EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *CITRUS* spp.

MÁRCIO LEANDRO TOMAZ
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro – 2000

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

Tomaz, Márcio Leandro
Embriogênese somática em *citrus* spp. / Márcio Leandro Tomaz. - - Piracicaba, 2000.
60 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Calo embriogênico 2. Embriogênese somática 3. Fisiologia vegetal 4. Fruta cítrica 5. Histologia vegetal 6. Linhagem genética 7. Melhoramento genético I. Título

CDD 634.3

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

A amizade é como dois espíritos que se tocam, mesmo que estejam viajando por diferentes países; compartilham o que encontram, mas sem querer atrapalhar os passos um do outro. Ela é como duas árvores que se protegem mutuamente do vento, dando-se força e coragem para enfrentar as tempestades da vida. A amizade é como um cálice cheio de amor, que se derrama quando dar é mais importante que receber.

A minha mãe - Maria - e irmãs - Patricia e Gisele -
por toda a força e compreensão...

ofereço

Agradecimentos

Agradeço as pessoas e instituições, que possibilitaram direta ou indiretamente o desenvolvimento do trabalho:

À Prof. Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes, pela orientação, disponibilidade e atenção durante a realização da pesquisa.

À Prof. Dra. Adriana P. M. Rodriguez, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho, sugestões e atenção.

Ao Prof. Dr. Francisco de A. Assis Mourão Filho, do Laboratório de Propagação de Plantas da ESALQ, pelas sugestões e acompanhamento do trabalho .

À Prof. Dra. Clarice Borges Demétrio, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Alessandra C.B.A. Monteiro Hara, pela amizade e disponibilidade para instruir nas técnicas fotográficas.

À Mônica Lanzoni Rossi, técnica do laborátorio de Histopatologia Vegetal, pela amizade e disponibilidade.

Aos professores e amigos Maria Angélica P. de Carvalho e Weliton A. Bastos de Almeida (Escola de Agronomia da UFBA).

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal e companheiros de trabalho – Paulo Celso de Mello Farias, Liliane C. Libório Stipp, Silvia Balbão Filippi, Sandra C. Capaldi Arruda, e estagiários – , e aos colegas do laboratório de Propagação de Plantas – Vagner A. Benedito, Adriana P. Ricci e Fernanda J. Mendes-da-Glória.

Ao João Geraldo Brancolin, laboratório de instrumentação e informática (CENA/USP).

À Marília Henyei, bibliotecária chefe (CENA/USP), pela revisão das referências bibliográficas.

À Biblioteca do CENA/USP e a Biblioteca Central da ESALQ/USP.

À FAPESP, pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS vi
LISTA DE TABELAS viii
RESUMO x
SUMMARY xii

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 A cultura dos Citros 3
2.2 Cultura de calos e embriogênese somática em *Citrus* 5

3 MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1 Efeito de diferentes açúcares no estímulo à embriogênese somática em calos embriogênicos de citros 15
3.2 Efeito da densidade de plaqueamento dos calos no estímulo à embriogênese somática em calos embriogênicos de citros 16
3.3 Efeito do inibidor de auxina, 7- azaindole (AZI) no estímulo à embriogênese somática em calos embriogênicos de citros..... 16
3.4 Pré-germinação e desenvolvimento dos embriões somáticos ... 17

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 19
4.1 Estímulo à embriogênese somática 19
4.2 Desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos 29

5 CONCLUSÕES 45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

LISTA DE FIGURAS

Página

1 Estímulo à embriogênese somática, em diferentes linhagens de calos citros utilizando-se de meio de cultura suplementado com maltose (37 mM) 22

2 Efeito do inibidor de auxina, 7-azaindole, no estímulo à embriogênese somática de três linhagens de calos de citros 28

3 Morfologia e caracterização histológica de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha', desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM) 30

4 Morfologia e caracterização histológica de embriões somáticos de laranja 'Valência', desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM) 31

5 Embriões somáticos de limão 'Cravo', desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM) 33

6 Embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra' linhagem 1, desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM)..... 34

7 Embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra' linhagem 2, desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM)..... 35

LISTA DE TABELAS

Página

1 Efeito de diferentes fontes de carboidratos, no estímulo à embriogênese somática, em 5 linhagens de calo embriogênico de *Citrus* spp..... 21

2 Efeito da densidade de plaqueamento de calo no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2..... 23

3 Efeito da densidade de plaqueamento de calo no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de limão 'Cravo'..... 24

4 Efeito do 7-azaindole (AZI), no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de limão 'Cravo' 26

5 Efeito do 7-azaindole (AZI), no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2 26

6 Efeito do 7-azaindole (AZI), no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 27

7 Efeito de diferentes concentrações de sacarose, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Valência' 37

8 Efeito de diferentes concentrações de sacarose, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha' 38

9 Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha' 42

10 Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Valência'..... 43

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Citrus* spp.

Autor: MÁRCIO LEANDRO TOMAZ
Orientadora: Profa. Dra. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

RESUMO

O trabalho teve como objetivo o estudo ao estímulo à embriogênese somática em linhagens de calos de laranja 'Seleta Vermelha', laranja 'Valência', laranja 'Caipira' , limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', linhagens 1 e 2, pela utilização de diferentes fontes de carboidratos. Nas linhagens de calos, com baixo potencial embriogênico também estudou-se o efeito do inibidor de auxina 7- azaindole (AZI), e densidade de plaqueamento de calos. O meio de cultura utilizado no estímulo à embriogênese somática, foi descrito por Murashige & Tucker (1969), substituindo-se a fonte de carboidrato por maltose, lactose, galactose, sacarose, glicose, nas concentrações de 18; 37; 75; 110 ou 150 mM, ou glicerol, nas concentrações de 6; 12; 24; 36 ou 50 mM. Os resultados obtidos, demonstraram que a maior eficiência para o estímulo à embriogênese somática ocorreu em meio de cultura suplementado com maltose, galactose ou lactose, para as linhagens de calo de laranjas 'Valência' e 'Caipira', e tangerina 'Cleópatra', linhagem 1. Para as linhagens de calos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, foram testados o inibidor de auxina, AZI, e a densidade de plaqueamento de calo, os quais demonstraram estar na dependência do açúcar para induzir a formação dos embriões somáticos. Pela análise histológica, pôde-se verificar que embriões somáticos de limão 'Cravo' e das

tangerinas 'Cleópatra', linhagens 1 e 2, apresentaram ausência de meristemas caulinar e/ou radicular, má formação da protoderme e do procâmbio. A histodiferenciação dos embriões somáticos, e a conversão em plantas foram obtidos para as laranjas 'Valência' e 'Seleta Vermelha', sendo observado um maior número de plantas nos embriões somáticos que permaneceram em meio de cultura de pré-germinação com 44 mM de sacarose. Com relação a concentração de ácido giberélico no meio de cultura para a germinação, obteve-se para a laranjas 'Valênca' e 'Seleta Vermelha', 23% e 51,4% de plantas germinadas em meio de cultura com concentração de 1,4 μM ácido giberélico, 17% e 60% de plantas germinadas e meio de cultura com concentração de 2,8 μM ácido giberélico, e 14% e 51,4% de plantas germinadas e meio de cultura com concentração de 1,4 μM ácido giberélico.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Citrus* spp.

Author: MÁRCIO LEANDRO TOMAZ
Adviser: Dr. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

Summary:

This work aimed to study the induction somatic embryogenesis induction in callus lines of 'Seleta Vermelha', 'Valência' and Caipira sweet oranges, Rangpur lime and Cleopatra mandarin, lines 1 and 2, using different carbohydrate sources. In callus lines with low embryogenic potential, the effect of the auxin inhibitor 7-azaindole (AZI) and callus platting density were studied as well. The culture medium used for induction of somatic embryogenesis was described by Murashige & Tucker (1969), exchanging the carbohydrate source by maltose, lactose, galactose, sucrose or glucose at concentrations of 18; 37; 75; 110 ou 150 mM, or glycerol, at concentrations of 6; 12; 24; 36 ou 50 mM. The results obtained showed that the highest efficiency for somatic embryogenesis stimulation occurred in the culture medium supplemented with maltose, galactose or lactose, for callus lines of 'Valencia' and Caipira sweet orange and Cleopatra mandarin, lines 1. For lines Rangpur lime and Cleopatra mandarin line 2, the auxin inhibitor AZI and the callus platting density were tested, demonstrating that the stimulation of somatic embryogenesis depends on the sugar. Histological analysis verified that somatic embryos of Rangpur lime and Cleopatra mandarin, lines1 and 2 had absence of shoot and/or root

deformation of protoderm and procambium. Histodifferentiation of somatic embryos and conversion in plants were obtained for 'Seleta Vermelha' and 'Valencia' sweet oranges, with a higher number of plants from somatic embryos which were maintained in pre-germination culture medium whit 44 mM sucrose. The use of gibberellic acid in the culture medium for germination resulted in 23% and 51.4% of germinated plants for 'Valencia' and 'Seleta Vermelha' sweet oranges in culture medium with 1,4 μM gibberellic acid, and 17% and 60% of plants germinated in culture medium with 2,8 μM gibberellic acid, and 14% and 51,4% of plants germinated in culture medium with 1,4 μM gibberellic acid.

1 INTRODUÇÃO

As plantas cítricas, *Citrus spp.*, são originárias das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático e ilhas adjacentes (Weber, 1967; Gmitter Junior et al., 1992), tendo sido levadas para os países europeus há séculos, antes da descoberta do novo continente, sendo hoje cultivadas no mundo todo, em países tropicais e subtropicais entre as latitudes 40^0 N e 40^0 S (Kunitake & Mii, 1995).

No Brasil, o desenvolvimento e a expansão inicial da citricultura ocorreu a partir da década de 20, aproveitando as condições de infra-estrutura deixadas pelo complexo cafeeiro, recebendo um impulso maior, no ano de 1962, pela queda na produção americana ocasionada pelas geadas na Flórida, estimulando assim a instalação de indústrias extratoras de suco no país (Kalatzis et al., 1996).

Hoje o Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com aproximadamente 18 milhões de ton. métricas, seguidos pelos E.U.A e Espanha (FNP Consultoria & Comércio, 1999). Apesar desta produção, existe a necessidade do desenvolvimento e melhoramento das variedades porta-enxerto e copa de interesse comercial, principalmente no que diz respeito a resistência a doenças, produtividade e qualidade dos frutos, para assim, ampliar a base genética dos pomares comerciais .

Os métodos tradicionais de melhoramento genético, enfrentam uma série de barreiras decorrentes da biologia reprodutiva do gênero, como o longo período juvenil, a poliembrionia nucelar, a auto-incompatibilidade e esterilidade sexual (Louzada, 1990; Gmitter Junior et al., 1992; Ollitrault et al., 1995; Machado, 1997), que podem ser contornados pela utilização de técnicas

modernas de biotecnologia como a hibridação somática. O material básico utilizado na hibridação somática é o calo embriogênico, com capacidade de regeneração de plantas via embriogênese somática.

Embora a embriogênese somática seja um processo natural em citros (Ranga Swamy, 1958), onde a indução dos embriões somáticos, a partir de calos cultivados *in vitro*, é muitas vezes relatada como sendo um processo que ocorre espontaneamente (Grosser & Gmitter Junior, 1990), sabe-se que o processo precisa ser melhor estudado, identificando características específicas de cada variedade, como o desenvolvimento de um sistema eficiente de regeneração de plantas, que possa ser utilizado na manipulação genética de genótipos de citros.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a embriogênese somática em linhagens de calos embriogênicos de citros, incluindo as etapas de indução, desenvolvimento e regeneração de plantas, além da caracterização histológica dos embriões somáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura dos Citros

O Brasil ocupa posição de destaque na citricultura mundial, por ser o maior produtor de laranjas, com aproximadamente 18 milhões de toneladas métricas, e de suco concentrado, com 1258 milhões de toneladas métricas, sendo deste total de suco concentrado 96% exportado, gerando em torno de 1,3 bilhões de dólares. Dentre as regiões produtoras de citros, a região Sudeste é considerada a maior produtora de laranja, contribuindo com 83% da produção nacional, sendo que o Estado de São Paulo produz 79% deste total, seguido pela região Nordeste, a qual contribui com 9,87% da produção nacional (FNP Consultoria & Comércio, 1999).

No Estado de São Paulo, a citricultura encontra-se entre as principais atividades econômicas, ocupando aproximadamente 850 mil hectares, sendo os maiores municípios produtores, segundo estimativa dos escritórios de desenvolvimento rural para o ano agrícola 1999/2000, Araraquara, Barretos, Catanduva, Jaboticabal, Limeira e Mogi Mirim (Instituto de Economia Agrícola, 2000). A composição varietal destes pomares, Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, é dividida em 4 variedades de laranjas, 'Pêra' (38%), 'Natal' (26%), 'Valência' (17%) e 'Hamlim' (7%), cujo destino principal é o processamento industrial (Gonçalves et al., 1995; Amaro, et al.,1997). Estas variedades copa, são apoiadas principalmente nos porta-enxertos limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', os quais tem grande representação nos pomares comerciais. Segundo as Divisões Regionais Agrícolas (DIRAS), o limão 'Cravo' compõe 80 a 90% dos porta-enxertos, a tangerina 'Cleópatra' de 5 a 10%, sendo o restante

distribuído em laranja azeda, tangerina 'Sunki', citranges 'Troyer' e 'Carrizo', limão 'Volkameriano', cuja a escolha principal diz respeito a resistência à doenças e a interação copa e porta-enxerto (Gonzalez, 1993).

Vários estudos tem sido realizados para avaliar o conjunto copa porta-enxerto, e várias diferenças foram encontradas com relação a época de maturação e precocidade na produção, resistência a seca, volume de copa e qualidade de fruto (Pompeu Junior, 1991; Stuchi, 1996).

