

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Ferramentas biotecnológicas para apoio ao melhoramento de *Rubus* spp.

Marcela Sant’Anna Cordeiro da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2023

Marcela Sant'Anna Cordeiro da Silva
Engenheira Agrônoma

Ferramentas biotecnológicas para apoio ao melhoramento de *Rubus* spp.

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2023

RESUMO

Ferramentas biotecnológicas para apoio ao melhoramento de *Rubus* spp.

Dentre os chamados pequenos frutos, a framboeseira é a terceira espécie mais cultivada no mundo. No entanto, a expansão de seu cultivo em países de clima tropical, como o Brasil, enfrenta alguns obstáculos, tais como o uso de cultivares importadas adaptadas a clima temperado e problemas fitossanitários como a ferrugem (*Pucciniastrum americanum*), a principal doença da cultura. Visando mitigar tais problemas, o presente estudo buscou desenvolver ferramentas biotecnológicas para apoio ao melhoramento *in vitro* de espécies de framboeseira (*Rubus* spp.), por meio de dois estudos: O primeiro estudo envolveu a indução de poliploidia *in vitro* de segmentos nodais de framboeseira vermelha cv. Heritage, utilizando-se colchicina e orizalina como agentes químicos, ao qual segmentos nodais de plantas mantidas *in vitro* foram tratados em meio líquido contendo quatro concentrações de colchicina (0; 0,05; 0,1 e 0,2%) em dois tempos de exposição (24 e 48 horas) e quatro concentrações de orizalina (0; 10; 20 e 40 μM) em dois tempos de exposição (4 e 7 dias). O segundo estudo envolveu a obtenção e cultivo de calos, isolamento e cultivo de protoplastos de espécies de framboeseira a partir de calos (*R. idaeus* e *R. niveus*) e de células do mesófilo foliar (*R. idaeus*). Para o experimento de obtenção de calos, discos foliares obtidos de plantas mantidas em estufa foram introduzidos em meio de cultura contendo combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0; 1 e 2 mg L^{-1}) com ácido 1-naftalenoacético (ANA) (0; 1 e 2 mg L^{-1}) ou ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (0; 1 e 2 mg L^{-1}), os quais foram avaliados após 40 dias de cultivo. Para os experimentos de isolamento de protoplastos com calos, foram testadas combinações de enzimas (1. 0,25% de Celulase “Onokuza” RS; 0,025% de Pectoliase Y-23 e 2% de Driselase. 2. 1% de Celulase “Onokuza” RS; 0,5% de Macerozima R-10; 0,1% de Pectoliase Y-23 e 0,4% de Driselase. 3. 1% de Celulase “Onokuza” RS; 1% de Macerozima R-10 e 0,% de Pectoliase Y-23), osmolaridade da enzima (0,7; 0,8 e 1 M) e temperatura de isolamento (25 e 28°C) e para os experimentos de isolamento com folhas, foram avaliadas combinações de enzimas e osmolaridade da enzima (as mesmas citadas anteriormente). Concluiu-se que a indução de poliploidia *in vitro* de segmentos nodais de framboeseira vermelha cv. Heritage utilizando-se 0,05% de colchicina por 24 horas foi o tratamento mais eficaz na obtenção de plantas tetraploides; o uso de colchicina à 0,2% foi completamente letal aos explantes; a orizalina acarretou menos fitotoxidez aos explantes quando comparada à colchicina, possibilitando maior número de plantas regeneradas; o uso de meio de cultura adicionado de 1 ou 2 mg L^{-1} de ácido naftaleno acético (ANA) é o mais indicado para indução de calos de framboeseira vermelha (*Rubus idaeus* cv. Heritage) e que o uso de 1 ou 2 mg L^{-1} de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é o mais indicado para indução de calos de framboeseira negra (*Rubus niveus*); o isolamento de protoplastos de framboeseira vermelha cv. Heritage (*Rubus idaeus*) a partir de calos friáveis foi mais eficaz com a utilização de solução enzimática contendo 0,25% de Celulase “Onozuka” RS, 0,025% de Pectoliase Y-23 e 2% de Driselase (solução 1), com osmolaridade de 0,7 M e temperatura de isolamento de 25°C; o isolamento de protoplastos de framboeseira negra (*Rubus niveus*) a partir de calos friáveis foi mais eficaz ao utilizar solução enzimática contendo 0,25% de Celulase “Onozuka” RS, 0,025% de Pectoliase Y-23 e 2% de Driselase (solução 1), com osmolaridade de 1 M e temperatura de isolamento de 28°C; e que o isolamento de protoplastos de framboeseira vermelha cv. Heritage (*Rubus idaeus*) a partir de células do mesófilo foliar foi mais eficaz ao utilizar solução

