

**HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA ENTRE LIMÃO CRAVO**  
**(*Citrus limonia* Osbeck) E TANGERINA CLEÓPATRA**  
**(*Citrus reshni* Hort.)**

**RODRIGO ROCHA LATADO**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **AUGUSTO TULMANN NETO**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em Agronomia, Área  
de Concentração: Genética e Melhoramento de  
Plantas.

**PIRACICABA**  
**Estado de São Paulo - Brasil**  
**Fevereiro - 1998**

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

Latado, Rodrigo Rocha

Hibridação somática entre limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort.) / Rodrigo Rocha Latado. - - Piracicaba, 1998.  
146 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.  
Bibliografia.

1. Hibridação somática 2. Fusão de protoplasto 3. Limão cravo 4. Melhoramento genético vegetal 5. Porta-enxerto 6. Tangerina I. Título

CDD 634.3

**HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA ENTRE LIMÃO CRAVO (*Citrus limonia*  
Osbeck) E TANGERINA CLEÓPATRA (*Citrus reshni* Hort.)**

RODRIGO ROCHA LATADO

Aprovada em: 02.04.1998

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira

ESALQ/USP

Profa. Dra. Siu Mui Tsai

CENA/USP

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni

UFV

Prof. Dr. Luis Carlos da Silva Ramos

IAC

Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

CENA/USP

Prof. Dr.  AUGUSTO TULMANN NETO

Orientador

*“ A vida, no mundo, é contada pelos bens que praticamos e não pelos dias que a desfrutamos. ”*

**Emmanuel**

(Extraído do livro Páginas de Coração)

*“ Não basta a certeza de que a vida continua infinita, além da morte. É necessário clarear o caminho. ”*

**Emmanuel**

(Extraído do livro Nosso Livro)

A Cristiane e ao Alain, dedico esta Tese,

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Augusto Tulmann Neto, pela orientação, apoio, amizade e incentivos; importantes, para a realização desta tese e para o desenvolvimento da minha carreira científica.

Aos Profs. Drs. Akihiko Ando, Maria Teresa V. C. Derbyshire e Siu M. Tsai, pelo estímulo, amizade e conhecimentos transmitidos durante a realização do curso de doutorado e da tese.

Aos Profs. Drs. Fernando B. D'Utra Vaz e Beatriz M. J. Mendes, pelos ensinamentos iniciais para realização desta tese.

Ao Depto. de Genética e aos seus professores, que me acolheram e proporcionaram a execução do curso, possibilitando a aquisição de conhecimentos e o desenvolvimento da minha carreira de pesquisador e/ou docente.

Ao Laboratório de Radiogenética do CENA/USP, que me acolheu e permitiu a execução deste trabalho. Aos técnicos Benedita Inês F. Rodrigues, Wlamir A. Godoy, Paulo Cassieri Neto, José B. Alves e a estagiária Nalza M. Camargo, pelo companheirismo e pela colaboração nos trabalhos de laboratório, estufa e de campo.

Aos técnicos do Lab. de Biologia Molecular do CENA/USP, José Elias Gomes, Fábio R.S. Duarte e a técnica do Lab. de Biologia de Proteínas Vegetais do CENA/USP, Myrian Raquel O., pelo apoio e auxílios nos trabalhos de laboratório.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos.

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



2.4.2.8	Métodos de discriminação de híbridos somáticos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Cultivo de plantas “in vitro”, a partir de sementes.....	31
3.2	Obtenção e cultivo de calos embriogênicos.....	31
3.3	Obtenção e cultivo de suspensões celulares.....	33
3.4	Isolamento de protoplastos a partir de suspensão celular.....	33
3.4.1	Eficiência de isolamento de protoplastos de suspensão celular, em diversas soluções enzimáticas.....	34
3.4.2	Efeito da densidade de cultivo de protoplastos.....	36
3.5	Cultivo de microcolônias, calos e regeneração de plantas.....	38
3.6	Aclimação das plantas ao meio ambiente.....	38
3.7	Isolamento de protoplastos de mesófilo.....	40
3.7.1	Eficiência de isolamento de protoplastos de mesófilo, em diversas soluções enzimáticas.....	40
3.8	Isolamento de protoplastos de suspensão celular e mesófilo, para experimentos de fusão.....	42
3.9	Experimentos de fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’.....	43
3.10	Identificação e caracterização dos híbridos somáticos.....	47
3.10.1	Análise de marcadores moleculares RAPD.....	47
3.10.1.1	Reação de RAPD para citros.....	47
3.10.2	Análises com marcadores isoenzimáticos.....	49
3.10.2.1	Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de amido.....	49
3.10.2.2	Análises de isoenzimas em géis de amido.....	51
3.10.2.3	Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de poliacrilamida..	51
3.10.2.4	Análises de isoenzimas em géis de poliacrilamida.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1	Cultivo de plantas “in vitro”, a partir de sementes.....	54
4.2	Obtenção e cultivo de calos embriogênicos.....	54
4.3	Obtenção e cultivo de suspensões celulares.....	56
4.4	Isolamento de protoplastos a partir de suspensão celular.....	57

4.4.1	Eficiência de isolamento de protoplastos a partir de suspensão celular, em diversas soluções enzimáticas.....	58
4.4.2	Efeito da densidade de cultivo de protoplastos.....	64
4.5	Cultivo de microcolônias, calos e regeneração de plantas.....	69
4.6	Aclimação das plantas ao meio ambiente.....	71
4.7	Isolamento de protoplastos de mesofilo.....	72
4.7.1	Eficiência de isolamento de protoplastos de mesofilo, em diversas soluções enzimáticas.....	72
4.8	Isolamentos de protoplastos de suspensão celular e mesofilo, para experimentos de fusão. ....	77
4.9	Experimentos de fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’.....	78
4.10	Identificação e caracterização dos híbridos somáticos.....	84
4.10.1	Análise de marcadores moleculares RAPD.....	84
4.10.1.1	Reação de RAPD para citros.....	86
4.10.1.2	Análise de plantas regeneradas, a partir de fusão de protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’ (suspensão celular) e protoplastos de limão ‘Cravo’ (mesofilo) .....	90
4.10.1.3	Análise de plantas regeneradas, a partir de fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ (suspensão celular) e protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’ (mesofilo) .....	99
4.10.2	Análise com marcadores isoenzimáticos.....	99
4.10.2.1	Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de amido.....	99
4.10.2.2	Análises de isoenzimas em géis de amido.....	103
4.10.2.3	Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de poliacrilamida....	112
4.10.2.4	Análises de isoenzimas em géis de poliacrilamida.....	112
4.11	Considerações finais.....	115
5	CONCLUSÕES.....	117
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
	ANEXOS.....	131

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Rendimento total de protoplastos, isolados de suspensão de tangerina ‘Cleópatra’, em diversas soluções enzimáticas.....	60
2 Rendimento total de protoplastos, isolados de suspensão de limão ‘Cravo’, em diversas soluções enzimáticas.....	61
3 Eficiência de cultivo em função da densidade inicial, avaliada aos 28 dias de cultivo.....	67
4 Quantidade total de microcolônias ( $\times 10^3$ ) em função da densidade de cultivo, avaliação aos 28 dias.....	68
5 Rendimento total de protoplastos, isolados de mesofilo de tangerina ‘Cleópatra’, em diversas soluções enzimáticas.....	75
6 Rendimento total de protoplastos, isolados de mesofilo de limão ‘Cravo’, em diversas soluções enzimáticas.....	76
7 Diversas fases de um experimento de fusão de protoplastos e regeneração de plantas.....	83
8 Gel de RAPD, teste dos “primers” OPG20, OPAP14 e OPAP20.....	88
9 Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAN6....	89
10 Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPG20....	91

11	Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAP20..	92
12	Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAP20. Experimentos de discriminação de plantas híbridas.....	93
13	Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAP14..	95
14	Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAN6..	96
15	Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAN6..	98
16	Gel de Penetrose (amido de milho) a 12%, tampão CM (pH 6,1), coloração para o sistema de Peroxidase anódica (PRXa).....	105
17	Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema da PRX anódica, na figura 16.....	105
18	Gel de Penetrose (amido de milho) a 13%, tampão CM (pH 6,1), coloração para o sistema da Isocitrato desidrogenase (IDH).....	108
19	Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema Isocitrato desidrogenase (IDH), na figura 18.....	108
20	Gel de Penetrose (amido de milho) a 13%, tampão TCB (pH 8,3), coloração para o sistema da Glutamato oxaloacético transaminase (GOT).....	109
21	Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema Glutamato oxaloacético transaminase (got-1), na Figura 20.....	109
22	Gel de Penetrose (amido de milho) a 13%, tampão TCB (pH 8,3),	

coloração para o sistema da Fosfoglucoase isomerase) (PGI).....	111
23 Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema Fosfoglucoase isomerase (pgi-1), na Figura 22.....	111
24 Gel de Poliacrilamida (sistema Davis) em gradiente de 4 a 10%. coloração para o sistema de Peroxidase (PRX).....	114
25 Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o gel de poliacrilamida, sistema de PRX anódica, na Figura 24.....	114

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Principais características do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', como porta-enxertos.....	8
2 Composição das diversas soluções enzimáticas testadas (tipo e concentração de enzimas), para isolamento de protoplastos de suspensão celular.....	35
3 Composição das diversas soluções enzimáticas testadas (tipo e concentração de enzimas), para isolamento de protoplastos de mesofilo.....	41
4 Composição da solução fusionante contendo PEG, tempo de incubação na solução fusionante e tipo de solução de lavagem utilizadas em experimentos de hibridação somática.....	44
5 Obtenção de calos friáveis (embriogênicos) e calos compactos, em porcentagem, a partir do cultivo de nucelos imaturos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'.....	55
6 Rendimento total de protoplastos de suspensão de tangerina 'Cleópatra', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.....	60
7 Rendimento total de protoplastos de suspensão de limão 'Cravo', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.....	61
8 Viabilidade média, em porcentagem, de protoplastos de suspensão celular de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', após 8 horas de incubação em diversas soluções enzimáticas.....	63
9 Eficiência média de plaqueamento de protoplastos de tangerina 'Cleópatra' e	

limão 'Cravo', após 28 dias de cultivo, com plaqueamento em gotas de agarose..	67
10 Quantidade total de microcolônias produzidas por ml de meio, de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', após 28 dias de cultivo, com plaqueamento em gotas de agarose.....	68
11 Porcentagem de plantas aclimatadas de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' cultivadas "in vitro", utilizando quatro métodos diferentes de aclimação.....	72
12 Rendimento total de protoplastos de mesofilo de tangerina 'Cleópatra', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.....	75
13 Rendimento total de protoplastos de mesofilo de limão 'Cravo', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.....	76
14 Quantidade média obtida de protoplastos de suspensão e mesofilo, de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', após a purificação.....	77
15 Eficiência de fusão, em porcentagem, entre protoplastos de tangerina 'Cleópatra' (suspensão) e limão 'Cravo' (mesofilo), utilizando-se dois métodos de fusão.....	79
16 Eficiência de fusão, em porcentagem, entre protoplastos de limão 'Cravo' (suspensão) e tangerina 'Cleópatra' (mesofilo), utilizando-se dois métodos de fusão.....	80
17 "Primers" de RAPD que apresentaram polimorfismo entre o padrão de bandas de DNA amplificado de limão 'Cravo' e de tangerina 'Cleópatra'.....	87
18 Teste de sistemas isoenzimáticos em diferentes soluções tampão de gel e de cuba, usando amostras de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	ácido indolilacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
BH <sub>3</sub>	Meio de cultivo descrito por Grosser & Chandler (1987)
CIN	cinetina
CPW 13M	Solução de lavagem de protoplastos contendo 13 % de manitol, descrita por Gilmour et al. (1989)
DAF	diacetato de fluoresceína
EDTA	ácido etileno diamino tetraacético
GOT	Glutamato oxaloacético transaminase
IDH	Isocitrato desidrogenase
KM8P 2x	Meio de cultivo (dupla concentração), descrito por Gilmour et al. (1989)
MES	ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico
MT	Meio de cultivo descrito por Murashigue & tucker (1969)
PEG	polietileno glicol
PGI	Fosfoglucose isomerase
ppm	Parte por milhão
PM	Peso molecular
PRX	Sistema isoenzimático da peroxidase
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético

# HIBRIDAÇÃO SOMÁTICA ENTRE LIMÃO ‘CRAVO’ (*Citrus limonia* Osbeck) E TANGERINA ‘CLEÓPATRA’ (*Citrus reshni* Hort.)

**Autor: RODRIGO ROCHA LATADO**

**Orientador: Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO**

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal a produção de plantas híbridas somáticas entre duas espécies do gênero *Citrus*, o limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) e a tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort.), como apoio ao melhoramento de porta-enxertos. O limão ‘Cravo’ se constitui atualmente no principal porta-enxerto comercial utilizado no Brasil, devido as suas boas qualidades agrônômicas. Entretanto, esta espécie é suscetível ao declínio dos citros, uma “doença” que é responsável pela morte e/ou eliminação de milhares de árvores cítricas por ano, no Brasil. A tangerina ‘Cleópatra’ é uma espécie bastante utilizada como porta-enxerto em outros países e que tem sido descrita na literatura como tolerante ao declínio.

Os impedimentos ligados à biologia reprodutiva das espécies do gênero *Citrus* dificultam ou, as vezes, até impedem o melhoramento mediante cruzamentos controlados. A hibridação somática em citros, por meio de fusão de protoplastos, tem possibilitado a produção de plantas híbridas tetraplóides, combinando características desejáveis de duas espécies.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma metodologia de isolamento e cultivo de protoplastos embriogênicos de suspensão celular das duas espécies, resultando na obtenção de plantas aparentemente idênticas às espécies parentais. A aclimação das plantas ao meio

ambiente foi considerada como a fase mais crítica do processo. Uma metodologia de isolamento de protoplastos de mesofilo das duas espécies também foi ajustada.

Nas densidades de cultivo de  $1$  e  $2 \times 10^5$  protoplastos.ml<sup>-1</sup> de suspensão celular de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’, observou-se a eficiência máxima de plaqueamento (5 a 15 %).

A porcentagem de obtenção de células heterocariontes (híbridas), logo após a adição de PEG foi de 5,0 a 6,9 %. Dois métodos de fusão, com uso de PEG, foram testados e não apresentaram diferença significativa em termos de formação de células heterocariontes.

Experimentos de fusão, com uso do polietileno glicol, foram realizados envolvendo protoplastos de suspensão celular e de mesofilo das duas espécies. Destes experimentos foram obtidas mais de 500 plantas. A seleção e a confirmação dos híbridos somáticos tetraplóides nestas plantas foram realizadas por meio de marcadores moleculares RAPD e marcadores isoenzimáticos. Como resultado, 11 plantas foram confirmadas como sendo híbridos somáticos.

**SOMATIC HYBRIDIZATION BETWEEN ‘RANGPUR’ LIME (*Citrus limonia*  
Osbeck) AND ‘CLEÓPATRA’ MANDARIN (*Citrus reshni* Hort.)**

**Author: RODRIGO ROCHA LATADO**

**Adviser: Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO**

**SUMMARY**

The aim of this research was to obtain somatic hybrids between two species of the genus *Citrus*, ‘Rangpur’ lime (*Citrus limonia* Osbeck) and ‘Cleópatra’ mandarin (*Citrus reshni* Hort.). ‘Rangpur’ lime is the most important Brazilian citrus rootstock due to its higher horticultural performance. Nevertheless, this species is susceptible to citrus “declínio” disease, a disease that is responsible for the death of millions of productive trees per year in Brazil. ‘Cleopatra’ mandarin has become an increasingly important rootstock in other countries and has been reported as being tolerant to citrus “declínio”.

The limited impact of breeding on citrus cultivar improvement is due to the particularities of the reproductive biology of citrus species. Plant somatic hybridization through protoplast fusion has been used to produce allotetraploid hybrids. It is an additive process that combines desirable characteristics of both parents.

This research describes the methodology of the isolation and culture of embryogenics protoplasts from ‘Cleópatra’ mandarin and ‘Rangpur’ lime, and as result, parental-like plants were recovered. The methods tested for rooted plant acclimation showed low efficiency. A methodology of leaf protoplast isolation for both species was also adjusted.

The maximum plating efficiency (5-15 %) was obtained at a density of  $1-2 \times 10^5$  protoplasts.ml<sup>-1</sup>.

Leaf protoplasts and protoplasts from embryogenic cell suspension were fused by two PEG methods. The frequency of heterokaryon formation was about 5 - 6.9 % and there was no difference between the fusion methods tested.

Plants were recovered following protoplast fusion of two treatments ('Cleopatra' as the protoplast from embryogenic suspensions and 'Rangpur' as the leaf protoplast and the reciprocal cross). Among them, eleven plants were confirmed to be an allotetraploid somatic hybrid by molecular markers (RAPD), isoenzymes markers and cytological analysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira situa-se numa posição de destaque a nível mundial, pois o Brasil é o primeiro país em termos de produção de laranjas, produção e exportação de suco de laranja concentrado.

Em termos nacionais a citricultura apresenta-se como uma atividade agroindustrial importante pois movimentada grande soma de recursos (mais de US\$ 1 bilhão/ano) e gera milhares de empregos. Entretanto, não está bem distribuída entre os estados. O Estado de São Paulo responde com cerca de 80 % da produção nacional de laranjas.

Apesar de ser extremamente competitiva, a citricultura brasileira apresenta uma série de limitações, uma das principais é a utilização quase que exclusiva do limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) como porta-enxerto, pois a partir da década de 60, mais de 90 % das plantas cítricas foram plantadas sobre esta espécie (Pompeu Junior, 1991). Este porta-enxerto apresenta ótimas características agrônômicas. No entanto, apresenta suscetibilidade a uma importante doença, o declínio dos citros. Esta doença, anualmente, tem levado à morte milhões de plantas cítricas, elevando os custos de produção, devido à necessidade de replantio.

Para a solução deste problema tem sido testadas como porta-enxerto no Brasil, outras espécies do gênero *Citrus* e de gêneros afins, tais como: tangerina ‘Cleópatra’, tangerina ‘Sunki’, tângelo ‘Orlando’, laranja ‘Caipira’, *Poncirus trifoliata*, entre outros. Entretanto, os resultados experimentais demonstram que nenhum destes porta-enxertos apresenta as excepcionais características do limão ‘Cravo’.

Uma alternativa é a produção de híbridos interespecíficos com o objetivo de se combinar características desejáveis dentro de uma mesma planta. Neste caso, a hibridação sexual pode ser realizada, entretanto, para o gênero *Citrus*, existem limitações devido à presença de alta heterozigosidade, esterilidade de pólen e óvulos, incompatibilidade sexual, apomixia e poliembrionia nucelar que dificultam e, em alguns casos, até impedem a produção de híbridos. A

estas dificuldades se adiciona a existência de fase juvenil longa nos híbridos obtidos por cruzamento, o que torna o programa de melhoramento demorado.

Uma alternativa ao melhoramento tradicional é a hibridação somática via fusão de protoplastos, neste caso, ao se fusionar duas células diplóides de espécies diferentes, o produto obtido será um híbrido alotetraplóide artificial.

A produção de híbridos somáticos interespecíficos e intergenéricos no gênero *Citrus* e com gêneros afins poderá resultar na produção de porta-enxertos mais promissores, devido a possibilidade de combinar características desejáveis de duas espécies numa mesma planta, incluindo a possibilidade de se obter um porta-enxerto híbrido com as excelentes características do limão 'Cravo' e que apresente formas de resistência ou tolerância ao declínio.

O objetivo do trabalho foi a produção de híbridos somáticos entre limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' por meio de fusão de protoplastos, com o uso do polietileno glicol (PEG). Alguns parâmetros associados aos experimentos de fusão e cultivo de protoplastos foram avaliados, tais como: meio de indução de calos e suspensões celulares; eficiência de isolamento de protoplastos de mesofilo e de suspensões celulares, usando-se diversas soluções enzimáticas; densidade de cultivo de protoplastos e eficiência formação de células heterocariontes em dois métodos de fusão. Além destes, ajustou-se uma metodologia de detecção de híbridos somáticos pelos métodos de marcadores moleculares RAPD e marcadores isoenzimáticos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A citricultura brasileira e mundial

Os citros se constituem no mais importante grupo da fruticultura mundial com volume físico de 22 % da produção total de frutas no mundo em 1994 (FAO, 1995). Na safra de 1994, a produção mundial de citros foi de 85,2 milhões de toneladas e das laranjas, 58,7 milhões de toneladas (69 % do total). Em termos de valores de exportações, os negócios da citricultura no mesmo ano movimentaram US\$ 6 bilhões, sendo US\$ 3,1 bilhões em frutas frescas e US\$ 2,1 bilhões com as processadas industrialmente (FAO, 1995).

A produção mundial de laranjas está concentrada em dois países: o Brasil com quase 32 % e o Estados Unidos (EUA), com 17%. Juntos, os dois países produziram em 1994, cerca de 50 % da produção mundial, ficando a outra metade dividida por 50 países (Neves, 1996).

Em 1994 o Brasil se apresentou como líder mundial na produção de laranjas com 18,6 milhões de toneladas, mas apresenta distribuição desigual entre os estados. Como exemplo, somente o Estado de São Paulo em 1995 concentrava a produção brasileira de laranjas (82 %) e com aproximadamente 73 % do total da área colhida do país. No total, foi carreado em divisas, ao redor de US\$ 1 bilhão/ano para o estado (Agrianual, 1997).

Nesse estado, a citricultura ocupava em 1996 ao redor de 900 mil hectares, distribuídos em mais de 20 mil propriedades agrícolas, empregando na indústria cerca de 9 mil trabalhadores e na agricultura, mais de 100 mil trabalhadores, favorecendo a economia de mais de cem municípios do estado (Neves, 1996).

Para avaliar a importância da agroindústria do citros no Brasil em termos de exportações, basta citar que durante a segunda metade dos anos 80 e nos primeiros anos desta década, o Brasil ocupou a posição de líder nas exportações mundiais de suco cítrico, sendo que o suco de laranja concentrado é o principal produto exportado. Segundo Agrianual (1997), na safra

1995/96, foram exportadas do Brasil, 1,07 milhões de toneladas de suco de laranja concentrado (79,8 % do total mundial); os Estados Unidos (EUA) ocupavam o segundo lugar no “ranking” dos exportadores com 82 mil toneladas anuais.

A produção mundial de suco de laranja concentrado tem se mantido estável nos últimos quatro anos, em torno de 2,2 milhões toneladas anuais. Neste mesmo período, a produção brasileira teve pequena oscilação (-5,7 %) e a dos EUA cresceu (+7,8 %). No entanto, o volume de exportações se manteve quase constante (Agrianual, 1997).

Não existem no país limitações climáticas para os citros, exceto em algumas áreas do Nordeste onde as chuvas são inferiores a 700 mm por ano e outras no Sul, onde podem ocorrer geadas fortes (Amaro et al., 1991). Vários autores tem realçado as inúmeras vantagens com relação às condições de clima, solo e topografia adequados para o cultivo de laranjas no Estado de São Paulo e que permitem o seu plantio em quase todo o estado (Neves, 1992 e Viégas & Guimarães, 1991).

As restrições climáticas constituem-se em sério fator limitante da produção de laranjas para fins industriais influenciando em várias propriedades da laranja, tais como: coloração, acidez, teor de sólidos solúveis, aroma, sabor e período de maturação. Estes fatores limitam a especificidade da fruta adequada ao processamento para extração do suco de laranja (Neves, 1996).

As boas condições climáticas do Estado de São Paulo, associadas ao uso de diferentes cultivares de laranja e outros citros, permitem a indústria local estender a suas operações por um período superior a 9 meses no ano (Viégas & Guimarães, 1991) enquanto na Flórida e no México, que são concorrentes diretos, este período está próximo a 6 meses, devido ao menor número de cultivares plantados e às condições climáticas (clima frio, sujeito a geadas, principalmente na região norte) (Neves, 1996).

Os cultivares de copa mais plantados no Estado de São Paulo em 1995 foram a laranja ‘Pêra’ (53 %), seguido das laranjas ‘Natal’ (26 %), ‘Valência’ (11 %) e ‘Hamlin’ (4 %); os outros cultivares plantados somam juntos 6 % do total (FAO, 1996).

Segundo Barret & Rhodes <sup>1</sup> (1976) citados por Grosser & Gmitter Junior (1990a), a maioria dos pomares comerciais de citros no mundo é formada em sistema de monocultura,

---

<sup>1</sup> BARRET, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Syst. Bot.*, v.1, p.130-136, 1976.

composta por um pequeno número de genótipos próximos, cultivada em pequenas áreas e com plantio adensado, criando um potencial para desastres em função do ataque de pragas e doenças.

## 2.2 Porta-enxertos de citros usados no Brasil

Os cultivares comerciais de citros raramente são cultivados na forma de pé-franco. O método mais usual é o enxerto sobre plantas de espécies diferentes, mas geneticamente próximas (porta-enxerto), que são mais adaptadas a ambientes particulares, resultando em tolerância a estresses, melhoramento da qualidade dos frutos e aumento da produção (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

A operação de enxertia em citros objetiva criar uma associação benéfica entre a copa e o porta-enxerto compatíveis, para que a planta criada pela enxertia seja produtiva e longa. Segundo Pompeu Junior (1991), as principais vantagens da enxertia são: a precocidade de início de produção; a uniformidade das plantas (cultivar de copa é praticamente idêntico à planta-mãe); a possibilidade de uso de borbulhas pré-imunizadas e certificadas; aumento de produção; resistência ou tolerância a condições desfavoráveis de clima, solo, pragas e doenças.

O limão ‘Cravo’, devido as suas excelentes características, é praticamente o único porta-enxerto sobre a qual foi construída a atual citricultura brasileira. As demais plantas estão enxertadas basicamente sobre tangerina ‘Cleópatra’, *P. trifoliata* e limão ‘Rugoso’ (Pompeu Junior, 1991).

A principal inconveniência na utilização de um único porta-enxerto já foi demonstrada pela virose da tristeza que, na década de 40, destruiu quase toda a citricultura brasileira que na época usava a laranja azeda como principal porta-enxerto (Pompeu Junior, 1991). Os prejuízos causados pelo vírus da tristeza constituíram-se no maior impacto econômico da citricultura mundial, pois ocasionou a destruição de milhões de plantas em vários países do mundo (Espanha, Argentina, Venezuela, Brasil e EUA) (Muller & Costa, 1991). A partir de então todos os porta-enxertos comerciais devem ser resistentes ou tolerantes ao vírus da tristeza. Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a), o limão ‘Rugoso’ e as laranjas doces (*C. sinensis*) são tolerantes à tristeza, as tangerinas são resistentes e algumas laranjas trifoliadas são imunes.

A partir da década de 70, uma doença, o declínio dos citros, vem causando a morte de milhões de plantas por ano no Brasil, principalmente nas combinações de laranja doce enxertadas

sobre limão 'Cravo' (Guirado et al., 1991). O declínio dos citros é uma doença sem causa ainda determinada, de rápida disseminação pelo campo e que tem como sintoma inicial uma murcha setorial ou generalizada da planta. O desenvolvimento da doença pode levar à morte das plantas, no período de 6 meses a 3 anos após o início dos sintomas (Guirado et al., 1991).

Na Flórida existe uma doença semelhante chamada de "blight" do citros que, segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a), provavelmente possui o mesmo agente causal do declínio do citros no Brasil. Embora já tenha sido realizada a transmissão, via enxerto de raízes, do "blight" (nos EUA) em 1984 e do declínio (no Brasil) em 1989, continua sendo desconhecido o seu agente causal (Guirado et al., 1991).

Uma fonte de resistência adequada ao "blight" e/ou declínio dos citros ainda não foi identificada no gênero *Citrus* (Grosser & Gmitter Junior, 1990a). Entretanto, Guirado et al., (1991) afirmam que cultivares de copa enxertados sobre tangerinas, laranja 'Caipira' e tângelo 'Orlando', não tinham sido afetados até 1991 pelo declínio, apresentando relativa tolerância. Os mesmos autores afirmam não ter sido constatado o declínio nos cultivares de copa de tangor 'Murcote' e nos limões verdadeiros, mesmo quando enxertados em limão 'Cravo'.

Pompeu Junior (1991) relata que a tangerina 'Cleópatra' mostrou uma tolerância média ao declínio, sendo constatado o declínio somente em algumas plantas com mais de 14 anos de idade. Com relação a plantas enxertadas em tangerina 'Sunki', ainda não tinha sido constatada a ocorrência de declínio.

Uma importante característica avaliada em programas de melhoramento de porta-enxertos é a tolerância aos principais nematóides do solo que atacam os citros. O aumento da população do nematóide *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. no solo ocasiona o chamado "declínio lento" de plantas cítricas. O fato não ocasiona a morte de plantas mas pode reduzir extremamente o vigor e a produtividade; os efeitos vão se tornando mais pronunciados à medida que as plantas envelhecem (Lordello & Lordello, 1991). Outro nematóide com menor incidência nos citros é o *Radopholus citrophilus* Huettel, chamado de nematóide cavernícola, somente encontrado em algumas áreas mais restritas da Flórida (Lordello & Lordello, 1991).

Com relação a fatores abióticos, a resistência de porta-enxertos à salinidade, seca e ao frio são os mais importantes para a cultura de citros. Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a) os porta-enxertos podem ter uma significativa influência na resistência das plantas ao frio. Plantas enxertadas sobre laranjas trifoliadas e tangerina 'Cleópatra' são menos suscetíveis ao frio do que

plantas enxertadas sobre limão 'Cravo' ou limão 'Rugoso'. A expansão da citricultura para regiões de solos salinos somente será possível com o melhoramento de porta-enxertos visando tolerância à salinidade (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

A característica de resistência à seca é extremamente importante para regiões de estação chuvosa insuficiente e sem a possibilidade de irrigação suplementar, caso do Nordeste brasileiro. Os limões 'Cravo' e 'Rugoso' são tolerantes à seca devido ao sistema radicular vigoroso e profundo, mas são extremamente sensíveis ao declínio (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

Castle <sup>2</sup> (1987) citado por Louzada et al. (1992) comenta que, dentre os problemas fitossanitários, a tolerância ao "blight" do citros, resistência ao vírus da tristeza, *Phytophthora* e nematóides são os fatores principais que ditam a escolha de um porta-enxerto para ser usado comercialmente na Flórida (EUA). A performance horticultural e a resistência aos estresses abióticos também devem ser adequados. Segundo os mesmos autores, não há porta-enxerto comercial que satisfaça completamente a todos estes critérios de seleção.

Castle <sup>2</sup> (1987) citado por Grosser et al. (1990) afirma que, a tangerina 'Cleópatra' é o porta-enxerto comercial mais importante da Flórida devido as suas tolerâncias à tristeza, exocorte, xiloporose, salinidade, frio e solos calcáreos, além de apresentar pouca incidência do "blight" do citros. Segundo os mesmos autores, os problemas que limitam o uso da tangerina 'Cleópatra' são as suscetibilidades à nematóides, *Phytophthora* e a baixa produtividade em plantas jovens.

A diversificação no uso de porta-enxertos no Brasil é uma necessidade premente. Para isto tem sido testadas experimentalmente várias espécies de porta-enxertos. Pompeu Junior (1991) relata que os porta-enxertos: tangerina 'Cleópatra', tangerina 'Sunki', *P. trifoliata*, laranja 'Caipira DAC' e tângelo 'Orlando' seriam os porta-enxertos mais indicados para a diversificação no Estado de São Paulo. Entretanto, o autor comenta que nenhum destes apresenta as excelentes características agrônômicas do limão 'Cravo', que continua tendo a preferência dos produtores e viveiristas, mesmo sendo suscetível ao declínio.

As principais características do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra' como porta-enxertos segundo Pompeu Junior (1991), estão descritas na Tabela 1.

---

<sup>2</sup> CASTLE, W.S. Citrus rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. (Eds.) *Rootstocks for fruit crops*. New York, Wiley, 1987. p.361-399.

Tabela 1. Principais características do limão 'Cravo' e da tangerina 'Cleópatra', como porta-enxertos.

Característica	Limão 'Cravo'	Tangerina 'Cleópatra'
Vigor de viveiro	grande	médio
Resistência à gomose	média	média
Resistência à seca	grande	média
Início de produção	precoce	médio
Produção	boa	boa
Qualidade de frutos	média	boa
Porte da planta	médio	grande
Solo indicado	arenoso ou argiloso	argiloso
Declínio	suscetível	tolerante

Fonte: Pompeu Junior (1991)

### 2.3 Genética e melhoramento do gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* pertence a família *Rutaceae*, que possui somente três gêneros com importância econômica: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*. Entre eles é possível a polinização com a obtenção de híbridos, alguns com valor comercial. O número básico de cromossomos é  $x = 9$ , sendo a diploidia ( $2n = 18$ ) a condição mais freqüente no gênero *Citrus* (Moreira & Pio, 1991).

Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a); Moreira & Pio (1991) e Cristofani (1991) a hibridação controlada no gênero *Citrus* apresenta várias dificuldades que estariam ligados à biologia reprodutiva das plantas do gênero. Um dos principais fatores seria a alta heterozigiosidade da maioria dos cultivares de citros; como conseqüência, cruzamentos entre cultivares geralmente produz progênies fracas, devido a ocorrência de depressão por endogamia. No entanto, uma seleção de plantas híbridas pode ser realizada na progênie, principalmente com o auxílio de algum tipo de marcador.

A esterilidade de pólen e óvulos e sistemas de auto e alo-incompatibilidade gametofítica têm sido observados entre muitos cultivares de citros e em híbridos interespecíficos (Soost & Cameron, 1975), estas incompatibilidades impedem muitas hibridações potenciais.

Várias espécies de citros podem ser hibridadas sexualmente com espécies de gêneros próximos, mas existem gêneros mais distantes com características interessantes e que são sexualmente incompatíveis (Swingle & Reece, 1967).

A ocorrência de apomixia facultativa via embrionia nucelar resulta freqüentemente na ocorrência de sementes poliembriônicas. Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a), o efeito mais marcante da poliembrionia está na ausência ou na produção de poucas plantas híbridas a partir de cruzamentos controlados. Esta característica (poliembrionia) associada à esterilidade e à depressão por endogamia dificultam a produção de populações segregantes vigorosas e com grande número de indivíduos, fonte básica para o trabalho de melhoristas.

A maioria da espécies de citros possui fase juvenil longa, com período mínimo de 5 anos para o aparecimento das primeiras flores e frutos (Soost & Cameron, 1975). As primeiras avaliações do potencial produtivo de uma planta devem ser realizadas após um período mínimo de crescimento de copa, assim, a avaliação de plantas híbridas requer tempo e custos elevados.

Segundo Moreira & Pio (1991) os principais objetivos buscados pelo melhoramento dos citros em todo mundo, estão relacionados à resistência ao frio, resistência à moléstias (gomose, cancrose e outras), coloração dos frutos, ampliação do período de safra, menor número de sementes, menor porte e tolerância à tristeza. Várias destas características são influenciadas pelo porta-enxerto, destacando-se o porte da planta, a precocidade do início da produção, a produção, a qualidade dos frutos, a tolerância aos estresses (seca, frio, salinidade, etc...) e a tolerância ou resistência a doenças (Pompeu Junior, 1991).

A variação genética se origina de processos distintos. A maior parte da variação genética decorre de recombinação dos genes, sendo que os métodos de melhoramento por cruzamento exploram estas recombinações. Ocasionalmente podem ocorrer mutações de ponto, aberrações cromossômicas estruturais e de número, sendo que estas modificações podem ser decorrentes de mutações induzidas ou espontâneas (Moreira & Pio, 1991).