Com relação a doenças, a cultura de citros está sujeita a uma série delas, dentre as quais destacam-se a gomose, a tristeza, o declínio, o cancro cítrico e a clorose variegada dos citros, que tornaram-se fatores limitantes para o seu desenvolvimento, e que vem modificando o cenário da citricultura desde o início de sua exploração econômica, momento no qual, as plantas enxertadas começaram a ser utilizadas.

A laranja 'Caipira' foi o primeiro porta-enxerto a constituir os pomares comerciais de citros, no entanto, sua baixa resistência a seca e a gomose, levaram a sua substituição pela laranja azeda. A gomose, causada por *Phythophytora*, é responsável por lesões no colo do tronco, ramos e raízes, provocando o amarelecimento da planta, queda das folhas, chegando a seca e morte das plantas (Pompeu Junior, 1990).

Em 1937, surgiu o vírus da tristeza, que eliminou em poucos anos, todas as plantas enxertadas em laranja azeda, que representavam cerca de 80% dos pomares, restando apenas as de pé franco, ou enxertadas em laranja 'Caipira' e limão 'Cravo'. O ressurgimento da citricultura, baseada no porta-enxerto limão 'Cravo', começou a enfrentar problemas com doenças, como a xiloporose e exocorte, que até então permaneciam latentes nas árvores enxertadas em laranja azeda (Salibe, 1987).

Por volta de 1970, uma outra doença é detectada nos pomares, o declínio, passando a atingir todos os Estados produtores de citros (Paguio & Santos Filho, 1993). Trata-se de uma doença de causa desconhecida, que afeta o sistema vascular, sendo o limão 'Cravo' altamente sensível a ela, tornando-se

um risco para a citricultura nacional, devido a sua predominância como porta-enxerto (Beretta, et al., 1988).

O cancro cítrico, doença de grande impacto na citricultura, foi detectada no final da década de 70, em Ribeirão Preto, onde de imediato foram tomadas providências para evitar a sua disseminação, como pulverizações a base de substâncias cúpricas, adoção de quebra-ventos no pomar, e em casos mais graves a erradicação das plantas (Pessenda, 1990).

Atualmente a citricultura vem enfrentando uma nova doença, conhecida como clorose variegada do citros (CVC) ou amarelinho, cujo relato data de 1987, a qual trata-se de uma bactéria, *Xylela fastidiosa*, limitada ao xilema, que afeta as principais variedades de valor comercial da citricultura nacional, causando clorose internerval nas folhas semelhante a deficiência de zinco, redução do tamanho do fruto e maior resistência da casca, sendo as cigarrinhas, o principal vetor de disseminação desta doença (Lee & Derrick, 1991).

2.2 Cultura de calos e embriogênese somática em *Citrus*

Os trabalhos de cultura de tecidos em citros iniciaram-se em 1950 (Ranga Swany, 1961), intensificando-se com o desenvolvimento dos meios de culturas MS (Murashige & Skoog, 1962) e MT (Murashige & Tucker, 1969). Os trabalhos visavam principalmente a produção de plantas livres de patógenos, pelo cultivo de tecido nucelar (Rangan et al.,1969), que após, foi substituído pela técnica de microenxertia de meristema apical, a qual tem a vantagem em relação ao cultivo de nucelos, no que diz respeito a juvenilidade das plântulas (Navarro, 1984).

Atualmente, encontram-se descritas na literatura várias técnicas de cultura de tecidos em citros, o cultivo de calos (Mourão Filho & Grosser, 1992; Oliveira et al., 1994a), células em suspensão (Oliveira et al., 1994b; Cabasson et al., 1995) e protoplastos (Kobayashi & Ohgawara, 1988; Grosser & Gmitter Junior,

1990; Mendes-da-Glória et al., 1997) principalmente com o objetivo de facilitar a manipulação genética pela hibridação somática (Grosser & Gmitter Junior, 1990; Grosser, 1993; Ling & Iwamasa, 1994; 1997) e transformação genética (Kobayashi & Uchimiya, 1989; Hiramatsu et al.; 1994; Penã et al., 1995; Penã et al., 1997).

Em citros, a formação de calos foi inicialmente observada em cultivos de nucelos em meios de cultura sem auxina, os quais apresentaram a formação de pequenas massas celulares, que davam origem a embriões somáticos, demonstrando assim, a capacidade embriogênica do material (RangaSwamy, 1961; Kochba et al.,1972; Button et al., 1974). Morfologicamente, os calos podem apresentar-se como nódulos esféricos, compactos e pequenos, ou de textura friável, de coloração branca a creme, sendo internamente caracterizados por células com citoplasma denso, contendo numerosas mitocôndrias, ligações lipídicas, com núcleo grande e nucléolo proeminente (Button et al., 1974)

Dentre os explantes utilizados para obtenção de calos, pode-se citar, óvulos, anteras, endosperma, embriões, hipocótilos, tecido nucelar e óvulos não desenvolvidos (Kochba et al.,1972; Kochba & Button, 1974; Kobayashi et al., 1878; Spiegel-Roy & Saad, 1982; Rangan, 1984; Moore, 1985; Gmitter Junior & Moore, 1986; Pasqual et al., 1988; Handro & Floh, 1990), os quais, geralmente, são cultivados em meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com auxinas, citocininas ou extrato de malte (Kunitake & Mii, 1995).

A eficiência na obtenção de calos, normalmente é baixa, existindo uma forte influência do genótipo, dos explantes utilizados e da composição do meio de cultura. Segundo estudos realizados por Kochba et al. (1972), a produção de calos a partir de nucelos foi considerada baixa, 2%, quando comparada a produção de calos a partir de óvulos não fertilizados, 16%, para a laranja 'Shamouti', sendo que para os outros genótipos testados, 'Valência' e 'Marsh', não ocorreu a produção de calos. Em contrapartida, para a laranja 'Pêra', a

produção de calos ocorreu em maior porcentagem quando foi utilizado como explante inicial os nucelos (Goldman, 1988). Nas variedades de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', a porcentagem de obtenção de calos, foi de 48,8 e 3,8 % respectivamente, enquanto que para o genótipo *Poncirus trifoliata* não ocorreu a formação de calos, mesmo naqueles meios de cultura que utilizaram ácido indolacético ou cinetina (Oliveira et al., 1994a), evidenciando forte influência do genótipo e do explante utilizado.

A utilização de meio de cultura suplementado com diferentes combinações de reguladores vegetais, como NAA e BAP para a laranja 'Bahia', tem demonstrado efeito negativo na formação de calos (Kobayashi et al., 1984), enquanto que a combinação de cinetina e IAA foi eficiente na obtenção de calos de laranja 'Pêra' (Cristofani, 1991). A combinação 2,4-D e BAP tem sido utilizada também, para a obtenção de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de diferentes variedades monoembriônicas (Ling & Iwamasa, 1997), no entanto, a utilização de 2,4-D, para obtenção de calos, tem sido evitado devido a possibilidade de promover alterações cromossômicas e a perda do potencial embriogênico dos calos cultivados (Vardi et al., 1982). Pasqual et al. (1988), observaram, que a adição de auxina e citocinina, promoveu uma redução no processo embriogênico dos nucelos de laranja 'Valência', sendo a produção de calo independente da suplementação destes reguladores vegetais indicando que o material vegetal poderia conter um nível endógeno alto de auxina. Ling & Iwamasa (1997), comparando a efiência de obtenção de calos, observaram crescimento vigoroso de calos em meios de cultura suplementados com adenina ou ácido giberélico e extrato de malte, em relação ao meio de cultura suplementado com 2,4-D, confirmando a capacidade do tecido utilizado em formar calos sem o uso de auxinas.

Uma vez obtidos os calos, eles são geralmente subcultivados em meio de cultura sólido ou líquido, rico em sacarose (Murashige & Tucker, 1969; Kochba & Button, 1974; Hidaka & Omura, 1989) ou suplementado com BAP e extrato de malte (Oliveira, et al., 1994a; Ling & Iwamasa, 1997), para aumentar a

disponibilidade de material. Na maioria das vezes, após um determinado número de subcultivos, que pode variar de 8 a 12 (Kochba & Button, 1974), os calos adquirem habilidade para divisão e crescimento, habituação, devido a uma possível síntese de reguladores vegetais pelas células (Kerbauy, 1999).

A regeneração de plantas em citros, a partir de calos, ocorre via embriogênese somática, isto é, com a formação de embriões semelhantes aos embriões zigóticos os quais se desenvolvem e germinam dando origem a plantas normais (Kunitake et al., 1991; Ling & Iwamasa, 1997; Cabasson et al., 1997).

A embriogênese somática, constitui-se numa via de regeneração de plantas no cultivo *in vitro*, na qual células somáticas desenvolvem-se formando estruturas semelhantes ao embrião zigótico, porém, sem a ocorrência de fusão de gametas. Estas estruturas caracterizam-se pela bipolaridade, ou seja, presença de meristemas caulinar e radicular, e um sistema vascular fechado, sem conexão com o explante (Guerra et al., 1999).

Os embriões somáticos podem ser formados a partir de dois padrões de embriogênese, a direta ou indireta. A embriogênese somática direta, envolve o desenvolvimento de embriões somáticos ou embrióides, a partir do explante, os quais possuem células programadas para a diferenciação e formação dos embriões somáticos, denominadas de "pre-embryogenic determined cells" (PEDC), que necessitam apenas de estímulos externos para desencadear o processo, enquanto que na embriogênese somática indireta, é necessário a desdiferenciação celular, sendo suas células denominadas de "induced embryogenic determined cell" (IEDC), que nas espécies vegetais, com exceção de citros, a desdiferenciação e a indução a formação dos embriões somáticos ocorre pelo cultivo em meios de cultura suplementados com auxinas (Sharp, 1980; Williams & Maheswaram, 1986).

A embriogênese somática em citros, tem sido observada principalmente a partir de calos, originados do cultivo de óvulos e nucelos (Button & Bornman, 1971; Mitra & Chaturvedi, 1972; Kochba et al., 1972), pelo emprego de

diferentes substâncias como inibidores de auxinas (Kochba & Spiegel-Roy, 1977), giberelinas (Kobayashi et al., 1978) e diferentes fontes de carboidrato (Spiegel-Roy et al., 1982; Sing et al., 1992; Cabasson et al., 1995), tendo uma forte interação com o genótipo (Moore, 1995). O efeito do genótipo foi também observado por Beloualy (1991) no estímulo de embriões somáticos, a partir de calos originados de cotilédones, onde as melhores respostas foram obtidas em meio de cultura suplementado com extrato de malte.

Ao contrário do que ocorre em outras culturas, a presença de auxinas, citocininas ou giberelinas suprimem a embriogênese somática em citros (Kochba et al.,1977; 1978; Kunitake & Mii, 1995). O efeito negativo das auxinas endógenas no processo embriogênico, tem sido evitado, pela utilização de inibidores de sua biossíntese.

Das substâncias inibidoras da biossíntese de reguladores vegetais, tem-se utilizados o 5 hidroxi nitrobenzilbromide (HNB) e o 7-azaindole (AZI), que são inibidores da síntese de auxinas, e demonstraram ter efeito positivo no estímulo a embriogênese somática em calos de laranja 'Shamouti' (Kochba et al., 1977). Moore (1985) avaliando diferentes aditivos de crescimento no meio de cultura, para pomelo (*C. paradisi* Macf.), não observou efeito significativo do inibidor de auxina, AZI, no processo de embriogênese somática, podendo sugerir que o nível de auxina endógeno pode variar com o genótipo, uma vez que respostas diferenciadas foram obtidas nos trabalhos que utilizaram esta substância.

Inibidores de giberelinas, como ácido succínico 2,2-methilhidazide (Alar) e 2,2-cloroetil trimetilammônio cloride (CCC), também foram utilizados para esta variedade, e foi verificado um efeito significativo no estímulo à embriogênese somática em relação ao número de embriões somáticos produzidos (Kochba, et al., 1978). A combinação de açúcar como a galactose, com os inibidores de giberelinas, daminozide ou paclobutrazol, tem demonstrado ser eficiente no estímulo à embriogênese somática em calos de *C. sinensis* (Spiegel-Roy, 1986).

Diferentes fontes de carboidrato, têm sido empregadas no estímulo à embriogênese somática. Açúcares como a galactose, e outros que a metabolizam, como a lactose e rafinose, têm-se mostrado eficientes para a embriogênese somática, em relação a sacarose, frutose e glicerol (Spiegel-Roy et al., 1982; Kochba et al.,1982; Sing, et al., 1992; Cabasson et al, 1995, Ling & Iwamasa , 1997), sendo este efeito atribuído a inibição da biosíntese de auxina, observada em coleoptilo decapitado de *Avena*, bem como pela redução no movimento de auxina e componentes da parede celular (Davies, 1995). Em calos embriogênicos originados de fusão de protoplastos, tem-se utilizado a maltose como fonte de carboidrato, a qual mostrou-se eficiente no estímulo a embriogênese somática (Mendes-da-Glória, 1998).

O conhecimento das estruturas internas do material, análise histológica, vem auxiliar no entendimento da organização e mudanças que ocorrem no desenvolvimento das plantas, bem como *in vitro*, permitindo distinguir a origem das estruturas formadas, falhas durante o desenvolvimento, esclarecendo algumas vezes problemas relativos a conversão dos embriões somáticos em plantas (Yeung, 1999).

Em calos de citros cultivados em meio de cultura com galactose as células com potencial embriogênico, caracterizaram-se pela alta proporção núcleo-citoplasma e pequenos grânulos de amido, e os embriões somáticos apresentaram polarização, a qual foi observada pelo acúmulo de reservas de amido na região radicular (Cabasson et al., 1995). Em cultivo de calos de algodão, foi possível diferenciar os calos embriogênicos, caracterizados por apresentarem forma compacta, citoplasma denso e atividade meristemática, enquanto que os calos não embriogênios demonstraram ser mais friáveis, apresentando células altamente vacuoladas (Shoemaker et al., 1986).