enzimática 1% de Celulase "Onozuka" RS, 0,5% de Macerozima R-10, 0,1% Pectoliase Y-23 e 0,4% de Driselase (solução 2), com osmolaridade de 0,7 M.

Palavras-chave: Poliploidia, Protoplastos, Colchicina, Orizalina, Framboeseira

ABSTRACT

Biotechnological tools to support *Rubus* spp improvement

Among the so-called small fruits, raspberry is the third most cultivated species in the world. However, the expansion of its cultivation in countries with a tropical climate, such as Brazil, faces some obstacles, such as the use of imported cultivars adapted to a temperate climate and phytosanitary problems, such as Late Leaf Rust (*Pucciniastrum americanum*), considered the main disease of the crop. In order to mitigate such problems, the present study aimed at developing biotechnological tools to support the *in vitro* improvement of raspberry species (*Rubus* spp.), through two studies: The first study involved the *in vitro* polyploidy induction of red raspberry nodal segments cv. Heritage, using colchicine and oryzalin as chemical agents, to which nodal segments of plants kept *in vitro* were treated in liquid medium containing four concentrations of colchicine (0; 0.05; 0.1 and 0.2%) in two exposure times (24 and 48 hours) and four concentrations of oryzalin (0; 10; 20 and 40 μM) in two exposure times (4 and 7 days). The second study involved obtaining and cultivating callus, isolating, and cultivating protoplasts of raspberry species from callus (*R. idaeus* and *R. niveus*) and leaf mesophyll cells (*R. idaeus*). For the experiment to obtain calli, leaf discs obtained from plants kept in a greenhouse were introduced into a culture medium containing combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) (0; 1 and 2 mg L^{-1}) with 1-naphthaleneacetic acid (ANA) (0; 1 and 2 mg L^{-1}) or dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0; 1 and 2 mg L^{-1}), which were evaluated after 40 days of cultivation. For the experiments of isolation of protoplasts with calli, combinations of enzymes were tested (1. 0.25% of Cellulase "Onokuza" RS; 0.025% of Pectoliase Y-23 and 2% of Driselase. 2. 1% of Cellulase "Onokuza" RS; 0.5% of Macerozyme R-10; 0.1% of Pectolyase Y-23 and 0.4% of Driselase. 3. 1% of Celulase "Onokuza" RS; 1% of Macerozyme R-10 and 0, % of Pectolyase Y-23), enzyme osmolarity (0.7; 0.8 and 1 M) and isolation temperature (25 and 28°C) and for the isolation experiments with leaves, combinations of enzymes and enzyme osmolarity (the same mentioned above). It was concluded that *in vitro* polyploidy induction of nodal segments of red raspberry cv. Heritage using 0.05% colchicine for 24 hours was the most effective treatment to obtain tetraploid plants; the use of 0.2% colchicine was completely lethal to the explants; oryzalin caused less phytotoxicity to the explants when compared to colchicine, allowing a greater number of regenerated plants; the use of culture medium added with 1 or 2 mg L^{-1} of naphthalene acetic acid (NAA) is the most indicated for calli induction on red raspberries (*Rubus idaeus* cv. Heritage) and that the use of 1 or 2 mg L^{-1} of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is the most suitable for inducing callus in black raspberry (*Rubus niveus*); the isolation of protoplasts from red raspberry cv. Heritage (*Rubus idaeus*) from friable calli was more effective with the use of an enzymatic solution containing 0.25% of Celulase "Onozuka" RS, 0.025% of Pectoliase Y-23 and 2% of Driselase (solution 1), with osmolarity of 0.7 M and insulation temperature of 25°C; the isolation of black raspberry (*Rubus niveus*) protoplasts from friable calli was more effective when using an enzymatic solution containing 0.25% of Celulase "Onozuka" RS, 0.025% of Pectolyase Y-23 and 2% of Driselase (solution 1), with osmolarity of 1 M and isolation temperature of 28°C; and that the isolation of protoplasts from red raspberry cv. Heritage (*Rubus idaeus*) from leaf mesophyll cells was more effective when using an enzymatic solution of 1% Cellulase "Onozuka" RS,