Os impedimentos relacionados à biologia reprodutiva do gênero *Citrus* limitaram o impacto do melhoramento tradicional, por meio de cruzamentos controlados, no lançamento de novos cultivares. Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a) e Moreira & Pio (1991), a maioria

dos novos cultivares de copa e porta-enxertos utilizados na citricultura, foi originada a partir de seleção de “seedlings” obtidos por cruzamentos naturais e por mutantes espontâneos de gemas, originados de cultivares já existentes. A laranja ‘Piralima’ se constitui num bom exemplo de trabalho de melhoramento realizado por meio de seleção de clones obtidos via mutações naturais em gemas (Moreira & Pio, 1991).

Um programa de melhoramento extenso por meio de cruzamentos controlados resultou na obtenção de alguns híbridos de importância econômica na Flórida (EUA). Como exemplo é citado que muitos tângelos de importância econômica, tais como o tângelo ‘Orlando’, ‘Minneola’ e ‘Seminole’ foram produzidos a partir do cruzamento de tangerinas (*C. reticulata*) e pomelos (*C. paradisi*). Os citranges ‘Troyer’ e ‘Carrizo’ também foram obtidos pelo mesmo método mas a partir de cruzamentos de *P. trifoliata* com cultivares de laranjas (Moreira & Pio, 1991).

Os métodos de indução de mutações também já têm sido rotineiramente utilizados em programas de melhoramento de citros (Tulmann Neto et al., 1991).

Mais recentemente com o desenvolvimento da genética celular e molecular, novas técnicas têm sido aplicadas com o objetivo de sobrepor as barreiras reprodutivas intra e intergenéricas no gênero *Citrus*. A hibridação somática por meio de fusão de protoplastos se constitui numa técnica que permite a transferência de genes entre espécies taxonomicamente próximas ou distantes.

Nos casos em que genes de interesse tenham sido identificados e isolados em espécies não-relacionadas, a transferência pode ser feita com uso de técnicas de transformação (Waara & Glimelius, 1995).

## **2.4 Hibridação somática interespecífica e intergenérica em citros**

### **2.4.1 Vantagens e limitações da técnica de hibridação somática**

Vários trabalhos descrevem com sucesso a obtenção de híbridos somáticos entre espécies do gênero *Citrus* e também com espécies de gêneros relacionados.

Em Citros, a hibridação somática por meio de fusão de protoplastos se desenvolveu a partir dos avanços recentes da cultura de tecidos (Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Cristofani, 1991). O método consiste no isolamento de protoplastos de dois parentais diplóides, por meio da

digestão da parede celular com solução enzimática, seguida de fusão por métodos físicos ou químicos. O cultivo “in vitro” dos produtos da fusão nos diversos estádios (protoplastos, microcolônias, calos, embriões, planta) possibilita a obtenção de plantas híbridas alotetraplóides.

Uma revisão bem completa sobre o assunto foi elaborada por Grosser & Gmitter Junior (1990a). Nesta os autores relatam as vantagens e as limitações do emprego da hibridação somática no melhoramento de citros, em comparação com método de hibridação sexual controlada. Segundo os autores, uma possível vantagem da hibridação somática estaria no uso direto (no campo) de híbridos somáticos como porta-enxertos, sem a necessidade da realização de retrocruzamentos.

O cruzamento das plantas híbridas tetraplóides com parentais diplóides geralmente resulta em plantas triplóides inférteis. Esta técnica tem sido utilizada com o objetivo da produção de cultivares comerciais de copa triplóides, sem sementes (Deng et al., 1996 e Kaneyoshi et al., 1997). Uma segunda vantagem é a de quebrar as barreiras de incompatibilidade entre espécies ou gêneros, criando combinações de plantas híbridas impossíveis de serem obtidas por hibridação sexual; conseqüentemente germoplasmas selvagens que apresentem características desejáveis podem ser introduzidos no “pool” genético dos citros cultivados.

Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990b), o objetivo mais atingido pelo melhoramento de plantas tradicional é a transferência de genes que conferem resistência a doenças ou tolerância a estresses, de espécies selvagens para cultivares melhorados produtivos.

Ao contrário da hibridação sexual, na hibridação somática ocorre a combinação e transmissão dos dois citoplasmas, uma variabilidade genética adicional pode surgir a partir da recombinação de genes citoplasmáticos e nucleares (Kumar & Cocking, 1987).

As principais limitações da hibridação somática são três, segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a). Primeiramente, uma das duas espécies parentais tem que possuir capacidade morfogênica “in vitro”, característica indispensável quando se trabalha com fusão de protoplastos. Os híbridos somáticos normalmente produzem flores anormais ou inférteis; entretanto, podem ser usados como fonte de pólen ou de óvulos para a realização de retrocruzamentos.

Outra limitação é a de que havendo necessidade de se realizar retrocruzamentos com um dos parentais com o objetivo de eliminar características indesejáveis, deve-se ter em mente que a planta híbrida é um tetraplóide artificial.

Segundo Cocking <sup>3</sup> (1985), citado por Grosser & Gmitter Junior (1990b), exceto em Solanaceae, Leguminosae e Cruciferae, os híbridos somáticos geralmente não são usados diretamente no campo como variedades, devido à presença de características indesejáveis trazidas do parental selvagem. Neste caso, um extenso trabalho de retrocruzamentos deve ser feito para eliminar estas características. Muitas vezes, estes esforços não resultam em sucesso devido a problemas de baixa fertilidade, infertilidade e devido ao aumento da ploidia nos híbridos.

No caso do gênero *Citrus*, Grosser & Gmitter Junior (1990b) citam que até híbridos intergenéricos podem ter uso direto como porta-enxerto, mas se retrocruzamentos forem necessários para melhorar a performance horticultural, uma ou duas gerações podem ser suficientes.

## 2.4.2 Histórico da cultura de tecidos de citros

### 2.4.2.1 Cultura de calos embriogênicos

A cultura de tecidos e células surgiu inicialmente como uma técnica auxiliar no processo de melhoramento genético de espécies cítricas. Um dos primeiros enfoques foi a obtenção de embriões nucleares “in vitro” a partir de espécies monoembriônicas, com a finalidade de produzir plantas isentas de viroses. Posteriormente, intensificou-se a obtenção de calos nucleares embriogênicos devido a possibilidade de se obter embriões somáticos em grande quantidade a partir destes calos (Cristofani, 1991). Uma revisão mais completa sobre indução, cultivo de calos e embriogênese somática em citros foi elaborada por Oliveira (1993).

O primeiro relato do cultivo de calos embriogênicos foi o de Kochba et al. (1972), que obtiveram calos embriogênicos de laranja ‘Shamouti’ a partir de nucelos. A partir de então, dezenas de trabalhos descrevem a obtenção de calos embriogênicos a partir de tecido nucelar (Vardi et al., 1982; Cristofani, 1991; Oliveira, 1993), embriões adventícios de *Microcitrus* (Vardi et al., 1986), região do hipocótilo de embriões de laranja doce, tangerina ‘Ponkan’ (Hidaka & Kajiura, 1988) e de *C. madurensis* Lour. (Ling et al., 1989), óvulos não fertilizados (Kochba et al., 1972; Vardi et al., 1982) e óvulos imaturos fertilizados (Kobayashi et al., 1983).

---

<sup>3</sup> COCKING, E.C. Somatic hybridization: implications for agriculture. In: ZAITLIN, M. (ed.) **Biotechnology in plant science**. Orlando, Academic, 1985. p.101-113.

Estes calos constituíram-se em excelentes materiais para o isolamento de protoplastos totipotentes. Uma vez obtido sucesso na regeneração de plantas de várias espécies e cultivares de citros, foram realizados estudos visando a fusão de protoplastos com a consequente obtenção de híbridos somáticos.

Segundo Moore (1985), os fatores que exercem as maiores influências sobre o processo de dediferenciação celular e que resultará na produção de calos embriogênicos são: o genótipo, a idade do explante, as condições ambientais de cultivo da planta doadora, os componentes do meio de cultivo e as condições de cultivo.

Kochba et al. (1972) verificaram que frutos de laranja 'Shamouti' com quatro semanas de idade possibilitaram melhores resultados para a extração e cultivo de óvulos. Goldman (1988) obteve melhores resultados na cultura de óvulos de laranja 'Pera' com 12 semanas de idade.

Oliveira (1993) obteve calos embriogênicos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' por meio de cultivo de nucelos extraídos de frutos com 12 semanas de idade. Enquanto Vardi et al. (1982) cultivaram óvulos extraídos de frutos de diversas espécies, com idade variando entre 2 e 6 semanas após a antese.

O meio de cultura básico mais utilizado para o cultivo de calos embriogênicos é composto por sais (macro e micronutrientes) e vitaminas de Murashige & Tucker (1969) adicionado de  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose (meio MT) (Ling et al., 1989; Ling & Iwamasa, 1994). A adição de extrato de malte no meio de cultivo de calos e suspensões celulares pode ser observada em diversos trabalhos, sempre na concentração de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  (Kochba et al., 1972; Kochba & Spiegel-Roy, 1973).

De acordo com Oliveira (1993), apesar de terem sido relatados os efeitos benéficos do extrato de malte na embriogênese de citros, sabe-se que o extrato de malte é uma substância complexa e devido a isto, ainda se desconhece qual ou quais de seus componentes são os responsáveis por este efeito.

Uma vez obtidos os calos, estes podem ser cultivados por longos períodos desde que mantidos em meio adequado, com preferência para meios sem a presença de reguladores de crescimento pois o uso de reguladores de crescimento por longo tempo, em alguns casos, pode elevar a taxa de variação somaclonal. Vardi et al. (1982) verificaram que calos de diversas espécies cultivados por mais de um ano, em meio sem reguladores de crescimento, apresentavam células diplóides com número cromossômico normal ( $2n = 18$ ), apenas uma linhagem de limão

'Villafranca' apresentou células tetraplóides ( $2n = 36$ ). O meio inicial de indução de calos desta linhagem de limão continha 0,5 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), os autores associaram a variação do número cromossômico à adição desta auxina.

Alguns trabalhos descrevem a indução e/ou a manutenção de calos em meio contendo 6-benzilaminopurina (BAP), geralmente nas concentrações de 5 ou 10 mg.L<sup>-1</sup> (Saito et al., 1991, 1993; Ohgawara et al., 1985,1991; Kobayashi et al., 1983, 1985, 1988 e 1991a). Kobayashi et al. (1984) concluíram que o melhor meio de indução de calos embriogênicos em 11 cultivares foi o meio MT suplementado com 10 mg.L<sup>-1</sup> de BAP .

Oliveira (1993) concluiu que os calos de tangerina 'Cleópatra' com maior taxa de crescimento foram aqueles habituados em meio MT sem reguladores de crescimento, mas induzidos a partir de meio MT acrescido de 10 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Para limão 'Cravo', o mesmo foi observado para calos habituados em meio MT e induzidos em meio MT acrescido de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolilacético (AIA) e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina (CIN).

#### 2.4.2.2 Cultura de células em suspensão

As suspensões celulares são obtidas transferindo-se uma quantidade inicial de calos friáveis para o meio líquido e mantendo-as sob agitação constante. Em geral, a composição do meio de cultivo para a obtenção de suspensões celulares é semelhante ao meio usado para o cultivo de calos (Dixon, 1985).

Na cultura de células em suspensão de citros têm sido usados os meios: MT sem reguladores de crescimento (Grosser et al., 1988a, 1988b), meio MT suplementado com 10 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Ohgawara et al. 1985, Kobayashi et al., 1988) e meio de cultura H + H (Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Deng et al., 1992).

Grosser et al. (1990) relatam a necessidade do acréscimo de 240 mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico (MES) ao meio de MT líquido, com o objetivo de reduzir a acidificação do meio causado pelo cultivo de suspensões celulares de tangerina 'Cleópatra'. Segundo os autores, este fenômeno da acidificação do meio de cultivo estaria relacionado ao insucesso no estabelecimento de suspensões celulares desta espécie.

O conhecimento das fases de crescimento de uma suspensão celular dentro de cada subcultivo é importante, uma vez que o potencial embriogênico das células em suspensão pode ser

mantido com a utilização de subcultivos nas fases de crescimento logarítmico das células (Ammirato, 1984).

O tempo de subcultivo mais utilizado para suspensões celulares de diversas espécies de citros é de duas semanas (Sim et al., 1988; Grosser et al., 1989, 1990; Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Deng et al., 1992).

Oliveira (1993) trabalhando com suspensões celulares, estabeleceu a curva de crescimento e estimou o tempo necessário para a duplicação da população de células de tangerina ‘Cleópatra’ (aproximadamente 8,3 dias) e de limão ‘Cravo’ (16,5 dias). Baseado nos dados obtidos, o autor recomenda os subcultivos à cada 12 dias para suspensões celulares de tangerina e 16 dias para limão.

#### **2.4.2.3 Isolamento de protoplastos**

O termo “protoplasto” é normalmente usado para descrever células livres de parede celular. A ausência de parede celular permite uma variedade de manipulações experimentais, tais como produção de híbridos somáticos e transformação celular (Fungaro & Vieira, 1989).

O primeiro isolamento e cultivo de protoplastos totipotentes de citros foi relatado por Vardi et al. (1975), utilizando laranja ‘Shamouti’. Neste trabalho os autores chegaram somente até o estágio de embrióides.

As soluções usadas para a digestão da parede celular e conseqüente liberação de protoplastos são comumente chamadas de soluções enzimáticas. Estas são normalmente compostas por enzimas hidrolíticas do tipo das celulases, hemicelulases e pectinases, estabilizadores osmóticos, tampões de pH e estabilizadores de membrana.

D’Utra Vaz et al. (1993), Dornelas (1995), Otoni (1995) trabalhando com espécies de *Passiflora* e Oliveira (1993) com citros, usaram a solução CPW 13M (Frearson et al., 1973 modificado por Gilmour et al., 1989) como meio de dissolução das enzimas. Vários autores, trabalhando com isolamento de protoplastos de citros, utilizaram como meio base o MT (Ling et al., 1989), metade da concentração de MT (Ling & Iwamasa, 1994), somente os macroelementos de MT na sua concentração normal (Vardi et al., 1982; Ohgawara et al., 1985, 1991; Saito et al., 1991, 1993) ou metade da concentração de macronutrientes (Kobayashi, et al., 1983, 1988, 1991a; Sim et al., 1988). Outros autores produziram uma solução enzimática concentrada como

estoque e a utilizaram em diluição com meio de cultivo BH<sub>3</sub> (Grosser & Chandler, 1987, Grosser et al., 1988a, 1989).

Segundo Vardi & Galun (1988) a pressão osmótica do meio, tipo e concentração de enzimas e tempo de digestão enzimática afetam enormemente a eficiência de isolamento e a capacidade de divisão dos protoplastos de citros.

Para Evans & Bravo (1983) e Carneiro & Conroi (1990), além dos fatores já citados, outros fatores que também afetam a eficiência de isolamento são: genótipo, estágio fisiológico das células, concentração e tipo de estabilizadores osmóticos, presença de estabilizadores de membrana, agitação, luminosidade e temperatura.

#### **2.4.2.3.1 Pressão osmótica e tipo de estabilizadores osmóticos na solução enzimática**

Na maioria dos trabalhos, a osmolaridade da solução enzimática varia entre 0,6 e 0,7 M (Vardi et al., 1975, 1982; Vardi & Galun, 1988; Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Ling et al., 1989; Ling & Iwamasa, 1994; Oliveira, 1993).

Segundo Vardi et al. (1975) o isolamento usando pressão osmótica de 0,7 M foi considerado como ótimo. Vardi & Galun (1988) afirmam que a adição de 0,7 M de manitol (sozinho) ou em combinação com sacarose se constitui numa osmolaridade adequada para a solução enzimática.

Ling et al. (1989) e Ling & Iwamasa (1994) usaram solução enzimática com acréscimo de 0,7 M de sorbitol, não observando efeito do sorbitol na eficiência de cultivo.

Segundo Grosser (1994) a concentração osmótica da solução, o tipo e a concentração de enzimas e tempo de digestão devem ser avaliados empiricamente. O mesmo autor sugere que o rompimento excessivo de protoplastos pode ser reduzido pelo aumento da concentração osmótica do meio.

#### **2.4.2.3.2 Tipo e concentração de enzimas**

As soluções enzimáticas utilizadas por vários autores em experimentos com citros são geralmente diferentes, principalmente na concentração das enzimas. As principais celulasas utilizadas são: Cellulase Onozuka R10 (Yakult Honsha Ltd.), Cellulase Onozuka RS (Yakult

Honsha Ltd.) e Driselase. As pectinases mais utilizadas são a Macerozyme R10 (Yakult Honsha Ltd.), Pectinase (Koch-light Lab.) e Pectolyase Y-23.

Grosser (1994) sugere que a retirada da maioria dos sais contidos nas pectinases, celulases e hemicelulases pode ter efeitos benéficos. A combinação da solução de enzimas com um meio de cultivo de protoplastos complexo pode reduzir o estresse durante o isolamento e por conseguinte aumentar a viabilidade dos protoplastos (Grosser, 1994).

#### **2.4.2.3.3 Tempo de digestão**

O tempo de incubação na solução enzimática é muito variável, com o máximo de 16 e mínimo de 6 horas.

Segundo Grosser (1994) a exposição excessiva à solução enzimática enfraquece a membrana plasmática dos protoplastos e reduz a sua viabilidade. O ideal seria a realização de um experimento-teste que determinasse o tempo mínimo necessário para obtenção da quantidade de protoplastos suficiente para se realizar as fusões.

#### **2.4.2.3.4 Genótipo**

Vardi & Galun (1988) observaram uma grande variação de resposta, entre várias espécies de citros e entre cultivares de uma mesma espécie, em experimentos de isolamento e cultivo de protoplastos. Os autores observaram que uma mesma solução enzimática usada para isolar protoplastos de calos, ocasionava diferenças na eficiência de cultivo entre 0,7 e 20,7 % em diferentes espécies. O mesmo acontecendo para outras soluções enzimáticas testadas.

#### **2.4.2.3.5 Estádio fisiológico**

Nos primeiros trabalhos, os protoplastos de citros eram isolados a partir de calos nucleares embriogênicos. Atualmente porém, têm sido utilizadas suspensões celulares devido à uma maior uniformidade da cultura de células, o que possibilita uma maior eficiência de isolamento devido à ação mais uniforme da solução enzimática (Ammirato, 1984).

Um menor tempo de incubação na solução enzimática pode ser obtido com o uso de calos e suspensões celulares em estágio log, quando a parede celular está mais fina e de composição principalmente celulósica (Power & Chapman, 1985).

Para o isolamento de protoplastos de mesofilo, Grosser (1994) recomenda que sejam retiradas folhas preferencialmente de plantas saudáveis e vigorosas, crescidas sob condições de alta umidade e baixa intensidade luminosa, utilizar folhas completamente desenvolvidas, mas descartando as folhas mais endurecidas, mesmo quando obtidas de plantas jovens.

Segundo Grosser & Chandler (1987) e Grosser (1994) a melhor fonte de protoplastos de folha é obtida a partir de plantas cultivadas “in vitro”, pois assim evita-se os procedimentos de descontaminação superficial das folhas, já que algumas espécies são muito sensíveis a estes procedimentos.

#### **2.4.2.3.6 Agitação, luminosidade e temperatura**

Na maioria dos trabalhos de protoplastos de citros, o isolamento foi realizado sob agitação baixa (25-50 rpm), que segundo Grosser (1994) pode facilitar a liberação dos protoplastos. Segundo o mesmo autor, os isolamentos devem ser realizados numa temperatura que permita a máxima atividade enzimática associada a uma boa viabilidade dos protoplastos (25 a 28 °C) e no escuro, pois a maioria dos protoplastos é sensível à luz.

Os métodos de isolamento de protoplastos de citros descritos na literatura são bem semelhantes, variando principalmente na concentração das enzimas celulases e pectinases. Como exemplo, pode se verificar em Vardi et al. (1982), Ling et al. (1989), Ohgawara et al. (1985), Saito et al. (1991) e Grosser & Chandler (1987).

A purificação dos protoplastos geralmente é feita por meio de filtração em peneiras de náilon ou aço com malha variando entre 30 e 60 µm, com o intuito de separar os protoplastos intactos, de resíduos de material não digerido. A seguir, a retirada da solução enzimática é feita por meio de combinação de centrifugação e ressuspensão em meio de lavagem (geralmente o mesmo meio base da solução de enzimas).

Para Grosser (1994) os restos celulares resultantes do estouro de protoplastos devem ser retirados mediante o uso de centrifugação gradiente (sacarose a 25 % : manitol a 13 %) ou outros

gradientes. Segundo o mesmo autor, a presença dos restos celulares pode reduzir tanto o pH do meio de cultivo, como a viabilidade de protoplastos e a frequência de fusão.

A viabilidade dos protoplastos pode ser verificada por meio de vários métodos, um dos mais utilizados é o de coloração com diacetato de fluoresceína (DAF) seguido de observação em microscópio ótico com luz U.V., semelhante ao usado por Dornelas (1995) ou Otoni (1995).

Em citros, Oliveira (1993), trabalhando com limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' avaliou que a viabilidade dos protoplastos das duas espécies, usando o corante azul de metileno, se situava entre 81 e 92 %. Cristofani et al. (1993) usaram o DAF para avaliar a radiosensitividade de protoplastos de laranja Pêra a diferentes doses de raios gama.

A capacidade de divisão das células derivadas de protoplastos é enormemente influenciada pelo sistema de cultivo e pela densidade de cultivo (Fungaro & Vieira, 1989). Densidade de cultivo corresponde a quantidade de protoplastos cultivados em relação a quantidade de meio de cultura utilizado.

#### 2.4.2.4 Cultivo de protoplastos

Vários métodos de cultivo de protoplastos de citros têm sido descritos nos trabalhos de hibridação somática; entretanto, dois grupos principais podem ser distinguidos: sistemas de cultivo em meio líquido e sistemas de cultivo de protoplastos imobilizados em meio semi-sólido (Grosser, 1994). Este último pode ser subdividido ainda em cultivo em gotas e em camadas de agarose (Fungaro & Vieira, 1989).

Colijn-Hooymans et al. (1988) observaram que o sistema de cultivo de protoplastos imobilizados é mais eficiente que o cultivo em meio líquido pois não ocorre a aglutinação dos mesmos e portanto, são menos propensos a sofrer alteração na densidade de cultivo.

A eficiência de cultivo expressa a porcentagem de protoplastos vivos após um período de tempo de cultivo, ou seja, protoplastos que realizam divisão celular, em relação ao total de protoplastos inicialmente cultivados.

Binding et al. (1988) consideraram que o sistema de cultivo em gotas é mais eficiente que o de camadas de agarose, pois as gotas permitem um maior intercâmbio de nutrientes entre a fase sólida e a fase líquida do meio.

D'Utra Vaz et al. (1993) e Otoni (1995) consideram que esta maior eficiência do cultivo em gotas estaria relacionada a um maior suprimento de oxigênio, ocasionando uma produção mais efetiva de ATP, com efeitos favoráveis nas divisões celulares; ao contrário, no cultivo em camada de agarose, os protoplastos ficam completamente submersos sob uma lâmina de meio líquido. D'Utra Vaz et al. (1992) observaram que, em atmosferas mais enriquecidas de oxigênio, a eficiência de cultivo de protoplastos e a capacidade de regeneração de plantas são superiores.

A eficiência de cultivo também pode ser afetada pelo tipo de agente gelificante (Ling et al., 1989). Os autores compararam a eficiência de cultivo em três métodos de cultivo (líquido, sólido/sem meio líquido e camada) e usando dois agentes gelificantes (ágar e agarose). A eficiência máxima (32 %) ocorreu nos meios com agarose (sólido ou camada). Segundo Debergh (1983), diferenças na marca e na pureza da agarose e do ágar, afetam a sua eficiência como agente gelificante.

As fontes de carbono e estabilizadores osmóticos (açúcares e açúcares alcoólicos) usados em vários meios de cultivo de protoplastos afetam a capacidade de divisão e também tem influência na regeneração de plantas. (Vardi et al., 1975, 1982; Vardi & Galun, 1988; Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

Vardi & Galun (1988) realizaram uma revisão sobre o uso de diferentes fontes de carbono. Para os autores, o sorbitol pode ser usado para cultivo de laranja 'Azeda', a frutose pode ser utilizada para tangerinas e a galactose foi considerada como boa fonte de carbono para laranja 'Shamouti' e laranja 'Azeda'. Os autores concluem que, como a sacarose e o manitol foram considerados como eficientes fonte de carbono e estabilizadores osmóticos para todas as espécies avaliadas, devem ser recomendados na concentração de 0,3 M cada, para meios de cultivo de protoplastos. Kobayashi et al. (1985) e Grosser & Gmitter Junior (1990a) consideram a combinação de 0,15 M de sacarose e 0,45 M de manitol como mais apropriada.

Segundo Grosser (1994) o meio de cultivo complexo 8P descrito por Kao & Michayluk (1975) tem sido usado com sucesso no cultivo de protoplastos e regeneração de muitas espécies de plantas. Segundo o mesmo autor, o sucesso deste meio provavelmente está na concentração apropriada de multivitaminas, ácidos orgânicos e dos açúcares/açúcares alcoólicos adicionados. Estes aditivos proporcionam uma capacidade adicional de tamponamento e de redução do estresse ambiental nos protoplastos devido ao fornecimento de metabólitos intermediários que são requeridos pelos protoplastos.

Grosser (1994) cita que eficientes meios de cultivo de protoplastos podem ser produzidos apenas adicionando os aditivos do meio 8P a um meio básico, como é o caso do meio BH<sub>3</sub>. Uma diferença adicional do meio BH<sub>3</sub> está na eliminação do nitrato de amônia (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) e substituição por glutamina, devido a ação tóxica da amônia para protoplastos. A glutamina ou o nitrato de cálcio podem ser usados como fonte alternativa de nitrogênio para o meio.

Os meios mais utilizados para cultivo de protoplastos de citros são o meio MT (Murashige & Tucker, 1969) e o meio BH<sub>3</sub> (Grosser & Chandler, 1987).

Segundo Vardi & Galun (1988), os protoplastos de citros em cultivo possuem uma fase lag relativamente grande. Assim, a primeira divisão celular ocorre geralmente entre 10 e 14 dias após o cultivo (Vardi & Galun, 1988; Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Deng et al., 1992).

Sim et al. (1988) observaram as primeiras divisões de protoplastos de *C. mitis* 3 dias após o isolamento.

A eficiência de cultivo de protoplastos de citros tem sido, em média, de 3,6 a 9 % aos 28 dias (Vardi et al., 1975) e de 0 a 35 % para Grosser & Gmitter Junior (1990a).

As densidades de cultivo mais utilizadas em trabalhos com citros são 1 e 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos por ml de meio de cultura. Vardi & Galun (1988) relatam que protoplastos de citros requerem uma densidade mínima de cultivo (em torno de 8 x 10<sup>4</sup> - 1 x 10<sup>5</sup> protoplastos por ml) para ocorrer divisões celulares.

Oliveira (1993) cultivou protoplastos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' usando o cultivo em gotas de agarose e com densidade de 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos por ml. A eficiência de cultivo foi avaliada aos 14 dias, obtendo-se 5 % para limão e 9 % para tangerina.

Segundo Grosser (1994), uma eficiência de cultivo extremamente alta pode inibir a futura indução de embriogênese somática e conseqüentemente inibir a regeneração de plantas. O autor recomenda a diluição da cultura ou transferência precoce (4 a 8 semanas após o isolamento) para meio sólido, se for observada uma alta eficiência de cultivo.

Para Kobayashi et al. (1985), no cultivo de protoplastos de citros em alta densidade de cultivo, algumas substâncias são produzidas ocasionando a supressão da embriogênese.

Sim et al. (1988) trabalhando com cultivo de protoplastos de *C. mitis*, utilizaram alta densidade de cultivo (2 x 10<sup>6</sup> protoplastos por ml de meio) obtendo uma eficiência de 0,0052 % aos 21 dias. Os autores comentam que apesar da baixa eficiência de cultivo ocasionado pela alta

densidade inicial de protoplastos, obtiveram um número elevado de embriões (mais de 1000 embriões em 35 dias de cultivo).

#### 2.4.2.5 Fusão de protoplastos

O primeiro autor a descrever experimentos de fusão de protoplastos foi Power et al. (1970), entretanto a frequência de fusão era muito baixa. Apenas depois de Kao & Michayluk (1974) descreverem o uso do polietileno glicol (PEG) como agente fusionante, conseguiu-se obter frequências aceitáveis de fusão.

Os métodos mais utilizados para a produção de híbridos somáticos são a fusão química, com uso do PEG e a eletrofusão.

O primeiro exemplo de sucesso na hibridação somática em *Citrus* foi relatado por Ohgawara et al. (1985). O híbrido intergenérico foi obtido pela fusão química de protoplastos de mesofilo de *Poncirus trifoliata* com protoplastos de calos embriogênicos de *Citrus sinensis*, duas espécies sexualmente compatíveis. Posteriormente, Kobayashi et al. (1991b) relataram que estes híbridos somáticos eram férteis, produziram frutos e sementes viáveis, sendo possível o retrocruzamento com qualquer dos seus parentais.

Grosser et al. (1988a), também trabalhando com hibridação somática entre *Poncirus trifoliata* e *Citrus sinensis*, produziram mais de 200 híbridos somáticos com morfologia intermediária entre as duas espécies.

Grosser et al. (1988b) produziram o primeiro híbrido somático entre espécies sexualmente incompatíveis. Os autores fusionaram, usando PEG, protoplastos de suspensão embriogênica de laranja 'Hamlin' e protoplastos de calos de epicótilo de *Severinia disticha* Blanco, obtendo mais de 150 híbridos somáticos. Neste trabalho comprovou-se que a hibridação somática se constitui num método viável para ultrapassar as barreiras de incompatibilidade sexual entre duas espécies.

Kobayashi et al. (1988) relataram a obtenção do primeiro híbrido interespecífico do gênero *Citrus*. Os autores realizaram fusão química de protoplastos entre Laranja 'Washington' (*C. sinensis*) e tangerina 'Satsuma' (*C. unshiu*) e obtiveram apenas 4 plantas. Comprovou-se que somente uma era híbrida somática.

Grosser et al. (1989) também realizaram hibridação somática com PEG entre espécies do gênero *Citrus*, usando lima ‘Key’ (*C. aurantifolia*) (protoplasto de suspensão celular) e laranja ‘Valência’ (*C. sinensis*) (protoplasto de folha). Os autores obtiveram sete plantas, todas comprovadamente híbridas. Não houve regeneração de protoplastos dos parentais, segundo os autores devido à dificuldade dos protoplastos de lima expressarem a embriogênese. O objetivo principal era a produção de híbridos de copa alotetraplóides para posteriormente serem usados em cruzamentos com plantas diplóides, para obtenção de plantas triplóides sem sementes.

Dois trabalhos relatam a obtenção de híbridos somáticos entre *Citropsis gilletiana*, espécie distante do gênero *Citrus* e sexualmente incompatível, com laranja ‘Hamlin’ (Grosser & Gmitter Junior, 1990b) e com tangerina ‘Cleópatra’ (Grosser et al., 1990) por meio de fusão com PEG. Em ambos os casos, o objetivo era a obtenção de híbridos alotetraplóides que apresentassem características complementares dos dois parentais para serem utilizados como porta-enxerto comercial.

A resistência ao frio (via dormência precoce) e o porte baixo chamaram a atenção dos melhoristas para plantas do gênero *Fortunella* (Deng et al., 1992). As espécies de *Fortunella* e *Citrus* são sexualmente compatíveis, mas o fato dos citros florescerem 3-4 meses antes, associado à existência de poliembrião em ambas espécies, tem dificultado a produção de plantas híbridas via cruzamentos controlados. Deng et al. (1992) obtiveram 71 híbridos somáticos entre *Fortunella crassifolia* cv. ‘Meiwa’ e laranja ‘Valência’. Para isto os autores fusionaram com PEG, protoplastos de suspensão celular de laranja e protoplastos de folha de *Fortunella*. Segundo os autores, as plantas alotetraplóides eram mais competitivas “in vitro” do que plantas diplóides, regeneradas de protoplastos não fusionados de laranja ‘Hamlin’.

Louzada et al. (1992) relataram a obtenção de híbridos somáticos interespecíficos a partir de oito combinações diferentes de espécies de porta-enxerto, incluindo híbridos entre limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’. O objetivo dos autores era a obtenção de uma população de híbridos somáticos com características complementares importantes de resistência à doenças, pragas e características hortícolas importantes para a Flórida (EUA). Algumas combinações de híbridos apresentavam alto vigor obtendo-se mais de 1000 híbrido somáticos; em outras combinações, plantas semelhantes ao parental de folhas (derivadas de protoplastos não fusionados de folha) foram obtidas. Pela primeira vez se observou diferenças morfológicas de folhas entre

plantas de uma mesma hibridação, talvez devido a diferenças de herança do genoma de cloroplastos e/ou mitocôndrias (Louzada et al., 1992).

Grosser et al. (1992) relataram a produção de plantas autotetraplóides de laranja e híbridos alotetraplóides de laranja 'Succari' x tângelo 'Nova' e entre laranja 'Hamlin' x tangerina 'Dancy' com o objetivo de usá-los em experimentos posteriores de produção de tangor e tângelos triploides sem sementes, por meio de cruzamentos com plantas diplóides monoembriônicas.

Grosser et al. (1996) relataram a produção de 18 novos híbridos alotetraplóides entre *Citrus* e sete gêneros próximos, incluindo quatro sexualmente incompatíveis, por meio de fusão química de protoplastos. Segundo os autores isto pode ter um impacto no melhoramento de porta-enxertos. Neste trabalho a natureza híbrida das plantas foi confirmada em análises citológicas e por meio de análises com marcadores RAPD.

Os primeiros híbridos somáticos obtidos por eletro fusão foram relatados por Saito et al. (1991). Após 5-6 meses do cultivo foram obtidas 12 plantas, das quais 8 eram híbridas entre *C. sudachi* (protoplastos de suspensão celular embriogênica) e lima (*C. aurantifolia*) (protoplastos de folha) e 4 eram morfologicamente semelhantes ao parental de folha (lima). Os autores afirmaram não saber se estas plantas foram obtidas a partir da regeneração de protoplastos de folha, ativados pelo co-cultivo com células embriogênicas; ou se a partir de células fusionadas cujo genoma nuclear do parental de suspensão ('Sudachi') tenha sido eliminado durante a embriogênese.

Kobayashi et al. (1991) analisaram o genoma mitocondrial de híbridos somáticos de laranja 'Navel' e tangor 'Murcote' e concluíram que todos possuíam mitocôndrias de parental de calos nucelares. Este resultado indica que o genoma mitocondrial do parental doador de protoplastos de calos nucelares tem uma característica preferencial na embriogênese, tornando incompatível a idéia de que os protoplastos de mesofilo tenham regenerado.

Saito et al. (1993) obtiveram plantas cíbridas entre *C. sudashi* (parental de suspensão) e duas espécies usadas como parental de folha (lima 'Mexicano' e limão 'Eureka') por meio de eletro fusão. No total de plantas obtidas no primeiro tratamento, 25 % eram cíbridas e no segundo, 80 % eram cíbridas. As plantas cíbridas possuíam características morfológicas e padrão de DNA nuclear idênticos aos do parental de folha e DNA mitocondrial idêntico ao parental de suspensão celular. A conclusão dos autores foi a de que o genoma mitocondrial do parental de calos nucelares deve exercer um importante papel na embriogênese.