As condições físicas de cultivo e estímulo a embriogênese somática também podem exercer influência no desenvolvimento dos embriões somáticos. Em meio de cultura líquido embriões somáticos não chegaram a atingir o estádio cotiledonar de desenvolvimento, sendo que em sua estrutura

interna, não houve a formação de procâmbio e de protoderme, em relação aos cultivados em meio de cultura sólido (Cabasson et al., 1997). A condição de luminosidade, pode ser considerada outro fator no processo de desenvolvimento do embrião somático, como observado por Gmitter Junior & Moore (1986), onde o maior número de embriões somáticos foram obtidos em condições de ausência de luz, com meio de cultura suplementado com 500 mg l^{-1} de extrato de malte, sendo baixo o número de embriões somáticos que se converteram em plantas.

Morfologicamente, foram observadas respostas diferenciadas nas estruturas embriogênicas obtidas em meio de cultivo suplementado com lactose ou maltose, como pseudobulbo, embrião globular e proliferação de calos (Perez et al., 1998), demonstrando assim, a falta de sincronismo no desenvolvimento dos embriões somáticos. Moore (1985), observou que dos genótipos avaliados, apenas o limão 'Bears' apresentou embriões somáticos fusionados ou com cotilédones múltiplos, demonstrando que o aspecto morfológico também poderia ser influenciado pelo genótipo. O aparecimento de embriões somáticos deformados em meio de cultura, como cotilédones de tamanhos e formas variadas, pode ser atribuído, ao fato de não existir barreiras físicas que delimitem o desenvolvimento dos embriões somáticos, como acontece *in vivo* no interior da semente. A liberação de metabólitos no meio de cultura durante o crescimento das células, também pode prejudicar a formação e o desenvolvimento das estruturas embriogênicas, segundo Fridborg et al.(1978), estas células em crescimento, secretam ácido fenilacético, e derivados de ácido benzóico, que possivelmente teriam efeito negativo na diferenciação celular, e que poderiam ser evitado pela utilização de carvão ativado, o qual teria a capacidade de adsorver estes componentes.

Outras substâncias têm sido utilizadas para o estímulo a embriogênese somática como o extrato de malte (Lorenzo et al., 1994), adenina (Button & Bornman, 1971), além da combinação de suco de laranja, ácido naftaleno acético (NAA) e sulfato de adenina (Rangan et al., 1969).

Em citros, apesar do grande número de embriões formados a partir de calos embriogênicos, poucas são as plantas que se desenvolvem. Segundo Gmitter Junior & Moore (1986) os requisitos básicos para aumentar a eficiência de regeneração, são a obtenção de embriões normais, a obtenção de um equilíbrio entre o desenvolvimento do sistema radicular e brotos e a composição do meio de cultura, com relação a presença de reguladores vegetais, quantidade e qualidade dos açúcares e o extrato de malte, onde os embriões foram cultivados (Gindy, 1990; Avenido, 1991; Song et al., 1991).

In vivo, de maneira geral, a embriogênese zigótica é dividida em fases distintas, as quais abrangem a fecundação e fertilização, o desenvolvimento do embrião da fase globular a cotiledonar, um período denominado de maturação, dissecação e dormência, estando nesta fase apto para o processo de germinação (Goldberg et al., 1994).

Alguns trabalhos têm realizado tentativas positivas para melhorar o desenvolvimento dos embriões somáticos em diversas espécies, simulando algumas etapas do desenvolvimento dos embriões zigóticos, principalmente da manipulação do meio de cultura. Uma das principais, é a etapa de maturação dos embriões somáticos, que tem por finalidade a deposição de reservas, como proteínas, e a expansão celular, o que vai garantir ao embrião somático qualidade no momento da germinação (Roberts et al., 1990). Dentre as substâncias utilizadas têm-se o polietileno-glicol, a maltose ou a sacarose, os quais são responsáveis por causar um estresse osmótico e simular assim, a fase de maturação (Anandarajah et al.,1990; Kong, et al., 1995; Li et al., 1998).

Em citros, não se encontram descritos tratamentos intermediários para os embriões somáticos, os quais são transferidos diretamente do meio de cultura de estímulo à embriogênese somática, pela individualização dos embriões somáticos, para o meio de cultura de germinação a qual normalmente é suplementado com ácido giberélico. Nestas condições, os embriões somáticos podem germinar normalmente, ou dar início novamente a formação de calos (Kochba et al., 1972; Kochba et al., 1974). Ling & Iwamasa et al., (1997),

trabalhando com satsumas, observaram o desenvolvimento normal dos embriões somáticos, a formação de calos e de embriões somáticos não germinados. Beloualy (1991) avaliando o efeito do ácido giberélico e ácido nafataleno acético (NAA), no processo de germinação e enraizamento, obteve alta taxa de germinação de plântulas completas, em média 23%, em meio de cultura suplementado com ácido giberélico, podendo estar relacionado ao fato das giberelinas, como observado em sementes zigóticas de cevada, liberarem fatores responsáveis pela conversão do amido a glicose e a sua mobilização para o crescimento dos embriões (Went & Thimann, 1995).

Em cultivo de embriões zigóticos de citros, Nieves et al.,(1998), utilizaram meio de cultura suplementado com sacarose em combinação com ABA e GA_3, resultando em praticamente 100% de embriões germinados, demonstrando assim, a necessidade de estudos de meios de cultura para o desenvolvimento dos embriões, zigótico ou somático, para aumentar a eficiência na conversão dos embriões somáticos em plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: foram utilizadas linhagens de calos embriogênicos das variedades de laranja 'Seleta Vermelha', 'Valência' e 'Caipira' (*C. sinensis* L. Osbeck), de limão 'Cravo' (*C. limonia* L. Osbeck) e duas linhagens de tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. ex Tanaka) denominadas de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, mantidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, em meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com 5 g l^{-1} de extrato de malte e 146 mM de sacarose, incubadas em ausência de luz, à temperatura de 27 ± 2C, e subcultivadas em intervalos de 4 semanas.

Todos os meios de cultura foram utilizados com pH 5,8, esterilizados em autoclave (120C/20 minutos) e distribuídos em placas de Petri de plástico descartável (100x15mm).

Análise Histológica: para caracterização morfológica e histológica dos embriões somáticos desenvolvidos, utilizou-se amostras de embriões somáticos de limão 'Cravo', tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, tangerina 'Cleópatra' linhagem 2, laranja 'Seleta Vermelha' , laranja 'Valência' e laranja 'Caipira', após 30 dias de indução em meio de cultura MT, suplementado com 37 mM de maltose. Os embriões somáticos foram fixados, por um período mínimo de 8 horas em solução de paraformaldeído (6%) e glutaraldeído (2%), em tampão cacodilato de sódio (0,2M), com pH 7,2, sob refrigeração.

Os tecidos fixados foram lentamente desidratados, à temperatura ambiente, em uma série de 100% de metil celosolve, etanol, propanol e butanol, com duração mínima de 1 hora em cada substância, seguido de imersão em

solução de butanol e meio de infiltração, na proporção de 1:1, durante a noite, à temperatura de 4C. Após este período as amostras foram transferidas para o meio de infiltração à temperatura de 4C, por 72 horas. A infiltração e inclusão dos embriões somáticos foi realizada em Historesina (hidroxietilmetacrilato), sendo que o processo de polimerização deu-se à temperatura ambiente, por 24 horas.

Foram realizados cortes seriados, com espessura de 0,4μm em micrótomo rotativo automático (LEICA RM2155), os quais foram corados com fucsina ácida por 2 minutos, e toluidina azul, por 5 minutos, para observações gerais, em microscópio de luz transmitida (ZEISS, modelo AXIOVERT 35).

3.1 Efeito de diferentes açúcares no estímulo à embriogênese somática em calos embriogênicos de citros

Calos embriogênicos de limão 'Cravo', tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, e laranjas 'Valência' e 'Caipira', foram cultivados em meio de cultura MT suplementado com galactose, glicose, lactote, maltose ou sacarose, nas concentrações de 18; 37; 75; 110 ou 150 mM, ou glicerol nas concentrações de 6; 12; 24; 36 ou 50 mM.

Foram distribuídos 50 mg de calo na superfície do meio de cultura, com auxílio de 1 ml do mesmo meio de cultura líquido, para facilitar a desagregação e distribuição do calo na superfície do meio de cultura. Após a desagregação dos calos, realizou-se movimentos circulares da placa de Petri, para distribuição dos calos por toda a superfície do meio de cultura, e o material foi incubado sob condições de luz indireta (300 lux), com fotoperíodo de 16 hs., à temperatura de 27 ± 2C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramento ao acaso, com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. As avaliações foram realizadas após 4 semanas da incubação, determinando-se o número de embriões somáticos no estádio globular, com auxílio de microscópio

estereoscópico. Para os genótipos não responsivos, realizou-se uma segunda avaliação após 6 semanas da incubação.

3.2 Efeito da densidade de plaqueamento dos calos no estímulo à embriogênese somática em calos embriogênicos de citros

Calos embriogênicos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2 e limão 'Cravo', foram incubados em meio de cultura MT, suplementado com maltose ou galactose nas concentrações de 37; 75 ou 110 mM, ou glicerol, nas concentrações de 36 ou 50 mM.

Os calos embriogênicos foram distribuídos na superfície do meio de cultura na densidade de 6; 12; 25 e 50 mg de calo por placa de Petri, com auxílio de 1 ml do mesmo meio de cultura líquido, e incubados à temperatura de 27 ± 2C, sob luz indireta (300 lux).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. A avaliação foi realizada após 4 semanas de incubação, determinando-se o número de embriões somáticos no estádio globular, com auxílio de microscópio estereoscópico.

3.3 Efeito do inibidor de auxina 7-azaindole (AZI) no estímulo à embriogênese somática em calos embriogênicos de citros

Calos embriogênicos das variedades de tangerina 'Cleópatra' linhagem 1 e linhagem 2, e limão 'Cravo' foram incubados em meio de cultura MT, suplementado com maltose nas concentrações de 18 ou 37 mM, ou sacarose nas concentrações de 25 ou 50 mM, contendo o inibidor de auxina 7-azaindole (AZI), nas concentrações de 0,08; 0,8 e 25 μM.

Os calos embriogênicos foram distribuídos na superfície do meio de cultura com auxílio de 1 ml do mesmo meio de cultura líquido, e incubados à temperatura de 27 ± 2C, sob luz indireta (300 lux).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 4 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. A avaliação foi realizada após 4 semanas de incubação, determinando-se o número de embriões somáticos no estádio globular, com auxílio de microscópio estereoscópico.

3.4 Pré-germinação e desenvolvimento dos embriões somáticos de citros

Embriões somáticos das laranjas 'Valência' e 'Seleta Vermelha', no estádio cotiledonar, e tangerina 'Cleópatra' linhagem 1 e linhagem 2, no estádio globular, obtidos após 70 dias da indução em meio de cultura MT suplementado com 37 mM de maltose, foram utilizados para avaliar o efeito do tratamento de pré-germinação, na obtenção de plântulas de citros.

Os embriões somáticos foram transferidos com auxílio de uma pinça para os tratamentos de pré-germinação, os quais constituíram-se de 4 concentrações de sacarose, equivalentes a 15; 44; 73 ou 102 mM, em meio de cultura MT na presença ou ausência de 0,5 g l^{-1} de carvão ativado. O meio de cultura MT com 37 mM de maltose foi mantido para verificar o efeito destes tratamentos no processo de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri com 5 embriões somáticos.

Os embriões somáticos permaneceram nos tratamentos por 10 dias, à temperatura de 27 ± 2C sob luz indireta (300 lux), e foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MT, suplementado com 73 mM de sacarose e 1,4 μM de ácido giberélico, em condições de fotoperíodo de 16 hs (500 lux). As avaliações foram realizadas após 30 dias da transferência,

observando-se o número de plântulas formadas, embriões somáticos não germinados e plântulas anormais.

Após a determinação do tratamento de pré-germinação que proporcionou o maior número de plantas, foram testados diferentes concentrações de ácido giberélico, 1,4; 2,8 ou 4,3 μM, em meio de cultura MT com 73 mM de sacarose, avaliando-se o número de plântulas obtidas .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estímulo à embriogênese somática

Dos fatores avaliados no estímulo à embriogênese somática, o método menos efetivo foi aquele que utilizou o inibidor de auxina, AZI, quando comparado ao emprego de diferentes fontes de carboidratos e da densidade de plaqueamento dos calos, sendo observado a influência do genótipo na resposta obtida. Dos genótipos avaliados, pode-se observar respostas diferenciadas para os diferentes açúcares testados, e para o desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 1).

Das fontes de carbono utilizadas, a maltose, foi o açúcar que estimulou a produção do maior número de embriões somáticos para os genótipos testados, seguidos pela lactose e galactose, com exceção da linhagem de calo de limão 'Cravo', a qual demonstrou baixo potencial embriogênico, e da linhagem de calo da laranja 'Caipira' onde o maior número de embriões somáticos foi obtido com a galactose (Tabela 1). Este efeito positivo da maltose no estímulo à embriogênese somática, também tem sido observado em outros trabalhos, os quais compararam outras fontes de carboidratos e suas combinações em calos embriogênicos de citros originários de óvulos (Perez et al., 1998) ou de fusão de protoplastos (Mendes-da-Glória et al., 1998).