0.5% Macerozyme R-10, 0.1% Pectolyase Y-23 and 0.4 % Driselase (solution 2), with osmolarity of 0.7 M.

Keywords: Polyploidy, Protoplasts, Colchicine, Oryzalin, Raspberry

1. INTRODUÇÃO

O setor de fruticultura apresenta grande importância para a economia brasileira pela sua participação expressiva no mercado interno e nas exportações. Nas décadas recentes, as oportunidades de exportação, devido às diferenças nos períodos de safra nos principais países produtores do hemisfério norte, e a busca por alternativas que atendam à demanda por novas fontes geradoras de renda na propriedade rural, têm acarretado o aumento do interesse por pequenas frutas como opção de cultivo, haja vista também as qualidades nutracêuticas apresentadas por elas. Dentre estas, o cultivo das chamadas pequenas frutas e frutas vermelhas de clima temperado, a exemplo da amora-preta (*Rubus* spp.), da framboesa (*Rubus idaeus*), do mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) e do morango (*Fragaria* x ananassa Duch.), embora ainda pouco expressivo, tem mostrado grande potencial de expansão (Fachinello et al. 2011; Raseira et al. 2004).

Dentre os pequenos frutos, a framboeseira é a terceira espécie mais cultivada no mundo, com uma área colhida de 112 mil hectares em 2020, estando atrás apenas do morango, com 384 mil de hectares colhidos e do mirtilo, com 126 mil hectares colhidos. A Rússia é o maior produtor de framboesa do mundo, com 182 mil toneladas, seguida pelo México, com 146 mil toneladas e pela Polônia, com 122 mil toneladas produzidas. Na América do Sul, o Chile detém a maior produção, com 15 mil toneladas, estando na décima posição no ranking mundial (FAO, 2022). No Brasil, os dados de produção e área de cultivo são escassos, porém, estima-se uma área de cerca de 400 hectares, sendo o entorno de Vacaria/RS a maior região produtora, com cerca de 150 hectares (Caminiti e Pagot 2016). Há ainda registros de áreas de cultivo pelos estados de Minas Gerais e São Paulo (Tiberti et al. 2015).

Alguns dos motivos do entrave para a exploração da cultura no Brasil são as limitações quanto à disponibilidade de cultivares adaptadas e a falta de conhecimentos técnicos sobre a cultura, uma vez que se trata de uma espécie extremamente sensível ao clima, principalmente, com relação à elevada pluviosidade e alta umidade relativa do ar encontrada, especialmente, no Sul do Brasil (Raseira et al. 2004), região de maior produção, podendo levar à ocorrência de doenças, como a ferrugem (*Pucciniastrum americanum*), uma das principais da cultura. Além disso, não existem produtos fitossanitários registrados para a cultura no Brasil, o que também limita sua produção e expansão no país (Abaurre et al. 2017).