Grosser & Gmitter Junior (1990a) recomendam a fusão química devido à sua simplicidade, eficiência, custo inexpressivo e ser um processo não-tóxico para protoplastos, se não houver contato prolongado.

Segundo Bates et al. (1985), a eletrofusão tem possibilitado obter alta frequência de fusão e possui a seguinte vantagem sobre a fusão química: maior controle das condições de fusão, possibilitando a manipulação de protoplastos frágeis que não suportariam a fusão química.

As soluções com PEG de alto peso molecular (6000 a 8000) eram normalmente as mais usadas, Grosser & Gmitter Junior (1990a) recomendam o uso de solução contendo 40 % de PEG (PM = 8000) seguindo um método adaptado de Menczel et al. (1981). Entretanto Grosser (1994) cita que o PEG de peso molecular 1500 tem se mostrado mais eficiente.

Negrutiu et al. (1986) compararam a frequência de fusão em *Nicotiana plumbaginifolia* utilizando diversos métodos descritos por outros autores. As conclusões dos autores são citadas a seguir: a concentração de PEG na solução fusionante foi importante enquanto o peso molecular do PEG não foi crítico; a redução da concentração de PEG de 50 para 40 % ou a adição de 0,1 M de manitol numa solução com 50 % de PEG reduziu a frequência de fusão; o uso da solução de lavagem W5 permitiu a redução na concentração de PEG na solução fusionante; o período de incubação no PEG foi importante pois protoplastos de folha são mais sensíveis ao PEG e por isto devem ficar menos tempo em exposição; a fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  não foi crítica nas soluções com altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  avaliadas; o aumento de pH da solução de PEG de 5,7 para 9,0 ocasionou um aumento na frequência de fusão.

Negrutiu et al. (1986) observaram ainda que o método de fusão recomendado por Menczel (1981) possibilitou uma maior frequência de fusão, mas só seria recomendado para trabalhos com protoplastos mais resistentes, o que não é o caso dos protoplastos de mesofilo. As taxas de fusão observadas se situaram entre 3 a 4 %, para protoplastos de mesofilo.

Segundo Waara & Glimelius (1995), a frequência de fusão, com uso de PEG, varia entre 1 a 20 %, dependendo dos tipos de células e das condições do experimento. Para citros a frequência de formação de heterocariontes via fusão química situa-se entre 1 e 10 % (Grosser & Gmitter Junior, 1990b). Já Ling & Iwamasa (1994) obtiveram uma frequência de 7 % de células heterocariontes, utilizando eletrofusão de tangerina 'Ponkan' com *Citropsis gabunensis*. Após 18 meses da fusão, mais de 150 híbridos somáticos já tinham sido confirmados.

Uma vez obtida a fusão de protoplastos, as células híbridas têm possibilidade de se dividir e originar microcolônias. A partir das colônias cultivadas em meio semi-sólido, embriões somáticos se originam. O cultivo dos embriões em meio de germinação permite a formação de uma planta completa, com raiz e caule. As plantas obtidas já podem ser levadas para a seleção dos possíveis híbridos somáticos.

#### 2.4.2.6 Indução de embriogênese e cultivo de plantas

Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a), o cultivo em meio MT solidificado com ágar permite a embriogênese espontânea de calos embriogênicos, entretanto, para calos mais recalcitrantes deve-se usar o meio MT acrescido de 2 % de glicerol como fonte única de carbono (Vardi & Galun, 1988). Os autores relatam que este meio induziu a um número excessivo de embriões em diversas espécies de *Citrus*.

Segundo Vardi & Galun (1988), os embriões somáticos ainda pequenos podem ser desenvolvidos em meio MT, contendo 4 % de sacarose e 1500 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de malte. Para o alongamento do embrião, desenvolvimento das raízes e germinação, os autores recomendam cultivar os embriões em meio de contendo 0,02 a 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA).

Um procedimento mais fácil para a germinação dos embriões foi sugerido por Gmitter Junior & Moore (1986), isto é: cultivar os embriões em meio contendo 1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico.

As plantas obtidas a partir da germinação dos embriões podem ser cultivadas em meio RMAN (Grosser & Gmitter Junior, 1990a) ou meio MT (Ling et al., 1989).

Para aclimatação das plantas, alguns autores relatam a transferência das plantas para vasos contendo substratos comerciais (Grosser & Gmitter, 1990a), mistura de solo (Vardi et al., 1986) e vermiculita esterilizada (Ling et al., 1989), mantendo-se a umidade alta por um período de tempo.

#### 2.4.2.7 Seleção de híbridos somáticos

Para Grosser & Gmitter (1990a) o sucesso em experimentos de hibridação somática em citros requer um sistema de seleção que permita identificar e separar os híbridos somáticos de

plantas originadas de protoplastos não fusionados ou obtidas de fusão entre protoplastos do mesmo parental.

Em citros, na maioria dos trabalhos, são isolados protoplastos de calos ou suspensões celulares de um dos parentais, pois estes protoplastos possuem capacidade embriogênica. Os protoplastos do outro parental são isolados de tecido não embriogênico (folhas), assim elimina-se a possibilidade de regenerar plantas de um dos parentais.

Ohgawara et al. (1985) observaram que o cultivo dos produtos da fusão em meio contendo 0,3 M de sacarose inibia a embriogênese somática em protoplastos não fusionados de laranja 'Trovita', possibilitando a obtenção de somente plantas híbridas.

Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a) o uso em experimentos de fusão, de suspensões celulares mantidas em meio líquido sem a presença de reguladores de crescimento por um período prolongado de tempo, tem mostrado que isto diminui ou até impede a regeneração de protoplastos não fusionados. Suspensões celulares de laranja 'Hamlin' cultivadas em meio líquido por dois anos possibilitaram a produção de três combinações diferentes de híbridos somáticos (laranja x *Citropsis gilletiana*, laranja x *P. trifoliata*, laranja x *Severinia disticha* (Grosser et al., 1988a; 1988b; Grosser & Gmitter Junior, 1990b).

Mais recentemente Grosser (1994) sugere que esquemas complicados de seleção devem ser evitados pois geralmente os híbridos somáticos obtidos são competitivos, podendo ser obtidos e discriminados mesmo na presença de grande número de plantas de parental não-fusionado.

#### 2.4.2.8 Métodos de discriminação de híbridos somáticos

De acordo com Grosser & Gmitter Junior (1990a), as características esperadas de um híbrido somático entre parentais diplóides são: morfologia intermediária entre os parentais, número cromossômico tetraplóide e expressão composta do DNA e dos produtos gênicos. Assim, pode-se discriminar híbridos somáticos por meio de observação visual de caracteres morfológicos, análise citológica, análise de marcadores isoenzimáticos e moleculares. Para os autores, nenhum dos métodos isoladamente permite a confirmação da natureza híbrida de uma planta.

As características morfológicas tais como: folha trifoliolada (Ohgawara et al., 1985; Grosser et al., 1988a), formato e largura da folha (Saito et al., 1991, 1993, Grosser et al., 1989) e

presença de pecíolos alados (Vardi et al., 1987; Ballve et al., 1997) são usadas em vários trabalhos como marcadores morfológicos para identificar híbridos putativos.

As análises citológicas são feitas por meio da contagem do número de cromossomos da ponta de raiz. A variação se encontra na metodologia de preparação das lâminas e coloração das raízes. Grosser & Gmitter Junior (1990a) descrevem uma metodologia usada em muitos trabalhos: a coloração das raízes com hematoxilina. Outros autores usam o método de coloração com Orceína lactopropiônica a 1 % (Ohgawara et al., 1985; Kobayashi et al., 1991). O último método observado em trabalhos com citros é a coloração pelo método de Feulgen (Grosser et al., 1988a).

As análises isoenzimáticas em amido e em poliacrilamida são bastante usadas para a confirmação de híbridos somáticos em *Citrus*. Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990a) a razão da boa aceitação das isoenzimas em amido está no seu baixo custo, simplicidade e segurança no uso, o que permite resultados confiáveis em pouco tempo, principalmente comparando com as técnicas de análise de DNA.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995) algumas outras vantagens dos marcadores isoenzimáticos são: a expressão das isoenzimas é co-dominante, isto é, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um loco são expressos e visualizados; em géis de amido pode-se analisar vários locos isoenzimáticos simultaneamente com a realização de cortes no gel, resultando em várias fatias.

Vários sistemas isoenzimáticos têm sido empregados nos trabalhos de *Citrus* e variam em função dos parentais usados no experimento. Os mais usados são a fosfohexose isomerase (PHI) e a fosfoglucose mutase (PGM), usadas para discriminar híbridos entre *Citropsis gillettiana* e tangerina 'Cleópatra' (Grosser et al., 1990). Outros sistemas bastante usados são o da peroxidase (PRX) (Deng et al., 1992), fosfoglucose isomerase (PGI) (Louzada et al., 1992) e a glutamato oxaloacético transaminase (GOT) (Ling & Iwamasa, 1994) e a malato desidrogenase (MDH), usada para discriminar híbridos entre *P. trifoliata* e laranja 'Hamlin' (Grosser et al., 1988a).

Em todos os trabalhos revisados, os autores afirmam que o padrão de bandamento dos híbridos somáticos possui complementação alélica, ou seja, o padrão complementar das duas espécies parentais.

As únicas exceções foram citadas em Louzada et al. (1992). Os autores observaram que as plantas híbridas entre laranja 'Azeda' e limão 'Volkamericano' não apresentaram na PGM, o alelo S, presente no padrão das duas espécies parentais. Os autores afirmam não saber se houve perda do alelo ou bloqueio da sua expressão, na planta híbrida. Os outros exemplos aconteceram na fusão entre *C. jambhiri* x *C. limon*, em que se observou a ausência do alelo M, mas em análises posteriores observou-se que o alelo também estava ausente nos calos de *C. jambhiri*. No último caso, o alelo S do híbrido entre laranja 'Hamlin' e *Severinia buxifolia* estava ausente, mas observou-se que houve eliminação cromossômica na planta híbrida, que apresentou  $2n = 27$  cromossomos.

Para confirmar a natureza híbrida de plantas obtidas em experimentos de fusão de protoplastos, alguns autores utilizaram a técnica de análise de DNA ribossômico (rDNA). Ohgawara et al. (1991) e Saito et al. (1993) usaram a técnica de digestão de rDNA, mtDNA e cpDNA com enzimas de restrição, seguido de análise de hibridação por "Southern blot", para estudar as características do genoma nuclear, mitocondrial e cloroplastídico. Ohgawara et al. (1985), Kobayashi et al. (1988) e Saito et al. (1991) analisaram apenas o DNA ribossômico.

Um grande avanço na área de marcadores moleculares ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar "primers" mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação de PCR, eliminando-se assim a necessidade do conhecimento prévio da sequência (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos e descrita nos trabalhos de Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland (1990); tendo sido chamada de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Ao se observar um gel de RAPD, não é possível distinguir se uma banda foi originada de um indivíduo diplóide homocigoto (AA) ou de um heterocigoto (Aa) para o mesmo loco RAPD, pois ambos possuem o "alelo" A que será amplificado. A detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar os dois casos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). O genótipo recessivo (aa) seria identificado pela ausência da banda no gel.

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), as vantagens dos marcadores RAPD em relação a outros marcadores moleculares (RFLP, por exemplo) são inúmeras. A diferença metodológica básica entre as técnicas de RFLP e RAPD é que enquanto os marcadores RFLP se

baseiam na hibridização de DNA, os marcadores RAPD se baseiam na amplificação de DNA, esta diferença se traduz numa série de vantagens práticas, resumidas em simplicidade e rapidez.

Mais recentemente, Grosser et al. (1996) utilizaram marcadores RAPD para discriminar 18 novos híbridos somáticos entre espécies de *Citrus*, com valor como porta-enxerto. Segundo os autores, o DNA foi extraído de ápices meristemáticos de plantas regeneradas, mas não esclarecendo se a partir de plantas “in vitro” ou aclimatadas. As plantas híbridas analisadas apresentaram padrão de bandas complementar às duas espécies parentais fusionadas. Em torno de 7 “primers” foram utilizados neste trabalho (OPA-7, OPA-17, OPW-4, OPW-15, OPQ-20, OPU-14 e OPV-2).

Mourão Filho et al. (1996) também utilizaram a análise de marcadores RAPD, para confirmar a natureza híbrida de plantas obtidas em experimento de fusão entre laranja ‘Succari’ e tângelo ‘Minneola’. Os “primers” utilizados foram o OPP-10, OPU-17, OPW-5 e OPX-18. Segundo os autores, os “primers” P-10 e W-5 mostraram a presença do DNA da laranja, enquanto o “primer” X-18, a presença do DNA de tângelo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo de plantas “in vitro”, a partir de sementes

Para a obtenção de plantas das duas espécies a serem usadas como fonte de protoplastos de mesofilo, foram colhidos no banco de germoplasma do IAC, em Cordeirópolis - SP, frutos maduros de limão ‘Cravo’ (acesso N° 362) e tangerina ‘Cleópatra’ (acesso N° 199).

Para o experimento, em torno de 25 frutos de cada espécie foram colhidos. Estes frutos foram então lavados em água corrente e em câmara de fluxo laminar, sofreram uma desinfecção superficial por meio de uma flambagem. A seguir foram cortados ao meio, as sementes foram retiradas e colocadas em vidros contendo 50 ml de meio semi-sólido.

O meio era formado por sais e vitaminas de MT, adicionado de 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e suplementado com 0,02 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA), pH ajustado para 5,8 e solidificado com 2 g.L<sup>-1</sup> de phytigel (Sigma Chemical Co.).

Os vidros foram colocados no escuro e à temperatura média de  $27 \pm 1$  °C, por 15 dias. Após este período, os mesmos foram levados para a sala de crescimento do laboratório de Radiogenética do CENA/USP, sob o fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de 24 W.m<sup>-2</sup> e à temperatura média de  $27 \pm 1$  °C.

No período entre 20 e 60 dias, as sementes germinaram obtendo-se plântulas. As plantas mantidas “in vitro” foram subcultivadas a cada 30 dias, utilizando para isto o mesmo meio de cultivo.

#### 3.2 Obtenção e cultivo de calos embriogênicos

Com o objetivo de determinar um meio apropriado para indução de calos embriogênicos de limão ‘Cravo’ e de tangerina ‘Cleópatra’ a partir de cultivo de nucelos imaturos, foi instalado

um experimento, no laboratório de Radiogenética do CENA/USP, visando o uso posterior dos calos como fonte inicial de cultivo de suspensões celulares. Protoplastos embriogênicos das duas espécies foram isolados a partir das suspensões celulares embriogênicas.

Os nucelos foram retirados de frutos jovens das duas espécies, com idade média de 12 semanas após a antese ou em torno de 3-4 cm de diâmetro. Para a confirmação do estágio de desenvolvimento, verificou-se se os nucelos apresentavam coloração rósea e os embriões, translúcidos e em estágio aquoso. Os frutos foram coletados de apenas uma planta de cada espécie: limão 'Cravo' (acesso N° 326) e tangerina 'Cleópatra' (acesso N° 199) no banco de germoplasma do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira", do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP.

Os frutos foram lavados e escovados em água corrente por 5 minutos, sendo então descontaminados em câmara de fluxo laminar por meio de flambagem; a seguir, os frutos foram cortados ao meio. As sementes imaturas foram retiradas, cortadas ao meio na posição longitudinal e os nucelos extraídos. Após, os nucelos foram colocados em placas de Petri com a parte cortada em contato com o meio de cultivo.

O meio de cultivo utilizado foi o MT, composto por sais e vitaminas de MT (Murashige & Tucker, 1969), adicionado de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 8,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Sigma Chemical Co.) (Anexo 1).

Os tratamentos testados foram compostos pela adição de 5 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) no meio de cultivo. O pH dos meios foi ajustado para 5,8, seguido de autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos.

Cada tratamento era composto por 20 placas de Petri contendo 5 nucelos cada, cortados ao meio, totalizando 100 nucelos por tratamento, por espécie. As culturas foram colocadas em câmara escura com temperatura média de 27 ± 1 °C. As avaliações foram realizadas 45 após a inoculação, contando-se o número de explantes que produziram calos friáveis e calos compactos.

Os calos obtidos foram subcultivados a cada 30 dias em meio MT semi-sólido (Anexo 1), solidificado com 8,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar e sem reguladores de crescimento. Como os calos foram mantidos por um longo período, tentou-se minimizar as possibilidades de ocorrência de variação somaclonal ou de supressão da capacidade embriogênica dos calos, não se adicionando reguladores de crescimento.

### 3.3 Obtenção e cultivo de suspensões celulares

Suspensões celulares embriogênicas de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ foram obtidas com o intuito de fornecer células de quantidade e qualidade adequadas para isolamentos de protoplastos embriogênicos das duas espécies.

As suspensões celulares das duas espécies foram iniciadas adicionando-se em “erlenmeyer” esterilizado de 250 ml, 1,0 g de calo fresco e 50 ml de meio MT líquido, sem reguladores de crescimento. Os “erlenmeyers” foram tampados com papel alumínio, selados com parafilme (American Can. Ltd.) e a seguir colocados num agitador orbital a 100 rpm, temperatura de  $27 \pm 1$  °C e no escuro.

O meio de cultivo MT líquido era composto por sais e vitaminas de MT, adicionados de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de malte e  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi distribuído em frascos contendo 50 ml de meio cada. A seguir, os frascos foram autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

O intervalo de subcultivo utilizado foi de 7 dias. Após filtragem da suspensão em peneira de plástico (malha de náilon de 58  $\mu\text{m}$ ) esterilizada por autoclavagem, um inóculo de células retidas no filtro (aproximadamente 1,0 g) foi transferido para outro “erlenmeyer”, seguido da adição de meio líquido fresco. Os “erlenmeyers” foram selados e levados para o agitador. A utilização de subcultivos com intervalos de 7 dias teve como objetivo minimizar os efeitos da acidificação do meio de cultivo, verificada no cultivo de suspensões celulares de tangerina ‘Cleópatra’ e relatada no trabalho de Grosser et al. (1990).

As suspensões celulares demoraram entre 7 a 8 subcultivos semanais para se tornar apropriadas para fornecer células com qualidade e quantidade necessárias, para a realização de isolamentos de protoplastos.

### 3.4 Isolamento de protoplastos a partir de suspensão celular

Protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Cravo’ foram isolados a partir de suspensões celulares embriogênicas que apresentavam colônias com boas características, tais como: colônias com baixo número de células (menos de 50 células), células de forma

arredondada, coloração e tamanho uniforme das colônias, indicando a existência de metabolismo alto e índice de divisão celular elevado.

As suspensões celulares foram estabelecidas e mantidas de acordo com a descrição no sub-ítem 3.2. Para fins de isolamento de protoplastos, suspensões celulares com 2 - 3 dias após o subcultivo foram filtradas em peneiras de malha 58  $\mu\text{m}$ , 0,5 g de tecido fresco foi retirado e colocado em placas de Petri de 6,0 cm de diâmetro. A seguir, adicionou-se 10 ml de solução CPW 13M (Gilmour et al., 1989, Anexo 2) para promover a pré-plasmólise das células. Após 1 hora, a solução CPW 13M foi substituída por 6 ml de solução enzimática.

#### **3.4.1 Eficiência de isolamento de protoplastos de suspensão celular, em diversas soluções enzimáticas**

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes soluções enzimáticas descritas na literatura e determinar o tempo adequado para o isolamento de protoplastos de suspensão celular das duas espécies, para posterior utilização nos experimentos de fusão de protoplastos.

Em todos os experimentos, a solução básica para enzimas era formada por sais de CPW (Anexo 2), 5 mM de MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico) (Sigma Chemical Co.), 13 % de manitol e 0,2 % de soro bovino albumina em pó (Sigma Chemical Co.) e as seguintes concentrações de enzimas (Tabela 2).

Tabela 2. Composição das diversas soluções enzimáticas testadas (tipo e concentração de enzimas), para isolamento de protoplastos de suspensão celular.

TRATAMENTO	CELULASES			PECTINASES	
	Cel.-R10	Cel.-RS	Drisel.	Macero.-R10	Pectol.-Y23
1 <sup>a</sup>	1 %		0,1 %	0,2 %	
2 <sup>b</sup>	0,2 %		0,1 %	0,3 %	
3 <sup>b</sup>	0,2 %			0,3 %	
4 <sup>c</sup>		1 %		1,0 %	0,2 %
5 <sup>d</sup>	3 %			0,3 %	
6 <sup>e</sup>	0,2 %		0,1 %	0,4 %	

**Cel.-R10 = Cellulase R10; Cel.-RS = Cellulase RS; Drisel. = Driselase; Macero.-R10 = Macerozyme R10; Pectol.-Y23 = Pectolyase Y23**

<sup>a</sup> Ochatt et al. (1987); D'Utra Vaz et al. (1993); Otoni (1995)

<sup>b</sup> Vardi et al. (1982); Vardi & Galun (1988); Kobayashi et al. (1983; 1988; 1991); Ohgawara et al. (1985); Saito et al. (1991; 1993) (para protoplastos de suspensão celular)

<sup>c</sup> Grosser & Chandler (1987)

<sup>d</sup> Ohgawara et al. (1985); Kobayashi et al. (1988; 1991); Saito et al. (1991; 1993) (para protoplastos de mesofilo)

<sup>e</sup> Ling et al. (1989; 1994)

O pH das soluções enzimáticas foi ajustado para 5,7 e a seguir, as mesmas foram esterilizadas por meio de filtro-esterilização, com membrana de 0,22 µm de diâmetro e armazenadas a -20 °C, em alíquotas de 10 ml em frascos esterilizados.

De acordo com a descrição no sub-ítem 3.4 , 0,5 g de tecido fresco de cada uma das duas espécies sofreu pré-plasmólise em 10 ml de CPW 13M por 1 hora. Após este período a solução CPW foi substituída por 6 ml de solução enzimática. As placas de Petri foram seladas com parafilme (American Can. Ltd.).

A solução enzimática 4 foi utilizada na proporção de 3 ml de meio BH<sub>3</sub> para cada 1 ml de solução enzimática, de acordo com o trabalho de Grosser & Gmitter Junior (1990a).

As placas foram colocadas sob agitação (50 rpm), no escuro e à temperatura de  $27 \pm 1$  °C.

A primeira avaliação foi feita após 4 horas de incubação; a seguir, a cada 2 horas foram realizadas novas avaliações, terminando-se o experimento após 14 horas de isolamento. As avaliações foram realizadas retirando-se alíquotas de 100 µl para verificação do estágio dos protoplastos e para contagem do número de protoplastos por ml em câmara de Neubauer.

A viabilidade dos protoplastos foi determinada após 8 horas do início do experimento. A metodologia usada foi a descrita por Otoni (1995). Para tal, confeccionou-se uma solução estoque de diacetato de fluoresceína (DAF), com 5 mg de DAF por ml de acetona. Adicionou-se 50 µl desta solução estoque em 10 ml de solução CPW 13M. A seguir, 100 µl de solução diluída de DAF foi adicionada à solução contendo os protoplastos. Após 10 minutos, os protoplastos viáveis foram contados em câmara de Neubauer, sob luz ultra-violeta, em microscópio invertido com objetiva de 10x. Os protoplastos viáveis apresentavam cor verde intensa e os inviáveis, cor escura. O resultado foi expresso em termos de porcentagem.

### 3.4.2 Efeito da densidade de cultivo de protoplastos

Com o objetivo de avaliar a influência de diferentes densidades de cultivo ( $5 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  protoplastos por ml de meio) na eficiência de cultivo de protoplastos de suspensão celular de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', foi instalado um experimento utilizando o cultivo de protoplastos na forma de gotas de agarose.

Os procedimentos para o isolamento de protoplastos de suspensão celular foram semelhantes aos descritos no experimento 3.4.1. Após a pré-plasmólise em CPW 13M, 0,5 g de tecido fresco de cada uma das duas espécies foi incubado com 6 ml de solução enzimática 1, composta por 1,0 % de Cellulase R-10 (Yakult Honsha Ltd.), 0,2 % de Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Ltd.) e 0,1 % de Driselase (Kyowa Ltd.). As placas foram seladas com parafilme.

A digestão enzimática dos tecidos ocorreu por meio de incubação durante 8 horas, no escuro, sob agitação orbital de 50 rpm e à temperatura de  $27 \pm 1$  °C.

Após a fase de isolamento, a mistura enzimática contendo os protoplastos e os restos de tecido não digeridos foram filtrados numa peneira plástica esterilizada (malha de náilon de 58  $\mu\text{m}$ ), colocada sobre uma placa de Petri de 9 cm, o filtrado foi recolhido com pipeta de Pasteur e transferido para tubos de vidro (com capacidade para 8 ml). A seguir, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 700 rpm, por duas vezes consecutivas, sendo o sobrenadante descartado após cada centrifugação e o “pellet”, ressuspenso em 8 ml de CPW 13M. Após a segunda adição de CPW 13M, avaliou-se o rendimento total e a viabilidade dos protoplastos isolados, das duas espécies.

A densidade de cultivo foi ajustada, retirando-se uma alíquota do tubo com a quantidade necessária de protoplastos para 8 ml de meio de cultivo, por exemplo: (densidade de cultivo  $5 \times 10^4$  protoplastos por ml  $\times$  8 ml meio =  $4 \times 10^5$  total de protoplastos requeridos).

Os protoplastos foram cultivados em quatro densidades ( $5 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  protoplastos por ml de meio) no sistema de gotas de agarose.

O meio de cultivo usado na gota foi o KM8P (Kao & Michayluk, 1975, modificado por Gilmour et al., 1989) e preparado na seguinte forma. Uma alíquota de 4 ml do meio KM8P 2x (dupla concentração) foi misturada a 4 ml de solução de 1,2 % de agarose tipo VII (Anexo 3) quente num tubo de 8 ml, resultando em 8ml de solução KM8P-agarose 0,6 %. A temperatura do tubo contendo o meio foi monitorada constantemente. Antes da solidificação, o meio foi transferido para o tubo contendo o “pellet” de protoplastos previamente centrifugado e sem a solução de lavagem CPW 13M. Após misturar levemente, os protoplastos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm (diâmetro), com auxílio de pipeta de Pasteur.

Após um período mínimo de 30 minutos de resfriamento e solidificação das gotas de agarose, adicionou-se em cada placa 2 ml de meio de banho. O meio de banho utilizado foi o  $\text{BH}_3$  0,6 M (Grosser & Gmitter Junior, 1990a). As placas foram então seladas com parafilme (American Can. Ltd.) e colocadas sob condições de escuro e temperatura média de  $27 \pm 1$  °C.

A redução da osmolaridade do meio de banho realizou-se a cada 7 dias, utilizando-se para isto da mistura de meios  $\text{BH}_3$  (0,6 M) x MT líquido (0,12 M), nas seguintes proporções: 3:1; 2:1; 1:1 e 0:1. Após 35 dias só se utilizou o meio MT como meio de banho.

O parâmetro utilizado para comparar as diferentes densidades de cultivo de protoplastos foi a eficiência de cultivo, avaliando-se o número de microcolônias formadas após 28 dias de cultivo em relação à densidade inicial de protoplastos cultivados.

### 3.5 Cultivo de microcolônias, calos e regeneração de plantas

Após 50 dias de cultivo, as microcolônias com mais de 1 mm de diâmetro foram transferidas para meio semi-sólido MT (sais e vitaminas de MT,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de malte,  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Um filme de meio MT líquido com aproximadamente 2 ml foi adicionado sobre o meio semi-sólido, para evitar a desidratação excessiva das gotas de agarose. As placas foram seladas e colocadas em sala contendo baixa irradiância ( $16 \text{ W.m}^{-2}$ ), fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os calos originados das microcolônias foram subcultivados a cada 30 dias no mesmo meio (meio MT semi-sólido).

Os embriões em estágio globular e com coloração verde foram sendo transferidos isoladamente para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 30 ml cada de meio MT semi-sólido acrescido de  $1500 \text{ mg.L}^{-1}$  de extrato de malte (Anexo 4) com o objetivo de promover o desenvolvimento até o estágio de embrião cotilédonar.

Os embriões cotilédonares, isto é, embriões que apresentavam cotilédone e eixo radicular incipiente foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 30 ml de meio MT semi-sólido acrescido de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de água de coco (Anexo 5), com o objetivo de promover a germinação.

Após a germinação dos embriões, plantas com tamanho aproximado de 2 cm de comprimento, foram transferidas para meio de desenvolvimento. Este meio era composto por sais e vitaminas de MT, acrescido de  $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido naftaleno acético (ANA),  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de phytigel. As plantas foram cultivadas até o tamanho aproximado de 5 cm de comprimento, quando foram levadas para a aclimação ao meio ambiente.

### 3.6 Aclimação das plantas ao meio ambiente

Foram testados quatro métodos de aclimação, sendo que para método foram testadas 60 plantas cultivadas “in vitro”, somando no total 240 plantas. Destas, 110 plantas foram obtidas a partir regeneração de protoplastos de suspensão celular de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ (plantas obtidas em experimentos de determinação de densidade de cultivo). As 130

plantas restantes foram obtidas a partir de sementes das duas espécies, germinadas “in vitro” e subcultivadas durante 1 ano. As plantas foram retiradas do meio de cultivo, tiveram as raízes lavadas para retirar o resíduo do meio e misturadas num “becker”, de forma a casualizar as plantas no experimento.

Os três primeiros métodos foram constituídos dos mesmos procedimentos, variando apenas o substrato. 1º) substrato comercial esterilizado Plantmax (Eucatex Ltda), 2º) vermiculita expandida comercial (Eucatex Ltda) esterilizada em autoclave, 3º) mistura 1:1 de solo:areia lavada esterilizada em autoclave. O método era composto por transplantio em copos plásticos contendo os diferentes substratos e cobertos com saco plástico transparente. As plantas foram colocadas em estufa por aproximadamente duas semanas, sendo a cobertura plástica dos copos, retirada gradativamente para que houvesse uma redução lenta da umidade no sistema. Após este período, a cobertura plástica foi retirada totalmente e as mudas, mantidas no local sombreado por mais duas semanas. A adaptação se completou com o transporte das plantas para uma estufa com maior insolação (sombrite de 50 %) por mais um mês. Após este período, as plantas foram transplantadas para vasos contendo solo.

O quarto método foi constituído de transplante das mudas para tubos de vidro contendo 50 ml de meio líquido, composto por sais do meio MS (metade da concentração) (Murashige & Skoog, 1962), pH ajustado para 5,8 e esterilizado por autoclavagem. As plantas foram presas na altura do colo com discos de isopor. Os tubos foram cobertos com sacos plásticos transparentes e colocados em estufa sombreada, por aproximadamente duas semanas. O restante do método (redução da umidade e aumento da luminosidade) foi idêntico aos métodos citados anteriormente.

A avaliação do melhor método foi feita em termos de porcentagem de plantas aclimatadas e que possuíam crescimento, após o transplantio para os vasos..

### 3.7 Isolamento de protoplastos de mesofilo

#### 3.7.1 Eficiência de isolamento de protoplastos de mesofilo, em diversas soluções enzimáticas

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes soluções enzimáticas descritas na literatura e determinar o tempo adequado para o isolamento de protoplastos de mesofilo de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’, para posterior utilização nos experimentos de fusão.

As folhas foram retiradas de plantas das duas espécies, obtidas de sementes e cultivadas “in vitro”, de acordo com os procedimentos descritos no sub-ítem 3.1.

As condições de isolamento de protoplastos de mesofilo foram semelhantes as dos experimentos de isolamento de protoplastos de suspensão celular e serão descritas a seguir.

Aproximadamente 0,5 g de folhas jovens, obtidas de plantas cultivadas “in vitro” de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’, foi destacado, cortado em tiras longitudinais com auxílio de pinça e bisturi e colocado em placa de Petri de 6 cm de diâmetro. A nervura central e o pecíolo das folhas foram descartados.

Para a pré-plasmólise, 10 ml de solução CPW 13M foram adicionados. Após 1 hora, a solução CPW 13M foi substituída por 6 ml de solução enzimática.

As enzimas foram dissolvidas em solução composta por sais de CPW, 5 mM de MES (Sigma Chemical Co.), 13 % de manitol e 0,2 % de soro bovino albumina em pó (Sigma Chemical Co.). A composição das diversas soluções enzimáticas testadas (tipo e concentração de enzimas) está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Composição das diversas soluções enzimáticas testadas (tipo e concentração de enzimas), para isolamento de protoplastos de mesofilo.

TRATAMENTO	CELULASES			PECTINASES	
	Cel.-R10	Cel.-RS	Drisel.	Macero.-R10	Pectol.-Y23
1 <sup>a</sup>	1 %		0,1 %	0,2 %	
4 <sup>b</sup>		1 %		1,0 %	0,2 %
5 <sup>c</sup>	3 %			0,3 %	
6 <sup>d</sup>	0,2 %		0,1 %	0,4 %	

Cel.-R10 = Cellulase R10; Cel.-RS = Cellulase RS; Drisel. = Driselase; Macero.-R10 = Macerozyme R10; Pectol.-Y23 = Pectolyase Y23

<sup>a</sup> Ochatt et al. (1987); D'Utra Vaz et al. (1993); Otoni (1995)

<sup>b</sup> Grosser & Chandler (1987)

<sup>c</sup> Ohgawara et al., 1985; Kobayashi et al. (1988, 1991); Saito et al. (1991, 1993) para protoplastos de mesofilo

<sup>d</sup> Ling et al. (1989, 1994)

A solução enzimática 4 foi utilizada na proporção de 4 ml de meio BH<sub>3</sub> para cada 1 ml de solução enzimática, de acordo com o trabalho de Grosser & Gmitter Junior (1990a).

O pH das soluções enzimáticas foi ajustado para 5,7 e a seguir, as mesmas foram esterilizadas, por meio de filtro-esterilização com membrana de 0,22 µm de diâmetro, e armazenadas a -20 °C, em aliquotas de 10 ml, em frascos esterilizados.

Após a adição da solução enzimática nas placas de Petri contendo as folhas cortadas, as placas foram seladas com parafilme. A digestão enzimática dos tecidos ocorreu no escuro, sob agitação orbital de 50 rpm e à temperatura de 27 ± 1 °C.

As avaliações foram realizadas a cada 2 horas, iniciando-se 4 horas após o início da digestão até o máximo de 16 horas. Para tal, retiraram-se aliquotas de 100 µl para verificação do

estádio dos protoplastos e para contagem do número de protoplastos por ml, em câmara de Neubauer.

### **3.8 Isolamento de protoplastos de suspensão celular e mesofilo, para experimentos de fusão**

De acordo com os resultados obtidos nos sub-ítem 4.4.1 e 4.7.1, utilizou-se neste experimento a solução enzimática 1, composta por 1,0 % de Cellulase R-10 (Yakult Honsha Ltd.), 0,2 % de Macerozyme R-10 (Yakult Honsha Ltd.) e 0,1 % de Driselase (Kyowa Ltd.), para isolamentos de protoplastos de suspensão celular e de mesofilo.

Os procedimentos de isolamento de protoplastos de suspensão foram idênticos aos descritos no sub-ítem 3.4.1, para isto foram adicionados em placa de Petri de 6 cm de diâmetro, 0,5 g de suspensão celular e 10 ml de solução CPW 13M.

Nos isolamentos de protoplastos de mesofilo uma ligeira modificação foi realizada, ao invés da adição de 0,5 g de folhas, adicionou-se 0,7 g de material fresco (folhas). A nervura central e o pecíolo das folhas foram retirados. A seguir, as folhas foram cortadas em tiras, com auxílio de pinça e bisturi.