Com relação aos açúcares comumente utilizados no estímulo à embriogênese somática em citros, como lactose e galactose, os resultados obtidos com maltose foram em média 50% superior na produção de embriões somáticos para os genótipos responsivos. Em outras culturas, como em alfafa, este efeito tem sido observado tanto no estímulo à embriogênese somática

como na conversão dos embriões, seja pela utilização somente da maltose, na concentração de 120 mM, ou em interação com a sacarose, podendo seu efeito primário ser atribuído possivelmente a um fator nutricional do que osmótico, necessitando-se de estudos enzimáticos e com marcadores radioativos para determinar o efeito dos carboidratos no metabolismo celular (Strickland et al., 1987). A lactose e galactose, têm-se mostrado efetivas no estímulo à embriogênese somática de diversas espécies de citros, principalmente quando comparadas ao glicerol, glicose e sacarose (Kochba et al., 1978a; Spiegel-Roy, et al., 1982; Perez et al., 1998), sendo seu efeito atribuído possivelmente a inibição da conversão do indoleacetaldeido a ácido indol acético (Kochba et al., 1978a).

Quanto a sacarose, pode-se observar a formação de alguns embriões somáticos nas linhagens de calos de laranja 'Caipira' e tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, em todas as concentrações utilizadas, sendo que a formação de embriões somáticos na linhagem de calo de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, ocorreu nas concentrações de 18 e 37 mM. Estes resultados, demonstram o alto potencial embriogênico destas linhagens de calos, uma vez, que muitos trabalhos em citros tem relatado a eficiência da sacarose no cultivo de calos e a supressão da embriogênese somática (Kochba et al., 1978b, Spiegel-Roy et al., 1982).

Para laranja 'Caipira', os resultados demonstraram que o maior número de embriões somáticos foi obtido em galactose, a partir de 110 mM, seguidos pela lactose (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Sing et al. (1992), quando comparou o glicerol e a galactose no estímulo à embriogênese somática em calos de limão 'Meyer' (*C. meyeri* Y. Tan.), onde a galactose foi o melhor açúcar para estimular o processo.

Para o limão 'Cravo', onde foi observado baixa resposta aos tratamentos de estímulo à embriogênese somática, verificou-se que os poucos embriões somáticos formados, foram totalmente encobertos pelo rápido crescimento de calos, dados não quantificados, sugerindo assim, que a densidade de calo utilizada, poderia contribuir com o genótipo para a formação dos embriões somáticos.

Tabela 1. Efeito de diferentes fontes de carboidratos no estímulo à embriogênese somática em 5 linhagens de calo embriogênico de *Citrus* spp.

Carboidrato	mM	Linhagens de calo				
		laranja 'Valência'	laranja 'Caipira'	tangerina 'Cleópatra' 1	tangerina 'Cleópatra' 2	limão 'Cravo'
Maltose	18	376 ± 48	62 ± 29	127 ± 3	0	13 ± 13
	37	245 ± 25	65 ± 37	175 ± 15	26 ± 19	0
	75	369 ± 99	25 ± 16	57 ± 17	11 ± 5	2 ± 3
	110	406 ± 48	24 ± 15	164 ± 31	35 ± 33	1 ± 1
	150	424 ± 22	13 ± 15	60 ± 26	57 ± 19	0
Glicose	18	8 ± 13	50 ± 8	4 ± 3	5 ± 9	0
	37	3 ± 2	78 ± 20	4 ± 1	6 ± 10	0
	75	0	17 ± 10	3 ± 5	3 ± 5	0
	110	0	61 ± 34	1 ± 1	8 ± 33	0
	150	0	39 ± 24	0	0	0
Lactose	18	47 ± 14	32 ± 16	3 ± 2	6 ± 10	0
	37	219 ± 36	30 ± 25	25 ± 2	37 ± 37	0
	75	239 ± 76	102 ± 28	77 ± 28	2 ± 3	0
	110	174 ± 35	99 ± 46	145 ± 32	31 ± 35	0
	150	173 ± 54	22 ± 24	146 ± 43	6 ± 4	0
Galactose	18	21 ± 13	25 ± 20	17 ± 18	7 ± 4	0
	37	14 ± 8	39 ± 24	87 ± 32	2 ± 2	0
	75	18 ± 20	67 ± 31	133 ± 5	3 ± 3	0
	110	4 ± 3	194 ± 90	122 ± 19	0	0
	150	75 ± 22	124 ± 25	114 ± 12	0	0
Sacarose	18	1 ± 1	14 ± 12	9 ± 7	0	0
	37	1 ± 1	23 ± 18	1 ± 1	0	0
	75	1 ± 1	10 ± 5	0	0	0
	110	2 ± 3	3 ± 2	0	0	0
	150	15 ± 15	10 ± 8	0	0	0
Glicerol	6	5 ± 6	3 ± 4	3 ± 3	0	0
	12	3 ± 6	0	1 ± 1	0	0
	24	31 ± 10	9 ± 8	3 ± 5	0	0
	36	48 ± 10	39 ± 30	26 ± 21	0	5 ± 7
	50	37 ± 11	48 ± 16	19 ± 13	0	10 ± 17

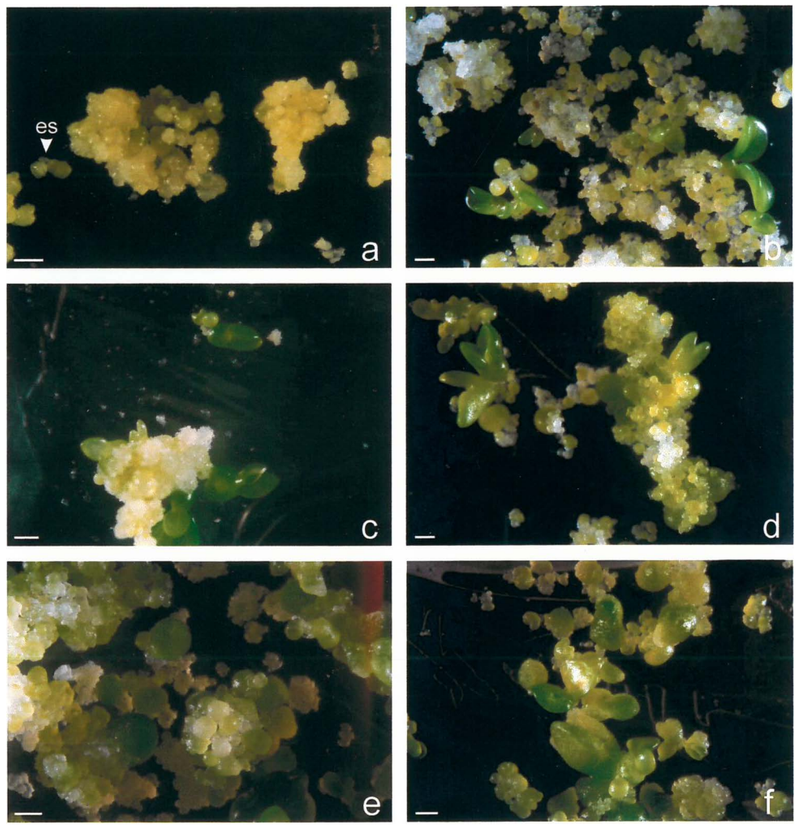

Figura 1. Estímulo à embriogênese somática, em diferentes linhagens de calos de citros utilizando-se meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). a) início da formação de embriões somáticos (es), na linhagem de calo de limão 'Cravo'. b) embriões somáticos de laranja 'Caipira'. c) embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha' em diferentes estádios de desenvolvimento. d) embriões somáticos de laranja 'Valência' em diferentes estádios de desenvolvimento. e) Embriões somáticos, no estádio globular, de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1. f) Embriões somáticos de morfologia irregular de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2. Barras = 1mm.

Os resultados obtidos com a utilização de diferentes densidades de plaqueamento de calo, no estímulo à embriogênese somática, encontram-se nas Tabelas 2 e 3, onde verificou-se na densidade de 12 mg de calo uma melhoria no número de embriões somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, podendo ser, mais um fator a considerar no processo, para interagir com o genótipo e a fonte de carboidrato.

O maior número de embriões somáticos obtidos para tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, foi na densidade de 12 mg de calo, quando utilizou-se a maltose como fonte de carboidrato. Devido a grande variação que ocorreu no número médio dos embriões somáticos nos diferentes tratamentos, não pode-se dizer que houve um efeito significativo no estímulo à embriogênese somática, no entanto, as condições de ambiente de cultivo foram melhoradas, pela melhor distribuição dos calos no meio de cultura, e um baixo crescimento de calo.

Tabela 2. Efeito da densidade de plaqueamento de calo no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2.

		Densidade de plaqueamento (mg)			
Carboidrato	mM	6	12	25	50
Maltose	37	261 ± 88	217 ± 31	259 ± 58	331 ± 136
	75	142 ± 65	369 ± 55	186 ± 144	175 ± 138
	110	261 ± 44	304 ± 143	275 ± 82	108 ± 74
Lactose	37	21 ± 34	28 ± 20	101 ± 84	128 ± 49
	75	3 ± 5	49 ± 23	82 ± 49	121 ± 63
	110	35 ± 35	130 ± 71	64 ± 70	133 ± 58
Glicerol	36	12 ± 10	5 ± 4	9 ± 12	20 ± 24
	50	22 ± 5	8 ± 8	6 ± 4	9 ± 15

Para o limão 'Cravo', a embriogênese somática foi estimulada mesmo na densidade de 50 mg de calo (Tabela 3), diferindo dos resultados obtidos

anteriormente, quando se utilizou diferentes fontes de carboidratos (Tabela 1), podendo indicar uma possível influência na época de coleta do calo. De maneira geral, com a diminuição da densidade de calo, observou-se um aumento no número de embriões somáticos, principalmente na densidade de 12 mg de calo, em meio de cultura suplementado com 37 mM de maltose.

Tabela 3. Efeito da densidade de plaqueamento dos calos no estímulo à embriogênese somática, na linhagem de calo embriogênico de limão 'Cravo'.

		Densidade de plaqueamento (mg)			
carboidrato	mM	6	12	25	50
Maltose	37	79 ± 65	100 ± 31	74 ± 43	73 ± 28
	75	10 ± 6	20 ± 16	18 ± 17	10 ± 11
	110	39 ± 50	4 ± 5	16 ± 14	18 ± 13
Lactose	37	14 ± 19	64 ± 50	26 ± 29	10 ± 10
	75	2 ± 3	0	0	6 ± 8
	110	3 ± 23	10 ± 24	20 ± 15	6 ± 13
Glicerol	36	2 ± 2	2 ± 2	3 ± 4	2 ± 3
	50	3 ± 27	4 ± 6	7 ± 9	0

Este efeito na densidade de calo, tem sido observado geralmente em cultura de células em suspensão, onde há uma série de mudanças no meio de cultura, devido a liberação de substâncias químicas como proteínas (Toonen et al., 1997; Kobayashi et al.,1999), gases como etileno e acetaldeído (Theverot et al.,1992), além de acidificação do meio de cultura e decréscimo da fonte de carboidrato, pela elevada atividade metabólica durante à embriogênese somática (Amino et al.,1988), o que poderia modificar a resposta ao estímulo à embriogênese somática. Alguns trabalhos de estímulo à embriogênese somática, em meio de cultura líquido, para citros, diminuem a quantidade de

inóculo no meio de cultura de estímulo à embriogênese somática, no entanto, sem comparar diferentes densidades de plaqueamento dos calos. Cabasson et al., (1995) em cultivo de células em suspensão, para realizar indução a embriogênese somática, realizou a seleção do tamanho de células através de peneiras de 100 a 500 μm para homogeneizar a cultura, sendo a densidade de células utilizadas de 4 g de peso fresco.

O inibidor de auxina, AZI, empregado para estimular a embriogênese somática nos genótipos pouco responsivos, não demonstrou ser efetivo para o processo de indução. A formação de embriões somáticos foi praticamente nula nos tratamentos que utilizaram a sacarose como fonte de carboidrato, enquanto que, naqueles em que o meio de cultura foi suplementado com maltose a embriogênese somática foi estimulada (Tabelas 4-6).

Para limão 'Cravo' (Tabela 4), altas concentrações do inibidor de auxina causaram amarelecimento do calo (Figura 2a), oxidação, podendo os poucos embriões somáticos desenvolvidos na concentração de 0,08 μM de AZI (Figura 2b), ser atribuído a presença do açúcar, maltose, uma vez que a testemunha produziu um número equivalente de embriões. A oxidação observada em altas concentrações do inibidor de auxina, não ocorreu para a tangerina 'Cleópatra' linhagem 1 (Figura 2d), sendo observado por Kochba & Spiegel-Roy (1977) em laranja 'Shamouti' que esta concentração induziu o maior número de embriões somáticos, conotando assim, uma resposta diferenciada para os genótipos, seja pelo baixo potencial embriogênico, ou por algum fator endógeno do material, como o nível de auxina.

Ao contrário do que ocorreu para a linhagem de calo de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2 (Tabela 5), alguns embriões somáticos foram induzidos nos tratamentos que utilizaram a sacarose para a tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 (Tabela 6), no entanto, não superam o número de embriões somáticos obtidos naqueles tratamentos que foram suplementados com a maltose, indicando assim, que este efeito na produção de embriões somáticos poderia estar associado ao açúcar. Morfologicamente, os embriões

somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 (Figuras 2c-d), e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2 (Figuras 2e-f), apresentaram-se no estádio globular, com anormalidades, sendo que estádios mais avançados não foram observados.

Tabela 4. Efeito do 7-azaindole (AZI), no estímulo à embriogênese somática na linhagem de calo embriogênico de limão 'Cravo'.

		AZI (μM)				
Carboidrato	mM	0	0,08	0,8	8,5	25
Sacarose	73	0	0	0	0	0
	146	0	0	0	0	0
Maltose	18	0	44 ± 32	0	0	0
	37	43 ± 40	17 ± 13	0	0	0

Tabela 5. Efeito do 7-azaindole (AZI), no estímulo à embriogênese somática na linhagem de calo embriogênico de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2.