A formação de pomares de framboeseira representa uma possibilidade de renda para pequenos produtores. Trata-se de uma cultura com baixo custo de implantação e que possui facilidade de manejo em campo, sendo o retorno financeiro para o produtor iniciado já a partir do oitavo mês após o plantio, a depender da cultivar. Além disso, com o agroturismo em alta, um

pomar de framboeseira pode agregar valor à produção, a qual pode ser destinada tanto ao mercado de frutas *in natura*, quanto para a indústria (Antunes 2002).

O cultivo de framboeseira no Brasil tem utilizado variedades comerciais importadas da Europa, as quais já perderam suas respectivas proteções (varietais), não sendo mais necessário pagamento de royalties. Entretanto, estas cultivares estão ultrapassadas por novos materiais genéticos em relação a sua capacidade de resistência a pragas e doenças, produção e qualidade. O desenvolvimento de programas de melhoramento permitirá o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às condições brasileiras de ambiente e mercado, quebrando o ciclo de dependência de materiais importados e ultrapassados. No Brasil, a Embrapa Clima Temperado tem desenvolvido trabalhos voltados ao melhoramento genético com a cultura da framboesa, porém, ainda não se desenvolveu uma cultivar de origem brasileira.

O melhoramento do gênero *Rubus* em geral, enfrenta desafios de natureza genética, tais como incompatibilidade de pólen e baixa germinação de sementes (Graham e Jennings 2009). Por este motivo, os programas de melhoramento de framboeseiras vermelhas utilizam outras espécies para incorporação de características desejáveis. No entanto, as hibridações entre framboeseiras vermelhas e outras espécies podem apresentar variação na fertilidade e exibir incompatibilidade unilateral (Daubeny 1996). Visando contornar as barreiras do melhoramento genético convencional, o uso de ferramentas biotecnológicas pode contribuir no desenvolvimento de variedades melhoradas. Considerando-se que a formação natural de poliploides ocorre em baixa frequência, o uso da poliploidia induzida tem crescido nos programas de melhoramento. Esse procedimento ocorre através do uso de agentes químicos capazes de atuar no ciclo mitótico ou por processos de junção de núcleos por fusão de protoplastos (hibridação somática). O interesse sobre os híbridos produzidos pela poliploidização de inúmeras espécies tem levado ao aprimoramento das técnicas utilizadas (Dhooghe et al. 2011).

O processo de indução de poliploidia por agentes químicos é realizado com a utilização de substâncias antimitóticas, as quais dificultam a polimerização do fuso mitótico, levando a divisão celular sem redução no número de cromossomos recém duplicados (Eng e Ho 2019). Produtos químicos, tais como colchicina e orizalina, estão entre os agentes antimitóticos que podem ser precursores da poliploidia (Dhooghe et al. 2011).

A poliploidia induzida por hibridação somática (fusão de protoplastos), por outro lado, é uma técnica que permite modificar células vegetais mediante fusões nucleares ou citoplasmáticas e obter híbridos interespecíficos, intergenéricos, de genitores compatíveis ou não, ou ainda, cíbridos (Calixto et al. 2004). A técnica possibilita a introdução de características agrônômicas desejáveis em materiais melhorados, o que a torna uma ferramenta muito útil para o melhoramento genético,

servindo como alternativa complementar para os programas tradicionais (Miranda et al. 1997). Para que a técnica possa ser realizada, é importante que um protocolo eficiente de isolamento e cultivo de protoplastos seja previamente estabelecido, a fim de garantir a qualidade e rendimento de protoplastos a serem utilizados na fusão.

Tendo em vista que os resultados de pesquisas envolvendo a poliploidia induzida por agentes químicos possibilitarão o desenvolvimento de uma cultivar de framboesa de origem nacional, e que pesquisas envolvendo o isolamento e cultivo de protoplastos serão de suma importância para que novos estudos envolvendo a hibridação somática por fusão de protoplastos com genótipos de framboesa sejam realizados, buscou-se, neste trabalho, desenvolver de ferramentas biotecnológicas visando apoio ao melhoramento *in vitro* de espécies de framboeseira (*Rubus* spp.).

