards Citrus Classification and Nomeclature. **Bulletin of University of Osaka**, Tokyo, v. 21, p. 139-145, 1969.

TAVANO, E.C.R.; STIPP, L.C.L.; MUNIZ, F.R.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. In vitro organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. **Biologia Plantarum**, v.53, p.395-399, 2009.

TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research, v.35, p.53–109, 2001.

TRIVEDI, M. Pollen variation in some taxa of *Citrus*. **Palynological Bulletin**, Lucknow, India, v. 4, p. 17-19, 1968.

USDA. Natural Resources Conservation Service. **Plants Profile (*Citrus* L.).** Washington, DC, 2011. Disponível em http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CITRU2. Acesso em 15 dez. 2011.

VICCINI, L.F.; CARVALHO, C.R. Meiotic chromosomal variation resulting from irradiation of pollen in maize**. Journal of Applied Genetics**, v.43, p.463-469, 2002.

VIZIR, I.Y.; ANDERSON, M.L.; WILSON, Z.A.; MULLIGAN, B.J. Isolation of defficiences in Arabidopsis genome by γ-irradiated pollen. **Genetics,** v.137, p.1111-1119, 1994.

VIZIR, I.Y; MULLIGAN, B.J. Genetics of gamma-irradiation-induced mutations in *Arabidopsis thaliana*: Large chromosomal deletions can be rescued through the fertilization of diploid eggs. **The Journal of Heredity**, v.90, n.3, p.412-417, 1999.

WEDZONY, M.; FORSTER, B. P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, M.; SZECHYNSKA-HEBDA, E.; GOTEBIOWSKA, D. G. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B. P.; JAIN, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. New York: Springer, p. 1-18, 2009.

YAMAMOTO, M.; OKUDAI, N.; MATSUMOTO, R.; YAMADA, Y. Seed number of hybrid plants in citrus, with special reference to seed number of parents and pollen yield of individuals. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 61, p. 757-762, 1993.

YANG, C.; MULLIGAN, B.J.; WILSON Z.A. Molecular genetic analysis of pollen irradiation mutagenesis in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v.164, p.279-288, 2004.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. Pollination with gamma irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. **Euphytica**, v.54, p. 101–109, 1991.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y.; CHEVREAU, E. Induction of haploidy in fruit trees. **Acta Horticulturae**, v.280: p.293–304, 1990.

ZORINIANTS, S.; TASHPULATOV, A.; HEBERLE-BORS, E.; TOURAEV, A. The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis. In: Palmer, C.E.; Keller, W.A.; Kasha, K.J. (Ed.). **Haploids in Crop Improvement II**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 35–52, 2005.