A pré-plasmólise foi realizada por 1 hora acrescentando-se 10 ml de solução CPW 13M. A seguir retirou-se o CPW e adicionou 6 ml de solução enzimática. A digestão enzimática foi realizada no escuro, sob agitação orbital de 50 rpm e à temperatura de  $27 \pm 1$  °C.

Os períodos de incubação na solução enzimática foram de 8 horas para protoplastos de suspensão celular das duas espécies e 12-14 horas para protoplastos de mesofilo das duas espécies. Como os períodos de incubação na solução enzimática eram diferentes, os isolamentos foram iniciados em horários distintos, de forma a haver sincronização no final (para protoplastos de suspensão celular e mesofilo).

Após a fase de isolamento, a mistura enzimática contendo os protoplastos e os restos de tecido não digeridos foi filtrada numa peneira plástica esterilizada (malha de náilon de 58  $\mu$ m), colocada sobre uma placa de Petri de 9 cm. O filtrado foi coletado com pipeta de Pasteur e transferido para tubos de vidro. A seguir, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 700 rpm, sendo o sobrenadante descartado após a centrifugação e o "pellet", ressuspenso em 8 ml de CPW 13M.

Nos isolamentos de protoplastos de mesofilo que apresentaram uma elevada quantidade de sujeira ou “debris”, um passo adicional foi a realização de centrifugação gradiente. O gradiente foi formado por solução CPW 21S (sais de CPW + 21 % de sacarose) e solução CPW 13M contendo os protoplastos. Primeiro foram acrescentados no tubo 3 ml de CPW 21S e depois, lentamente, os 4-5 ml de solução de protoplastos-CPW 13M. A centrifugação foi feita a 700 rpm, por 5 minutos e sem a utilização de freio na centrífuga. Os protoplastos de mesofilo presentes no centro da banda formada na interface das duas soluções, foram recolhidos com pipeta de Pasteur e transferidos para outro tubo, adicionando-se CPW 13M até completar o volume de 8 ml.

A contagem do número de protoplastos por ml foi realizada no final da fase de purificação, com auxílio de uma câmara de Neubauer e observação em microscópio ótico.

### **3.9 Experimentos de fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’**

Este experimento foi realizado com o objetivo de determinar a eficiência de fusão (porcentagem de formação de células heterocariontes) entre protoplastos de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’, com uso de polietileno glicol (PEG), utilizando duas metodologias descritas na literatura.

As metodologias de fusão utilizadas eram compostas por duas soluções fusionantes e duas soluções de lavagem de protoplastos diferentes e estão descritas na Tabela 4. Para tal, as duas metodologias de fusão foram testadas em dois tratamentos diferentes:

1. Fusão de tangerina ‘Cleópatra’ (parental de suspensão celular nucelar) x limão ‘Cravo’ (parental de folha)
2. Fusão de limão ‘Cravo’ (parental de suspensão celular nucelar) x tangerina ‘Cleópatra’ (parental de folha)

Após as fases de isolamento, purificação e contagem do número de protoplastos na solução de lavagem (CPW 13M ou W5), os protoplastos de suspensão e de mesofilo foram misturados na proporção de 1:1 em tubos de vidro (8 ml de capacidade).

A densidade de cultivo utilizada foi de  $2 \times 10^5$  protoplastos por ml de meio ( $1 \times 10^5$  protoplastos por ml, de cada parental). Assim, o total de protoplastos adicionados no tubo de 8 ml foi  $16 \times 10^5$  protoplastos, sendo  $8 \times 10^5$  protoplastos de cada um dos parentais.

O tubo foi centrifugado a 700 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e 4 ml de solução fusionante contendo PEG foram adicionados.

Como a fase de adição da solução fusionante foi considerada a mais crítica, tentou-se padronizar o máximo possível. A solução fusionante foi adicionada mantendo-se a ponta da pipeta de Pasteur na borda superior do tubo e o tubo na posição vertical. Inicialmente, a solução de PEG foi adicionada gota a gota até o volume de 2 ml, pelo centro do tubo, evitando que a mesma descesse pela lateral do tubo. Imediatamente após, acrescentou-se mais 2 ml de solução fusionante no tubo utilizando uma maior pressão, o que ocasionou a mistura física dos protoplastos.

Tabela 4. Composição da solução fusionante contendo PEG, tempo de incubação na solução fusionante e tipo de solução de lavagem utilizadas em experimentos de hibridação somática.

COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO FUSIONANTE	TEMPO DE INCUBAÇÃO NA SOLUÇÃO FUSIONANTE	SOLUÇÃO DE LAVAGEM
25 % PEG <sup>1</sup> , 4 % sacarose, 10 mM CaCl <sub>2</sub> pH 5,6 (concentração final de PEG - 20 %) <sup>a</sup>	10 minutos	CPW 13M
50 % PEG <sup>1</sup> , 0,1 M CaCl <sub>2</sub> , 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,7 (concentração final de PEG - 37,5 %) <sup>b</sup>	10-15 minutos	W5

<sup>1</sup> PEG com peso molecular 1500 (Sigma Chemical. Co.)

(<sup>a</sup>) segundo Power et al. (1976)

(<sup>b</sup>) segundo Negrutiu et al. (1986)

Imediatamente após a adição da solução fusionante foi realizada uma avaliação para determinar a frequência de fusão. Para tal, retirou-se com a pipeta de Pasteur, uma alíquota (gota)

da solução de PEG contendo os protoplastos, acrescentaram-se duas gotas de solução de lavagem e observou-se em câmara de Neubauer. O resultado foi expresso em termos de porcentagem de formação de células heterocariontes, células homocariontes (suspensão/suspensão e mesofilo/mesofilo), no total de protoplastos não fusionados.

As células heterocariontes (híbridas) foram detectadas devido à sua coloração verde e branca logo após a fusão. Já as células homocariontes são resultantes da fusão de protoplastos da mesma espécie e apresentam coloração verde, quando resultante da fusão de dois protoplastos de folha e coloração branca, quando resultante da fusão de protoplastos de suspensão celular.

Após o período de 10 minutos de incubação na solução fusionante, acrescentou-se a cada 5 minutos, 2 ml de solução de lavagem (CPW 13M ou W5) no tubo, até completar o volume de 8 ml. O tubo foi então centrifugado a 700 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspenso em solução de lavagem (CPW 13M ou W5). Este procedimento de lavagem para retirada da solução de PEG, foi repetido por duas vezes.

Após a segunda centrifugação com solução de lavagem, o sobrenadante foi descartado e iniciou-se o cultivo dos protoplastos. Os protoplastos foram cultivados na forma de gotas de agarose e com densidade de  $2 \times 10^5$  protoplastos por ml, semelhante ao descrito no sub-ítem 3.4.2.

O meio de cultivo usado nas gotas de agarose foi o KM8P (Kao & Michayluk, 1975, modificado por Gilmour et al., 1989) preparado na seguinte forma. Uma alíquota de 4 ml do meio KM8P 2x (dupla concentração) foi misturada a 4 ml de solução de 1,2 % de agarose tipo VII (Anexo 3) quente num tubo de 8 ml, resultando em 8ml de solução KM8P-agarose 0,6 %. Antes da solidificação, o meio foi transferido para o tubo contendo o “pellet” de protoplastos. Após misturar levemente, os protoplastos foram cultivados com pipeta de Pasteur em placas de Petri de 6 cm (diâmetro).

Após um período mínimo de 30 minutos para proceder a solidificação das gotas, adicionou-se em cada placa 2 ml de meio de banho. O meio de banho utilizado foi o BH<sub>3</sub> 0,6 M (Grosser & Gmitter Junior, 1990a). As placas foram seladas com parafilme e colocadas sob condições de escuro e à temperatura média de  $27 \pm 1$  °C.

A redução da osmolaridade do meio de banho foi realizada a cada 7 dias, utilizando-se para isto da mistura de meios BH<sub>3</sub> (0,6 M) x MT líquido (0,12 M), nas seguintes proporções: 3:1; 2:1; 1:1 e 0:1. Após 35 dias só se utilizou o meio MT como meio de banho.

As microcolônias com mais de 1 mm de diâmetro foram transferidas para meio semi-sólido MT solidificado com  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Um filme de meio MT líquido com aproximadamente 2 ml foi adicionado sobre o meio semi-sólido, para evitar a desidratação excessiva das gotas de agarose. As placas foram seladas e colocadas em sala contendo baixa irradiância ( $16 \text{ W.m}^{-2}$ ), fotoperíodo de 16 horas e à temperatura média de  $27 \pm 1$  °C.

Os calos originados das microcolônias foram subcultivados a cada 30 dias no mesmo meio (meio MT semi-sólido).

Os embrióides em estágio globular e com coloração verde foram transferidos isoladamente para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 30 ml cada de meio MT semi-sólido, acrescido de  $1500 \text{ mg.L}^{-1}$  de extrato de malte (Anexo 4). Os embrióides foram cultivados neste meio até o estágio de embrião cotilédonar.

Os embriões cotilédonares foram transferidos para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 30 ml de meio de germinação de embriões, MT semi-sólido, acrescido de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico e  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de água de coco (Anexo 5).

Após a germinação dos embriões, plantas com tamanho aproximado de 2 cm de comprimento foram transferidas para meio de desenvolvimento, composto por sais e vitaminas de MT, acrescido de  $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA,  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de phytigel. As plantas foram cultivadas até o tamanho aproximado de 5 cm de comprimento, quando foram levadas para a aclimatação ao meio ambiente.

As plantas foram aclimatadas usando o método de transplantio em copos plásticos contendo vermiculita esterilizada e cobertos com saco plástico transparente. As plantas foram colocadas em estufa sombreada por aproximadamente duas semanas, sendo a cobertura plástica dos copos retirada gradativamente para que houvesse uma redução lenta da umidade no sistema. Após este período, a cobertura foi retirada totalmente e as mudas foram mantidas em local sombreado por mais duas semanas. A adaptação se completou com o transporte das plantas para uma estufa com maior insolação (sombrite de 50 %) por mais um mês.

### 3.10 Identificação e caracterização dos híbridos somáticos

A identificação de híbridos somáticos iniciou-se com o método molecular usando-se marcadores RAPD. Com este método, o objetivo foi discriminar plantas híbridas putativas de plantas regeneradas de protoplastos de parentais. O objetivo a seguir passou a ser a confirmação da natureza híbrida destas plantas selecionadas e a caracterização, pelos métodos de marcadores isoenzimáticos em gel de amido e gel de poliacrilamida.

#### 3.10.1 Análise de marcadores moleculares RAPD

Os experimentos com marcadores moleculares foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do CENA/USP. O passo inicial consistiu na extração do DNA genômico de plantas cultivadas “in vitro”, para isto foi usada a metodologia descrita por Edward et al. (1991) ligeiramente modificada (Anexo 6).

Após a purificação, o DNA foi ressuspensão em 100  $\mu\text{l}$  de tampão TE contendo RNase (10  $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ ) e quantificado em espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda Bio 2.31 da seguinte forma. Retirou-se uma alíquota de 1  $\mu\text{l}$  da amostra de DNA e acrescentou em 999  $\mu\text{l}$  de água ultra-pura autoclavada. (diluição de 1:1000). A concentração de DNA das amostras foi avaliada por leituras em espectrofotômetro, com luz ultra-violeta nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

##### 3.10.1.1 Reação de RAPD para citros

As reações de amplificação foram realizadas como descrito por Williams et al. (1990) e McClelland et al. (1990), com ligeiras modificações. O volume de reação foi de 25  $\mu\text{l}$ , contendo 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1 % Triton X-100; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 100  $\mu\text{M}$  de cada dinucleotídeo dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 15 ng de iniciadores (“primers”) (Operon Technologies); 25 ng de DNA genômico e 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Operon Technologies). Depois de preparadas, as reações foram cobertas com uma gota de óleo mineral (Sigma Chemical Co.). A metodologia usada está descrita no Anexo 7.

As ampliações foram feitas no termociclador GeneAmp PCR System 2400, usando-se o programa correspondente a 45 ciclos de 1 minuto a 92 °C (desnaturação), 1 minuto a 37 °C (anelamento do “primer”) e 2 minutos a 72 °C (extensão da *Taq* polimerase e incorporação de nucleotídeos). Os produtos foram analisados em gel de 1,4 % de agarose (BRL Labs.) dissolvido em de tampão TAE (1X) e contendo brometo de etídio ( $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (Anexo 8). Para isto, 25  $\mu\text{l}$  de cada amostra amplificada foram misturados a 5  $\mu\text{l}$  de tampão de carregamento (6X); 30  $\mu\text{l}$  da amostra final foram colocados nos poços do gel. A eletroforese foi realizada com voltagem constante  $6 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ , por 2-3 horas. O tampão da cuba usado foi o TAE (1X). Os géis foram fotografados sob luz UV usando filme polaróide 667.

Inicialmente foram testados 66 “primers” diferentes (OPAP1 até OPAP20; OPG1 até OPG20; OPW1 até OPW20; OPB1; OPA5; OPA10; OPA20; OPAN6 e OPO19) em ampliações de DNA das duas espécies parentais. Para isto, extraiu-se o DNA de folhas obtidas de apenas uma planta parental adulta, de cada espécie (tangerina ‘Cleópatra’-acesso 199 e limão ‘Cravo’-acesso 362). O DNA amplificado de cada “primer” foi corrido, dois a dois, para verificar se havia polimorfismo entre as duas espécies.

O método de triagem dos híbridos somáticos foi baseado na capacidade de regeneração dos protoplastos de suspensão celular e na provável ausência da capacidade de regeneração de protoplastos de mesofilo. Assim selecionaram-se “primers” que possuíam fragmentos amplificados adicionais para limão ‘Cravo’ ou para tangerina ‘Cleópatra’.

O “primer” OPAP20 foi selecionado por apresentar banda adicional para limão ‘Cravo’, sendo então usado para experimento de fusão entre tangerina ‘Cleópatra’ (protoplasto de suspensão) x limão ‘Cravo’ (protoplasto de mesofilo). As amostras que amplificadas com o “primer” OPAP20, apresentavam o fragmento adicional de limão ‘Cravo’ foram consideradas como híbridas putativas, pois demonstravam conter o genoma da espécie usada como parental de folha. Esta hipótese estava apoiada na literatura que considera a probabilidade da regeneração de protoplastos não fusionados de mesofilo de citros, como baixa ou nula.

Os “primers” OPAP14 e OPAP5 foram selecionados para o tratamento inverso, pois produziam um fragmento adicional bem característico de tangerina ‘Cleópatra’.

Os “primers” OPAN6, OPG20 e OPW15 foram usados para confirmar a natureza híbrida das plantas pois amplificavam fragmentos de diferentes tamanhos (bandas adicionais) nas duas espécies e poderiam ser utilizados nos tratamentos recíprocos.

### 3.10.2 Análises com marcadores isoenzimáticos

Os experimentos com marcadores isoenzimáticos foram realizados no laboratório de Biologia de Proteínas Vegetais do CENA/USP e tiveram como objetivo de confirmar a natureza híbrida das plantas, sendo realizadas em dois tipos: géis de amido e géis de poliacrilamida.

#### 3.10.2.1 Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de amido

O objetivo principal dos experimentos com gel de amido foi o de confirmar a natureza híbrida de híbridos putativos obtidos a partir de experimentos de fusão de protoplastos entre limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’. Para tal, experimentos foram realizados com objetivos de determinar protocolos de extração de amostras e determinar os sistemas isoenzimáticos polimórficos entre as duas espécies.

Os experimentos se iniciaram com a extração das amostras. Folhas desenvolvidas, de brotações novas, foram obtidas de plantas de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ pertencentes ao Banco de Germoplasma do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP. O transporte e a armazenagem deste material foram feitos a baixas temperaturas (5 a 10 °C), para evitar a desnaturação das proteínas.

As soluções extratoras testadas foram a “Nankoong”, descrita por Alfenas et al. (1991) (Anexo 9) e a água deionizada, segundo Ballve et al. (1991). A extração foi realizada por meio de maceração em almofariz de porcelana resfriado no congelador, usando-se 50 mg de amostra (folhas) e 200 µl de solução extratora (proporção 1:4). Durante as extrações, as amostras foram mantidas resfriadas. Cada amostra extraída foi absorvida em dois retângulos de papel filtro, com 6 cm de largura e 14 cm de comprimento (“weak”). Os “weaks” foram armazenados em “eppendorfs”, à 0 °C, por até uma semana.

Para o teste de soluções extratoras preparou-se dois géis de amido de milho chamado penetrose (Refinações Milho Brasil Ltda.) a 13 % (p/v). Dois géis foram confeccionados, o primeiro com tampão de gel TC (Tris-Citrato / pH 7,5) e o outro, com tampão CM (Citrato-Morfolina / pH 6,1) (Anexo 10).

Os géis foram montados em formas de acrílico com 10 cm de largura, 23 cm de comprimento e 1,2 cm de espessura. A penetrose foi dissolvida no respectivo tampão, com o

auxílio do forno de microondas e vertida na fôrma. Após um período de resfriamento para solidificação do gel, aplicaram-se as amostras.

A aplicação das amostras foi realizada após o corte do gel (com lâmina de bisturi) a 3 cm de uma das bordas (corte paralelo a borda de maior comprimento do gel); o pedaço menor do gel foi ligeiramente afastado e os retângulos (“weaks”) foram aplicados em sequência, na face cortada (cobrindo completamente a espessura). Um “weak” embebido em solução de azul de bromofenol (a 1 %) foi aplicado a esquerda do gel para monitorar a migração. O pedaço menor foi novamente agrupado ao restante do gel.

Os procedimentos para a eletroforese (voltagem, corrente e tempo de corrida) variaram em função do tampão utilizado (TC, CM ou TCB) e estão citados no Anexo 11.

No final da eletroforese, os géis de penetrose foram cortados sempre em 5 fatias com largura de 2 mm aproximadamente.

Para a determinação da melhor solução extratora seis sistemas isoenzimáticos foram testados: (PRX) Peroxidase; (GOT) Glutamato oxaloacético transaminase; (LAP) Leucina aminopeptidase; (MDH) Malato desidrogenase e (PGI) Fosfoglucose isomerase). Os procedimentos para as colorações foram semelhantes aos citados em Alfenas et al. (1991). Os parâmetros avaliados foram: nitidez da banda e presença de rastro enzimático (indicativo de degradação enzimática).

A partir da determinação da melhor solução extratora, o objetivo a seguir passou a ser a determinação dos sistemas enzimáticos que apresentavam padrões de bandas nítidas, com boa repetibilidade, de fácil interpretação e com polimorfismo entre limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’. Para tal, as amostras de plantas “in vitro” de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ foram extraídas em solução “Nankoong”, de acordo com o experimento anterior, sempre na proporção de 1:4 (folhas:solução extratora).

Os géis de penetrose a 13 % foram confeccionados de acordo com experimento anterior e nos três tampões de gel (TC-pH 7,5; CM-pH 6,1 e TCB-pH 8,3) (Anexo 10). Os parâmetros da eletroforese variavam em função do tampão do gel (CM, TC e TCB)(Anexo 11).

Os sistemas isoenzimáticos testados foram: PRX (Peroxidase); GOT (Glutamato oxaloacético transaminase); SKDH (Ácido Shiquímico desidrogenase); MDH (Malato desidrogenase); PGM (Fosfoglucose mutase); IDH (Isocitrato desidrogenase); PGI (Fosfoglucose isomerase); SDH (Sorbitol desidrogenase); ADH (Álcool desidrogenase); 6-PGDH (6-

Fosfogluconato desidrogenase); LAP (Leucina aminopeptidase); ACP (Fosfatase ácida); ALP (Fosfatase alcalina) e EST (Esterase). Os procedimentos para as colorações foram semelhantes aos citados em Alfenas et al. (1991).

Para a avaliação dos sistemas, os parâmetros anotados foram: padrão de resolução (bandas nítidas ou difusas), estrutura quaternária da enzima (monomérica, dimérica, trimérica, etc...) e presença de polimorfismo entre as duas espécies (tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Cravo’).

### 3.10.2.2 Análises de isoenzimas em géis de amido

Baseado nos resultados iniciais, selecionaram-se 4 sistemas isoenzimáticos para serem usados na discriminação e/ou confirmação da natureza híbrida de híbridos somáticos, o GOT, PGI, IDH e PRX anódica.

Para tal, cada sistema enzimático selecionado em gel de penetrose a 13 % foi confeccionado no tampão em que se obteve uma melhor resposta no experimento anterior. GOT e PGI (em TCB), IDH (em CM) e PRX (em CM /gel de 12 %).

As amostras foram extraídas a partir de folhas de plantas “in vitro” obtidas em experimentos de fusão. As extrações foram realizadas de acordo com método descrito anteriormente (sub-ítem 3.10.2.1). Em todos experimentos de discriminação e confirmação de plantas híbridas, acrescentaram-se amostras de cada uma das espécies parentais cultivadas “in vitro” para serem utilizadas como padrão de referência para distinção dos híbridos somáticos.

A aplicação das amostras, eletroforese e o corte em fatias foram feitos de acordo com o experimento anterior (sub-ítem 3.10.2.1). As colorações foram realizadas de acordo com Alfenas et al. (1991) e estão citadas no Anexo 12.

### 3.10.2.3 Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi utilizado devido ao seu alto poder de resolução, assim, este método de análise foi utilizado somente para o sistema isoenzimático da PRX (Peroxidase).

Inicialmente, trabalhando com folhas de plantas limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ cultivadas “in vitro”, testaram-se três soluções extratoras: “Nankoong”, descrita por Alfenas et al. (1991) (Anexo 9); água deionizada acrescida de 5 mg de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e

solução extratora descrita por Sawazaki et al. (1992), constituída de Tris-HCl 0,02 M pH 7,4, PVP (Polivinilpirrolidona) a 12 % e Mercaptoetanol a 0,5 %. A extração foi realizada por meio de maceração em almofariz de porcelana resfriado usando-se 50 mg de amostra (folha) e 200 µl de solução extratora (proporção 1:4). Durante as extrações, as amostras foram mantidas resfriadas. Cada amostra extraída foi recolhida em “eppendorfs” e centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos. 100 µl do sobrenadante foi recolhido e misturado a 20 µl de solução de glicerol a 80 %. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas no congelador por até uma semana.

Para estes experimentos utilizou-se a eletroforese vertical testando-se dois tipos de géis, Davis (a 7 %) e Davis (gradiente de 4 a 10 %). A descrição da metodologia de confecção dos géis e do tampão de corrida encontra-se no Anexo 13.

Os géis foram montados em formas de vidro com espaçadores e medidas: 13 cm de altura, 9 cm de comprimento e 0,2 cm de espessura. O pente utilizado foi o de 12 amostras. O volume de amostra aplicado variou entre 15 e 20 µl para PRX. Uma gota de solução de azul de bromofenol (a 1 %) foi aplicada na solução tampão da cuba superior de eletroforese, com o objetivo de monitorar a migração.

A eletroforese iniciou com corrente constante (10 mA), até as amostras passarem do gel concentrador para o gel separador, a partir de então, fixou-se a voltagem em 220 V. A eletroforese era finalizada quando o frente de azul de bromofenol alcançava o final do gel. Os procedimentos para a coloração do sistema PRX (peroxidase) estão descritos no Anexo 14.

#### **3.10.2.4 Análises de isoenzimas em géis de poli(acrilamida)**

A partir dos resultados iniciais obtidos, optou-se por utilizar como solução extratora a água deionizada, acrescida de 5 mg de PVPP. Para o sistema PRX confeccionou-se o gel de poli(acrilamida em gradiente de 4 a 10 % (sistema Davis).

Nos experimentos com plantas híbridas, amostras de folhas dos dois parentais e das plantas híbridas putativas foram retiradas e maceradas com solução de extração (proporção 1:4), em condições de baixa temperatura. Após a centrifugação, 100 µl de cada amostra foi misturada a 20 µl de solução de glicerol (80 %) e guardadas no congelador.

O volume de amostra aplicado foi o mesmo, entre 15 e 20 µl para PRX. Uma gota de solução de azul de bromofenol (a 1 %) foi aplicada na solução tampão da cuba superior de

eletroforese. A eletroforese e a coloração de PRX foram realizadas da mesma forma do experimento anterior.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultivo de plantas “in vitro”, a partir de sementes

Os 25 frutos colhidos de cada espécie possibilitaram a obtenção de, no mínimo 100 sementes de cada espécie. A germinação das sementes iniciou-se a partir de 20 dias, mas algumas sementes germinaram somente 45 ou 60 dias após a introdução.

Devido à presença do fenômeno da poliembrionia nas sementes de citros verificou-se a obtenção de mais de uma planta por semente. Neste caso uma seleção foi necessária, com o transplante da planta mais vigorosa de cada tubo para outro e eliminando-se as demais. O objetivo desta seleção foi o de tentar eliminar as plantas originadas dos embriões zigóticos e manter as plantas de origem nucelar (genótipo idêntico à planta-mãe).

O meio utilizado foi eficiente para o desenvolvimento das plantas. A presença da auxina ANA, mesmo em concentração baixa ( $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ ), teve como objetivo a indução de formação de raízes. Em geral, as plantas de citros cultivadas “in vitro” apresentavam raiz única e sem a presença de radículas.

Em torno de 80 plantas de cada espécie foram subcultivadas mensalmente por um período de até 1 ano. A partir deste período, novas sementes foram coletadas e introduzidas “in vitro”.

### 4.2 Obtenção e cultivo de calos embriogênicos

A frequência de obtenção de calos friáveis e calos compactos nos diferentes meios testados em avaliação aos 45 dias de cultivo, está apresentada na Tabela 5. Concluiu-se que o melhor meio para a indução de calos friáveis foi o meio MT (Murashige & Tucker, 1969)

suplementado com  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-benzilaminopurina (BAP), com a produção de calos friáveis em 60 % e 48 % dos nucelos cultivados de tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Cravo’, respectivamente.

Tabela 5. Obtenção de calos friáveis (embriogênicos) e calos compactos, em porcentagem, a partir do cultivo de nucelos imaturos de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’.

Tratamento	Tangerina ‘Cleópatra’		Limão ‘Cravo’	
	Calos friáveis	Calos compactos	Calos friáveis	Calos compactos
$5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP	60 %	0 %	48 %	15 %
$10 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP	28 %	0 %	19 %	4 %

Ling & Iwamasa (1994) induziram calos embriogênicos de tangerina ‘Ponkan’ usando o mesmo meio (MT acrescido de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP), mas não relataram a frequência de obtenção de calos. Já Kobayashi et al. (1984) concluíram que o melhor meio de indução de calos embriogênicos em 11 cultivares de citros foi o meio MT suplementado com  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

Os tratamentos testados foram escolhidos baseando-se no relato de Oliveira (1993) o qual afirmou que, os calos de tangerina ‘Cleópatra’ obtidos no meio MT contendo  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e subcultivados em meio sem reguladores de crescimento, foram os que tiveram a maior taxa de desenvolvimento após 7 subcultivos mensais.

Apesar de terem sido utilizados nucelos extraídos de frutos com mesma idade (12 semanas após a antese), os resultados obtidos com a utilização do meio suplementado com  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP foram superiores aos obtidos por Oliveira (1993), usando o mesmo de regulador de crescimento, mas com concentração diferente ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Oliveira (1993) relatou que o melhor meio de indução de calos embriogênicos para as duas espécies (limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’) foi o meio MT suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA (ácido Indol acético) e  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de CIN (cinetina). O autor obteve calos friáveis em 78,7 % dos nucelos cultivados de tangerina e em 7,5 % dos nucelos de limão. Enquanto que o cultivo em meio com  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP proporcionou a produção de calos em 16,25 % dos nucelos de tangerina. O autor não conseguiu obter calos de limão ‘Cravo’ usando o meio com BAP.

Os calos obtidos no meio contendo  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP foram aproveitados, sendo a seguir, subcultivados em meio MT (semi-sólido) sem a adição de reguladores de crescimento. Apesar de alguns trabalhos descreverem a manutenção de calos de citros por vários anos em meio MT contendo  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (Kobayashi et al., 1983; 1985) sem perda da capacidade embriogênica, Oliveira (1993) observou a ocorrência de oxidação em calos de tangerina 'Cleópatra' subcultivados em meio contendo BAP.

Alguns calos de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo' foram subcultivados por 30 dias no mesmo meio de indutor de calos (meio MT acrescido de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP). Observou-se que a oxidação dos calos de tangerina e limão iniciou a partir de uma semana após a repicagem tornando-os com coloração marrom claro, seguindo-se para marrom escuro. Após 30 dias de subcultivo no mesmo meio, os calos já estavam totalmente oxidados.

No presente experimento, os calos de tangerina e de limão habituados em meio MT eram friáveis. Os calos de tangerina apresentavam coloração branca enquanto que os calos de limão possuíam coloração amarelo-pálido.

Nos seis primeiros subcultivos dos calos no meio sem reguladores de crescimento (aproximadamente 7-8 meses após a introdução dos nucelos), algumas placas apresentavam calos com alto índice de embriogênese, ou seja, a diferenciação dos calos em embriões globulares e cordiformes. Após este período, a frequência de aparecimento de embriões diminuiu sensivelmente até cessar. Ao mesmo tempo, verificou-se visualmente que os calos aumentaram a sua taxa de crescimento.

### **4.3 Obtenção e cultivo de suspensões celulares**

O meio de cultivo MT líquido acrescido de extrato de malte possibilitou a obtenção de suspensões celulares das duas espécies. Após o início do cultivo das suspensões foi necessário um período mínimo de 7-8 semanas com subcultivos semanais para atingir um estágio ideal, qual seja, suspensões celulares com agregados finos, pequeno número de células por agregado e com células de formato arredondado, indicando altos índices mitóticos. Em alguns frascos, observaram-se a presença de agregados maiores e até embriões globulares, neste caso, realizou-se uma filtragem com peneira de malha  $100 \mu\text{m}$ , seguido da eliminação dos agregados retidos no filtro.

Em muitos trabalhos cujo objetivo era a hibridação somática, suspensões celulares de diversas espécies de *Citrus* foram subcultivadas em intervalos de 14 dias (Grosser & Gmitter Junior, 1990a, 1990b; Grosser et al., 1996; Mourão Filho et al., 1996).

Oliveira (1993), estudando o cultivo de suspensões celulares de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', estabeleceu curvas de crescimento para suspensões das duas espécies. De acordo com os resultados obtidos, o autor recomendou um intervalo de 12 dias entre subcultivos de suspensão de tangerina e intervalo de 16 dias para limão, entretanto Grosser et al. (1990) relatam a ocorrência de uma rápida acidificação do meio de cultura quando subcultivadas suspensões celulares de tangerina 'Cleópatra' em intervalos de 14 dias. Segundo os autores, a acidificação do meio impedia o desenvolvimento das suspensões celulares; neste caso, a opção foi por acrescentar  $240 \text{ mg.L}^{-1}$  de uma substância tamponante de pH, o MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico), no meio líquido.

No presente trabalho optou-se pela redução do período entre subcultivos para 7 dias. Após atingir o estágio ideal de cultivo foi observado que as suspensões celulares das duas espécies apresentavam alta taxa de crescimento pois dobravam o volume celular em 7 dias.

As suspensões celulares que apresentavam crescimento vigoroso já eram capazes de fornecer células com qualidade e quantidade necessárias para realizar isolamentos de protoplastos.

#### 4.4 Isolamento de protoplastos a partir de suspensão celular

Após o estabelecimento de suspensões celulares vigorosas das duas espécies, protoplastos em quantidade e qualidade suficientes foram isolados por meio da digestão da parede celular com a solução enzimática apropriada.

Os fatores observados que mais influenciaram na qualidade e na eficiência de isolamento de protoplastos de suspensão foram: suspensão vigorosa e bem estabelecida, número de dias do último subcultivo da suspensão, temperatura durante o isolamento e tempo de incubação na solução enzimática.

Testes iniciais demonstraram que, isolamentos realizados em suspensões celulares novas (com menos de 8 subcultivos semanais, que apresentavam colônias com diversos tamanhos e baixa taxa de desenvolvimento) resultaram em baixa eficiência de isolamento e com grande quantidade de "debris". Este fato pode ser creditado à falta de uniformidade das colônias.

Mesmo em suspensões bem estabelecidas (mais de 8 subcultivos), observaram-se diferenças nos isolamentos realizados em suspensões subcultivadas 2-3 ou 7-8 dias antes. As suspensões subcultivadas 2-3 dias antes do isolamento, produziram isolamentos limpos, com poucos protoplastos estourados e pequena quantidade de “debris”. Dando-se ao contrário para suspensões subcultivadas 7-8 dias antes, que produziram um grande número de protoplastos arrebatados. Este resultado pode estar associado às diferentes fases de crescimento das suspensões. Segundo Power & Chapman (1985), células em fase de crescimento exponencial possibilitam isolamentos mais eficientes.

Os efeitos da temperatura durante o isolamento foram verificados devido à realização de experimentos consecutivos em que se observou uma redução drástica na quantidade de protoplastos obtidos. Estes isolamentos foram realizados durante o período da noite, em dias de temperatura mais amena. Apesar do ambiente em que se realizaram os experimentos apresentar controle de temperatura, uma redução de 4 a 5 °C foi observada. A redução na quantidade de protoplastos isolados foi creditada à esta variação negativa na temperatura. Grosser (1994) comenta que os isolamentos devem ser realizados numa temperatura que permita uma alta atividade enzimática, associada à uma alta viabilidade de protoplastos (entre 25 e 28 °C).

O tratamento de pré-plasmólise das células em solução CPW 13M também auxiliou na obtenção de isolamentos limpos, contribuindo para elevar a eficiência de isolamento de protoplastos. Isolamentos realizados sem este procedimento resultaram na elevação da quantidade de “debris”.

#### **4.4.1 Eficiência de isolamento de protoplastos a partir de suspensão celular, em diversas soluções enzimáticas**

Segundo Grosser (1994), o tipo e a quantidade de enzimas, o tempo de incubação e a concentração do estabilizador osmótico presentes na solução enzimática devem ser testados empiricamente.

Os rendimentos obtidos com a incubação de suspensões celulares de tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Cravo’, em diversas soluções enzimáticas e em diferentes períodos, estão listados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Os resultados indicam que após 4-6 horas de isolamento todas as soluções testadas tinham produzido protoplastos das duas espécies em quantidade suficiente para experimentos de fusão. Para este cálculo, considerou-se uma perda média de 20 % de protoplastos durante a fase de purificação. Normalmente, os experimentos de fusão descritos neste trabalho, utilizavam um total de  $2-3 \times 10^6$  protoplastos de suspensão celular.

Na maioria das soluções enzimáticas testadas, o número de protoplastos isolados de tangerina 'Cleópatra' aumentou até o período de 10-12 horas de isolamento, após, observou-se uma ligeira tendência ao declínio na quantidade total (Figura 1). Neste mesmo tempo foi observado um aumento da quantidade de "debris", resultantes de rompimento de membrana plasmática dos protoplastos, um sinal de super exposição à solução enzimática. Segundo Grosser (1994), a exposição em excesso de protoplastos à mistura enzimática pode causar danos à membrana plasmática e reduzir a sua viabilidade.

Oliveira (1993), trabalhando com as mesmas espécies, avaliou a curva de obtenção de protoplastos de calos de tangerina 'Cleópatra'. O autor também observou uma curva experimental semelhante, com o aumento no número de protoplastos isolados até o período de 4 horas, seguido de redução na quantidade total após este período.

Com relação ao limão 'Cravo', observou-se uma tendência à produção de menor quantidade de protoplastos comparando-se com tangerina, em todas as soluções enzimáticas testadas. Em contrapartida, para o tempo de incubação avaliado, as curvas de isolamento foram sempre crescentes, apenas verificando uma tendência a estabilização da curva após 12 horas nas soluções 3 e 6 (Figura 2).