2. CONCLUSÕES

A indução de poliploidia *in vitro* de segmentos nodais de framboeseira vermelha cv. Heritage utilizando 0,05% de colchicina por 24 horas foi o tratamento mais eficaz na obtenção de tetraploides.

O uso de colchicina à 0,2% foi completamente letal aos explantes.

A orizalina acarretou menos fitotoxidez aos explantes quando comparada à colchicina, possibilitando maior número de plantas regeneradas.

O uso de meio de cultura adicionado de 1 ou 2 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) é o mais indicado para indução de calos de framboeseira vermelha (*Rubus idaeus* cv. Heritage).

O uso de meio de cultura adicionado de 1 ou 2 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é o mais indicado para indução de calos de framboeseira negra (*Rubus niveus*).

O isolamento de protoplastos de framboeseira vermelha cv. Heritage (*Rubus idaeus*) a partir de calos friáveis foi mais eficaz ao utilizar solução enzimática contendo 0,25% de Celulase “Onozuka” RS, 0,025% de Pectoliase Y-23 e 2% de Driselase (solução 1), com osmolaridade de 0,7 M e temperatura de isolamento de 25°C.

O isolamento de protoplastos de framboeseira negra (*Rubus niveus*) a partir de calos friáveis foi mais eficaz ao utilizar solução enzimática contendo 0,25% de Celulase “Onozuka” RS, 0,025% de Pectoliase Y-23 e 2% de Driselase (solução 1), com osmolaridade de 1 M e temperatura de isolamento de 28°C.

O isolamento de protoplastos de framboeseira vermelha cv. Heritage (*Rubus idaeus*) a partir de células do mesófilo foliar foi mais eficaz ao utilizar solução enzimática 1% de Celulase “Onozuka” RS, 0,5% de Macerozima R-10, 0,1% Pectoliase Y-23 e 0,4% de Driselase (solução 2), com osmolaridade de 0,7 M.

REFERÊNCIAS

- Abaurre ME, Zanuncio Junior JS, Balbino JMS, Guarçoni RC, Costa H (2017) **Framboeseira**: cultivo e pós-colheita na Região Serrana do Espírito Santo. Vitória: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper, Documentos, 253). 24p.
- Agogbua JU, Ekeke C (2017) *In vitro* polyploidization of *Zehneria capillacea* (Shumach.) C. Jeffrey using nodal explants. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology** 13:1-13. <https://doi.org/10.9734/JABB/2017/28686>
- Allard RW (1971) Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blücher, 381p.
- Antunes LEC (2002) Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural** 32:151-158. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100026>
- Arturo RD, Andrea A, Pedro R, Bryan R, Gooty JM (2016) Obtaining protoplasts from leaf tissue plantlets of *Rubus glaucus* benth (blackberry) to develop proembryos. **Indian Journal of Science and Technology**, 9:1-8. <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i10/81983>
- Avila-Peltroche J, Won BY (2020) Protoplast production from *Sphacelaria fusca* (Sphacelariales, Phaeophyceae) using commercial enzymes. **J Mar Biosci Biotechnol** 12:50-58 <https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.1.050>
- Calixto MC, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ, Vieira MLC (2004) Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. **Pesq. Agropec. Bras** 39:721-724. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000700015>
- Canhoto JM (2010) Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra. 408 p. <https://doi.org/10.14195/978-989-26-0404-6>
- Castelblanque L, García-Sogo B, Pineda B, Moreno V (2010) Efficient plant regeneration from protoplasts of *Kalanchoe blossfeldiana* via organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 100:107-112. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9617-8>
- Castro LM, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ (2011) Eficiência de isolamento e de plaqueamento de protoplastos de laranja-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33:509-516. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000074>
- Chaikam V, Molenaar W, Melchinger AE, Boddupalli PM (2019) Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics** 132:3227–3243. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03433-x>
- Chawla HS (2010) Introduction to Plant Biotechnology (3rd Ed.). Enfield: Science Publishers.
- Cimen B (2020) Efficient protoplast isolation from ovule-derived embryogenic callus in *Citrus volkameriana*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 44:567-576. <https://doi.org/10.3906/tar-1912-16>
- Caminiti A, Pagot E (2016) Produção de Framboesa. In: Rufato A, Antunes LEC Técnicas de produção de framboesa e mirtilo. **Embrapa Clima Temperado-Livro técnico** (INFOTECA-E), 11-31.
- Compton ME, Saunders JA, Veilleux RE (2000) Use of protoplast for plant improvement. In: Trigiano RN, Gray DJ eds. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise. CRC Press, Boca Raton, USA. p.249-261.
- Conde P, Santos C (2006) An efficient protocol for *Ulmus minor* Mill. protoplast isolation and culture in agarose droplets. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 86:359-366. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9122-2>
- Cousineau JC, Donnelly DJ (1991) Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 27:249-255 <https://doi.org/10.1007/BF00157588>