		AZI (μM)				
Carboidrato	mM	0	0,08	0,8	8,5	25
Sacarose	73	0	1 ± 1	0	0	0
	146	0	0	0	2	0
Maltose	18	11 ± 3	68 ±31	14 ± 8	28 ± 20	6 ± 5
	37	14 ± 3	19 ± 13	31 ± 12	10 ± 5	12 ± 10

Tabela 6. Efeito do 7-azaindole (AZI), no estímulo à embriogênese somática na linhagem de calo embriogênico de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1.

		AZI (μM)				
Açúcar	mM	0	0,08	0,8	8,5	25
Sacarose	73	2 ± 2	11 ± 3	3 ± 2	0	0
	146	2 ± 1	0	0	5 ± 0,5	0
Maltose	18	37 ± 13	43 ± 21	59 ± 9	64 ± 57	20 ± 18
	37	18 ± 13	15 ± 5	19 ± 11	130 ± 91	24 ±1 5

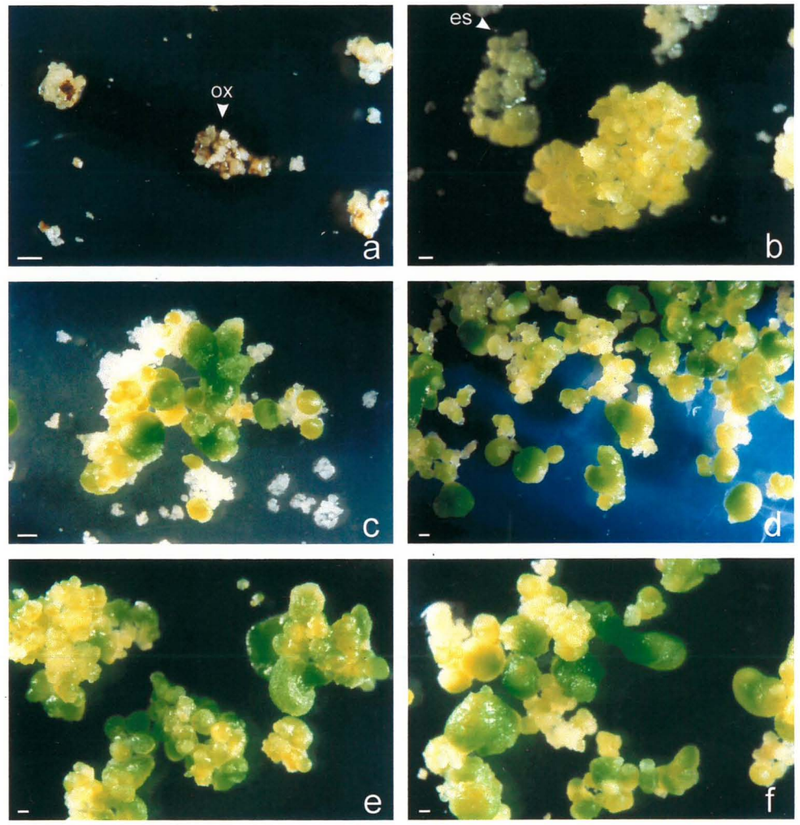

Figura 2. Efeito do inibidor de auxina, 7-azaindole, no estímulo à embriogênese somática de três linhagens de calos de citros. a) calos de limão 'Cravo', apresentando oxidação (ox), em meio de cultura de estímulo à embriogênese somática suplementado com AZI (25 μM) e maltose (37 mM). b) calos de limão 'Cravo', iniciando a formação de embriões somáticos (es), em meio de cultura suplementado com AZI (0,08 μM) e maltose (18 mM). c) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). d) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, em meio de cultura suplementado com AZI (25 μM) e maltose (37 mM). e) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, em meio de cultura de estímulo à embriogênese somática, suplementado com AZI (0,08 μM) e maltose (18 mM). f) Embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, em meio de cultura suplementado com AZI (0,8 μM) e maltose (18 mM). Barras = 0,4 mm.

4.2 Desenvolvimento e germinação dos embriões somáticos

A histodiferenciação e germinação dos embriões somáticos, não ocorreu para todos os genótipos estudados.

Os diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos , foram obtidos para as laranjas 'Seleta Vermelha' (Figura 3a), 'Valência' (Figura 4a) e 'Caipira', nos primeiros 30 dias da incubação dos calos, em meio de estímulo à embriogênese, sendo a sequência de desenvolvimento obtida para estes genótipos, consideradas como padrão para o cultivo *in vitro* (Zimermann, 1993). Estas diferentes fases de desenvolvimento, foram relatadas em laranja 'Valência' (Kunitake & Mii, 1995), após a transferência dos embriões somáticos, em estádio globular, para meio de cultura contendo ácido giberélico, sendo que para os genótipos testados esta prática não foi requerida, como observado também por Perez et al. (1998) em vários genótipos de citros.

Morfologicamente, os embriões somáticos apresentaram-se normais, com alguns embriões de cotilédones múltiplos, sendo as diferentes fases de desenvolvimento observadas durante todo o ciclo de cultivo. Alguns trabalhos, tem relatado diversas conformações de embriões somáticos, dentre estas, embriões com cotilédones múltiplos ou pluricotiledonares (Gmitter Jr. & Moore, 1986; Ranga Swany, 1958).

Internamente, os embriões somáticos apresentaram a formação de protoderme, a presença de faixas procambiais e a definição do meristema radicular (Figuras 3b-f e 4b-e), semelhantes aos verificados em embriões somáticos de *Citrus deliciosa* por Cabasson et al., (1977) em meio de cultura suplementado com galactose.

Anormalidades no estímulo e desenvolvimento dos embriões somáticos foram observadas para a linhagem de calo de limão 'Cravo' (Figura 5a) e para as tangerinas 'Cleópatra', linhagem 1 (Figura 6a) e 'Cleópatra', linhagem 2 (Figura 7a), os quais inicialmente formaram embriões de formato globular e não desenvolveram durante o cultivo.

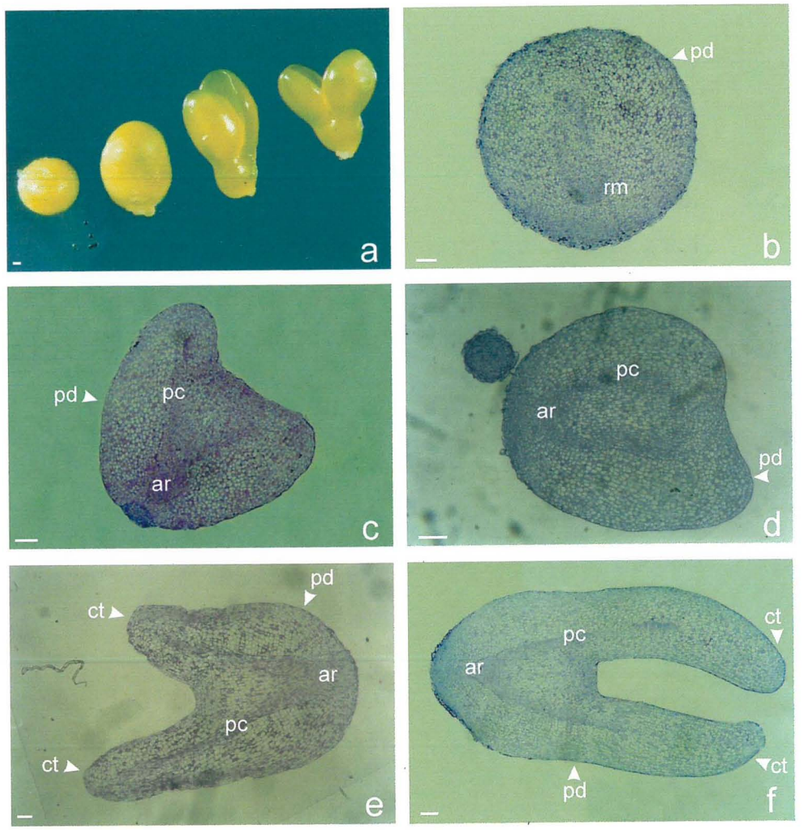

Figura 3. Morfologia e caracterização histológica de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha', desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). a) diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (globular - cotiledonar). b) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio globular, apresentando a formação da protoderme (pd) e região meristemática (rm). c-d) corte longitudinal de embriões somáticos, no estádio de coração, apresentando a definição da simetria bilateral, protoderme (pd), procâmbio (pc) e meristema radicular (ar). e-f) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio cotiledonar, apresentando definição de protoderme (pd), procâmbio (pc), cotilédones (ct) e meristema radicular (ar). Barras = Figura (a) 0,2mm; Figuras (b-f) 0,1 mm.

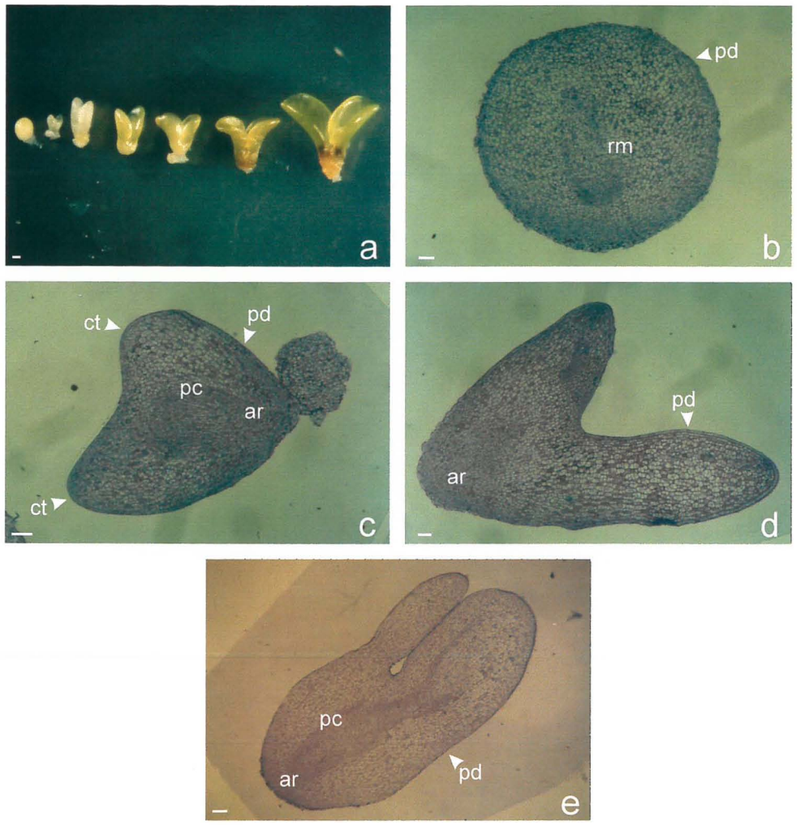

Figura 4. Morfologia e caracterização histológica de embriões somáticos de laranja 'Valência', desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). a) diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (globular - cotiledonar). b) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio globular, monstrando a definição de região meristemática (rm) e protoderme (pd). c) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio de coração, iniciando a simetria bilateral, apresentando cotilédones (ct), protoderme (pd), procâmbio (pc) e meristema radicular (ar). d) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio cotiledonar, protoderme (pd) e meristema radicular (ar). e) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio cotiledonar, definição de protoderme (pd), procâmbio (pc) e meristema radicular (ar). Barras = Figura (a) 0,3mm; Figuras (b-e) 0,1mm.

Em limão 'Cravo', os embriões somáticos formados não apresentaram morfologia normal, mesmo no estádio globular, mostrando conformações variadas (Figura 5a). Estas anormalidades, tem sido observadas em culturas *in vitro* de citros e podem ser atribuídas ao genótipo, como observado por Moore (1985), onde dos vários genótipos utilizados, apenas embriões somáticos de limão 'Bears', apresentaram anormalidades (embriões somáticos fusionados).

Internamente os embriões somáticos, apresentaram o desenvolvimento de protoderme e procâmbio, sendo observado a ausência de meristema caulinar e deformações da protoderme (Figuras 5b-f).

Para a tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, alguns embriões somáticos no estádio cotiledonar foram obtidos (Figura 6a), no entanto, a sua conformação não foi normal, quando comparada a de laranja 'Seleta Vermelha' e laranja 'Valência', o mesmo ocorrendo para a tangerina 'Cleópatra', linhagem 2 (Figura 7a). Perez et al., (1998), observaram em diversos genótipos de citros, inclusive em tangerina 'Cleópatra', alta frequência de embriões somáticos no estádio cotiledonar, utilizando-se altas concentrações de maltose, superiores a 40 mg l^{-1}, o que poderia desencadear a histodiferenciação dos embriões somáticos.

Nestes genótipos, estruturas internas como a faixa procambial e a protoderme foram observadas, entretanto o meristema caulinar e radicular encontraram-se ausentes (Figuras 6b-e e 7b-d). Em estudo realizado com células em suspensão de laranja 'Shamouti', foram observados falhas na formação de protoderme, e ausência de histodiferenciação dos embriões somáticos (Cabasson et al., 1995).

O completo desenvolvimento dos embriões somáticos, e consequente germinação, desenvolvimento de raiz e brotos, foi alcançado para as laranjas 'Valência' e Seleta vermelha, após 100 dias da incubação dos calos no meio de cultura de estímulo à embriogênese somática.