Tabela 6. Rendimento total de protoplastos <sup>1</sup> de suspensão de tangerina 'Cleópatra', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.

Tempo (horas)	Soluções enzimáticas <sup>2</sup>					
	1	2	3	4	5	6
4	8,7 ± 1,8	12,4 ± 1,5	12,7 ± 0,9	11,8 ± 1,3	11,1 ± 0,9	10,7 ± 0,2
6	10,1 ± 1,2	14,2 ± 2,1	14,7 ± 2,4	13,7 ± 2,0	12,0 ± 1,8	12,8 ± 0,2
8	12,4 ± 2,2	14,1 ± 2,0	20,5 ± 2,3	13,8 ± 1,5	15,8 ± 1,7	17,7 ± 0,4
10	14,7 ± 2,4	16,4 ± 2,3	28,3 ± 1,8	18,3 ± 1,9	19,8 ± 3,1	24,6 ± 0,6
12	16,9 ± 1,9	18,7 ± 1,5	24,7 ± 1,6	16,8 ± 2,0	22,5 ± 1,7	21,2 ± 0,3
14	20,5 ± 1,9	23,4 ± 1,8	18,9 ± 1,5	16,2 ± 1,3	21,1 ± 1,9	19,8 ± 0,3

coeficiente de variação (para o tempo de incubação de 8 horas): 4,22 %

d.m.s. para teste Tukey a 5 % (para o tempo de incubação de 8 horas) 1,81

<sup>1</sup> média e desvio padrão de três experimentos, total de protoplastos ( $\times 10^6$ )

<sup>2</sup> soluções enzimáticas descritas na Tabela 2, página 35.

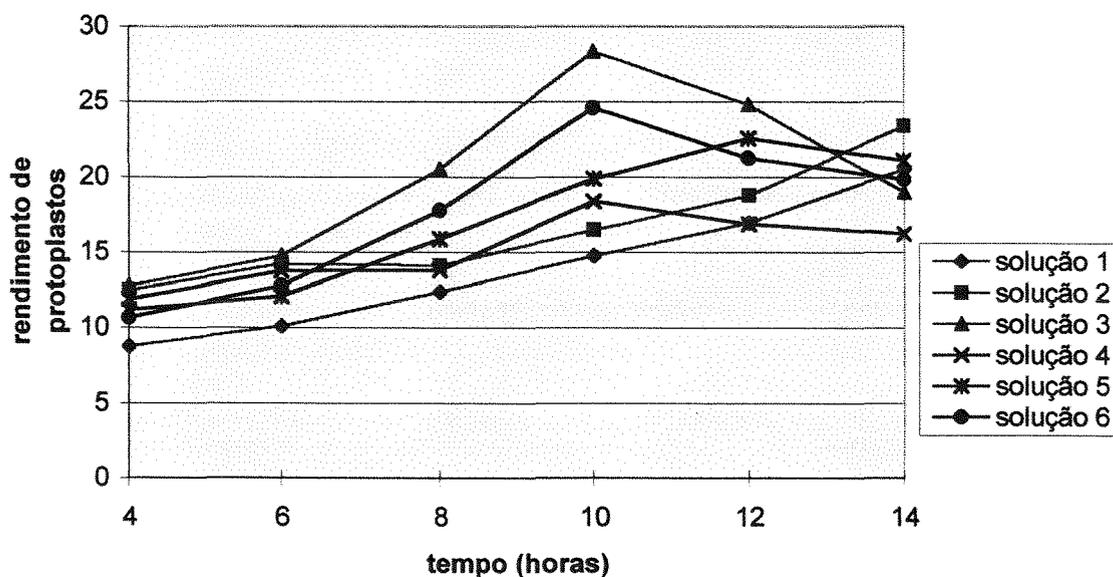


Figura 1. Rendimento total de protoplastos, isolados de suspensão de tangerina 'Cleópatra' em diversas soluções enzimáticas ( $\times 10^6$ )

Tabela 7. Rendimento total de protoplastos <sup>1</sup> de suspensão de limão 'Cravo', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.

Tempo (horas)	Soluções enzimáticas <sup>2</sup>					
	1	2	3	4	5	6
4	5,9 ± 1,0	6,7 ± 1,8	5,3 ± 0,9	8,6 ± 1,3	7,6 ± 0,7	6,5 ± 0,8
6	7,3 ± 1,3	8,0 ± 0,7	6,8 ± 2,3	10,6 ± 1,4	9,9 ± 1,9	8,7 ± 2,1
8	8,0 ± 1,4	10,5 ± 1,3	8,5 ± 1,4	11,4 ± 0,6	11,3 ± 1,2	11,2 ± 1,3
10	12,1 ± 2,1	11,1 ± 1,4	9,2 ± 1,6	14,1 ± 0,9	13,3 ± 1,2	12,8 ± 0,8
12	13,6 ± 1,6	12,6 ± 2,4	10,6 ± 1,0	13,8 ± 2,5	14,6 ± 1,1	13,8 ± 1,7
14	16,5 ± 0,8	14,1 ± 0,6	10,8 ± 0,9	17,3 ± 1,4	16,7 ± 2,3	13,2 ± 2,2

coeficiente de variação (para o tempo de incubação de 8 horas): 12,61 %

d.m.s. para teste Tukey a 5 % (para o tempo de incubação de 8 horas) 3,51

<sup>1</sup> média e desvio padrão de três experimentos, total de protoplastos ( $\times 10^6$ )

<sup>2</sup> soluções enzimáticas descritas na Tabela 2, página 35.

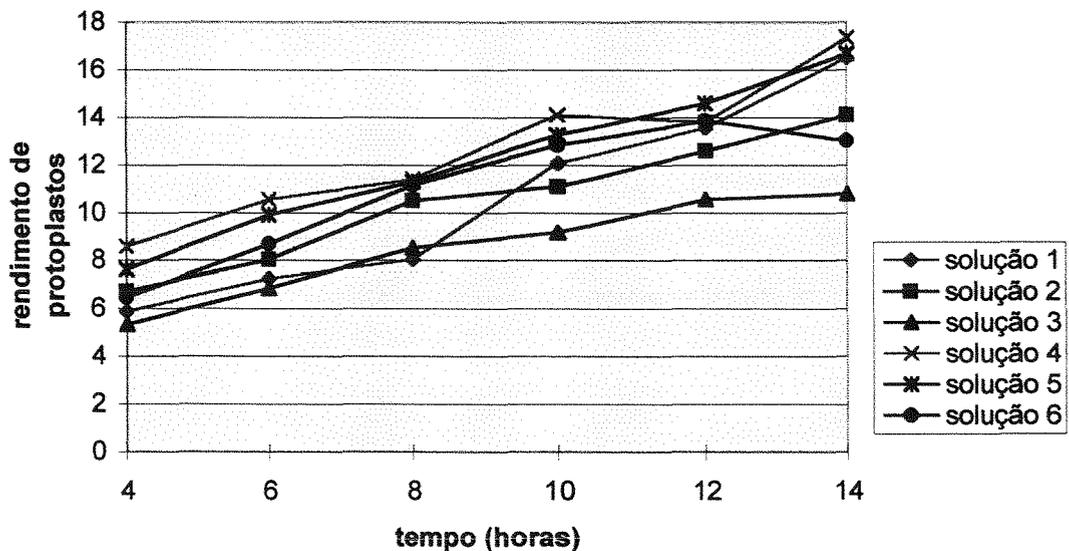


Figura 2. Rendimento total de protoplastos, isolados de suspensão de limão 'Cravo' em diversas soluções enzimáticas ( $\times 10^6$ )

A viabilidade média dos protoplastos das duas espécies após 8 horas de incubação em várias soluções enzimáticas foi avaliada pelo método de coloração com diacetato de fluoresceína (DAF) e visualização em luz ultra-violeta. Os resultados estão expressos na Tabela 8. À exceção da solução enzimática número 5 que apresentou uma viabilidade muito menor, todas as outras soluções apresentaram protoplastos com viabilidade satisfatória.

Os resultados obtidos com relação a viabilidade dos protoplastos estão de acordo com os encontrados por Oliveira (1993) e Cristofani (1991) que obtiveram viabilidade entre 73 e 92 %, para protoplastos de limão 'Cravo', tangerina 'Cleópatra' e laranja 'Pera'.

Pela análise da composição da solução enzimática 5 verifica-se que a mesma pode ser considerada como tóxica para isolamento de protoplastos de suspensão celular, apesar de vários autores utilizá-la em isolamentos de protoplastos de mesofilo de citros (Ohgawara et al., 1985; Kobayashi et al., 1991; Saito et al., 1993). Além da baixa viabilidade, a solução 5 produziu isolamentos com grande quantidade de "debris", nas duas espécies.

Oliveira (1993) em seu trabalho, também classificou a solução enzimática número 4 (descrita por Grosser & Gmitter Junior, 1990a) como concentrada. Entretanto, nas condições experimentais testadas, tal solução teve um comportamento semelhante às demais. No trabalho de Grosser & Gmitter Junior (1990a), os autores recomendam a confecção da solução enzimática concentrada seguido de diluição na proporção de 1:3 (solução enzimática: meio BH3) antes da incubação.

Tabela 8. Viabilidade média, em porcentagem <sup>1</sup>, de protoplastos de suspensão celular de tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Cravo’, após 8 horas de incubação em diversas soluções enzimáticas.

Espécie	Solução enzimática <sup>2</sup>					
	1	2	3	4	5	6
Tangerina	83,2 ± 3,7	88,1 ± 5,4	88,3 ± 6,2	81,2 ± 3,6	56,0 ± 6,0	80,6 ± 4,4
Limão	81,4 ± 4,1	78,1 ± 5,5	83,0 ± 6,3	88,7 ± 3,4	62,3 ± 6,1	78,6 ± 6,9

Coefficiente de variação: 7,01 %

d.m.s. pelo teste Tukey a 5%: 15,14

<sup>1</sup> porcentagem média e desvio padrão de três experimentos

<sup>2</sup> soluções enzimáticas descritas na Tabela 2, página 35.

As soluções enzimáticas podem ser avaliadas em termos de eficiência de isolamento de protoplastos (Cristofani, 1991; Oliveira, 1993) ou pela eficiência de cultivo de protoplastos (Vardi & Galun, 1982).

Vardi & Galun (1982) escolheram a melhor solução enzimática para diferentes espécies de citros baseando-se na eficiência de cultivo após 35 dias de cultivo. Segundo os autores, a variabilidade de resposta encontrada nas espécies foi devido a fonte de pectinase usada; algumas espécies mostraram sensibilidade diferencial aos dois tipos de pectinase testadas (Macerozyme R-10 ou Pectinase Koch-light).

Como todas as soluções enzimáticas permitiram o isolamento de protoplastos em quantidade acima do necessário, mesmo após 4 horas de incubação, e com viabilidade média semelhante (à exceção da solução 5), a conclusão final deste experimento permitiu a escolha de qualquer uma das soluções testadas. A única exceção foi a solução 5 que apresentou isolamentos de baixa qualidade. O tempo ideal de incubação nas soluções enzimáticas testadas situou-se entre 4 e 8 horas.

Para os experimentos seguintes optou-se pela solução enzimática número 1, com tempo de incubação variando entre 6 e 8 horas.

#### 4.4.2 Efeito da densidade de cultivo de protoplastos

Após o período de incubação das células na solução enzimática, passou-se à fase de purificação e posterior cultivo dos protoplastos.

Em vários experimentos de isolamento de protoplastos de suspensão celular com as duas espécies, observou-se a presença de “debris”. Com o objetivo de separar os protoplastos isolados, destes “debris, tentou-se realizar a centrifugação gradiente. Apesar de vários tipos de centrifugação gradiente terem sido testados (manitol (13 %): sacarose (21 %); manitol (13 %): sacarose (25 %); manitol (13 %): percoll (25 %) e manitol (13 %): percoll (50 %), as respostas não foram satisfatórias para as duas espécies em questão. Não se verificou a formação de uma banda na interface das soluções de diferentes densidades, impedindo a separação dos protoplastos. A razão para o insucesso da centrifugação gradiente está ligada à densidade dos protoplastos de suspensão de limão e tangerina, pois em experimentos anteriores com isolamento de protoplastos de suspensão de laranja ‘Pera’ a centrifugação gradiente produziu uma banda bem nítida, possibilitando a eliminação quase total dos “debris”.

A centrifugação gradiente nos isolamentos de protoplastos de mesofilo de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ possibilitaram a eliminação completa dos “debris”.

As eficiências de cultivo de protoplastos das duas espécies, utilizando o cultivo em gotas de agarose, em diferentes densidades de cultivo estão descritos na Tabela 9.

Os resultados obtidos demonstraram que a maior eficiência de cultivo para as duas espécies situou-se entre 1 e  $2 \times 10^5$  protoplastos.ml<sup>-1</sup>. Estes resultados se encontram dentro dos limites citados por Grosser & Gmitter Junior (1990a), entre 0 e 35 %.

Vardi et al. (1975), em trabalho com cultivo de protoplastos de laranja ‘Shamouti’, relatam a obtenção de melhores resultados com cultivo na densidade de  $1 \times 10^5$  protoplastos.ml<sup>-1</sup>, obtendo uma eficiência de cultivo de aproximadamente 6,5 %, em avaliações aos 28 dias. Já Oliveira (1993), trabalhando com as mesmas espécies do presente trabalho, cultivou protoplastos na densidade de  $2 \times 10^5$  protoplastos.ml<sup>-1</sup>, obtendo eficiência de cultivo de 9 % para tangerina e 5 % para limão, em avaliações aos 14 dias.

Os protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’ apresentaram uma melhor resposta ao cultivo do que os de limão, para todas as densidades de cultivo testadas (Figura 3). Uma outra

observação é a de que a partir da densidade considerada ótima ( $1-2 \times 10^5$ ), notou-se uma tendência a redução na eficiência de cultivo, nas duas espécies estudadas.

As quantidades totais de microcolônias existentes em cada ml de meio, nos diferentes tratamentos (densidades de cultivo) foram calculadas da seguinte forma: multiplicação da eficiência média de cultivo pela densidade inicial de cultivo e estão apresentadas na Tabela 10 e na Figura 4. Observando os dados conclui-se que houve uma tendência à estabilização do número de microcolônias formadas a partir do mesmo ponto em que houve um declínio na eficiência de cultivo.

A reunião destes fatos indica a existência de uma capacidade limite de suprimento de nutrientes do meio para os protoplastos e/ou, de troca gasosa entre o meio e os protoplastos; Uma vez alcançado este limite, o número de microcolônias mantidas pelo meio permaneceria estável. O cultivo em densidades acima da capacidade de suporte do meio resultaria numa menor eficiência de cultivo. Para Grosser (1994), uma alta densidade de cultivo pode reduzir a eficiência de cultivo.

Para as condições experimentais utilizadas, a capacidade limite de cultivo de microcolônias de limão 'Cravo' se situava próxima de  $13 \times 10^3$  microcolônias.ml<sup>-1</sup> e para tangerina 'Cleópatra', próxima de  $19 \times 10^3$  microcolônias.ml<sup>-1</sup>, após 28 dias de cultivo.

D'Utra Vaz et al. (1992) observaram em arroz, tomate e juta que, em atmosferas mais enriquecidas com oxigênio, as eficiências de cultivo de protoplastos foram superiores. Em arroz, a capacidade de regeneração de plantas a partir de protoplastos foi também aumentada com o cultivo em atmosferas enriquecidas com oxigênio.

Otoni (1995), comparando os métodos de cultivo em gotas e camada de agarose em *Passiflora spp.*, concluiu que o método de cultivo em gotas era mais eficiente. Segundo o autor, o motivo estaria relacionado a um maior suprimento de oxigênio, ocasionando uma produção mais efetiva de ATP, com efeitos favoráveis nas divisões celulares. Enquanto no cultivo em camada de agarose, os protoplastos ficam completamente submersos sob uma lâmina de meio líquido. Grosser (1994), também cita que a forma de cultivo (meio líquido, gotas de agarose ou camada de agarose), deve permitir a maximização das trocas gasosas.

Segundo Grosser (1994), uma eficiência muito alta de cultivo de protoplastos de citros é indesejável pois pode inibir a posterior capacidade embriogênica dos calos, impedindo a

regeneração de plantas. Assim, o autor sugere uma diluição da cultura ou transferência rápida para meio sólido, no caso de eficiência de cultivo inicial ser extremamente alta.

Tabela 9. Eficiência média <sup>1</sup> de plaqueamento de protoplastos de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', após 28 dias de cultivo, com plaqueamento em gotas de agarose.

Espécie	Densidade de plaqueamento			
	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$4 \times 10^5$
Tangerina	$9,6 \pm 1,5 \%$	$15,6 \pm 4,4 \%$	$8,6 \pm 1,6 \%$	$4,7 \pm 0,9 \%$
Limão	$1,9 \pm 1,1 \%$	$4,9 \pm 1,2 \%$	$5,9 \pm 1,2 \%$	$3,3 \pm 1,0 \%$

coeficiente de variação (para o tempo de incubação de 8 horas): 26,1 %

d.m.s. para teste Tukey a 5 % (para o tempo de incubação de 8 horas) 3,1

<sup>1</sup> média e desvio padrão de três experimentos, expressa em porcentagem

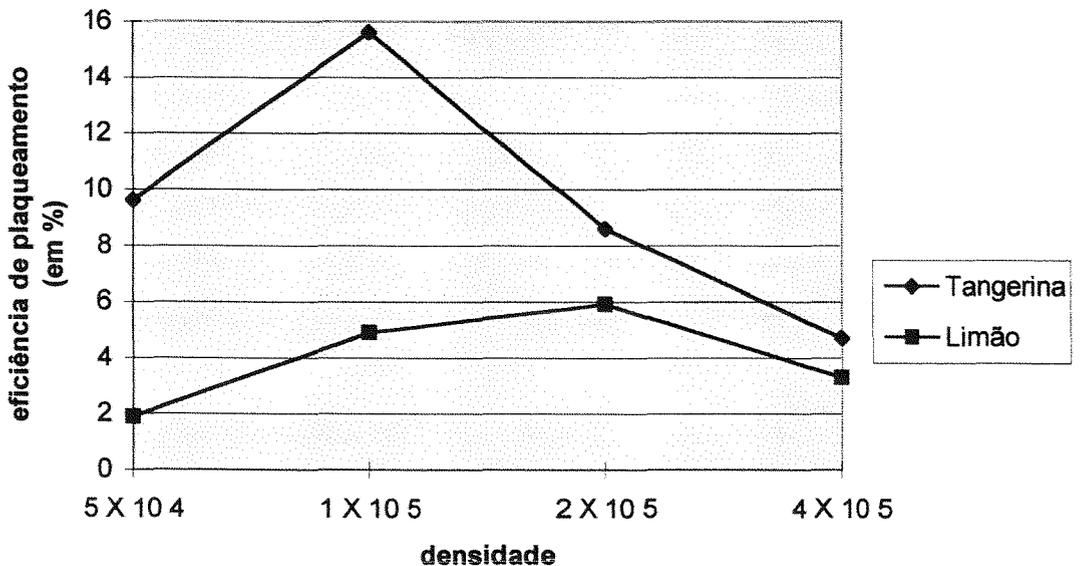


Figura 3. Eficiência de cultivo em função da densidade inicial, avaliada aos 28 dias de cultivo

Tabela 10. Quantidade total de microcolônias produzidas por ml de meio, de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', após 28 dias de cultivo, com plaqueamento em gotas de agarose.

Espécie	Densidade de plaqueamento <sup>1,2</sup>			
	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$4 \times 10^5$
Tangerina	$5 \times 10^3$	$16 \times 10^3$	$17 \times 10^3$	$19 \times 10^3$
Limão	$0,9 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$12 \times 10^3$	$13 \times 10^3$

<sup>1</sup> total de microcolônias por ml de meio da gota

<sup>2</sup> fórmula de cálculo: (densidade de cultivo x eficiência de cultivo (em %) / 100 = quantidade de microcolônias. ml<sup>-1</sup> de meio da gota).

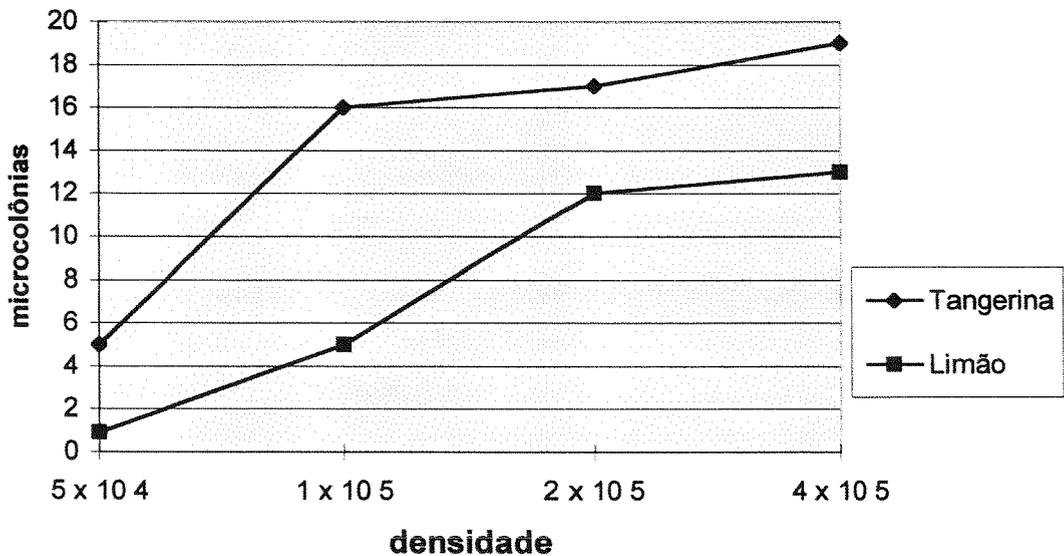


Figura 4. Quantidade de microcolônias ( $\times 10^3$ ) em função da densidade de cultivo, avaliação aos 28 dias

Em geral, as primeiras divisões celulares foram observadas 7 dias após o cultivo. Vardi & Galun (1988) e Grosser & Gmitter Junior (1990a) relatam que normalmente as primeiras divisões celulares são observadas aos 10-14 dias após o início do experimento. Segundo Vardi & Galun (1988), a razão é devido aos protoplastos de citros possuírem uma fase lag relativamente extensa. Sim et al. (1988) entretanto, observaram as primeiras divisões aos 3 dias, em cultivo de protoplastos de *Citrus mitis*.

Os meios de cultivo utilizados neste experimento foram o meio KM8P (para confecção das gotas de agarose) e como meios de banho, o meio BH<sub>3</sub> (0,6 M) e posteriormente, o meio MT. Segundo Grosser (1994) o meio de cultivo de protoplastos K8P, de Kao & Michayluk (1975) tem sido usado com sucesso por vários autores, em diversas espécies. Segundo Grosser (1994), a razão do sucesso do meio estaria provavelmente na adição de concentrações apropriadas de multivitaminas, ácidos orgânicos e açúcares/alcoóis complexos que atuariam como redutores de estresses ambientais, devido ao fornecimento de metabólitos intermediários.

O meio KM8P é suplementado com 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D); 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de zeatina. O meio BH<sub>3</sub> é semelhante ao meio KM8P, diferindo basicamente por não conter reguladores de crescimento e pela substituição do nitrogênio, na forma de nitratos, pela glutamina. Grosser (1994) comenta que a presença do nitrogênio na forma de nitratos, nos níveis encontrados no meio KM8P, pode causar toxidez aos protoplastos.

Baseando-se nos resultados obtidos optou-se pelo cultivo na densidade de 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos por ml de meio de cultivo, nos experimentos com fusão de protoplastos das duas espécies.

#### 4.5 Cultivo de microcolônias, calos e regeneração de plantas

No presente trabalho, o cultivo na forma de gotas de agarose, o uso do meio KM8P e a redução da osmolaridade do meio de banho em 28 dias, possibilitaram uma rápida obtenção de calos. Após 35 dias de cultivo, microcolônias com 1 mm de diâmetro já eram visualizadas.

As microcolônias com mais de 1mm de diâmetro foram transferidas para meio semi-sólido e para condições de baixa irradiância. A adição de 2 ml de meio líquido na transferência das microcolônias para o meio sólido foi considerada de grande importância pois, na sua ausência, observou-se uma oxidação na área de contato entre as colônias e o meio semi-sólido. Grosser &

Gmitter Junior (1990a) recomendam manter as microcolônias em condições de alta umidade até que se adaptem às condições de cultivo em meio sólido.

Os calos foram subcultivados em meio MT semi-sólido apenas duas vezes (60 dias). Após este período, placas que apresentavam calos com grande crescimento foram descartadas, restando somente aqueles calos que apresentavam a formação de embrióides. O cultivo de calos com grande vigor (alta taxa de crescimento) demonstrou que nestes, a embriogênese estava inibida, pois não se observou a formação de embrióides.

Os embrióides normalmente se originaram em placas, a partir de microcolônias, nos estádios finais de redução da osmolaridade do meio de banho ( $\pm 45$  dias de cultivo) ou a partir de calos cultivados em pequena quantidade, no meio semi-sólido.

A embriogênese somática nos calos ocorreu de forma espontânea. Os embriões somáticos em estágio globular e com coloração verde, foram transferidos individualmente para o meio MT contendo  $1500 \text{ mg.L}^{-1}$  de extrato de malte, com o objetivo de acelerar o desenvolvimento, tal como descrito por Vardi & Galun (1988). Entretanto, esta fase não pareceu ser essencial pois embriões que não foram cultivados neste meio também tiveram um desenvolvimento normal.

Na fase de cultivo de calos e na embriogênese, o agente solidificante utilizado foi o ágar. Os resultados obtidos com este agente solidificante em limão 'Cravo' foram melhores em comparação com o phytigel, em termos de desenvolvimento de calos e de embriões (Cristofani <sup>4</sup>). Após a fase de embriogênese, passou-se a usar o phytigel nos meios de cultivo de plantas. As vantagens do phytigel como agente solidificante são: a transparência elevada e o custo mais baixo, pois o phytigel é adicionado na concentração de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto que o ágar, na concentração de  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de meio.

Os embriões em estágio cotiledonar foram transferidos para o meio de germinação contendo ácido giberélico e água de coco. Este meio foi altamente eficiente na germinação de embriões. Em torno de 85% dos embriões transferidos para este meio germinaram e resultaram em plantas.

---

<sup>4</sup> Cristofani, M. Comunicação pessoal, 1997.

As plantas obtidas a partir da germinação dos embriões somáticos se desenvolveram bem no meio MT adicionado de ANA. Algumas plantas que não apresentavam tamanho adequado para a fase de aclimação foram subcultivadas no mesmo meio, para tal, uma poda nas raízes foi realizado. A formação de novo sistema radicular demorou em torno de 14 dias e em algumas plantas, a formação de novas raízes não foi observada. As plantas que não formavam raízes acabaram sendo eliminadas.

#### **4.6 Aclimação das plantas ao meio ambiente**

Os resultados obtidos com a aclimação de plantas das duas espécies no presente estudo estão expressos na Tabela 11. O método 2 (aclimação em vermiculita expandida) foi o que apresentou o melhor resultado, com cerca de 65 % das mudas adaptadas, seguido do primeiro.

Todos os métodos de aclimação de plantas de citros foram considerados como de baixa eficiência, em comparação com os resultados obtidos com outras espécies (banana e crisântemo) estudadas no laboratório de Radiogenética do CENA/USP. A literatura revela que tradicionalmente há problemas com a adaptação de mudas oriundas de cultura de tecidos de espécies lenhosas.

Baptista et al. (1991) relatam um método de adaptação de plantas cítricas cultivadas “in vitro” semelhante aos três primeiros testados neste trabalho. O método consiste no transplante das plantas para copos plásticos contendo mistura 1:1 areia lavada:pó de xaxim, com redução gradativa da umidade e elevação da insolação, até a aclimação total. Os autores relatam que este método requer um longo período para aclimação e, para a redução do tempo de aclimação, recomendam a realização de enxertia (método da garfagem) sobre plantas de porta-enxerto (com 5 mm de diâmetro), já plantadas em solo.

O principal problema encontrado nos métodos testados foi o aparecimento de fungos, talvez devido à excessiva umidade do ambiente. A diferença básica entre os três primeiros métodos foi o tipo de substrato utilizado. A utilização da mistura solo:areia (esterilizada em autoclave) (método 3) ocasionou o aparecimento de fungos em quase 100 % das plantas e resultou na morte da maioria das plantas. A utilização do substrato comercial Plantmax, também resultou no aparecimento de fungos, mas em menor quantidade do que no método 3. A utilização do

fungicida Benlate, nestes casos, não resultou em efeito benéfico, outros tipos de fungicidas poderiam ter sido testados.

O método de adaptação em meio líquido (4) possui uma série de desvantagens em relação aos outros avaliados pois requer ambiente esterilizado para o transplante, proporcionou um menor desenvolvimento de caules e de raízes, além de necessitar de um transplante adicional para o solo.

O método selecionado para ser utilizado nos experimentos de fusão foi o método 2, com a utilização da vermiculita expandida (esterilizada em autoclave).

Tabela 11. Porcentagem de plantas aclimatadas de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ cultivadas “in vitro”, utilizando quatro métodos diferentes de aclimação.

	Método <sup>a</sup>			
	1	2	3	4
Plantas aclimatadas <sup>b</sup>	45 %	65 %	2 %	34 %

<sup>a</sup> 1 - transplante em copos com substrato comercial Plantmax (Eucatex Ltda)

2 - transplante em copos com vermiculita expandida comercial (Eucatex Ltda)

3 - transplante em copos com mistura 1:1 de solo:areia lavada esterilizada em autoclave

4 - transplante em tubos com meio líquido MS (1/2 da concentração de sais) (esterilizado)

<sup>b</sup> para cada método, um total de 60 plantas escolhidas ao acaso.

#### 4.7 Isolamento de protoplastos de mesofilo

##### 4.7.1 Eficiência de isolamento de protoplastos de mesofilo, em diversas soluções enzimáticas

Os rendimentos obtidos com o isolamento de protoplastos de mesofilo de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ em diversas soluções enzimáticas, estão descritos nas Tabelas 12 e 13.

Os resultados indicam que somente após 12 horas de isolamento, todas as soluções testadas tinham produzido protoplastos em quantidade suficiente das duas espécies, para

experimentos de fusão, considerando uma perda de 30 % de protoplastos devido à purificação e à centrifugação gradiente. Normalmente os experimentos de fusão descritos neste trabalho utilizavam um total de  $3 \times 10^6$  protoplastos de mesofilo.

Para todas as soluções testadas o número de protoplastos isolados das duas espécies foi sempre crescente, até o período de 16 horas de isolamento (Figuras 5 e 6), isto se constitui numa indicação de que o experimento poderia avançar mais, com a obtenção de quantidades maiores de protoplastos. Após 16 horas de isolamento ainda podia-se observar tecidos não digeridos. Entretanto, seguindo a recomendação de Grosser (1994), os isolamentos devem ser interrompidos tão logo tenha sido obtido a quantidade mínima necessária para prosseguir com os experimentos de fusão, mantendo-se assim a qualidade dos protoplastos (evitando danos à membrana plasmática).

Grosser & Chandler (1987) isolaram protoplastos de mesofilo de 5 materiais (3 espécies e 2 híbridos) utilizando uma solução enzimática idêntica a de número 4 usada neste experimento. Após 10-15 horas de isolamento, os autores obtiveram em torno de  $20-60 \times 10^6$  protoplastos por grama de tecido fresco. Segundo os autores, as variações na eficiência de isolamento deveram-se principalmente a idade e as condições das folhas.

Um passo importante no isolamento de protoplastos de mesofilo de citros é a utilização da infiltração da solução enzimática nas folhas, com a utilização de vácuo (Grosser, 1994). Este procedimento permite um incremento na capacidade de isolamento de protoplastos, já que algumas espécies e/ou cultivares de citros possuem o tecido parenquimático muito compacto. A recomendação é de 105 a 140 kPa de vácuo, por 15 a 30 minutos (Grosser, 1994).

Apesar de alguns autores terem destacado a importância da infiltração enzimática a vácuo, observou-se no presente estudo que a sua ausência não foi impeditiva pois protoplastos de folha foram isolados em quantidade suficiente, sem o uso do vácuo.

A solução enzimática número 5 foi a mais eficiente no isolamento de protoplastos de mesofilo das duas espécies. Entretanto se for analisada em termos de custo e benefício, verifica-se que na sua composição a concentração total de enzimas é muito alta (3,3 %), em comparação com às outras soluções. A solução número 6 por exemplo, com 16 horas de isolamento, produziu aproximadamente  $2/3$  do total de protoplastos de limão e metade do total de protoplastos de tangerina isolados com a solução 5. A concentração total de enzimas da solução 6 era de 0,7 %. O mesmo raciocínio pode ser feito com relação às outras soluções enzimáticas testadas.

As soluções enzimáticas 1 e 4 apresentaram resultados semelhantes nos isolamentos de protoplastos das duas espécies, no entanto, optou-se pelo uso da solução número 1 para experimentos de fusão devido às facilidades operacionais, pois a mesma já tinha sido selecionada para isolamentos de protoplastos de suspensão celular. O tempo de incubação enzimática escolhido foi de 12-14 horas.

As folhas utilizadas no presente experimento foram obtidas a partir de plantas cultivadas “in vitro”, com o objetivo de evitar a fase de descontaminação de folhas. Grosser (1994) recomenda a utilização de folhas obtidas de plantas cultivadas sob condições de baixa luminosidade e umidade alta (em câmaras de crescimento ou “in vitro”).

Testes iniciais em que se tentou isolar protoplastos a partir de plantas jovens mantidas em casa de vegetação, não obtiveram sucesso. A eficiência de isolamento foi muito baixa e a descontaminação não foi eficiente, pois todas as placas cultivadas apresentavam contaminação com bactérias.

Tabela 12. Rendimento total de protoplastos <sup>1</sup> de mesofilo de tangerina 'Cleópatra', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.

Tempo (horas)	Soluções enzimáticas <sup>2</sup>			
	1	4	5	6
8	1,9 ± 1,8	1,7 ± 0,9	3,1 ± 1,3	0,9 ± 1,2
10	4,7 ± 0,6	3,6 ± 2,1	5,7 ± 1,0	2,3 ± 1,5
12	7,3 ± 1,4	5,4 ± 1,5	7,4 ± 0,4	4,2 ± 1,3
14	9,2 ± 0,5	7,9 ± 1,2	11,7 ± 0,6	6,5 ± 2,3
16	11,8 ± 1,8	10,7 ± 1,6	14,3 ± 1,6	7,2 ± 0,5

coeficiente de variação (para o tempo de incubação de 14 horas):

12,54 %

d.m.s. para teste Tukey a 5 % (para o tempo de incubação de 14 horas)

2,35

<sup>1</sup> média e desvio padrão de três experimentos, total de protoplastos ( $\times 10^6$ )

<sup>2</sup> soluções enzimáticas descritas na Tabela 3, página 41.