- Daubeny HA. (1996) Brambles. In: Janick J, Moore JN (Eds.) **Fruit Breeding**, Vol. II: Vine and Small Fruits, New York: John Wiley & Sons, Inc. 2:109-190.
- Dhooghe E, Laere KV, Eeckhaut T, Leus L, Huylenbroeck JV (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 104:359-373 <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>
- Duquenne B, Eeckhaut T, Werbrouck S, Van Huylenbroeck J (2007) Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 91:165-173 <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9226-3>
- Eeckhaut T, Samyn G, Van Bockstaele E (2002) *In vitro* polyploidy induction in *Rhododendron simsii* hybrids. **Acta Horticulturae** 572:43-49 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.572.4>
- Dutra L, Da Silva NDG, Donini L, Nino A, Da Silva FOX, Vieira F (2012). Protocolos de micropropagação de plantas III: framboesira. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 21p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 341).
- Eng, WH, Ho WS (2019). Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. **Scientia horticulturae** 246:604-617 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>
- Eng WH, Ho WS, Ling KH (2021) Effects of colchicine treatment on morphological variations of *Neolamarckia cadamba*. **International Journal of Agricultural Technology** 171:47-66
- Evans DA, Bravo JE (1983) Protoplast isolation and culture. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: McMillan Press 1:124-176.
- Fachinello JC, Pasa MDS, Schmitz JD, Betemps DL (2011) Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33:109-120. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500014>
- FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://faostat.org.br>>. Acesso em: 15 de abr. 2022.
- Fizree MPMAA, Shaharuddin NA, Ho CL, Abd-Manaf MA, Parveez GKA, Masani MYA (2021) Efficient protocol improved the yield and viability of oil palm protoplasts isolated from in vitro leaf and mesocarp. **Scientia Horticulturae** 290:110522 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110522>
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973) The isolation, culture and regeneration of Petunia leaf protoplasts. **Developmental Biology** 33:130-137 [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90169-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90169-3)
- Gallone A, Hunter A, Douglas GC (2014) Polyploid induction in vitro using colchicine and oryzalin on Hebe 'Oratia Beauty': Production and characterization of the vegetative traits. **Scientia Horticulturae** 179:59-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.014>
- Geier, T. (2012) Chimeras: properties and dissociation in vegetatively propagated plants. **Plant mutation breeding and biotechnology**. p.191-201. <https://doi.org/10.1079/9781780640853.01>
- George EF, Hall MA, Klerk GJ (2008) Plant propagation by tissue culture. Dordrecht: SPRINGER, 3 ed., 1:502p.
- Graham J, Jennings N (2009) Raspberry breeding. In: Jain SM, Priyadarshan PM. **Breeding Plantation Tree Crops: temperate species**. New York: Springer-Verlag 233-248.
- Grooser JW, Chandler JL (1987) Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus* × *Poncirus* Hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. **Scientia Horticulturae** 31:253-257 [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(87\)90050-1](https://doi.org/10.1016/0304-4238(87)90050-1)
- Grooser JW, Gmitter Jr FG (1990) Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant breeding reviews**. 8:339-374
- Haihong C, Weizhou C, Jingyi S, Zepan C (2018) Isolation and callus formation of *Gracilariaopsis bailiniae* (Gracilariiales, Rhodophyta) protoplasts. **Journal of Oceanology and Limnology** 36:2268-2277 <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7217-y>