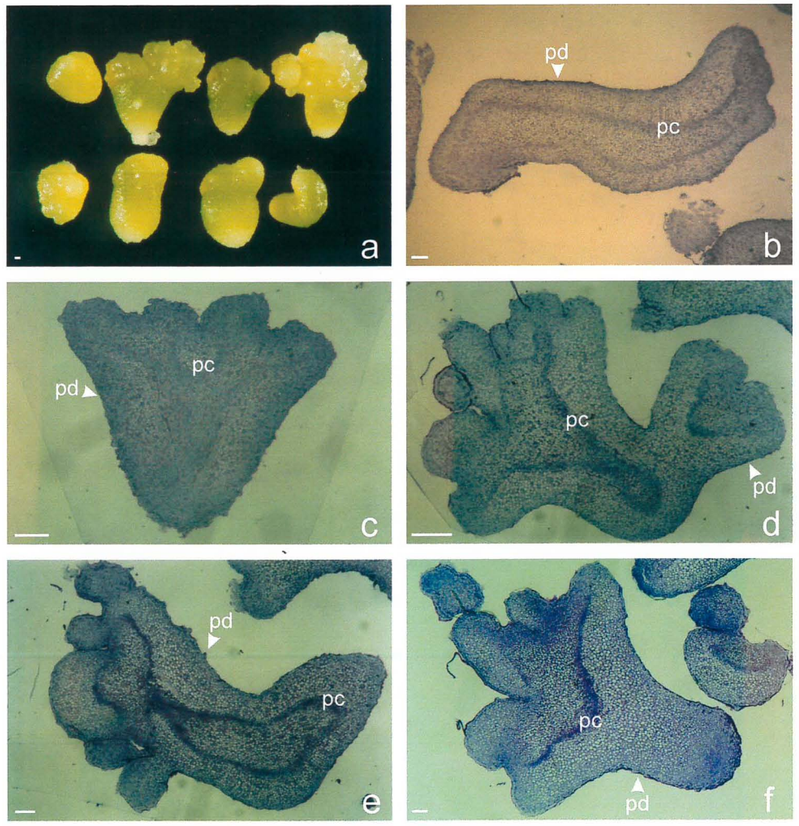

Figura 5. Embriões somáticos de limão 'Cravo', desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). a) embriões somáticos, demonstrando diferentes morfologias. b) corte longitudinal de embrião somático, apresentando a formação irregular da protoderme (pd) e definição do procâmbio (pc). c-f) corte de embriões somáticos anormais, apresentando a definição de procâmbio (pc), protoderme (pd) e ausência de meristema radicular e caulinar. Barras = 0,1mm.

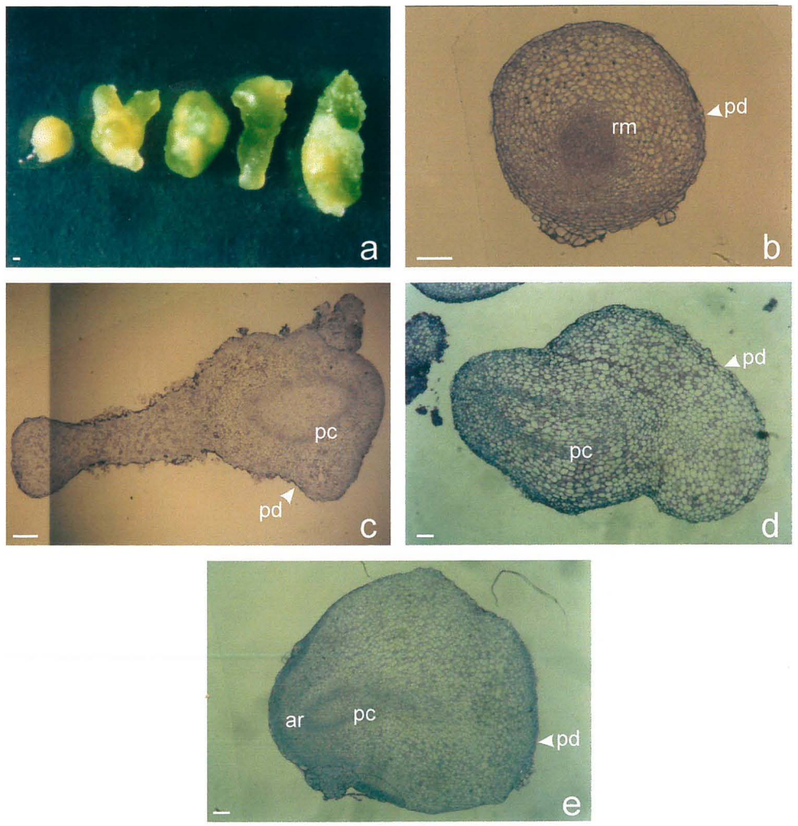

Figura 6. Embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). a) embriões somáticos em estádio globular e de morofologia anormal. b) corte longitudinal de embriões somáticos no estádio globular, apresentando região meristemática (rm) e protoderme deformada (pd). c-d) corte de embriões somáticos anormais, com deformação de protoderme e meristema radicular e caulinar, e formação de procâmbio (pc). e) corte de embrião somático anormal, apresentando protoderme irregular (pd), definição de procâmbio (pc) e meristema radicular (ar). Barras = Figura (a) 0,2mm; Figuras (b-e) 0,1mm.

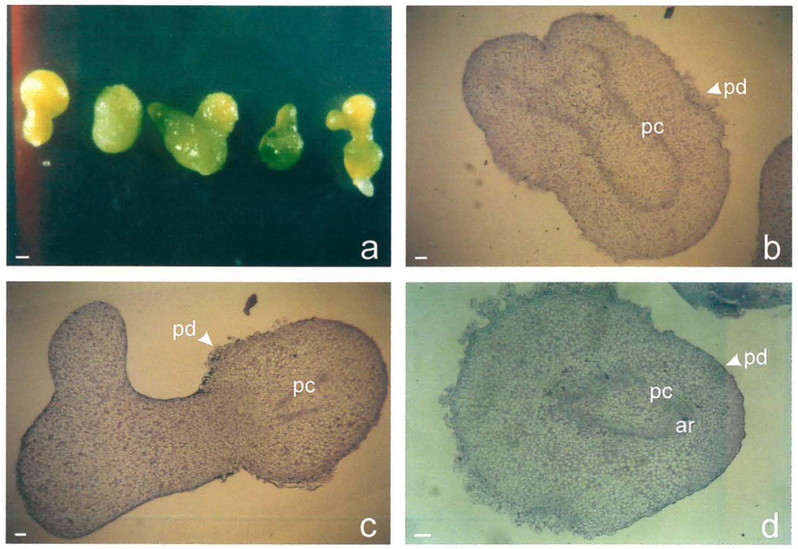

Figura 7. Embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, desenvolvidos em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM). a) diferentes morfologias de embriões somáticos. b-c) corte longitudinal de embrião somático, apresentando deformação de protoderme (pd) e procâmbio (pc). d) corte longitudinal de embrião somático, apresentando procâmbio (pc) , protoderme deformada (pd) e meristema radicular (ar). Barras = Figura (a) 0,5mm; Figuras (b-d) 0,1mm.

Dos resultados obtidos, foi possível observar o aumento na eficiência de germinação dos embriões somáticos, utilizando tratamentos intermediários ou pré-germinativos, os quais tem sido empregados em diferentes espécies de plantas.

Para a laranja 'Valência', os embriões somáticos que permaneceram em meio de cultura com 44 μM de sacarose, quando foram transferidos para o meio de cultura de germinação, proporcionaram a maior percentagem, 52%, de embriões germinados, em relação aos embriões somáticos que desenvolveram no meio de cultura com 37mM de maltose (Tabela 7). Morfologicamente, estes embriões mostraram cotilédones bem desenvolvidos e de coloração uniforme, com hipocótilo alongado, semelhantes aos obtidos em meio de cultura suplementados com carvão ativado (Figura 8a). Os embriões somáticos desenvolvidos em meio de cultura com outras concentrações de sacarose, independente da adição de carvão ativado, mostraram menor desenvolvimento, principalmente dos cotilédones (Figura 8b) e deformação cotiledonar (Figuras 8 c-d), enquanto que aqueles transferidos para o mesmo meio de cultura de estímulo à embriogênese somática, apresentaram coloração irregular dos cotiédones, desenvolvimento inicial de raiz e a presença de pequena massa de calo (Figura 8e). Em trabalho realizado por Kochba et al. (1972), a laranja 'Valência' respondeu diferenciadamente para o desenvolvimento de raiz e caule, quando considerou-se um mesmo meio de cultura, evidenciando a necessidade de um meio de acondicionamento, onde possa haver o máximo de sincronia no desenvolvimento dos embriões somáticos.

Em relação a laranja 'Seleta Vermelha', o maior número de plantas foi obtido em meio de cultura com 44 μM de sacarose, sendo observado uma superioridade de 16% no número de embriões somáticos germinados, em comparação ao meio de cultura com 37 mM de maltose (Tabela 8). Durante a permanência dos embriões somáticos, nos tratamentos de pré-germinação, verificou-se o inicio de formação de raiz e primórdios foliares (Figura 9a), o que pode ser considerado como o processo de germinação.

Tabela 7. Efeito de diferentes concentrações de sacarose, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Valência'.

	sacarose				Sacarose + c.a				maltose	maltose + c.a
	mM				mM				mM	mM
	15	44	73	102	15	44	73	102	37	37
Planta	2	13	5	5	4	3	2	6	5	7
Parte aérea	10	10	12	10	8	9	8	10	7	9
Raiz	3	1	0	2	4	3	5	0	0	0
Cotiledonar	10	1	8	8	9	10	10	9	13	9

Parte aérea = primórdio foliar Cotiledonar = embrião somático não germinado c.a = carvão ativado

Para os outros tratamentos que utilizaram sacarose, os embriões somáticos, desenvolveram cotilédones múltiplos (Figura 9b) ou deformados (Figura 9d), e alguns desenvolveram-se pouco (Figura 9c), enquanto que no meio de cultura suplementado com maltose os embriões somáticos mostraram coloração intensa dos primórdios foliares, os quais apresentaram pontos de oxidação (Figura 9e).

Nesta linhagem de calo, o número de embriões somáticos não germinados em tratamentos que utilizaram o carvão ativado, foi muito maior que o número de plantas obtidas, podendo sugerir que este elemento estaria adsorvendo substâncias responsáveis pelo processo de germinação.

Os embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 e 'Cleópatra' linhagem, 2, os quais não histodiferenciaram, foram submetidos aos tratamentos com sacarose para observar a possibilidade de alguma mudança na fase de desenvolvimento, no entanto, isto não ocorreu.

Durante o período que os embriões somáticos permaneceram em sacarose, foram observados o desenvolvimento de calos, deformações no embrião somático e alguns permaneceram no estádio globular (Figuras 10a e 10d).

Tabela 8. Efeito de diferentes concentrações de sacarose, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha'.

	sacarose				Sacarose + c.a				maltose	maltose + c.a
	mM				mM				mM	mM
	15	44	73	102	15	44	73	102	37	37
Planta	12	14	12	8	0	0	3	4	10	5
Parte aérea	12	11	13	16	12	12	10	13	15	5
Raiz	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
Cotiledonar	1	0	0	1	13	7	9	3	0	15

Parte aérea = primórdio foliar Cotiledonar = embrião somático não germinado c.a = carvão ativado

Para tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 os embriões somáticos, transferidos para meio de cultura com ácido giberélico, não apresentaram desenvolvimento normal, sendo observados início de formação de raiz (Figuras 10e-f). Para a tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, não ocorreu o desenvolvimento da parte aérea (Figuras 10b-c), sendo os cotilédones deformados em relação aos das laranjas 'Seleta Vermelha' e 'Valência', e a iniciação da raiz, foi observado em aproximadamente 23% dos embriões somáticos.

Os resultados obtidos na utilização de diferentes concentrações de ácido giberélico, para promover a germinação dos embriões somáticos, demonstraram a formação de plântulas em todas as concentrações utilizadas (Tabelas 9 e 10), sendo observado variações nas respostas, quando comparou-se os genótipos.

Para a laranja 'Seleta Vermelha', 60% do embriões somáticos desenvolveram-se em plantas, na concentração de 2,8 μM de ácido giberélico, enquanto que nas demais concentrações, a conversão foi de 51% dos embriões somáticos (Figuras 11a-c-e).

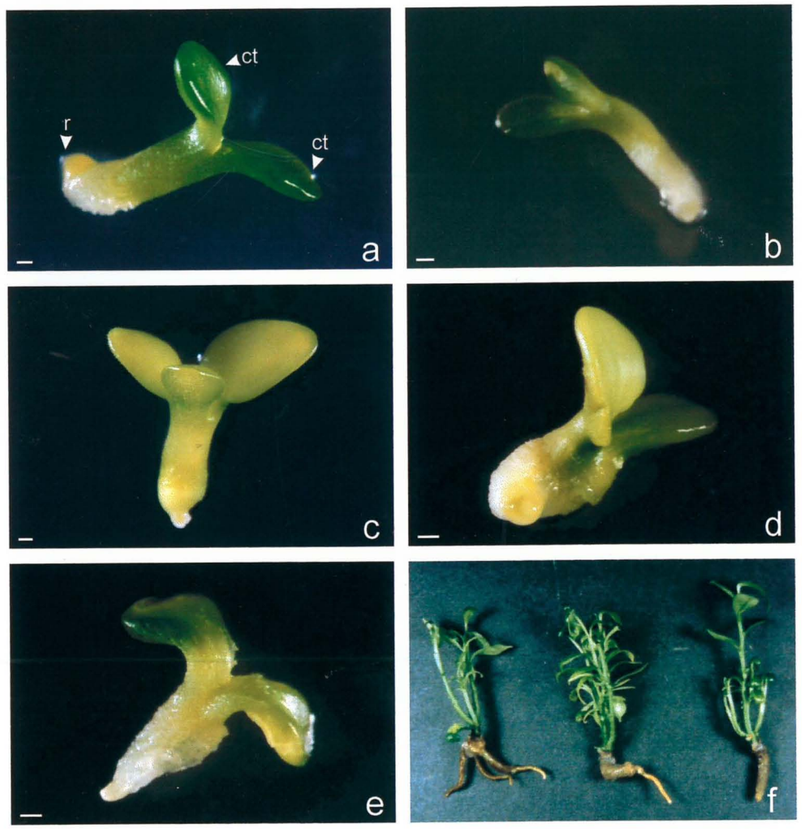

Figura 8. Aspecto geral de embriões somáticos de laranja 'Valência', germinados em meio de cultura suplementado com GA_3 (1,4 μM), após o período de 10 dias em tratamento de pré-germinação. a) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (44 mM) adicionado de carvão ativado (0,5 g l^{-1}), apresentando cotilédones verdes (ct), hipocótilo alongado e início de emissão de raiz (r). b) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (15 mM), apresentando cotilédones pequenos e eixo embrionário alongado. c) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (73 mM), na presença de carvão ativado (0,5 g l^{-1}), com cotilédones múltiplos e ausência de emergência de raiz. d) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (102 mM), na presença de carvão ativado (0,5 g l^{-1}), apresentando deformação do hipocótilo. e) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM), mostrando irregularidade na coloração dos cotilédones, início de emergência de raiz e pequena massa de calo. f) plântulas obtidas em meio de cultura, utilizando como substrato ágar, apresentando desenvolvimento restrito de raiz. Barras = 0,5 mm.