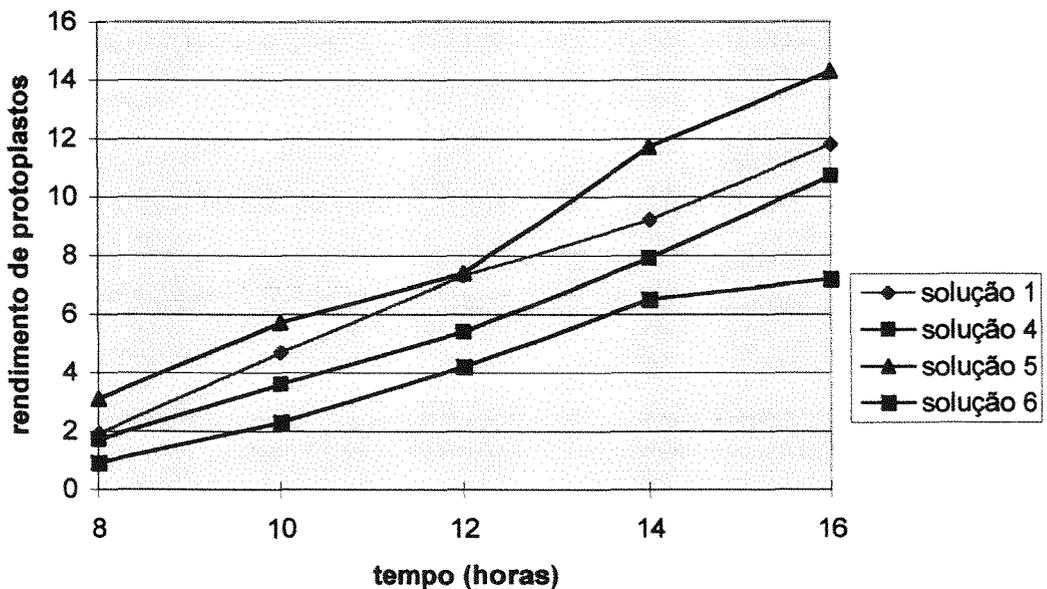


Figura 5. Rendimento total de protoplastos, isolados de mesofilo de tangerina 'Cleópatra' em diversas soluções enzimáticas ( $\times 10^6$ )

Tabela 13. Rendimento total de protoplastos <sup>1</sup> de mesofilo de limão 'Cravo', após isolamentos em diversas soluções enzimáticas.

Tempo (horas)	Soluções enzimáticas <sup>2</sup>			
	1	4	5	6
8	2,3 ± 1,0	2,1 ± 1,8	3,4 ± 1,5	1,8 ± 0,9
10	3,5 ± 1,2	4,5 ± 2,1	6,9 ± 1,7	3,1 ± 1,3
12	5,2 ± 0,7	6,8 ± 1,0	7,8 ± 2,4	4,4 ± 1,7
14	7,9 ± 1,4	8,5 ± 1,2	10,6 ± 0,8	5,4 ± 2,1
16	9,6 ± 1,2	10,7 ± 1,6	12,6 ± 1,1	8,4 ± 0,7

coeficiente de variação (para o tempo de incubação de 14 horas): 18,31 %

d.m.s. para teste Tukey a 5 % (para o tempo de incubação de 14 horas) 1,89

<sup>1</sup> média e desvio padrão de três experimentos, total de protoplastos ( $\times 10^6$ )

<sup>2</sup> soluções enzimáticas descritas na Tabela 3, página 41.

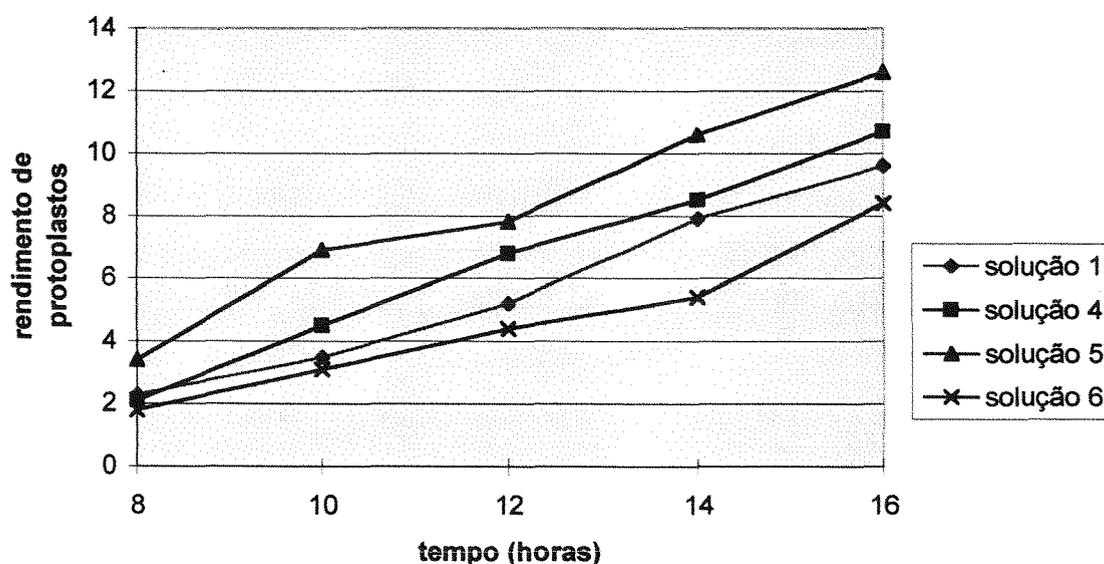


Figura 6. Rendimento total de protoplastos, isolados de mesofilo de limão 'Cravo' em diversas soluções enzimáticas ( $\times 10^6$ )

#### 4.8 Isolamentos de protoplastos de suspensão celular e mesofilo para experimentos de fusão.

Os isolamentos de protoplastos de mesofilo foram iniciados sempre 4 horas antes do isolamento de protoplastos de suspensão, com o objetivo de sincronizar o final de ambos. O tempo de isolamento de protoplastos das duas espécies foi de 8 horas para protoplastos de suspensão e 12-14 horas para protoplastos de mesofilo.

Os resultados obtidos visando o isolamento de protoplastos de suspensão e de mesofilo, das duas espécies, estão descritos na Tabela 14. Observando os dados conclui-se que, os resultados, em termos de quantidade, são ligeiramente inferiores aos obtidos nos experimentos de teste de soluções enzimáticas, mas deve ser lembrado que a contagem dos protoplastos neste experimento foi feita após a purificação, enquanto que no primeiro experimento (teste de enzimas), a contagem foi feita antes da purificação. Após vários experimentos sucessivos, observou-se variabilidade na quantidade de protoplastos isolados; o motivo para tal fato se deve a ocorrência de variações de temperatura durante o isolamento e diferenças no estágio fisiológico e na idade, de suspensões e folhas.

Tabela 14. Quantidade média<sup>1</sup> obtida de protoplastos de suspensão e mesofilo, de tangerina 'Cleópatra' e limão 'Cravo', após a purificação.

Espécie	Tipo de Protoplastos	
	Suspensão	Mesofilo
Tangerina 'Cleópatra'	10,6 ± 2,3	6,1 ± 1,5
Limão 'Cravo'	6,8 ± 1,9	4,8 ± 1,3

<sup>1</sup> média e desvio padrão de cinco experimentos, total de protoplastos ( $\times 10^6$ )

O aumento na quantidade de material fresco (folhas) adicionado no início dos isolamentos, de 0,5 g para 0,7 g, possibilitou a obtenção de maior quantidade de protoplastos. Esta modificação metodológica teve como objetivo, a garantia da obtenção de quantidades mínimas necessárias de protoplastos, para prosseguir com os experimentos de fusão.

Devido ao insucesso na realização da centrifugação gradiente nos protoplastos isolados a partir de suspensão das duas espécies, um maior rigor nas condições experimentais dos isolamentos teve de ser empregado, de forma a maximizar a qualidade e evitar a liberação de “debris” em grande quantidade. As condições experimentais mais rigorosas foram: utilização nos isolamentos, de suspensões (vigorosas) com 2-3 dias após o último subcultivo; redução do tempo de isolamento (finalizando o isolamento após atingir o número mínimo necessário de protoplastos) e redução do número de lavagens com solução CPW 13M (apenas uma), antes da fusão.

Nos isolamentos de protoplastos de mesofilo que apresentavam “debris” (sujeira), a realização de centrifugação gradiente com CPW 21S possibilitou a obtenção de isolamentos bastante limpos e com protoplastos de boa qualidade.

#### **4.9 Experimentos de fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’**

As porcentagens de obtenção de células heterocariontes e homocariontes medidas imediatamente após a fusão, em cinco experimentos consecutivos de fusão de protoplastos do tratamento 1 e do tratamento 2, estão listados nas Tabelas 15 e 16.

O tratamento 1 corresponde a fusão de tangerina ‘Cleópatra’ (protoplastos de suspensão celular) com limão ‘Cravo’ (protoplastos de mesofilo), enquanto o tratamento 2, corresponde ao tratamento recíproco, fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ (suspensão celular) com protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’ (mesofilo).

Observando os dados das Tabelas 15 e 16 conclui-se que, não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de formação de células heterocariontes, nos dois métodos de fusão testados.

Este resultado está em discordância com os obtidos por Negrutiu et al. (1986) que trabalharam com fusão de protoplastos de mesofilo de diversas linhagens mutantes auxotróficas de *N. plumbaginifolia*. Negrutiu et al. (1986) consideraram que o pré-tratamento em solução salina W5 seguido de fusão com solução contendo 40 ou 50 % de polietileno glicol (PEG) (e sem a adição de açúcares), resultava em maior frequência de fusão. A frequência média de fusão obtida no trabalho de Negrutiu et al. (1986) foi de 3 a 4 %.

Segundo Negrutiu et al. (1986), os protoplastos ressuspensos em solução salina W5 antes da fusão, sofreram fusão mais facilmente em comparação com os protoplastos pré-

incubados em soluções contendo sacarose ou manitol. As razões estariam na sedimentação mais rápida dos protoplastos mantidos em W5 e na atração mais forte entre os protoplastos e a base da placa de Petri, resultando numa densidade local mais alta e uma maior área de contato intracelular, durante a fase de aglutinação com PEG.

No presente trabalho também foi observado que os protoplastos mantidos em W5 possuíam uma sedimentação mais rápida do que quando mantidos em solução CPW 13M. A solução W5 possui uma menor densidade e também uma menor osmolaridade (em torno de 0,29 M) em comparação com a solução CPW 13 M (em torno de 0,7 M).

Tabela 15. Eficiência de fusão, em porcentagem <sup>a</sup>, entre protoplastos de tangerina 'Cleópatra' (suspensão) e limão 'Cravo' (mesofilo), utilizando-se dois métodos de fusão.

Tipos de células	Métodos de fusão	
	1	2
Células heterocariontes	6,8 % ± 1,34	5,1 % ± 0,66
Células homocariontes	6,7 %	4,0 %
Protoplastos não fusionados	86,5 %	90,9 %
Coefficiente de variação:	17,71 %	
d.m.s.pelo teste Tukey a 5%:	2,4	

<sup>a</sup> porcentagem média e desvio padrão de cinco experimentos

Método 1 - Solução de PEG a 25 % pH 5,6 (Power et al., 1976)

Método 2 - Solução de PEG a 50 % pH 5,7 (Negrutiu et al., 1986)

Tabela 16. Eficiência de fusão, em porcentagem <sup>a</sup>, entre protoplastos de limão 'Cravo' (suspensão) e tangerina 'Cleópatra' (mesofilo), utilizando-se dois métodos de fusão.

Tipos de células	Métodos de fusão	
	1	2
Heterocariontes	6,3 % ± 1,71	5,8 % ± 0,64
Homocariontes	5,9 %	5,3 %
Protoplastos não fusionados	87,8 %	88,9 %
Coeficiente de variação:		19,16 %
d.m.s.pelo teste Tukey a 5%:		2,6

<sup>a</sup> porcentagem média e desvio padrão de cinco experimentos

Método 1 - Solução de PEG a 25 % pH 5,6

(Power et al., 1976)

Método 2 - Solução de PEG a 50 % pH 5,7

(Negrutiu et al., 1986)

Segundo Negrutiu et al. (1986), o tipo de suporte para fusão usado no presente estudo (tubos de vidro com fundo cilíndrico) possui algumas desvantagens em relação a placas de Petri (plásticas ou vidro), as principais seriam a ocorrência de uma maior frequência de protoplastos danificados e dificuldade de monitoramento do processo de aglutinação.

No presente estudo, uma alta frequência de protoplastos danificados foi verificada somente quando se utilizou a solução fusionante do método 2, este fato foi creditado à alta concentração de PEG da solução e não devido à utilização de tubos de vidro como suporte para a fusão.

Os seguintes procedimentos de fusão foram mantidos constantes durante os experimentos de fusão: densidade de protoplastos; pH da solução de PEG; altura da queda das gotas de solução fusionante; pressão do jato de solução fusionante que ocasionava uma mistura física no protoplastos e o tempo de incubação na solução fusionante. O monitoramento do processo foi feito sempre, logo após a adição da solução contendo o PEG e em todos os experimentos realizados.

Com relação aos tratamentos de fusão, analisando os dados dos experimentos de fusão em conjunto (Tabelas 15 e 16) observa-se que não houve diferença significativa, em termos de porcentagem de formação de células heterocariontes, nos dois tratamentos realizados (limão 'Cravo' como parental doador de protoplastos de suspensão celular e tangerina 'Cleópatra', como parental doador de protoplastos de mesofilo e o tratamento recíproco). Entretanto, no acompanhamento posterior dos experimentos ficou demonstrado que apenas quando a tangerina 'Cleópatra' foi usada como parental de suspensão celular foram obtidos híbridos somáticos.

A razão da ocorrência de tal fato, pode estar ligada a diferença na capacidade embriogênica das células de suspensão das duas espécies. Os protoplastos de suspensão (não fusionados) de limão 'Cravo' demonstraram ser mais recalcitrantes às condições de cultivo utilizadas no presente trabalho (ver sub-ítem 4.4.2.).

A frequência de obtenção de células heterocariontes no presente estudo variou entre 5,1 e 6,8 %. Grosser & Gmitter Junior (1990b) relataram que em vários trabalhos com fusão química de citros, a frequência de formação de heterocariontes situou-se entre 1 e 10 %. Já Ling & Iwamasa (1994) obtiveram uma frequência de 7 % de células heterocariontes entre tangerina 'Ponkan' e *Citropsis gabunensis*, mas utilizando a eletrofusão.

Os protoplastos resultantes de todos os eventos de fusão foram cultivados na densidade total de  $2 \times 10^5$  protoplastos.ml<sup>-1</sup> de meio, sendo que a metade destes eram protoplastos de mesofilo. Considerando a hipótese de os protoplastos de mesofilo das duas espécies não sofrerem a primeira divisão celular tal como no trabalho de Grosser & Chandler (1987), o esperado era de que o cultivo se apresentasse semelhante ao cultivo na densidade de  $1 \times 10^5$  protoplastos.ml<sup>-1</sup> de meio.

A eficiência média de cultivo dos protoplastos obtidos em experimentos de fusão foi de  $4,5 \% \pm 2,1$ , abaixo da obtida com o cultivo de protoplastos das espécies parentais não fusionados (sub-ítem 4.4.2.).

A condução dos experimentos de fusão nas fases de cultivo de protoplastos, microcolônias e calos foi semelhante a dos experimentos com protoplastos não fusionados das espécies parentais. Os embrióides se originaram espontaneamente a partir de calos cultivados em pequena quantidade no meio MT semi-sólido.

A seguir, os embrióides foram separados dos calos para poder completar o seu desenvolvimento. Ao atingir o estágio de embrião cotiledonar, os embriões foram sendo transferidos isoladamente para o meio de germinação contendo ácido giberélico e água de coco.

Este meio também foi muito eficiente na germinação de embriões somáticos obtidos a partir de experimentos de fusão. As plantas contendo caule e raiz foram transferidas para o meio de manutenção de plantas (meio MT acrescido de ANA, ver sub-ítem 3.5).

A Figura 7 ilustra as diversas fases de um experimento de fusão de protoplastos, a partir da fusão até a fase de aclimação das plantas ao meio ambiente.

Aproximadamente 505 plantas “in vitro” foram obtidas em cinco experimentos consecutivos de fusão de protoplastos usando-se a tangerina ‘Cleópatra’ como parental de suspensão celular e limão ‘Cravo’ como parental de mesófilo (tratamento 1), enquanto no tratamento 2, apenas 42 plantas “in vitro” foram obtidas.

Inicialmente 105 plantas do tratamento 1 foram levadas para a aclimação; como resultado, apenas 25 plantas foram aclimatadas (eficiência de 23,8 %); devido a esta baixa eficiência, optou-se por fazer a discriminação dos híbridos somáticos, ainda quando cultivados “in vitro”.

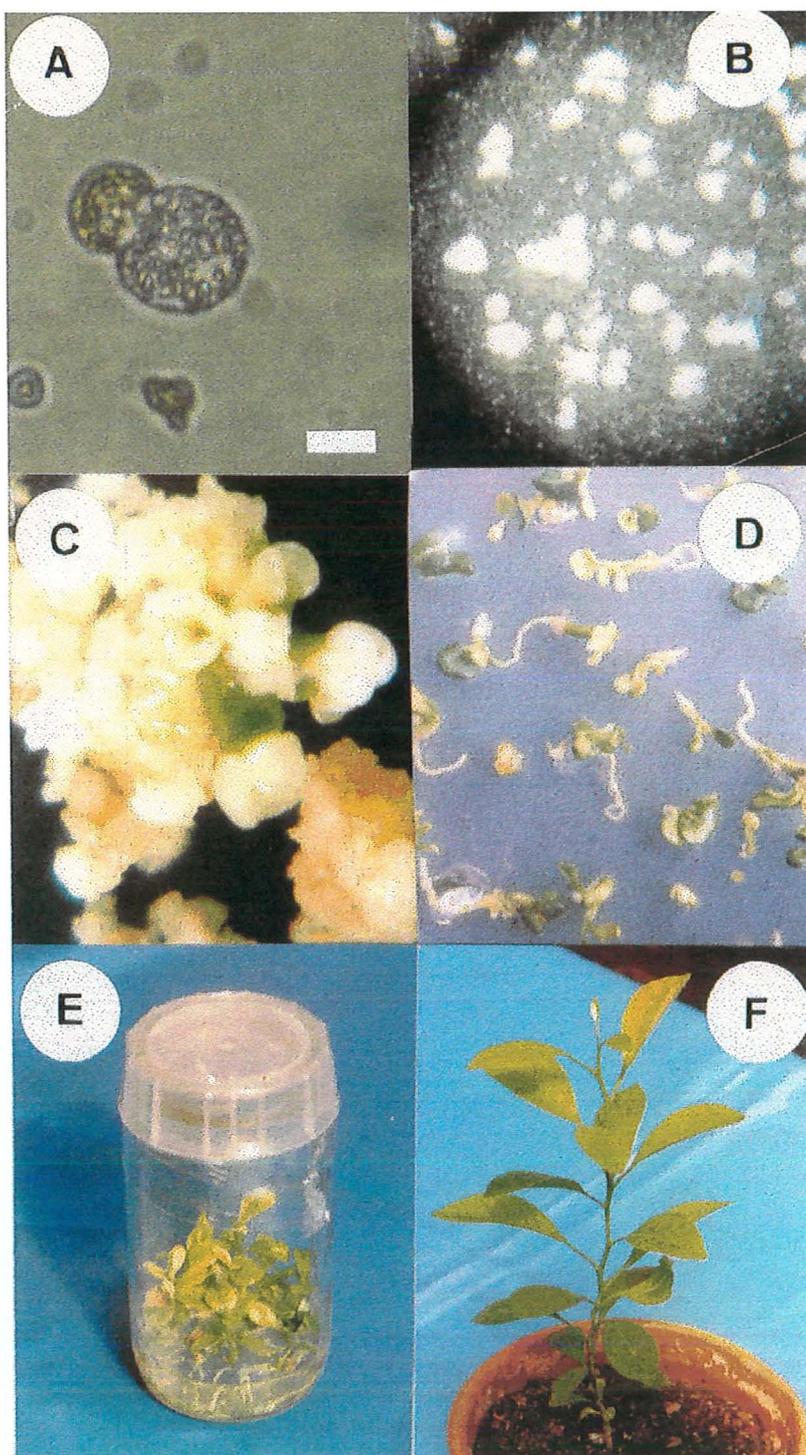


Figura 7. Diversas fases de um experimento de fusão de protoplastos e regeneração de plantas. **A.** Fusão entre protoplasto de mesofilo e protoplasto de suspensão celular. Barra - 20  $\mu\text{m}$ . ; **B.** microcolônias com 40 dias de cultivo; **C.** calos apresentando embriogênese; **D.** germinação de embriões; **E.** cultivo de plantas obtidas a partir de experimentos de fusão; **F.** Planta aclimatada obtida a partir de experimento de fusão.

#### 4.10 Identificação e caracterização dos híbridos somáticos

Nenhuma característica morfológica que permitisse a distinção entre híbridos somáticos e plantas regeneradas a partir de protoplastos das espécies parentais foi observada nas plantas cultivadas “in vitro”, mesmo após 6 meses de subcultivos.

Algumas das características morfológicas citadas como pertencentes aos híbridos alotetraplóides seriam: formato intermediário de folha entre as duas espécies (Grosser et al., 1990; Mourão Filho et al., 1996); coloração mais escura das folhas e maior espessura do limbo foliar (Grosser & Gmitter Junior, 1990). A única característica frequentemente presente nas plantas cultivadas “in vitro” era a dificuldade de enraizamento, mas esta característica poderia ser devido a outros fatores que não a natureza híbrida das plantas.

Segundo Grosser & Gmitter Junior (1990b), a morfologia das primeiras folhas dos híbridos somáticos entre tangerina ‘Cleópatra’ e *Citropsis gilletiana* era muito variável. A espécie *Citropsis gilletiana* possuía folhas pentafolioladas, mas as plantas híbridas produziram as primeiras folhas unifolioladas. A estabilização do formato das folhas ocorreu somente após um período de desenvolvimento das plantas, e a partir daí, os híbridos apresentaram padrão intermediário de folhas.

A identificação de híbridos somáticos no presente trabalho se iniciou com o método molecular com uso de marcadores RAPD. Um protocolo mais simples, rápido e barato de extração de DNA foi otimizado com sucesso para as duas espécies. Com os marcadores RAPD foi possível não só discriminar quais plantas eram híbridas, mas também confirmar a presença dos dois genomas nos híbridos somáticos.

##### 4.10.1 Análise de marcadores moleculares RAPD

O protocolo de extração de DNA total foi adaptado a partir do trabalho de Edward et al. (1991) que trabalhou com *Brassica napus*. Este protocolo bem simples, que utiliza uma pequena quantidade de reagentes e com poucos passos, foi utilizado devido à sua principal vantagem, extrair DNA a partir de uma quantidade pequena de tecido fresco de plantas. Isto possibilitou a realização de testes precoces nas plantas obtidas de experimentos de fusão. Outras vantagens foram a redução do número de plantas a serem mantidas “in vitro”, devido à eliminação das

plantas não-híbridas (regeneradas de protoplastos de parentais) e a redução das perdas de híbridos somáticos durante a aclimação, fase que é considerada como uma das mais críticas em plantas perenes.

Partindo-se de 20 mg de tecido fresco (folhas de plantas cultivadas “in vitro”) foi possível obter em torno de 1 a 1,5 µg de DNA, o bastante para realizar mais de 50 ampliações. Este método de extração de DNA pode ser considerado como simples em comparação com outros métodos mais sofisticados, como o utilizado por Machado et al. (1996). No trabalho de Machado et al. (1996), os autores extraíram DNA total de 39 acessos de tangerinas de folhas colhidas de árvores no campo para a estudo de polimorfismo e similaridade genética por meio de marcadores RAPD.

Segundo Moon <sup>5</sup>, as folhas de citros apresentam teores elevados de polissacarídeos e compostos fenólicos, substâncias que podem interferir na reação de amplificação; assim justificaria a utilização de um método de extração de DNA mais eficiente do que o usado no presente trabalho. Entretanto, a qualidade e a quantidade de DNA extraído por amostra foram consideradas como satisfatórias, não havendo problemas sérios de interferências nas reações de amplificação. A razão da utilização com sucesso deste método pode ser creditado à fonte de DNA utilizado, folhas jovens obtidas de plantas cultivadas “in vitro”. Testes preliminares em que se tentou extrair DNA de folhas obtidas das plantas matrizes no campo (limão ‘Cravo’/acesso 362 e tangerina ‘Cleópatra’/acesso 199) utilizando este mesmo método resultaram em DNA com altos teores de contaminantes.

Devido à simplicidade do método usado, em algumas amostras extraídas, verificou-se a presença de um “pellet” com coloração amarela esverdeada, o que seria um sinal de excesso de contaminantes. Seguindo recomendação de Ferreira & Grattapaglia (1995) alguns passos adicionais foram realizados, tais como: ressuspensão do “pellet” em solução de NaCl, centrifugação e nova precipitação com isopropanol, melhorando a qualidade do DNA.

---

<sup>5</sup> MOON, D. Comunicação pessoal, 1997.

#### 4.10.1.1 Reação de RAPD para citros

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no anexo 7. Para a análise de polimorfismos, 66 “primers” foram testados em reações de amplificação das duas espécies parentais. De um modo geral, o polimorfismo entre as duas espécies foi considerado como baixo, pois somente 16 “primers” apresentavam bandas fortes que pudessem ser utilizadas para diferenciar as espécies (Tabela 17). No restante dos “primers”, o padrão de amplificação das duas espécies foi semelhante ou a amplificação resultava num grande número de fragmentos de pequena intensidade.

Dentre os 16 “primers” que apresentaram polimorfismo entre as espécies, a maioria (11) produzia apenas um único fragmento que diferenciava uma das espécies. Para exemplificar, pode ser citado o “primer” OPAP20 (Figura 8) que apresentou um fragmento adicional para o limão ‘Cravo’, possibilitando a distinção de tangerina ‘Cleópatra’. Já os “primers” OPAP2 e OPAP5 apresentaram fragmentos adicionais para a tangerina ‘Cleópatra’ (Tabela 17).

Os “primers” OPAN6, OPAP14 e OPG20 apresentaram fragmentos adicionais para ambas as espécies, ou seja, um fragmento adicional que caracterizava o limão ‘Cravo’ e outro fragmento adicional que caracterizava a tangerina ‘Cleópatra’.

Dentre os três o “primer” OPG20 (Figura 8) possuía um padrão de bandas de interpretação mais fácil, pois amplificava somente um fragmento em cada uma das espécies, o fragmento de 900 pb para limão ‘Cravo’ e o fragmento de 1200 pb para tangerina ‘Cleópatra’. O “primer” OPAP14 (Figura 8) amplificava um fragmento (300 pb) bastante nítido e com migração que caracterizava a tangerina ‘Cleópatra’ e um fragmento de 1600 pb não tão nítido, que caracterizava o limão ‘Cravo’.

O “primer” OPAN6 (Figura 9) amplificava fragmentos intensos e de ótima nitidez (observado em várias repetições), dois fragmentos intensos de 850 e 550 pb para tangerina e um, menos intenso, de 900 pb para limão ‘Cravo’.

O método de discriminação das plantas híbridas putativas foi baseado na capacidade de regeneração dos protoplastos de suspensão celular e na provável ausência da capacidade de regeneração de protoplastos de mesofilo. Assim, nos experimentos em que o limão ‘Cravo’ foi utilizado como parental de folha, os protoplastos desta espécie provavelmente não teriam capacidade (ou teriam uma menor capacidade) de regenerar plantas. Então foi escolhido um

“primer” com banda adicional para esta espécie (OPAP20, por exemplo). A presença da banda adicional na amplificação de DNA extraído das plantas testadas constituía numa indicação de ser esta um provável híbrido somático. A mesma lógica foi utilizada para o outro tratamento, apenas modificando o “primer”.

Tabela 17. “Primers” de RAPD que apresentaram polimorfismo entre o padrão de bandas de DNA amplificado de limão ‘Cravo’ e de tangerina ‘Cleópatra’.

“Primer”	Fragmento adicional identificador do genoma de limão ‘Cravo’	Fragmento adicional identificador do genoma de tangerina ‘Cleópatra’
OPAN6	SIM	SIM
OPAP2	NÃO	SIM
OPAP3	SIM	SIM
OPAP5	NÃO	SIM
OPAP6	NÃO	SIM
OPAP7	SIM	NÃO
OPAP14	SIM	SIM
OPAP20	SIM	NÃO
OPAW7	SIM	NÃO
OPAW8	SIM	NÃO
OPAW9	NÃO	SIM
OPAW11	NÃO	SIM
OPAW15	SIM	NÃO
OPG12	SIM	SIM
OPG17	SIM	NÃO
OPG20	SIM	SIM

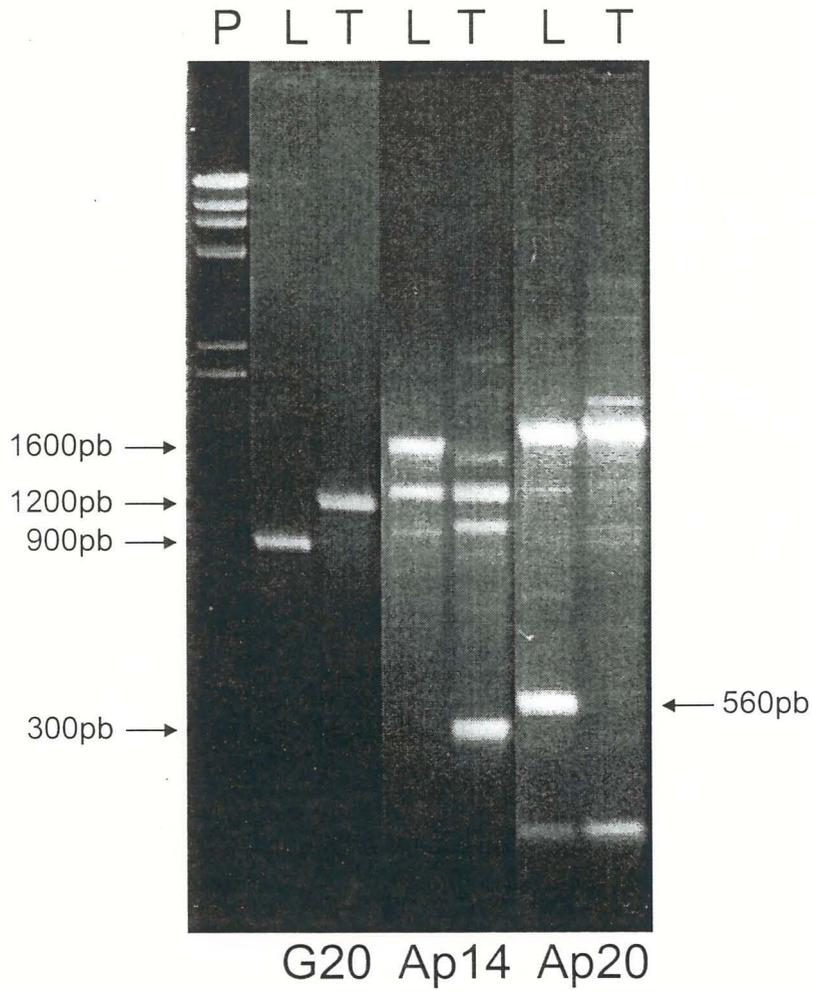


Figura 8. Gel de RAPD, teste dos “primers” OPG20, OPAP14 e OPAP20. (P) Padrão DNA de  $\lambda$  digerido com HindIII, (L) Padrão de amplificação de DNA de limão ‘Cravo’, (T) Padrão de amplificação de DNA de tangerina ‘Cleópatra’.

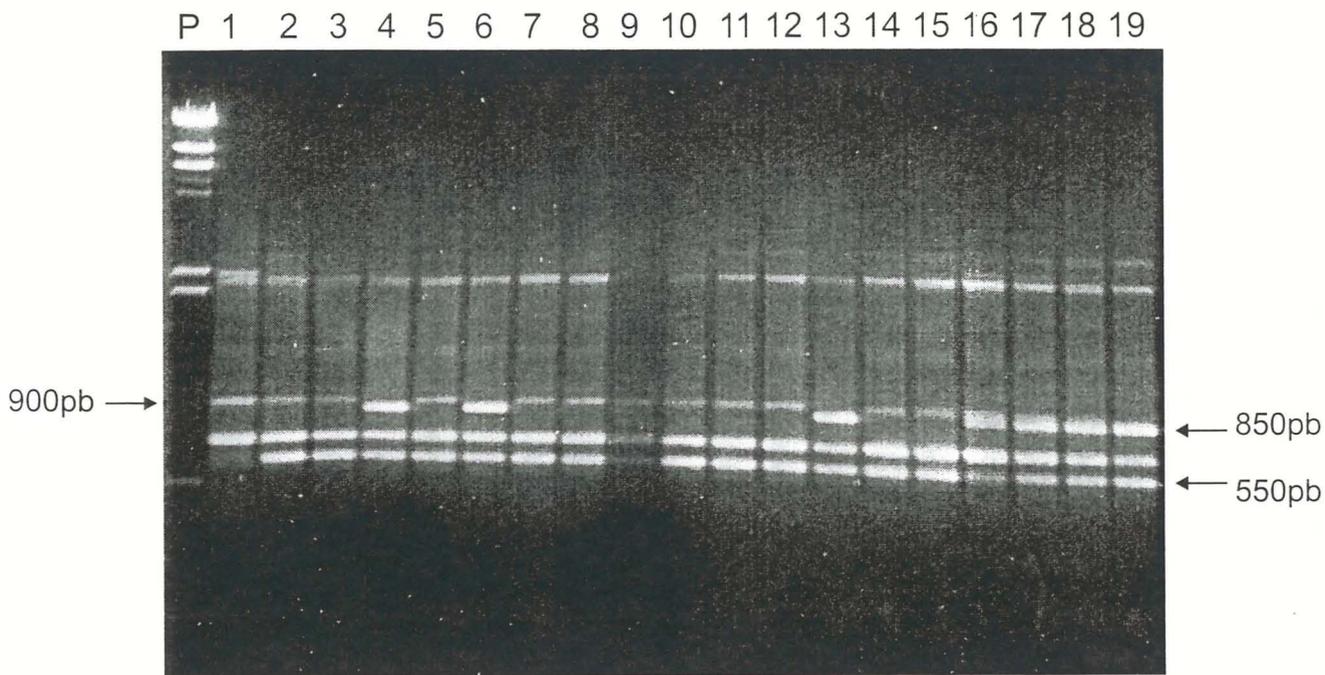


Figura 9. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAN6. Amostras: (P) Padrão, 1. limão ‘Cravo’; 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15. híbridos somáticos; 4, 6, 13. plantas regeneradas de protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’; 9, 18. padrão não distinguível; 16, 17, 18. Mistura física de DNA de limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ (1 + 19); 19. tangerina ‘Cleópatra’.

#### 4.10.1.2 Análise de plantas regeneradas, a partir de fusão de protoplastos de tangerina 'Cleópatra' (suspensão celular) e protoplastos de limão 'Cravo' (mesofilo)

Para plantas provenientes de experimentos de fusão de tangerina 'Cleópatra' (protoplastos de suspensão) x limão 'Cravo' (protoplastos de mesofilo) foi inicialmente escolhido o "primer" OPG20, devido à simplicidade de interpretação dos produtos da amplificação. A amplificação com este "primer" resultou na produção de somente um fragmento em cada uma das duas espécies, com diferentes migrações (900 pb para limão e 1200 pb para tangerina) (Figura 10). Esta característica possibilitaria não só a discriminação, mas também a confirmação de híbridos somáticos usando apenas uma amplificação: para tal, seriam considerados híbridos somáticos aqueles que possuísem ambos os fragmentos. Algumas plantas foram analisadas com este "primer" e apresentaram os dois fragmentos, sendo então consideradas como híbridas. Entretanto, em algumas amplificações a nitidez não foi satisfatória, ocasionando confusão na interpretação do géis. A partir de então, este "primer" deixou de ser usado para discriminação de híbridos somáticos.