- Huy BP, Landi L, Taruschio L, Mott D, Mezzetti B, Rosati P (1997) Protoplast isolation, culture and cell differentiation in raspberry and blackberry cultivars (*Rubus* spp.). **Angewandte Botanik** 71:131-137
- Huy NP, Luan VQ, Tung HT, Hien VT, Ngan HTM, Duy PN, Nhut DT (2019) *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. **Scientia horticultrae** 252:283-290. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.063>
- Iannicelli J, Guariniello J, Tossi VE, Regalado JJ, Di Ciaccio L, van Baren CM, Álvarez SP, Escandón AS (2020) The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. **Scientia Horticulturae** 260:108854. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108854>
- Infante R, Iasi R, Bernardi G, Rosati P (1993) Isolation and culture of blackberry protoplasts (*Rubus* sp.) var. Hull Thornless, **Acta Horticulturae**, 352:345-351. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.352.49>
- Isac V, Popescu AN (2009) Protocol for *in vitro* micropropagation of raspberry, and plant regeneration by organogenesis. In: Mezzetti B, Ružič D, Gajdosova A. (Eds.) A Guide to Some *In Vitro* Techniques - Small Fruits. 863:116. Brussels: Cost
- Jia XY, Zhang XH, Qu JM, Han R (2016) Optimization conditions of wheat mesophyll protoplast isolation. **Agricultural Sciences** 7:850-858. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2016.712077>
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta** 126:105-110 <https://doi.org/10.1007/BF00380613>
- Kerbaui GB (1999) Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: Tôrres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1999. v.2. p. 519-531.
- Khosravi P, Kermani MJ, Nematzadeh GA, Bihanta MR, Yokoya K (2008) Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of Rosa. **Euphytica** 160:267-275 <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9571-7>
- Kielkowska A, Adamus A (2018) Peptide growth factor phytosulfokine- α stimulates cell divisions and enhances regeneration from *B. oleracea* var. *capitata* L. protoplast culture. **Journal of Plant Growth Regulation** 86:1-14. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9903-y>
- Klimek-Chodacka M, Kadluczka D, Lukasiewicz A, Malec-Pala A, Baranski R, Grzebelus E (2020) Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 143:693-707. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01953-9>
- Latado RR, Cristofani-Yaly M, de Carvalho CR, Machado MA (2007) Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42:1429-1435. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000009>
- Lam HK, Harbard JL, Koutoulis A (2014) Tetraploid induction of *Acacia crassicarpa* using colchicine and oryzalin. **Journal of Tropical Forest Science** 26:347-354.
- Ling AP, Phua GA, Tee CS, Hussein S (2010) Optimization of protoplast isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. **Journal of Medicinal Plants Research** 4:1778-1785. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.053>
- Liu J (2005) Protoplast isolation and culture of woody plants. In: S.M. Jain, P.K. Gupta (Eds.). Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Springer, Dordrecht 77: 553-566
- Lopez-Arellano M, Dhir S, Albino NC, Santiago A, Morris T, Dhir SK (2014) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Stevia rebaudiana*. **Biotechnol. J. Int.** 5:1-12. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2015/13884>
- Maheshwari SC, Gill R, Maheshwari N, Gharyal PK (1986) **Isolation and Regeneration of Protoplasts from Higher Plants**. In: J. Reinert, H. Binding (Eds.), Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells, Results and Problems in Cell Differentiation. 12:3-36. Berlin: Springer.