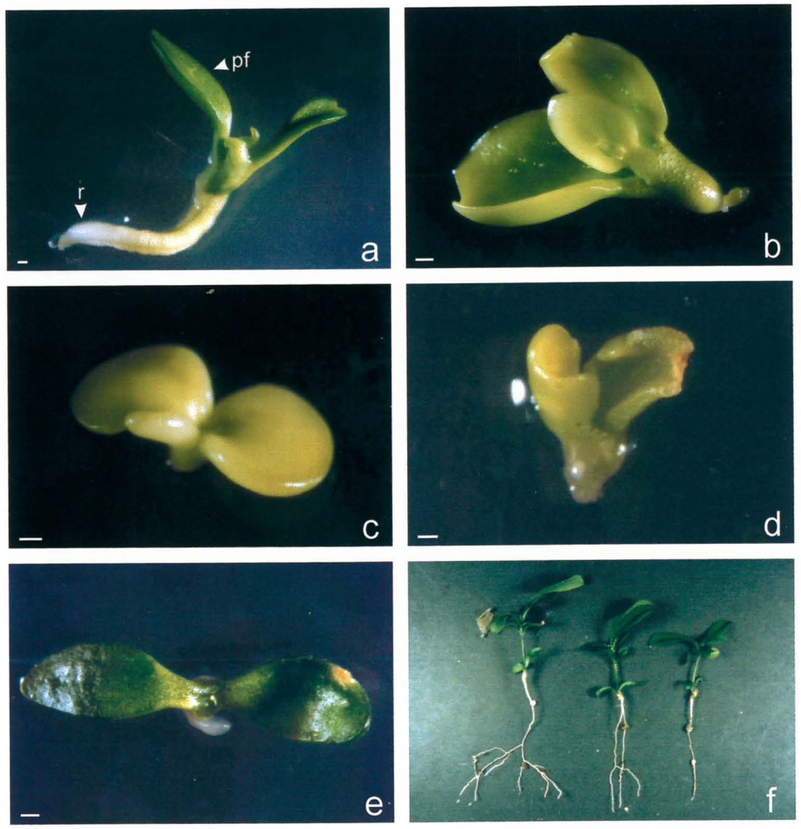

Figura 9. Aspecto geral dos embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha', germinados em meio de cultura suplementado com GA_3 (1,4 μM), após o período de 10 dias em diferentes tratamentos de pré-germinação. a) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (44 mM), apresentando desenvolvimento de raiz (r) e primórdios foliares (pf). b) embrião somático cultivado em meio de cultura com sacarose (15 mM), na presença de carvão ativado (0,5 g l^{-1}). c) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (73 mM), apresentando cotilédones pequenos e bem formados. d) embrião somático cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose (102 mM), apresentando deformação dos cotilédones. e) embrião somático, cultivados em meio de cultura suplementados com maltose (37 mM), apresentando coloração intensa dos cotilédones e pontos de oxidação. f) plântulas obtidas em meio de cultura, utilizando como substrato vermiculita, apresentando ramificações da raiz. Barras = 0,5 mm.

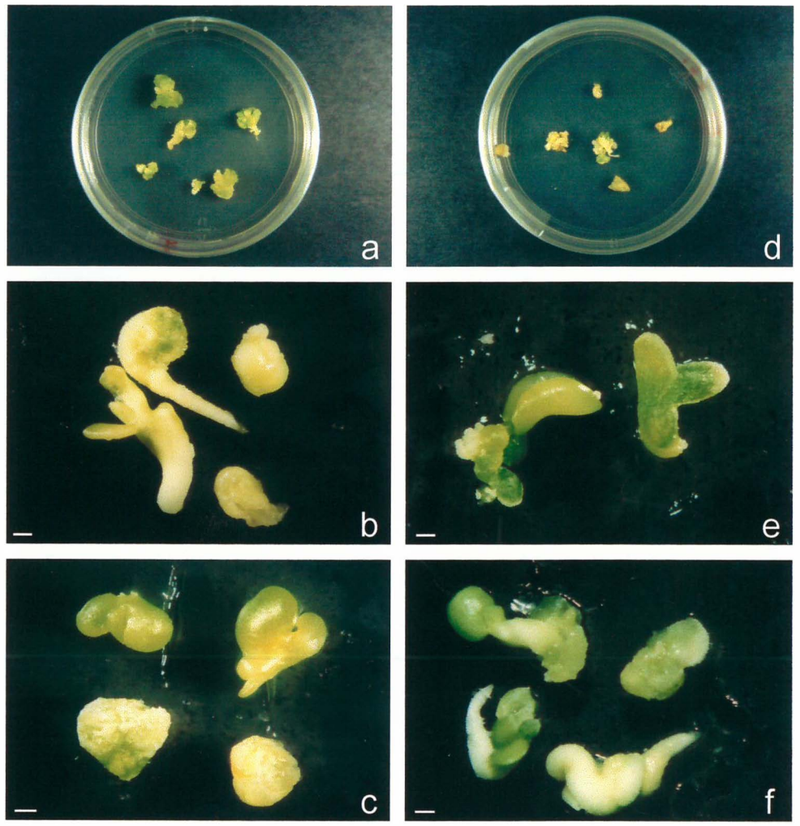

Figura 10. Efeito do tratamento de pré-germinação, no desenvolvimento de embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagens 1 e 2. a) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose (44 mM), com deformação no desenvolvimento. b-c) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, germinados em meio de cultura com ácido giberélico, após tratamento em meio de cultura de pré-germinação com sacarose (102 mM) ou maltose (37 mM), apresentando desenvolvimento irregular, com emergência de raiz e ausência de parte aérea. d) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1 cultivados em meio de cultura suplementado com maltose (37 mM), com a formação de calos e embriões somáticos deformados. e) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, germinados em meio de cultura com ácido giberélico, após tratamento em meio de cultura de pré-germinação com sacarose (73 mM), com o desenvolvimento de raiz. f) embriões somáticos de tangerina 'Cleópatra', linhagem 1, germinados em meio de cultura com ácido giberélico, após tratamento em meio de cultura de pré-germinação com sacarose (15 mM), com o desenvolvimento irregular. Barras = 1mm.

A morfologia das plântulas não diferiram em relação aos tratamentos, sendo observado o desenvolvimento de raiz e do caule principal, o qual apresentou algumas ramificações. Em trabalho realizado por Moore (1985), dos embriões somáticos transferidos para o meio de cultura suplementado com 2,8 μM de ácido giberélico, a taxa de germinação foi de 94% de plântulas completas, raiz e primórdio foliar, enquanto que para *Citrus deliciosa*, a regeneração de plantas, variou entre 19 e 35%.

Tabela 9. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha'.

	GA_3 (μM)		
	1,4	2,8	4,3
Planta	18	21	18
Parte aérea	0	0	0
Raiz	4	0	0
Cotiledonar	13	14	17

Cotiledonar = embrião somático não germinado

Para a laranja 'Valência' (Tabela 10), 23% dos embriões somáticos, formaram plântulas na concentração de 1,4 μM de ácido giberélico, o que pode ser considerado baixo, quando comparados aos resultados obtidos para a laranja 'Seleta Vermelha', sendo observado um grande número de plântulas apresentando apenas o desenvolvimento da parte aérea (Figuras 11b-d-f), demonstrando a possível necessidade de suplementação do meio de cultura com aditivos que favoreçam o processo de enraizamento. Em trabalho realizado por Kochba et al., (1974), com embrióides de laranja 'Shamouti', demonstraram a eficiência no desenvolvimento de plantas com início de raiz, em meio de cultura suplementado com sulfato de adenina, ácido giberélico e sacarose em

concentrações de 5 a 6%, os quais segundo o autor, seria responsável por iniciar a região meristemática ou estimular o seu desenvolvimento. A importância da sacarose, foi verificada em trabalho realizado por Carrier et al., (1997), onde 25% da sacarose disponível no meio de cultura foi consumida, podendo estar envolvida na disponibilização de lípidos para o consumo, durante o processo de germinação.

Tabela 10. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico, na germinação de embriões somáticos de laranja 'Valência'.

	GA_3 (μM)		
	1.4	2.8	4.3
Planta	8	6	5
Parte aérea	12	19	13
Raiz	0	0	0
Cotiledonar	15	10	17

Cotiledonar = embrião somático não germinado

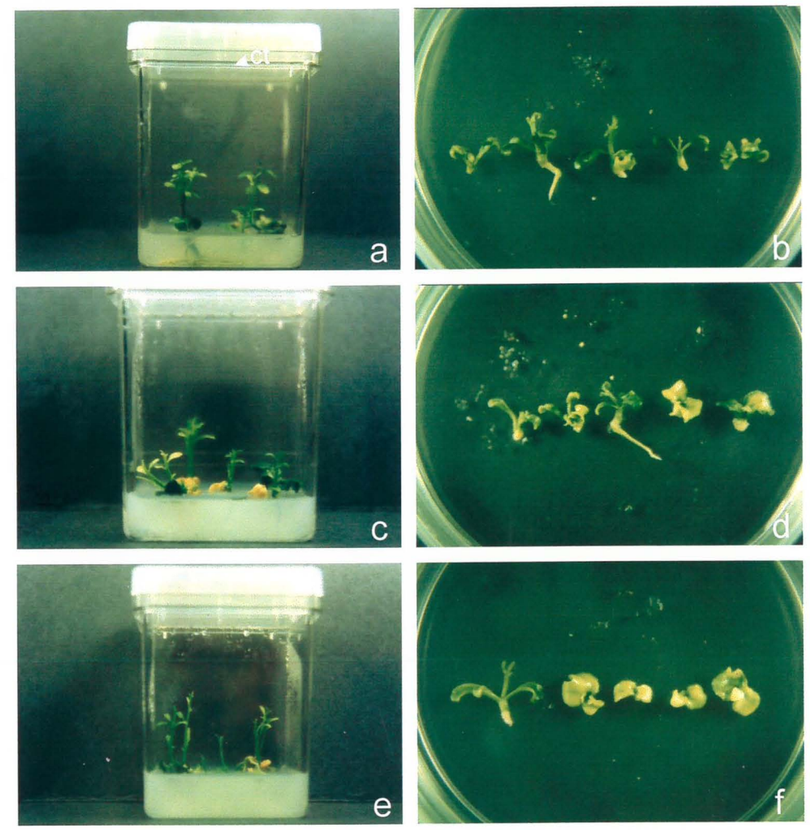

Figura 11. Efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico na germinação de embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha' e 'Valência'. a) embriões de laranja 'Seleta Vermelha', cultivados em meio de germinação com ácido giberélico (1,4 μM.). b) embriões somáticos de laranja 'Valência', cultivados em meio de germinação com ácido giberélico (1,4 μM), com o desenvolvimento de plantas completas, primórdios foliares, ou sem desenvolvimento. c) embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha', cultivados em meio de germinação com ácido giberélico (2,8 μM). d) embriões somáticos de laranja 'Valência', cultivados em meio de germinação com ácido giberélico (2,8 μM) com o desenvolvimento de plantas completas ou plantas incompletas com primórdios foliares. e) embriões somáticos de laranja 'Seleta Vermelha', cultivados em meio de germinação, com ácido giberélico (4,3 μM). f) embriões somáticos de laranja 'Valência', cultivados em meio de germinação com ácido giberélico (4,3 μM), com o desenvolvimento de plantas completas e embriões somáticos não germinados.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultado obtidos, pode-se concluir que:

a) A formação de embriões somáticos nas diferentes linhagens de calos, foi dependente do genótipo estudado, sendo as melhores fontes de carboidratos, a maltose, seguidas pela galactose e lactose.

b) As linhagens de calo de limão Cravo' e tangerina 'Cleópatra', linhagem 2, demonstraram baixo potencial embriogênico, nos diferentes tratamentos utilizados.

c) A utilização de inibidor de auxina, AZI, não produziu um número médio de embriões somáticos satisfatório, quando comparados as fontes de carboidratos, necessitando de melhores estudos com relação à estimativa do nível endógeno de auxina para cada genótipo.

d) A densidade de plaqueamento, em conjunto com a fonte de carboidrato, pode contribuir para aumentar a eficiência no estímulo à embriogênese somática.

e) A caracterização histológica dos embriões somáticos, permitiu atribuir o fato de não ocorrer o desenvolvimento do embrião somático, principalmente para tangerina 'Cleópatra', linhagens 1 e 2, e limão 'Cravo', pela ausência de estruturas como os meristemas caulinar e radicular, protoderme e/ou procâmbio.

f) A histodiferenciação ocorreu de maneira completa para as laranjas 'Valência', 'Seleta Vermelha' e 'Caipira', sendo suas estruturas internas compostas por regiões meristemáticas, procâmbio e protoderme.

g) Tratamentos intermediários, para a conversão dos embriões somáticos em plantas, mostraram-se satisfatórios, sendo melhores resultados obtidos para a laranja 'Valência' e 'Seleta Vermelha'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARO, A.A.; MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Informações Econômicas**, v.27, n.7, p.11-23, jul. 1997.