Para as análises seguintes, passou-se a usar o "primer" OPAP20, por apresentar um fragmento adicional (560 pb) de limão 'Cravo' bastante nítido, com migração bem diferenciada e boa repetibilidade (Figuras 11 e 12). Das 505 plantas obtidas nos experimentos de fusão deste tratamento, 117 plantas "in vitro" e 21 plantas em aclimação foram analisadas com este "primer". Com estas análises foi possível discriminar como híbridos somáticos, nove plantas "in vitro" e duas em aclimação, por apresentarem o fragmento adicional de limão 'Cravo'. A presença deste fragmento excluía a possibilidade destas plantas terem se originado a partir da regeneração de protoplastos não fusionados de tangerina 'Cleópatra'. Entretanto, havia ainda a possibilidade de terem se originado a partir de protoplastos de mesofilo de limão 'Cravo'.

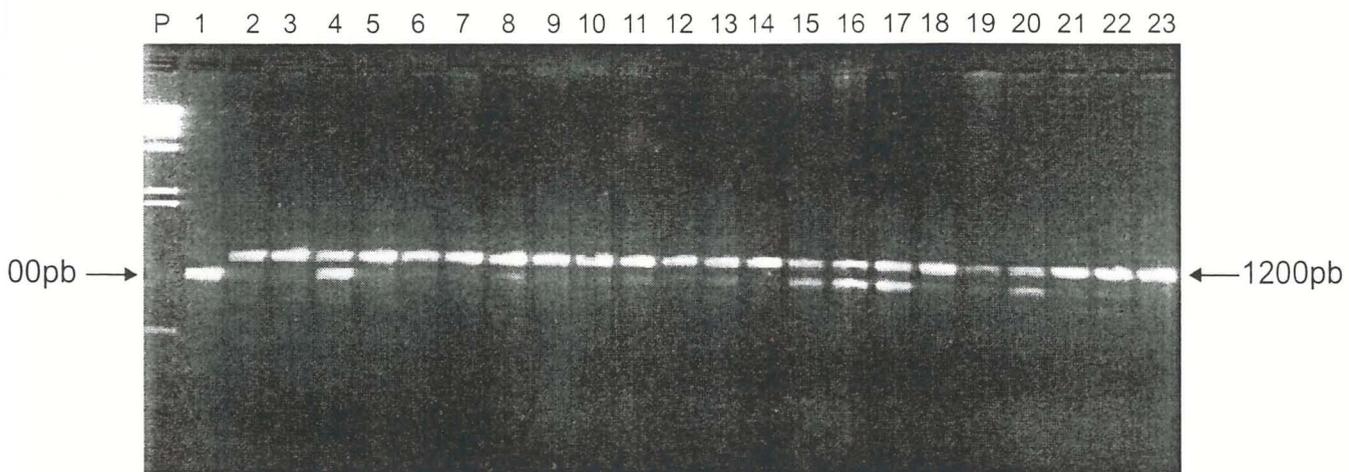


Figura 10. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPG20. Amostras: (P). Padrão; 1. limão ‘Cravo’; 4, 15, 16, 17, 20. híbridos somáticos; 2, 3, 5 a 14, 18, 19, 21, 22. padrão não distinguível; 23. tangerina ‘Cleópatra’.

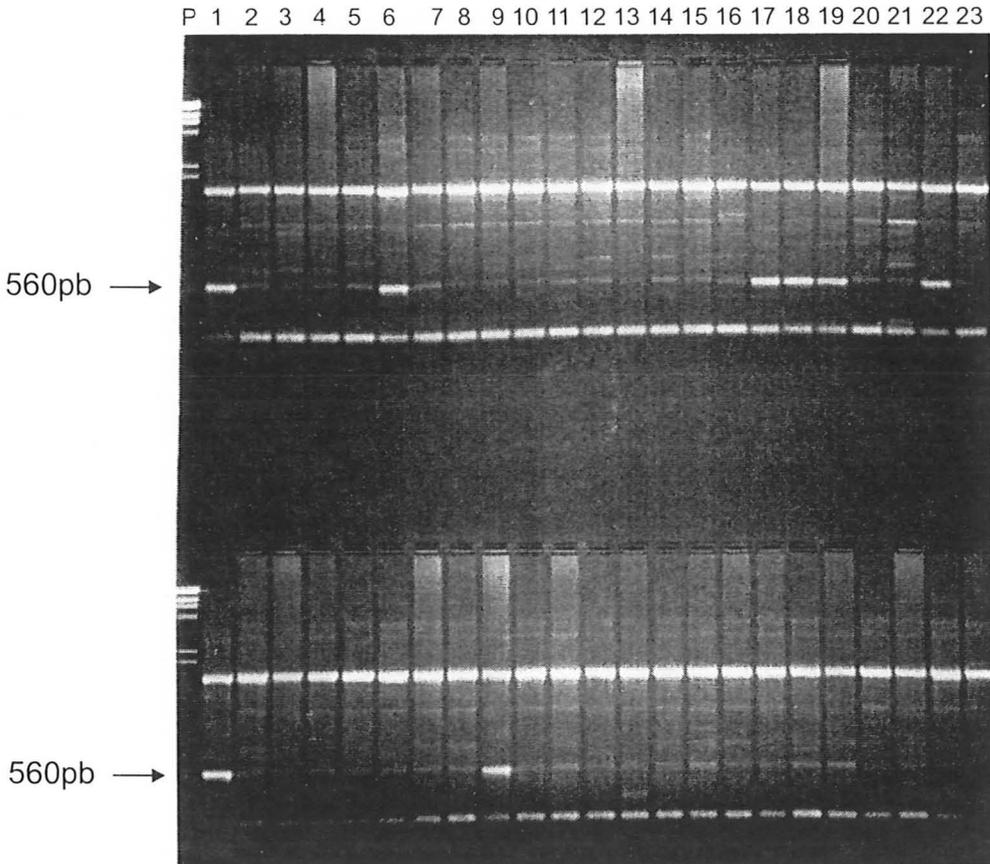


Figura 11. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAP20.

Experimentos de discriminação de plantas híbridas.

Acima- Amostras: (P). Padrão; 1. limão ‘Cravo’; 6, 17, 18, 19, 22. híbridos somáticos; 2 a 5, 7 a 16, 20, 21. plantas regeneradas de protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’; 23. tangerina ‘Cleópatra’.

Embaixo- Amostras: (P). Padrão; 1. limão ‘Cravo’; 9. Híbrido somático; 2 a 8, 10 a 22. plantas regeneradas de protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’; 23. tangerina ‘Cleópatra’.

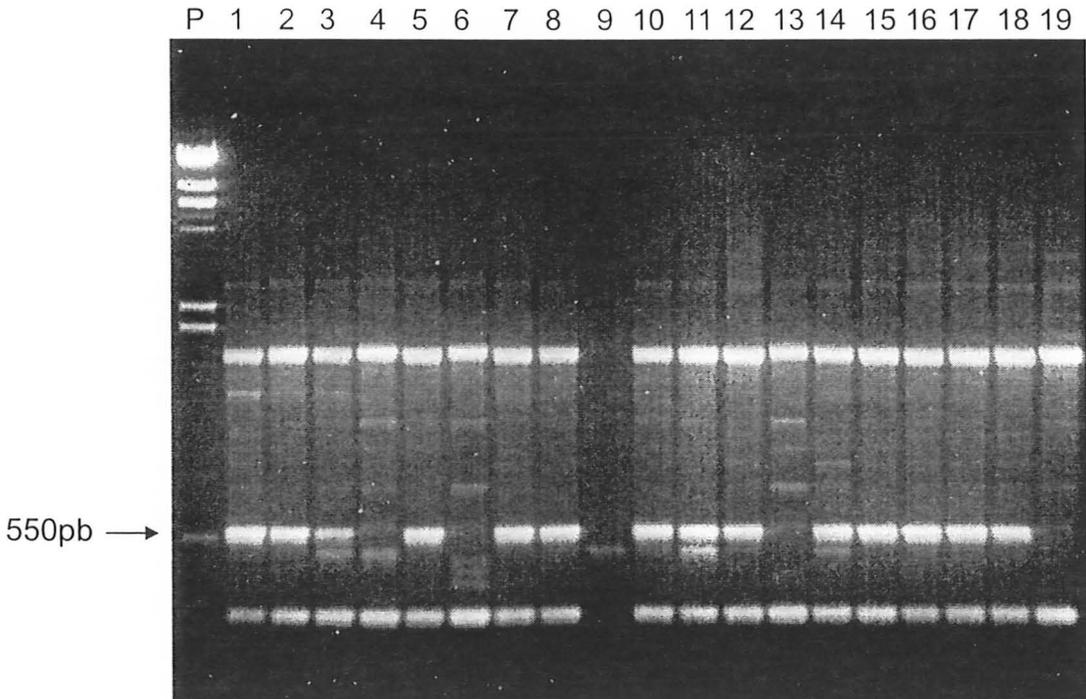


Figura 12. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAP20. Amostras: (P). Padrão; 1. limão ‘Cravo’; 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18. híbridos somáticos; 9. padrão não distinguível; 4, 6, 13. plantas regeneradas de protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’; 20. tangerina ‘Cleópatra’.

Vários autores relataram a obtenção de plantas semelhantes ao parental de folha em experimentos de fusão (Ohgawara et al., 1989; Saito et al., 1991, 1993; Tusa et al., 1990 e Louzada et al., 1992). Alguns autores acreditam que isto ocorreu devido à regeneração de protoplastos de folha em condições de co-cultivo com células embriogênicas, mas não relataram a comprovação da hipótese (Louzada et al., 1992). Outros autores provaram que estas plantas com características morfológicas semelhantes as do parental de folha, na verdade eram plantas híbridas. As plantas apresentavam características morfológicas e o genoma nuclear semelhantes aos do parental de folha, mas com genoma mitocondrial semelhante ao do parental de calos embriogênicos (Saito et al., 1993). A única possibilidade neste caso seria a ocorrência de eliminação cromossômica e de organelas (mitocôndrias), nas células híbridas, durante os diversos estádios da embriogênese e de desenvolvimento das plantas.

O objetivo a seguir passou a ser a confirmação dos híbridos somáticos por meio de marcadores moleculares RAPD. Para tal, outros "primers" foram escolhidos e novas amplificações foram realizadas. Os "primers" escolhidos foram: OPAN6, OPAP5, OPAP14 e OPW15.

O "primer" OPAP14 foi utilizado por apresentar um fragmento adicional bastante nítido (com aproximadamente 300 pb) característico de tangerina 'Cleópatra' (Figura 13). Todas as plantas híbridas testadas apresentaram este fragmento, demonstrando também a presença do genoma de tangerina 'Cleópatra'.

Reunindo os dados obtidos com os "primers" OPAP20, OPAP14 e OPAN6 observou-se que, as plantas em questão apresentaram os fragmentos adicionais das duas espécies, podendo-se então concluir que as plantas realmente eram híbridos somáticos.

Um padrão interessante foi obtido a partir da amplificação com o "primer" OPAN6. Este "primer" amplificou em tangerina 'Cleópatra' dois fragmentos adicionais característicos (com 850 e 550 pb) bastante intensos e um fragmento adicional em limão 'Cravo', não tão intenso (com 900 pb). Todas os híbridos somáticos possuíam um padrão aditivo de bandas, a exceção do fragmento de 850 pb que estava ausente. Então, comparando-se o padrão de bandas de tangerina 'Cleópatra' com o de híbridos somáticos, a presença do fragmento de 900 pb (e ausência de 850 pb) caracterizava híbridos somáticos; dando-se ao contrário para tangerina 'Cleópatra', que tinha presente o fragmento de 850 pb e ausente, o de 900 pb (Figuras 9 e 14).

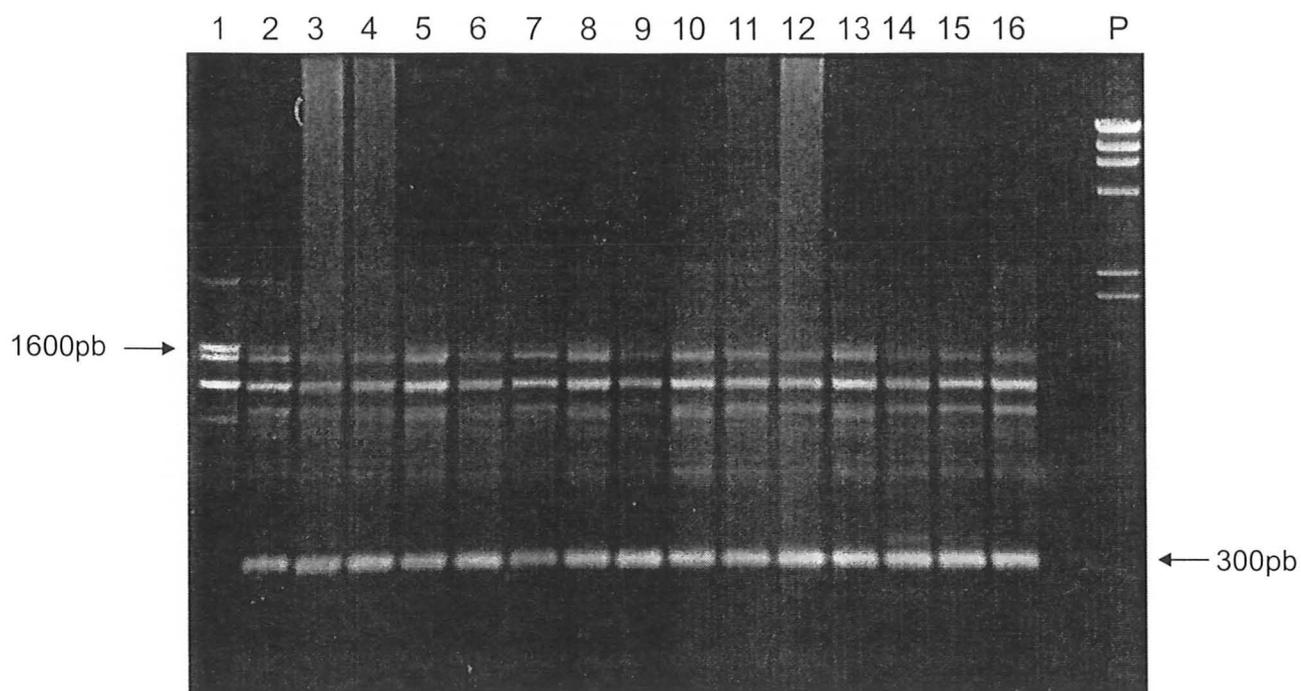


Figura 13. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAP14.  
Amostras: **1.** limão ‘Cravo’; **2-15.** híbridos somáticos; **16.** tangerina ‘Cleópatra’; (**P**).  
Padrão.

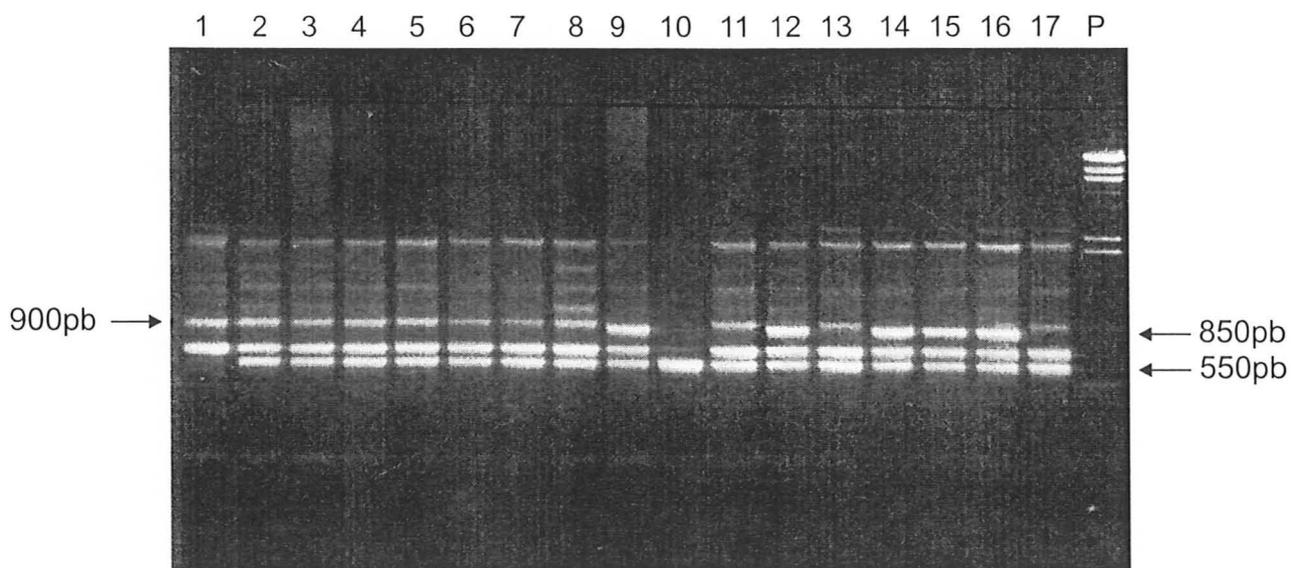


Figura 14. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAN6. Amostras: **1.** limão ‘Cravo’; **2 a 8, 11, 13, 17.** híbridos somáticos; **9, 12, 14, 15.** plantas regeneradas de protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’ **10.** padrão não distinguível; **16.** tangerina ‘Cleópatra’; **(P).** Padrão.

A ausência do fragmento de 850 pb no padrão das plantas híbridas amplificadas com o "primer" OPAN6 não deve ser caracterizada como perda de parte do genoma de tangerina 'Cleópatra' (devido à eliminação de cromossomos), pois o padrão foi observado em todos os híbridos somáticos.

Uma característica da reação RAPD relatada na literatura é a competição de DNA por sítios de amplificação RAPD, o fenômeno ocorre devido à existência de diferentes graus de homologia entre os genomas e o "primer" utilizado (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), a reação RAPD favorece a amplificação de segmentos quando a complementariedade entre o "primer" e o sítio de iniciação no DNA-molde for mais alta.

Nos trabalhos de Mourão Filho et al. (1996) e Grosser et al. (1996) os autores analisaram o padrão de RAPD de híbridos somáticos de citros em várias combinações de fusão e afirmam que as plantas híbridas, apresentaram bandas complementares às duas espécies parentais. Entretanto, pela visualização dos géis apresentados no trabalho de Grosser et al. (1996), em alguns casos, pode-se observar no padrão das plantas híbridas, o aparecimento de novas bandas (inexistentes no padrão das espécies parentais) e também a ausência de algumas bandas (existentes no padrão de pelo menos uma das espécies parentais). Isto pode ter ocorrido devido ao mesmo fenômeno, competição de DNA por sítios de amplificação RAPD.

Um experimento foi instalado para se verificar a existência deste tipo de competição entre DNAs das duas espécies por sítios de amplificação RAPD: para tal, utilizou-se o "primer" OPAN6. A partir de solução contendo DNA purificado (com aproximadamente  $10 \text{ ng. } \mu\text{l}^{-1}$ ) das duas espécies, foram preparadas amostras contendo diferentes misturas físicas dos dois DNAs, na seguinte proporção: 100 %:0 %, 90 %:10 %, 80 %:20 %, 70 %:30 %, ...; 0 %:100 % (tangerina:limão). O padrão de amplificação RAPD usando o "primer" OPAN6 e as diferentes misturas de DNA, pode ser visualizado na Figura 15.

Observando-se a Figura 15 verifica-se que a redução gradual da proporção do DNA de tangerina na mistura de DNAs causou uma redução, também gradual, na intensidade de amplificação dos fragmentos de 850 pb e de 550 pb, que são característicos da espécie e um aumento na intensidade do fragmento de 900 pb, que é característico de limão. Observando-se estes resultados conclui-se que a competição por sítios não produziu, em nenhuma amostra, um padrão de bandas semelhante aos observados nos híbridos somáticos, demonstrando não ser esta a responsável pela ausência de bandas no padrão dos híbridos.

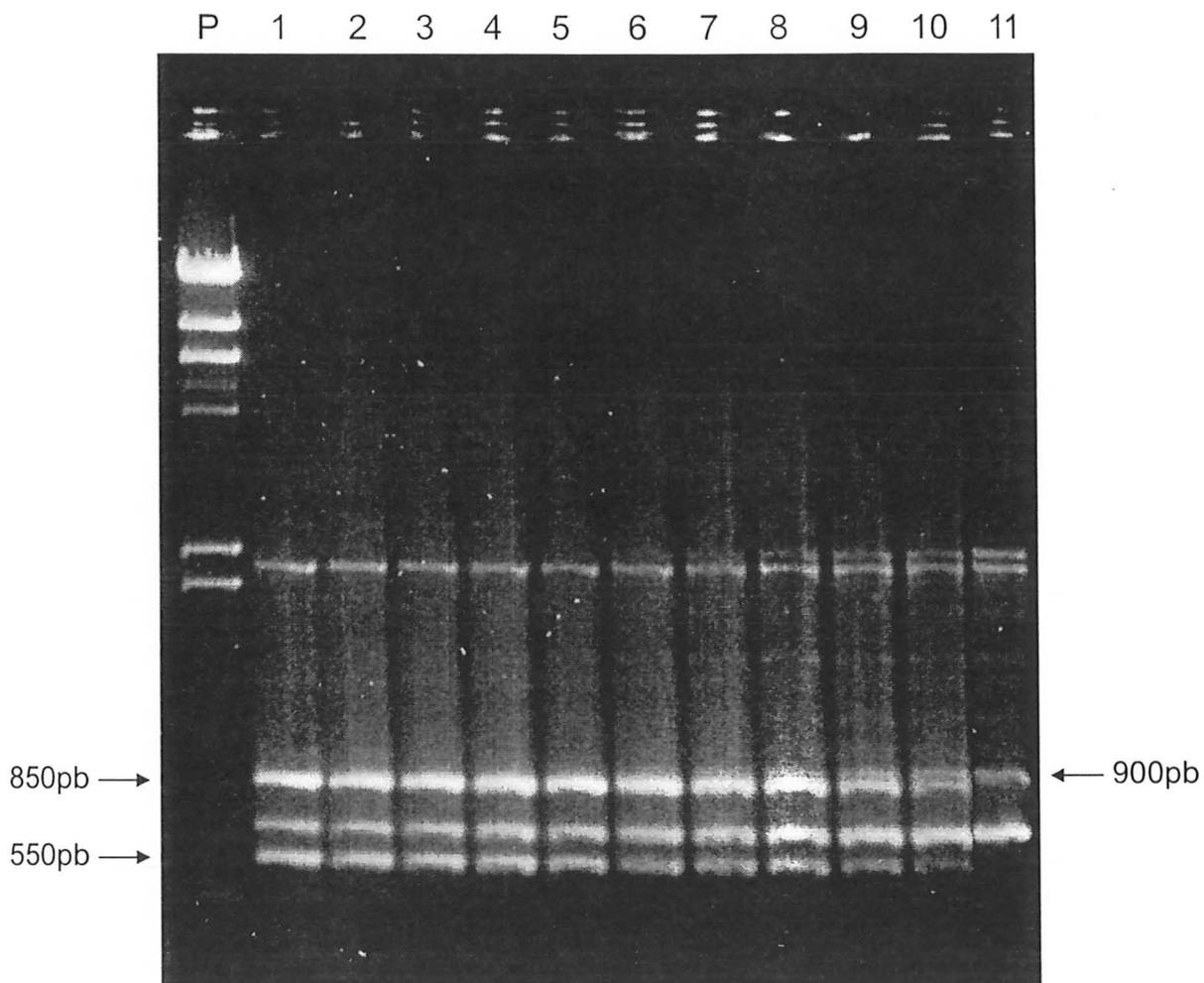


Figura 15. Gel de RAPD com as amostras de DNA amplificadas com o “primer” OPAN6. Amostras: (P). Padrão; 1. tangerina ‘Cleópatra’, 2. Mistura física de DNAs de tangerina e limão (proporção 9:1); 3. Mistura de DNAs (proporção 8:2); 4. Mistura de DNAs (proporção 7:3)... 10. . Mistura de DNAs (proporção 1:9); 11. Limão ‘Cravo’.

#### **4.10.1.3 Análise de plantas regeneradas, a partir de fusão de protoplastos de limão ‘Cravo’ (suspensão celular) e protoplastos de tangerina ‘Cleópatra’(folha)**

O “primer” OPAP14 foi selecionado para a discriminação de plantas provenientes de experimentos de fusão de limão ‘Cravo’ (protoplasto de suspensão) x tangerina ‘Cleópatra’ (protoplasto de mesofilo) por apresentar um fragmento adicional bem característico de tangerina ‘Cleópatra’ (com 300 pb) (Figura 13). A presença deste fragmento na amplificação excluía a possibilidade das plantas terem se originado da regeneração de protoplastos não fusionados de limão ‘Cravo’, mas haveria ainda a possibilidade de terem se originado a partir de protoplastos de mesofilo de tangerina ‘Cleópatra’.

Um total de 42 plantas “in vitro” obtidas com este tratamento foram analisadas, nenhuma planta apresentou o fragmento adicional de tangerina. Todas as plantas foram consideradas então como regeneradas de protoplastos de suspensão celular (limão ‘Cravo’).

Para confirmação deste resultado, as 42 amostras foram amplificadas com o “primer” OPAN6. Os resultados obtidos com este “primer” confirmaram os resultados anteriores pois todas as amostras apresentaram padrão de limão ‘Cravo’.

#### **4.10.2 Análises com marcadores isoenzimáticos**

##### **4.10.2.1 Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de amido**

Os resultados obtidos com a comparação entre soluções extratoras (água deionizada e “Nankoong”) demonstraram que, nos seis sistemas isoenzimáticos testados (PRX - Peroxidase; GOT - Glutamato oxaloacético transaminase; LAP - Leucina aminopeptidase; MDH - Malato desidrogenase e PGI - Fosfoglucose isomerase), a solução extratora “Nankoong” apresentou uma melhor resposta em cinco sistemas, devido a apresentação de bandas mais fortes e nítidas. Apenas no sistema LAP a resolução de amostras extraídas com água destilada foi igual ao da extração com “Nankoong”. Em nenhuma das amostras se observou a existência de rastros, demonstrando que não houve degradação enzimática. Por isto resolveu-se optar pelo uso da solução extratora “Nankoong”.

No trabalho de Ballve et al. (1991) sobre isoenzimas em diversas espécies de *Citrus*, os autores testaram várias soluções extratoras, algumas com acréscimo de diversos tipos de antioxidantes e uma outra, composta por Tris pH 7,5 (substância tamponante de pH). A conclusão obtida foi de que a melhor solução extratora seria a água destilada. Entretanto, os autores verificaram que diversos sistemas apresentaram bandas com resolução difusa e outros, com bandas nítidas, mas atividade enzimática instável.

A solução extratora “Nankoong” possui uma composição bem complexa, com a presença de vários tipos de antioxidantes (Ácido ascórbico, DTT, Bissulfito de sódio, 2 Mercaptoetanol), agentes quelantes (Bórax, EDTA, DIECA), tampão de pH (Fosfato de sódio bibásico), precipitadores de taninos e adsorventes de fenóis (PEG, PVP-40). Segundo Alfenas et al. (1991) um dos maiores problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença de compostos fenólicos liberados durante a trituração que, em solução, são oxidados à quinonas. Tanto os compostos fenólicos quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas. Os mesmos autores citam que o método de extração deve ser desenvolvido de modo a separar especificamente fenóis das proteínas e ao mesmo tempo evitar a oxidação dos compostos fenólicos.

Alfenas et al. (1991) comentam que a melhor solução extratora para plantas deve ser testada experimentalmente em função da espécie e do tipo de tecido.

A comparação entre amostras extraídas de folhas obtidas de plantas cultivadas “in vitro” e de folhas de plantas adultas no campo demonstrou que, para alguns sistemas, as folhas de plantas “in vitro” apresentavam bandas fracas, demonstrando uma pequena atividade enzimática. Resultado semelhante foi obtido por Carvalho<sup>6</sup> em trabalho com bananeira, onde se observou que amostras de isoenzimas extraídas de plantas “in vitro” possuíam uma menor atividade enzimática em comparação às amostras de plantas de campo.

Uma dificuldade adicional da análise isoenzimática em plantas “in vitro” é que, em alguns casos, as plantas não tinham 50 mg de folhas para serem usadas na extração; nestes casos optou-se pela redução na quantidade de folhas (redução para 25 ou 30 mg), mas mantendo-se a proporção de 1:4 (tecido:solução extratora).

---

<sup>6</sup> CARVALHO, M.T.V. Comunicação pessoal, 1998.

Segundo Mourão Filho <sup>7</sup>, as análises de marcadores isoenzimáticos para discriminação de híbridos somáticos em citros normalmente são realizadas após a fase de aclimatação das plantas ao meio ambiente e após as plantas apresentarem desenvolvimento pleno. Realmente, nenhum dos trabalhos revisados cita a utilização de plantas cultivadas “in vitro” para análise de isoenzimas. No presente trabalho os problemas apresentados na análise de isoenzimas em plantas na fase de cultivo “in vitro” puderam ser plenamente compensados com a redução do tempo para discriminação dos híbridos. Um período de 4 meses seria gasto para se obter plantas completamente aclimatadas as condições do ambiente e em desenvolvimento pleno.

Os resultados obtidos com a aplicação de amostras das duas espécies (limão ‘Cravo’ e tangerina ‘Cleópatra’ em géis de penetrose a 13 % e coloração em 14 sistemas isoenzimáticos estão listados na Tabela 18.

Baseado nos resultados listados na Tabela 18, resolveu-se escolher os sistemas isoenzimáticos para discriminar e/ou confirmar a natureza híbrida de híbridos somáticos putativos entre as duas espécies. Foram seleccionados os sistemas GOT e PGI (em TCB), IDH (em CM) e PRX (em CM /gel de 12 %) pois apresentavam bandas nítidas, com boa repetibilidade e polimorfismo para as duas espécies.

---

<sup>7</sup> MOURÃO FILHO, F.A.A. Comunicação pessoal, 1997.

Tabela 18. Teste de sistemas isoenzimáticos em diferentes soluções tampão de gel e de cuba, usando amostras de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'.

Sistema Isoenzimático	Tampão TC pH 7,5	Tampão CM pH 6,1	Tampão TCB pH 8,3	Observações
PRX anódica	+	++	-	monomérica, 1 loco
GOT	N	-	++	dimérica, 2 locos
SKDH	+	-	-	monomérica
MDH	N	+	±	dimérica, 2 locos
SDH	-	N	N	não coloriu
ADH	-	N	-	não coloriu
6-PGDH	±	+	N	complexa
IDH	N	++	-	dimérica, 1 loco
PGM	-	-	-	pouca expressão
PGI	±	±	++	dimérica, 2 locos
ACP	-	N	±	complexa, 3 locos
ALP	-	N	-	complexa
EST	N	N	±	complexa
LAP	-	-	±	complexa

++ sistema com bandas nítidas, apresentam repetibilidade, existe polimorfismo para as duas espécies.

+ sistema com bandas nítidas, mas que não discriminam as duas espécies (motivos: espécies com mesmo padrão ou padrão complexo, caso da 6-PGDH).

± sistemas com bandas difusas ou de análise complexa, com repetibilidade. Não se consegue analisar corretamente, mas pode ser melhorado.

- sistemas com bandas difusas, sem repetibilidade, sem coloração ou não se distingue as bandas, etc...

N combinação sistema - tampão não testado.

#### 4.10.2.2 Análises de isoenzimas em géis de amido

Os trabalhos de hibridação somática entre diversas espécies do género *Citrus* e com espécies de géneros afins geralmente se utilizam de análises de isoenzimas em géis de amido. Os sistemas mais utilizados foram: PRX, PGI, PGM, PHI (Fosfohexose isomerase), e em menor escala, o MDH e a GOT. Numa observação mais detalhada se observa que estes sistemas isoenzimáticos apresentam uma análise fácil. Normalmente são monoméricos (PRX e PGM) ou diméricos (PGI, PHI, MDH e GOT) e com, no máximo, dois locos (com dois alelos ou três alelos) (Grosser et al. 1990, 1992, 1996; Grosser & Gmitter Junior, 1990b; Deng et al., 1992; Louzada et al., 1992; Ling & Iwamasa, 1994; Mourão Filho et al., 1996).

Os resultados obtidos na presente pesquisa serão descritos de acordo com o sistema isoenzimático utilizado:

**-PRX (Peroxidase)** O sistema da peroxidase apresenta atividade anódica e catódica. Segundo Ballve et al. (1991), a PRX de atividade catódica em citros apresenta um zimograma complexo e inconstância de padrões, não sendo utilizada para identificação de plantas híbridas e clones nucelares. A PRX catódica realmente apresentou no presente trabalho um padrão inconstante de bandas, não complexo e com boa resolução.

Para Ballve et al. (1991), a PRX anódica apresenta padrão mais simples (enzima monomérica e três alelos), com boa repetibilidade e por isto pode ser utilizada para identificar plantas híbridas e clones nucelares.

De acordo com Ballve et al. (1991; 1997), para PRX anódica o limão 'Cravo' seria homozigoto MM e a tangerina 'Cleópatra', homozigoto FF. O alelo F teria mobilidade relativa (Rf) igual a 0,58 e o alelo M teria o Rf de 0,52. O padrão esperado para os híbridos somáticos tetraplóides seria MMFF.

No presente trabalho testou-se inicialmente a peroxidase em gel de penetrose (13 %) em tampão CM - pH 6,1, com amostras das espécies parentais. Após 12 horas de eletroforese (com 18 mA de corrente constante) as espécies apresentavam um padrão com bandas muito próximas, quase indistinguíveis. Um ajuste foi tentado diminuindo a concentração do penetrose (amido) para 12 % e com eletroforese de 20 horas. Os resultados obtidos se assemelharam ao descrito por

Ballve et al. (1991), o limão 'Cravo' apresentou-se como homozigoto (MM) com Rf igual a 0,50 e a tangerina 'Cleópatra', homozigota (FF) com Rf igual a 0,59 (Figuras 16 e 17).

Uma vez definida a metodologia, amostras de folhas das 11 plantas caracterizadas como híbridos somáticos foram extraídas, a seguir foram aplicadas em gel CM a 12 %. Uma fatia do gel sofreu revelação (coloração) para o sistema da peroxidase. Todas as plantas híbridas apresentaram o padrão tetraplóide FFMM (Figura 17).

Louzada et al. (1992), trabalhando com fusão entre limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', utilizaram as isoenzimas PRX, PGM e PGI para discriminar híbridos somáticos. Para PRX, os autores consideraram o limão com padrão SS, ao invés de MM, e o padrão de tangerina, FF. Os híbridos obtidos neste trabalho apresentavam em PRX, o padrão complementar FFSS.

Ballve et al. (1997) utilizaram o sistema da PRX anódica e a PGI em géis de amido, para confirmar a natureza híbrida de plantas obtidas a partir de cruzamentos sexuais controlados entre quatro espécies de *Citrus*, uma delas era o limão 'Cravo'.

O sistema enzimático da peroxidase anódica usado neste trabalho demonstrou a capacidade de discriminar facilmente híbridos somáticos entre limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra', e com a vantagem de poder ser utilizado em plantas provenientes dos dois tratamentos de fusão.