- Mei XD, Shen YB (2017) *Nitraria sibirica* cell suspension culture: establishment, characterization and application. **J. Forest. Res.** 28:935-942 <https://doi.org/10.1007/s11676-017-0367-x>
- Menezes-Sá TSA, Arrigoni-Blank MF, da Costa AS, Santos-Serejo JA, Blank AF, Soares CA, Moura GMS (2019) Chromosome doubling in *Cattleya tigrina* A. Rich. **Scientia Plena** 15:11. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2019.110202>
- Miguel TP, Leonhardt KW (2011). *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. **Scientia Horticulturae** 130:314-319. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.002>
- Miranda M, Motomura T, Ikeda F, Ohgawara T, Saito W, Endo T, Omura M, Moriguchi T (1997) Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. **Plant Cell Reports** 16:401- <https://doi.org/10.1007/BF01146782>
- Mondin M, Silva PAKXM, Latado RR, Mourão Filho FAA (2018) *In vitro* induction and regeneration of tetraploids and mixoploids of two cassava cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 18:176-183 <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332018v18n2a25>
- Mukhtar I, Bajwa R, Nasim G (2012) Isolation of Mesophyll Protoplasts from Leaves of *Dalbergia sissoo* Roxb. **J Appl Sci Environ Manage** 16:11-15.
- Murashige T, Skoog E (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15:473-497
- Niazian M, Nalousi AM (2020) Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 142:447-469. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01888-1>
- Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. **Cell** 131:452-462 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>
- Povedano L, Henrique FH, Neto AT, Latado RR (2017) Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes. **Citrus Research & Technology** 33:65-74. <https://doi.org/10.5935/2236-3122.20120008>
- Preece JE (2010) Micropropagation in stationary liquid media. **Prop. Orn. Plants** 10:183-187.
- Rao KS, Prakash AH (1995) A simple method for the isolation of plant protoplasts. **Journal of Biosciences** 20:645-655. <https://doi.org/10.1007/BF02703304>
- Raseira MD, Gonçalves ED, Antunes L (2004) Aspectos técnicos da cultura da framboeseira. Embrapa Clima Temperado-Documents (Documento 120). 22p.
- Rezazadeh R., Randall P. Niedz (2015). Protoplast isolation and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) using experiments in mixture-amount design. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 122:585-604 <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0790-7>
- Sabooni N, Gharaghani A, Jowkar A, Eshghi S (2022) Successful polyploidy induction and detection in blackberry species by using an *in vitro* protocol. **Scientia Horticulturae** 29:110850 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110850>
- Sabzehzari M, Hoveidamanesh S, Modarresi M, Mohammadi V (2019) Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago psyllium*. **Plant Cell Tissue Organ Cult** 139:131–137. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00846-x>
- Schmidt-Durán A, Alvarado-Ulloa C, Chacón-Cerdas R, Alvarado-Marchena LF, Flores-Mora D (2016) Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schtdl.) and its microscopic analysis. **SpringerPlus** 5:1-9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3381-0>
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. **Chromosomal Evolution in Higher Plants** London: Edward Arnold 216p.

- Tiberti AS, Bianchini FG, Pio R, Curi PN, Moura PHA, Tadeu MH (2015). Armazenamento a frio e aplicação de reguladores vegetais no enraizamento de estacas radiculares e caulinares de framboeseira. **Ciência Rural** 45:1445-1450. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131502>
- Usman M, Fatima B, Usman M, Samad WA, Bakhsh K (2012). Embryo culture to enhance efficiency of colchicine induced polyploidization in grapefruit. **Pak. J. Bot** 44:399-405.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature Protocols** 2:1565-1572.
- Zhang T, Tang H, Vaylonis D, Cosgrove DJ (2019) Disentangling loosening from softening: insights into primary cell wall structure. **Plant J** 100:1101–1117. <https://doi.org/10.1111/tpj.14519>