AMINO, S.C.; TAZAWA, M. Uptake and utilization of sugars in cultured rice cells. **Plant Cell Physiology**, v.29, n.3, p.483-487, 1988.

ANANDARAJAH, K.; MCKERSIE, D. Manipulating the desiccation tolerance and vigor of dry somatic embryos of medicago sativa with sucrose, heat shock and abscisic acid. **Plant Cell Reports**, v.9, p.451-455, 1990.

AVENIDO, R.A.; ZAMOR, A.B.; PATENA, L.F.; BARBA, R.C. Callus induction and plant regeneration in calamansi (x *Citrofortunella mitis* J. Ingram and H.E. Moore). **Philippine Agriculturist**, v.74, n.2, p.245-252, 1991.

BELOUALY, N. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v.24, p.29-34, 1991.

BERETTA, M.J.G.; ROSSETI, V.; POMPEU JUNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Comportamento de porta-enxerto em relação ao declínio de cítricas no Estado de São Paulo. **Laranja**, v.9, p.311-325, 1988.

BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of Washington navel orange in vivo. **Journal of South African of Botany**, v.37, n.2, p.127-134, 1971.

BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange citrus sinensis osb. **Journal of Experimental Botany**, v.25, n.85, p.446-457, 1974.

CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F.X.; FERRIÊRO, N.M.; DAMBIER, D.; DALNIE, R.; TEISSON, C. Characteristics of Citrus cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embriogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.464-470, 1995.

CABASSON, C.; ALVARD, D.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; TEISSON, C. Improvement of citrus somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.33-37, 1997.

CARRIER, D.J.; CUNNINGHAM, J.E.; TAYLOR, D.C.; DUNSTAN, D.I. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v.61, p.550-554, 1997.

CRISTOFANI, M. Adaptação de metodologias de cultura de tecidos visando o melhoramento através de tecidos visando o melhorammento através de indução de mutações em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera. Piracicaba, 1991. p.185. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

DAVIES, P.J. The role of hormones in plant development. In: HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. Londres: University of Western Ontario, 1995. cap.15, p.285-310.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2000**: ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo, 1999. p.286-319.

FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. The effect of active charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v.43, p.104-106, 1978.

GINDY, E.F. Plant regeneration from sour orange and Rangpur lime undeveloped ovule cultures. **Annals of Agricultural Science**, v.28, n.4, p.2407-2417, 1990.

GMITTER JUNIOR, F.G.; MOORE, G.A. Plant regeneration from developed ovules and embryogenic calli of citrus: Embryo production, germination, and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.139-147, 1986.

GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: CAB International, 1992. cap.14, p.335-369.

GOLDBERG, R.B.; PAIVA, G. de; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. **Science**, v.266, p.605-614. 1994.

GOLDMAN, M.H.S. Cultura de tecidos nucelares, isolamento e radiossentividade de protoplastos de *citrus sinensis* (L.) Osbeck cv Pera. Piracicaba, 1988. p.127. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A.M. Mercado internacional de frutas cítricas *in natura* . **Laranja**, v.16, n.1, p.1-20, 1995.

GONZALEZ, M.A. A citricultura na DIRA de Barretos. **Laranja**, v.14, n.2, p.651-676, 1993.

GROSSER, J.W. *Citrus* scion and rootstock improvement via somatic hybrydization. **Acta Horticulturae**, v.336, p.297-305, 1993.

GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G. Wide-hybridization of Citrus via protoplast fusion: progress, strategies, and limitations. **Horticultural Biotechnology.** New York: Wiley-Liss, 1990, p.31-41.

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

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990. 203-212.

HIDAKA, T.; OMURA, M. Control of embryogenesis in citrus cell culture regeneration from protoplast and attempts to callus bank. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station**, n.61, p.1-17, 1989.

HIRAMATSU, J.K.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata Raf.*). **Plant Cell Reports**, v.13, n.10, p.541-545, 1994.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Previsões e estimativas das safras agrícolas por escritório de desenvolvimento rural do Estado de São Paulo**. Ano agrícola - 1999/2000. http://www.iea.sp.gov.br (fev. 2000).

KALATZIS, A.E.G.; ALVES, F.J.C.; BATALHA, M.O. Recentes movimentos no setor citrícola: estratégias e um novo padrão competitivo. **Informações Econômicas**, v.26, n.9, p.27-34, 1996.

KOBAYASHI, J.; SPIEGEL-ROY, H.N.; SAAD, S. Stimulation of embryogenesis in Citrus ovular callus by ABA, Ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA_3. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, v.89, p.427-432, 1978.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Induction of nucellar callus from orange (C. sinensis Osb.) ovules and uniformity of regenerated plants. **Buletin of the Fruit Tree Research Station**, n.5, p.43-54, 1984.

KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T. Production of somatic hybrid plants through protoplast fusion in Citrus. **Journal of Agriculture Reviews**, v.22, n.3, p.181-188, 1988.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis Osb.*) protoplasts by direct DNA transfer. **Japan Journal of Genetics**, v.64, p.19-25, 1989.

KOBAYASHI, T.; HIGASHI, K.; SAITOU, T.; KAMADA, H. Physiological properties of inhibitory conditioning factor (s), inhibitory to somatic embryogenesis, in high-density cell cultures of carrot. **Plant Science**, v.144, p.69-75, 1999.

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

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

KOCHBA, J.; BUTTON, J. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiolgie**, v.73, p.405-414, 1974.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY; P. The effects of auxins, cytokinins and inibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (*C. sinensis*). **Zeitschrift fur Pflanzenphysiolgie**, v.81, p.283-288, 1977.

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

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY; P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Stimulation of embryogenesis in *citrus* tissue culture by galactose. **Naturwissenschaften**, v.65, 261-262, 1978.

KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of carboydrates on somatic embryogenesis in subcultures nucellar callus of *Citrus* cultivars. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiolgie**, v.105, p.359-368, 1982.

KONG, L.; YEUNG, E. Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Piceae glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.298-304, 1995.

KOMAI, F.; OKUSE, I.; SAGA, K.; HARADA, T. Improvement on the efficiency of somatic embryogenesis from spinach root tissues by applying various sugar. **Jounal Japan Society Science**, v.65, p.67-72, 1996.

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

KUNITAKE, H.; MII, M. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: BAJAJ, Y.P.S. **Somatic embriogenesis and syntetic seed. I.** Berlin: Springer-Verlag, 1995. cap.3, p.280-298.

LEE, R.; DERRIK, K. Clorose variegada dos citros: uma nova e destrutiva doença dos citros no Brasil. **Laranja**, v.12, n.2, p.357-363, 1991.

LI, X.Y; HUANG, F.H.; MURPHY, J.B.; GBUR JR., E.E. Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **In Vitro Cell Development Biology Plant**, v.34, p.22-26, 1998.

LING, J.T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* e *Citropsis gabunensis* through electrofusion. **Plant Cell Reports**, v.13, n.9, p.493-497, 1994.

LING, J.T.; IWAMASA, M. Plant regeneration from embryogenic calli of six *Citrus* related genera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.145-148, 1997.

LORENZO, J.C.; GARCIA, G.; ESCALONA, M.; DAQUINTA, M.A.; CASTILHO, R.; FUNDORA, Z.; BORROTO, C.G. *In vitro* somatic embryogenesis in

Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ext. tan). **Centro Agricola**, v.21, n.3, p.85-91, 1994.

LOUZADA, E.S. Possibilidades do uso da biotecnologia em citros. **Laranja**, v.11, n.1, p.151-165, 1990.

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

MENDES, F.J. da G.; MOURÃO FILHO, F.A.A., MENDES, B.M.J. Regeneração de plantas após fusão e cultura de protoplasto de Laranja 'Caipira' (*Citrus sinensis L. Osbeck*) e limão 'Cravo' (*Citrus limonia L. Osbeck*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., Gramado, 1997. **Resumos**. Gramado, 1997.

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

MITRA, G.C.; CHAUTRVEDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vivo grown emasculated flower buds of citrus spp. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.99, p.184-189, 1972.

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

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

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

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

NAVARRO, L. Citrus tissue culture. In: FAO/NORWAY SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, TECHNOLOGY AND UTILIZATION, As, Norway, 1984. **Micropropagation of selected rootcrops, palms, citrus, and ornamental species;** proceedings. Rome: FAO, 1984. p.113-154. (FAO Plant Production and Protection Paper, 59).

NIEVES, N.; LOURENZO, J.C.; BLANCO, M. de L.A.; GONZALEZ, J.; PERALTA, H.; HERNÁNDEZ, M.; SANTOS, R.; CONCEPCIÓN, O.; BORROTO, C.G.; BORROTO, E.; TAPIA, R.; MARTINEZ, M.E.; FUNDORA, Z.; GONZÁLES, A. Artificial endosperm of Cleopatra tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v.54, p.77-83, 1998.

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

OLIVEIRA, R.P. de; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. Cultura de células em suspensão de 2 porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, n.2, p.141-144, 1994b.

OLLITRAULT, P.; LURO, F. *Citrus* breeding and biotechnology. **Fruits**, v.50, n.4, p.267-279, 1995.

PAGUIO, O.R.; SANTOS FILHO, H.P. O declínio dos citros na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.2, p.189-193, 1993.

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

PEÑA, L.; MAGDALENA, C.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium* - mediated transformation of Sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.14, n.10, p.616-619, 1995.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PINA, J.A. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v.16, n.10, p.731-737, 1997.

PEREZ, R.M.; GALIANA. A.M.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Embryogenesis in vitro several citrus species and cultivars. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.73, n.6, p.796-802, 1998.

PESSENDA, C.E. Situação atual da campanha nacional de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Laranja**, v.11, n.1, p.75-86, 1990.

POMPEU JUNIOR, J. Situação do uso de porta-enxertos no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 1., Bebedouro, 1990. **Porta-enxertos**; anais. Jaboticabal: FUNEP, 1990. p.1-9.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargil, 1991. p.265-277.

RANGAN, T.S. Clonal propagation: somatic embryos of citrus. In: VASIL, K.I. Cell culture and somatic cell genetics of plants. University of Florida, 1984. v.1.

RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969. **Proceedings**. 1969. P.225-229.

RANGA SWANY, N.S. Culture of nucellar tissue of Citrus in vitro. **Experientia** v.14, n.3, p.111-112, 1958.

RANGA SWANY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of citrus microcarpa bunge. **Phytomorphology**, v.11, p.108-127, 1961.

ROBERTS, D.R.; FLINN, B.S.; WEBB, D.T.; WEBSTER, F.B.; SUTTON, C.S. Abscisic and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. **Physiologia Plantarum**, v.78, p.355-360, 1990.

SALIBE, A.A. Clones nucelares de citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, v.8, n.2, 443-466, 1987.

SHARP, W.R. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. **Horticultural Reviews**, v.2, p.268-310, 1980.

SHOEMAKER, R.C.; COUCHE, L.J.; GALBRAITH, D.W. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v.3, p.178-181, 1986.

SING, A.K.; NITO, N.; IWAMASA, M.; SUBHADRA, B.S. Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of *Citrus* callus. **Acta Horticulturae**, n.321, p.606-609, 1992. /Presented at International Symposium on Tropical Fruit, Frontier in Tropical Fruit Research.

SONG, W.S.; OH, S.D.; CHO, H.M.; PARK, J.H. Plant regeneration in dangyooza (*Citrus grandis* Osbeck) trough somatic embryogenesis. 1- Effect of plant growth regulators on embryogenic callus induction and somatic embryogenesis. **Research Reports of the Rural Development Administration, Biotechnology**, v.33, n.2, p.14-21, 1991.

SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S. Effect of carboydrates and inhibitors of GA_3 biosynthesis on embryogenic potential of salt tolerant and non-tolerant callus lines of orange (*C. sinensis Osbeck*). **Plant Science**, v.47, p.215-220, 1986.

SPIEGEL-ROY, P.; NEWMAN, H.; SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subculture nucellar callus of *Citrus* cultivar. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiolgie**, v.105, p.359-368, 1982.

STRICKLAND, S.G.; NICHOL, J.W.; MCCALL, C.M.; STUART, D.A. Effect of carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.48, p.113-121, 1987.

STUCHI, E.S.; SEMPIONATO, O.R.; SILVA, J.A. da. Influência dos porta-enxertos na qualidade dos frutos cítricos. **Laranja**, v.17, n.1, p.159-178, 1996.

TOONEN, M.A.J.; SCHMIDT, D.L.; KAMMEN, A.B.V.; VRIES, S.C. de. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. **Planta**, v.203, 188-195, 1997.

TREVENOT, P.C.; TOURAND, I.G.; MAURO, M.C.; JOVANNEAU, J.P.; BOULAY, M.; DELOIRE, A.; GUERN, J. Somatic embryogenesis from grapevine cells. I- Improvement of embryo development by changes in culture conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.125-133, 1992.

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

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus Industry. In: REUTHER, W; WEBBER, H.J; BATCHELOR, L.D. **The Citrus Industry**. Berkeley: Un. Calif. Press., v.1, p.1, 1967.

WENT, F.W; THIMANN, K.V. Biochemistry and mode of action of hormones. In: HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. Londres: University of Western Ontario, 1995. cap.16, p.311-339.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G.M. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic groups. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986. 140

YEO, U.D.; KOHMURA, H; NAKAGAWA, N.; SAKURAC, N. Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantlet development of aspargus (*Aspargus officinalis* L.). **Plant Cell Physiology**, v.39, n.6, p.607-614, 1998.

YEUNG, E.C. The use of histology in the study of plant tissue culture systems-some practical comments. **In Vitro Cell Development Biology Plant**, v.35, p.137-143, 1999. 170

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v.5, p.1411-1423, 1993.