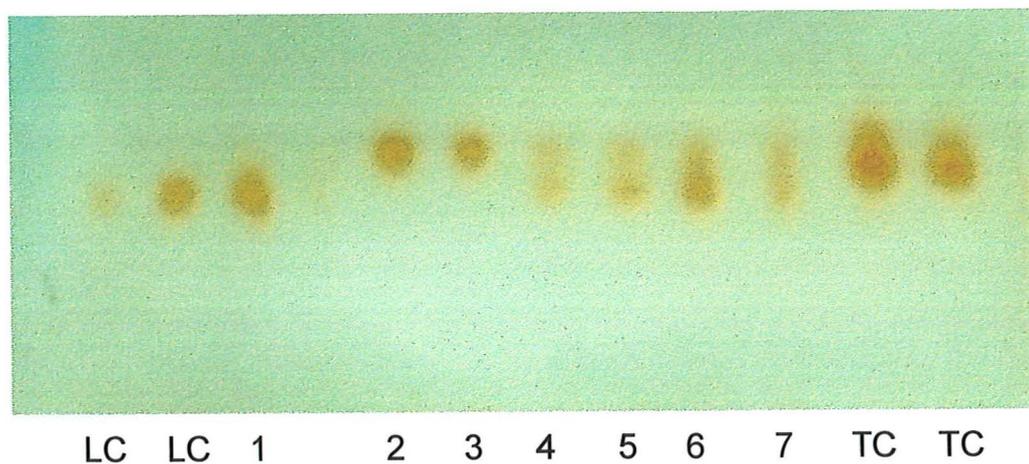


Figura 16. Gel de Penetrose (amido de milho) a 12%, tampão CM (pH 6,1), coloração para o sistema de Peroxidase anódica (PRXa). Amostras citadas na Figura 17 (abaixo).

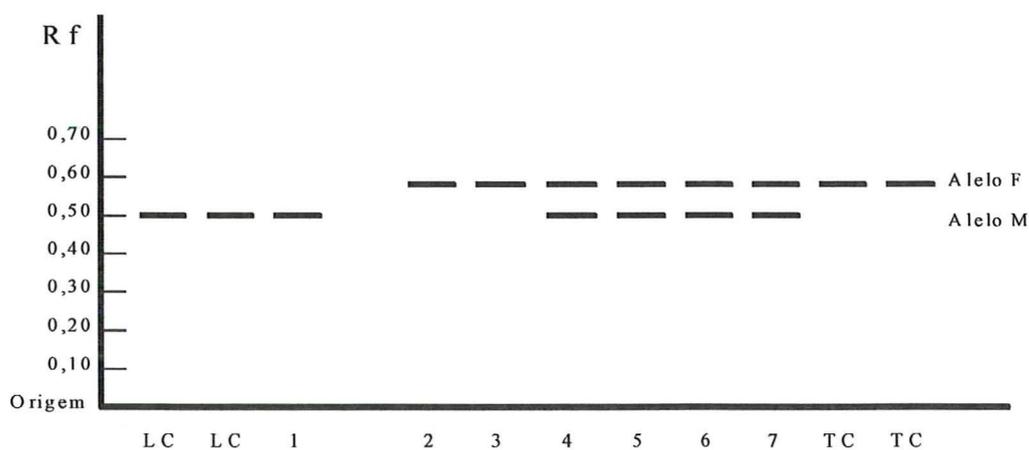


Figura 17. Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema da PRX anódica, na Figura 16 (Acima). Amostras: **LC**. limão 'Cravo'; **1**. Planta regenerada de protoplastos de limão 'Cravo'; **2,3**. Plantas regeneradas de protoplastos de tangerina 'Cleópatra'; **4,5,6,7**. Híbridos somáticos; **TC**. tangerina 'Cleópatra'.

- **IDH (Isocitrato desidrogenase)** A IDH foi descrita no trabalho com gel de poliacrilamida de Sawazaki et al. (1992) como sendo dimérica (com quatro alelos) e formada por um loco. A tangerina foi classificada como homozigota (II) e o limão, como heterozigoto (IS).

Os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando amostras de espécies parentais, comprovam os relatos de Sawazaki et al. (1992). O padrão de bandas no sistema IDH possui uma boa nitidez e também uma boa repetibilidade. O limão 'Cravo' apresentou-se como heterozigoto IS e a tangerina, como homozigoto II. O alelo I possuía Rf igual a 0,28 e o alelo S, Rf igual a 0,10 (Figura 18).

A eletroforese em gel de amido do extrato de folhas de híbridos somáticos de limão e tangerina e coloração no sistema IDH, demonstrou que o padrão dos híbridos para esta isoenzima era complementar, com a presença do padrão (IIIS), onde o alelo S era quase imperceptível (Figura 19).

Analisando o padrão da IDH para as duas espécies em questão e relacionando com a pequena probabilidade de regeneração de protoplastos de mesofilo conclui-se que, a utilização deste sistema somente serviria para discriminar híbridos putativos no tratamento em que o limão fosse usado como parental de folha. Neste caso, a presença de amostras com padrão heterozigoto (IIIS) denunciaria a presença de uma possível planta híbrida, mas que teria de ser confirmada por outros sistemas isoenzimáticos (PRX, por exemplo) ou por outros métodos.

-**GOT (Glutamato oxaloacético transaminase)** O sistema da GOT foi descrito por Ballve et al. (1991) apresentando dois locos enzimáticos: got-1 (próximo da origem) e got-2 (na porção mediana do gel). Segundo os autores a got-1 é dimérica, apresenta excelente resolução e alelos com migração bastante distinta. O limão seria heterozigoto, com padrão FS e a tangerina, homozigota com padrão SS.

Os resultados obtidos neste experimento com as plantas parentais comprovaram o relato de Ballve et al. (1991), a got-1 apresentou estrutura dimérica, mas com bandas com pequena intensidade, em que se observa o padrão do limão 'Cravo' como heterozigoto FS e a tangerina, homozigota SS (alelo F com Rf 0,35 e alelo S com Rf 0,51) (Figuras 20 e 21).

Pela observação da eletroforese de gel de amido contendo amostras das plantas híbridas e coloração no sistema got-1, não foi possível verificar o padrão das plantas híbridas devido a baixa intensidade das bandas (Figura 20).

A got-2 apresenta uma segregação complicada segundo Ballve et al. (1991), com a presença de um loco duplicado e formação de heteodímeros intralocos. No presente trabalho a got-2 apresentou bandas mais nítidas do que a got-1, mas com dificuldade de interpretação (Figura 20).

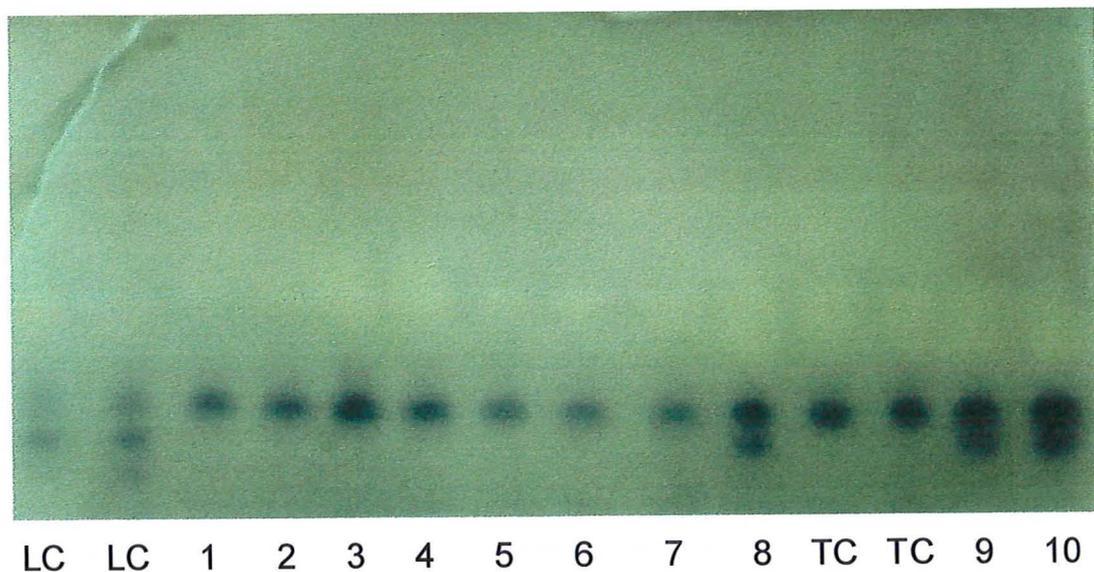


Figura 18. Gel de Penetrose (amido de milho) a 13%, tampão CM (pH 6,1), coloração para o sistema da Isocitrato desidrogenase (IDH). Amostras citadas na Figura 19 (abaixo).

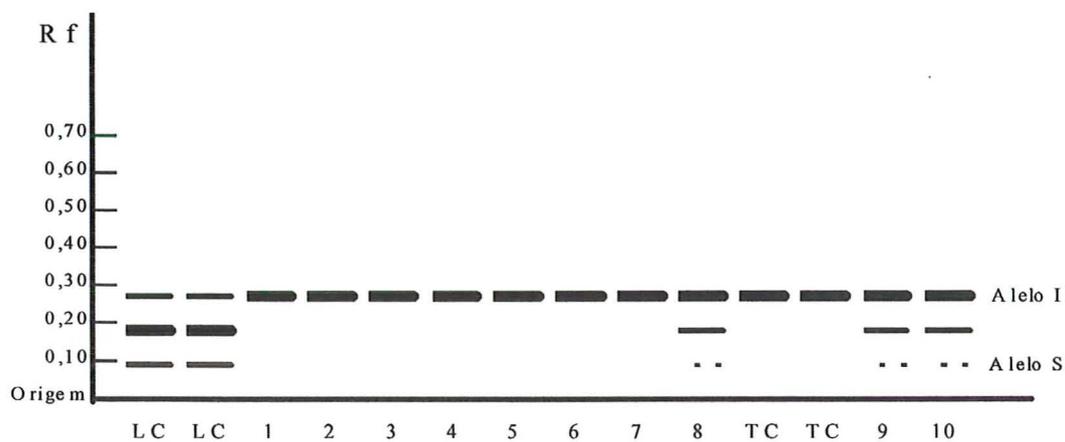


Figura 19. Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema Isocitrato desidrogenase (IDH), na figura 18 (Acima). Amostras: **LC**. limão 'Cravo'; **1 a 7**. Plantas regeneradas de protoplastos de tangerina 'Cleópatra'; **8,9,10**. Híbridos somáticos; **TC**. tangerina 'Cleópatra'.

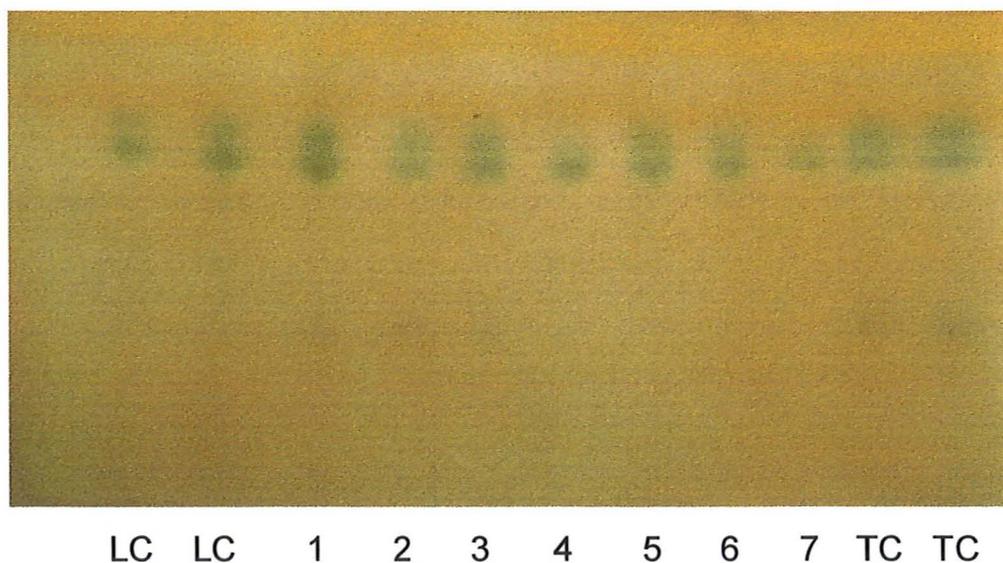


Figura 20. Gel de Penetrose (amido de milho) a 13%, tampão TCB (pH 8,3), coloração para o sistema da Glutamato oxaloacético transaminase) (GOT). Acima - got-2. Embaixo - got-1. Amostras citadas na Figura 21 (abaixo).

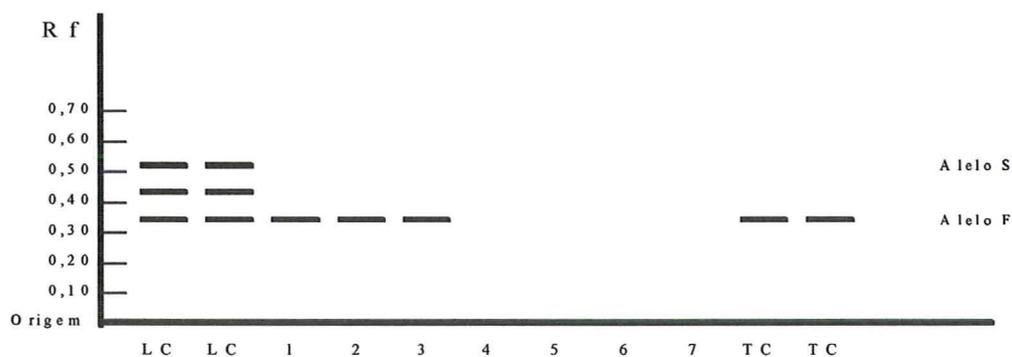


Figura 21. Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema Glutamato oxaloacético transaminase (got-1), na Figura 20. Amostras: **LC**. limão 'Cravo'; **1,2,3**. Plantas regeneradas de protoplastos de tangerina 'Cleópatra' **4,5,6,7**. Amostras sem coloração; **TC**. tangerina 'Cleópatra'.

- **PGI (Fosfoglucose isomerase)** O sistema PGI foi relatado por Louzada et al. (1992) e por Ballve et al. (1991) como sendo dimérico. Ballve et al. (1991) descrevem a existência de 2 locos, mais rápido chamado de *pgi-2* e um mais lento, chamado de *pgi-1*. Segundo os mesmos autores, o loco da *pgi-2* apresenta polimorfismo, mas com resolução insatisfatória.

O resultado obtido neste trabalho com o sistema *pgi-2* mostrou a existência de bandas com boa resolução, mas sem mostrar polimorfismo entre as duas espécies. Ambas apresentaram uma única banda, com Rf igual a 0,9.

Com relação ao *pgi-1*, Ballve et al. (1991) e Louzada et al. (1992) descrevem o limão como heterozigoto (FS ou MS, de acordo com os dois trabalhos, respectivamente) e a tangerina como sendo homozigota (FF ou MM). Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam este fato, o limão se mostra como heterozigoto FS e a tangerina, como homozigota FF; tendo o alelo F, Rf igual a 0,72 e o alelo S, Rf igual a 0,66 (Figura 22).

O locos do *pgi-1* segue o mesmo caso da IDH em relação a capacidade de discriminar híbridos somáticos, pois nos dois sistemas (*pgi-1* e IDH), o limão 'Cravo' apresentou o padrão heterozigoto e a tangerina 'Cleópatra', padrão homozigoto.

O padrão de bandas da isoenzima PGI nos híbridos somáticos de limão e tangerina demonstrou ser complementar ao das espécies parentais. A *pgi-2* apresentou uma banda única tal como as espécies parentais. Na *pgi-1*, as plantas híbridas apresentavam padrão complementar das duas espécies (FFFS), mas com o alelo S quase imperceptível (Figura 23).

Louzada et al. (1992) também observaram que os híbridos somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' apresentavam o padrão (MMMS) no sistema *pgi-1*, padrão este complementar ao das espécies parentais.

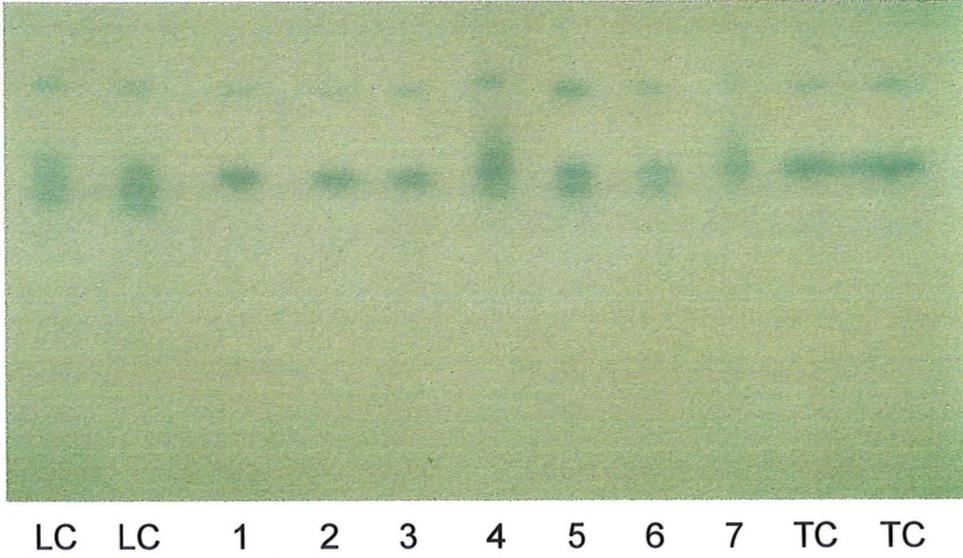


Figura 22. Gel de Penetrose (amido de milho) a 13%, tampão TCB (pH 8,3), coloração para o sistema da Fosfoglucoase isomerase (PGI). Acima - pgi-2. Embaixo - pgi-1. Amostras citadas na Figura 23 (abaixo).

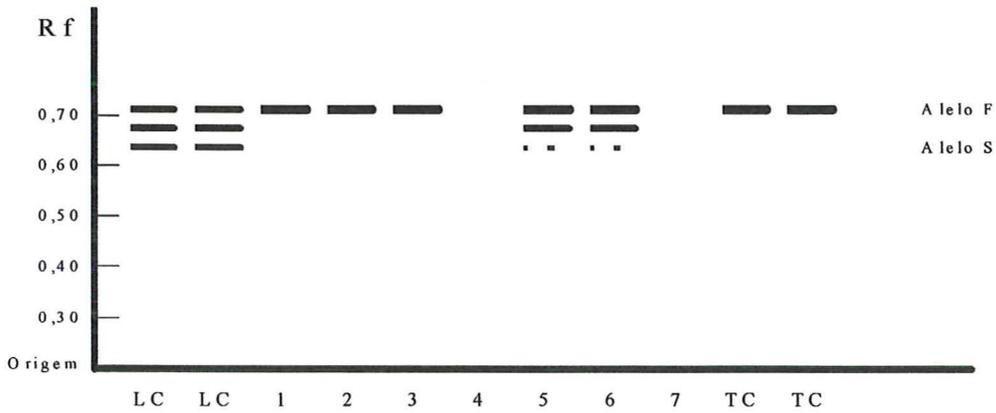


Figura 23. Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o sistema Fosfoglucoase isomerase (PGI-1), na Figura 22. Amostras: **LC**. limão 'Cravo'; **1,2,3**. Plantas regeneradas de protoplastos de tangerina 'Cleópatra'; **5,6**. Híbridos somáticos; **4,7**. Amostras degradadas; **TC**. tangerina 'Cleópatra'.

#### 4.10.2.3 Otimização do protocolo de isoenzimas em géis de poliacrilamida

A fase inicial do experimento constou da avaliação de três soluções extratoras citadas em trabalhos com poliacrilamida em citros. As três soluções extratoras testadas foram: “Nankoong” (descrita por Alfenas et al., 1991); água deionizada acrescido de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e solução extratora descrita por Sawazaki et al. (1992) (Tris-HCl 0,02 M pH 7,4, acrescido de 12 % de PVP (Polivinilpirrolidona) e 0,5 % de Mercaptoetanol). Para estes experimentos confeccionou-se um gel de poliacrilamida a 7 % (sistema Davis) em eletroforese vertical e coloração com peroxidase.

Os resultados indicaram não haver diferenças significativas de nitidez entre as amostras extraídas com as três soluções extratoras. De acordo com os resultados resolveu-se optar pela solução extratora composta por água deionizada acrescido de PVPP, por ser mais simples e barata.

A escolha da melhor solução extratora para géis de poliacrilamida seguiu a mesma lógica da escolha para géis de amido, por meio de testes experimentais. Um ajuste a mais teve de ser realizado no trabalho com poliacrilamida, a determinação da quantidade de amostra a ser aplicada no gel. Nos testes preliminares observou-se que, a aplicação de amostras em excesso dificultava ou até impedia a análise do padrão de bandas. Para as condições deste trabalho utilizou-se 15 a 20  $\mu$ l de amostra para coloração com PRX.

A utilização de eletroforese de isoenzimas em géis de poliacrilamida teve como objetivo a análise mais detalhada do padrão de bandas das plantas híbridas e das espécies parentais. Segundo Alfenas et al. (1991), os géis de poliacrilamida permitem um maior poder de resolução e uma ampla variação no diâmetro dos poros em comparação com os géis de amido. As vantagens dos géis de amido seriam: o menor custo e a possibilidade de análise de vários sistemas no mesmo gel, devido a possibilidade de cortes do gel em fatias.

#### 4.10.2.4 Análises de isoenzimas em géis de poliacrilamida

Os resultados experimentais com a PRX em gel de poliacrilamida comprovam que a peroxidase anódica apresenta-se como uma enzima monomérica, com um loco e três alelos (F com Rf 0,58; M com Rf 0,52 e S com Rf 0,49), semelhante ao resultado descrito por Ballve et al.

(1991). No presente trabalho, os resultados obtidos com géis de amido (penetrose) a 12 % e descrito no sub-ítem 4.10.2.2, demonstraram que o limão 'Cravo' apresentava-se como homozigoto (MM) (Rf 0,50) e a tangerina 'Cleópatra', como homozigota (FF) (Rf 0,59).

Inicialmente testou-se o gel de poliacrilamida a 7 % (sistema Davis) com eletroforese de 6 horas, o resultado obtido foi a presença de padrão de bandas nítidas, mas muito próximas (alelo M com Rf 0,45 e alelo F Rf 0,49). Com o intuito de distanciar mais as bandas foi confeccionado um gel de poliacrilamida a 5% e com eletroforese de 12 horas. Este gel possibilitou distanciar mais as bandas mas com influência na resolução das bandas, que piorou sensivelmente.

Uma terceira tentativa foi a de se confeccionar um gel de poliacrilamida em gradiente de 4 a 10% e eletroforese por 18 horas (voltagem constante de 200 V). O resultado obtido foi a apresentação de bandas mais distanciadas e com boa resolução. Os resultados obtidos em gel de poliacrilamida corroboram os resultados apresentados em gel de amido, modificando apenas os valores da mobilidade relativa (Rf). O limão 'Cravo' apresentava-se como homozigoto (MM) (Rf igual a 0,61) e a tangerina 'Cleópatra', como homozigota (FF) (Rf igual a 0,65). Os híbridos somáticos apresentaram o padrão complementar (FFMM) das duas espécies (Figuras 24 e 25).

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida, usando o sistema isoenzimático da peroxidase, também foi capaz de discriminar as plantas híbridas entre as duas espécies, mas não deve ser recomendado para análise de um grande número de amostras, devido a sua maior dificuldade de uso e devido ao maior custo das análises.

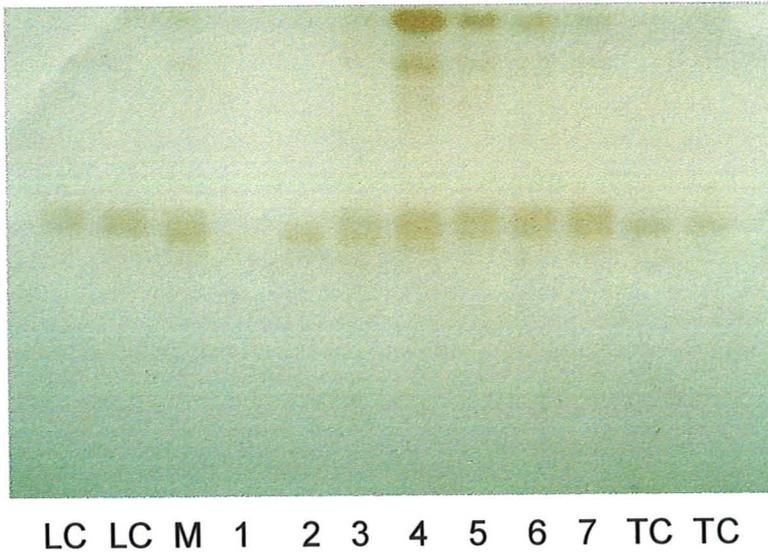


Figura 24. Gel de Poliacrilamida (sistema Davis) em gradiente de 4 a 10%. coloração para o sistema de Peroxidase (PRX). Origem em cima. Amostras citadas na Figura 25 (abaixo).

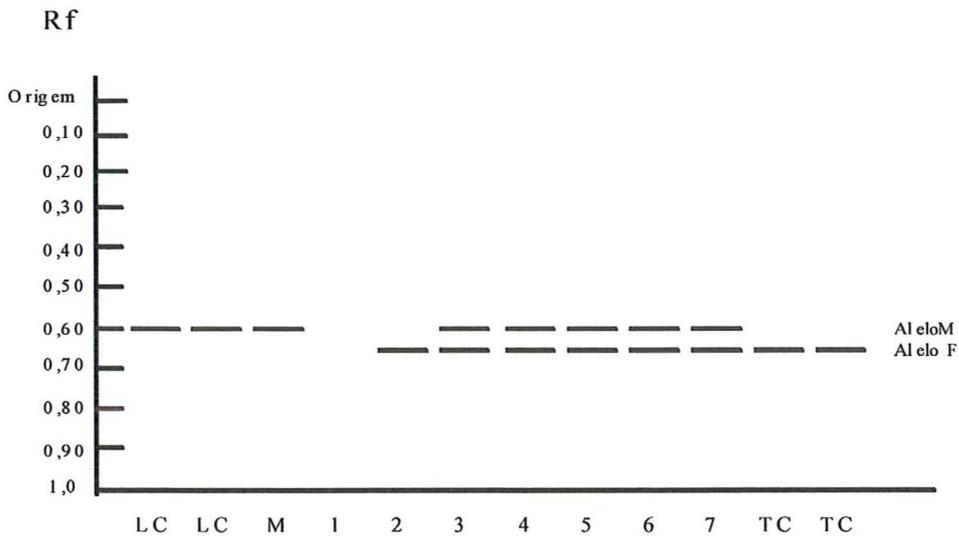


Figura 25. Padrões isoenzimáticos, intensidade relativa e Rfs observados para o gel de poliacrilamida, sistema de PRX anódica, na Figura 24 (Acima). Amostras: **LC**. limão 'Cravo'; **M**. Mistura física de amostras de limão e tangerina; **2**. Planta regenerada de protoplastos de tangerina 'Cleópatra'; **3, 4, 5, 6, 7**. Híbridos somáticos; **TC**. tangerina Cleópatra'.

#### 4.11 Considerações finais

Os cinco experimentos de fusão do tratamento 1 (fusão de protoplastos de suspensão celular de tangerina ‘Cleópatra’ com protoplastos de mesofilo de limão ‘Cravo’) possibilitaram a obtenção de aproximadamente 505 plantas. Destas, apenas 129 plantas foram analisadas para determinação de híbridos somáticos. Por meio das análises de marcadores moleculares RAPD e marcadores isoenzimáticos concluiu-se que 11 plantas eram híbridas (8,5% do total de plantas analisadas).

Comparando-se a frequência de obtenção de células heterocariontes (5,1 a 6,8%) momentos após a fusão (sub-ítem 4.9), com a frequência de obtenção de plantas híbridas (8,5%), pode-se concluir que, as células, calos e/ou embriões híbridos tetraplóides apresentaram competitividade “in vitro” suficiente para regenerar plantas.

Segundo Grosser (1994) os produtos de hibridação somática geralmente são competitivos, isto é, os híbridos somáticos podem ser obtidos mesmo quando a população de plantas regeneradas for constituída basicamente de plantas parentais regeneradas de protoplastos não fusionados. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam este relato.

Para o tratamento número 2 (fusão de protoplastos de suspensão celular de limão ‘Cravo’ com protoplastos de mesofilo de tangerina ‘Cleópatra’), aproximadamente 42 plantas foram obtidas e todas apresentaram padrão idêntico ao do parental de suspensão celular. Existem vários motivos para a ausência de plantas híbridas, mas deve-se ressaltar que em apenas três experimentos de fusão, conseguiu-se chegar até a fase de plantas, no restante as colônias estacionaram na fase de calos. Segundo Grosser (1994), na hibridação somática os experimentos devem ser realizados com repetições por vários dias, sob observação e ajustes contínuos, assim poderá ser obtido um grande número de plantas híbridas de cada combinação.

Para discriminação dos híbridos somáticos o método de marcadores moleculares RAPD demonstrou vantagens devido a sua rapidez e precisão, no entanto necessitou a utilização de pelo menos dois “primers” para discriminar plantas híbridas. Enquanto que o método de marcadores isoenzimáticos deve ser utilizado para confirmar a natureza híbrida; para isto, o sistema da peroxidase anódica em gel de amido demonstrou possuir que a vantagem de confirmar a natureza híbrida utilizando apenas uma eletroforese.

O período de tempo para a produção de híbridos somáticos, partindo-se do início do trabalho foi de aproximadamente 18 meses, distribuídos na seguinte forma: obtenção de calos adequados ( $\pm 4$  meses), obtenção de suspensões adequadas ( $\pm 2$  meses), experimentos de fusão e regeneração de plantas ( $\pm 10$  meses), discriminação e confirmação de híbridos somáticos ( $\pm 2$  meses).

Os híbridos somáticos obtidos entre limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra' serão levados para o campo, para a fase de multiplicação e para posterior avaliação do seu potencial como porta-enxerto.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos e de acordo com os resultados obtidos foram possíveis as seguintes conclusões:

- 1- O meio MT (Murashige & Tucker, 1969) acrescido de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP induziu à formação de calos embriogênicos em limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'.
- 2- O tempo de incubação ideal de suspensões celulares nas soluções enzimáticas testadas foi de 4-8 horas e para isolamentos de protoplastos de mesófilo foliar, 12-14 horas foram necessárias.
- 3- As suspensões celulares de limão 'Cravo' obtiveram rendimentos inferiores de protoplastos em comparação com as de tangerina 'Cleópatra', para todas as soluções enzimáticas testadas.
- 4- A viabilidade dos protoplastos isolados (próxima a 80 %), a partir de suspensões celulares das duas espécies, foi adequada para a realização de experimentos de fusão.
- 5- Nas densidades de cultivo de  $1-2 \times 10^5$  protoplastos. $\text{ml}^{-1}$  observou-se a eficiência máxima de cultivo (5 a 15 %), em avaliações aos 28 dias de cultivo.
- 5- O método de cultivo de protoplastos foi eficiente na regeneração de plantas das duas espécies, porém os métodos de aclimação das plantas "in vitro" apresentaram baixa eficiência.
- 6- A porcentagem de obtenção de células heterocariontes (híbridas), logo após a adição da solução fusionante, foi de 5,0 a 6,9 %. Dois métodos de fusão foram testados e não apresentaram diferença significativa, em termos de formação de células heterocariontes.

- 7- Os experimentos de fusão possibilitaram a obtenção de híbridos somáticos somente no tratamento em que a tangerina 'Cleópatra' foi utilizada como parental de suspensão celular e o limão 'Cravo' como parental de mesófilo foliar. No tratamento inverso (limão 'Cravo' como parental de suspensão), não foi possível obter plantas híbridas.
  
- 8- Para a discriminação e confirmação das plantas híbridas putativas, as análises de marcadores moleculares RAPD (utilizando vários "primers") e marcadores isoenzimáticos (em quatro sistemas: PRX anódica, IDH, PGI e GOT) foram eficientes, porém com diferentes graus de informação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL Anuário estatístico da agricultura brasileira. 1997.

AMARO, A.A.; ARAUJO, C.M.; PORTO, O.M.; DORNELLES, C.M.M.; CUNHA SOBRINHO, A.P.; PASSOS, O.S. Panorama da citricultura brasileira In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.1, São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 22-54.

AMMIRATO, P.V. Induction, maintenance and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetic of plants**. Orlando: Academic Press, 1984. v.1, p.139-151.

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

BALLVE, R.M.L., MEDINA-FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing. **Revista Brasileira de Genética**, v. 20, n. 4, p.697-703. 1997.

BATES, G.W.; HASENKAMPF, C. A. Culture of plant somatic hybrids following electrical fusion. **Theoretical and Applied Genetics**, v.70, p.227-233, 1985.

BINDING, H.; BUNNING, D.; GORSCHEN, E.; JORGENSEN, J.; KOLLMANN, R.; KRUMBIEGEL-SCHROEREN, G.; LING, H.Q.; MONZER, J.; MORD-HORST, G.;

RUDNICK, J.; SAUER, A.; WITT, D.; ZUBA, M. Uniparental, fusant and chimeric plants regenerated from protoplasts after steak plating in agarose gels. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.12, p.133-137, 1988.

CARNEIRO, V.T.C.; CONROI, T. Protoplastos de células vegetais. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1990. p.171-202.

COLIJN-HOOYMANS, C.M.; BOUWER, R.; DONS, J.J.M. Plant regeneration from cucumber protoplasts. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.12, p.147-150, 1988.

CRISTOFANI, M. Uso da cultura de tecidos no melhoramento de citros. **Laranja**, v.12, p.449-453, 1991.

CRISTOFANI, M.; MENDES, B.J.; TULMANN NETO, A.; ANDO, A. Determinação da viabilidade de protoplastos irradiados de laranja 'Pêra'. **Bragantia**, v.52, p.101-104, 1993.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.270-276, 1983.

DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, v.49, p.55-62, 1992.

DENG, X.X.; YIN, H.L.; LI, F.; GUO, W.W.; YE, W.M. Triploid citrus plants obtained from crossing the diploids with allotetraploid somatic hybrids. **Acta Botanica Sinica**, v.38, n.8, p.631-636, 1996. /Resumo/

DIXON, R. A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R.A. (Ed.) **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford:IRL Press, 1985. p.1-20.

- DORNELAS, M.C. Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. Piracicaba, 1995. 182p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L.. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-18, 1990.
- D'UTRA VAZ, F.B.; DOS SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv flavicarpa Degener.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Reports*, v.12, n.4, p.220-225, 1993.
- D'UTRA VAZ, F.B.; SLAMET, I.H.; KHATUN, A.; COCKING, E.C.; POWER, J.B. Protoplast culture in high molecular oxygen atmospheres. *Plant Cell Reports*, v.11, n.8, p.416-419, 1992.
- EDWARD, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Focus*, v. 19, p.1349, 1991.
- EVANS, D. A. Use of protoplast fusion for crop improvement In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (Eds.) **Biotechnologia para a produção vegetal**. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991, p.391-429.
- EVANS, D. A.; BRAVO, J.E. Protoplast isolation and culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds.) **Handbook of plant cell culture**. New York: Mcmillian press, 1983. v.1, p. 124-176.
- FAO. International Trade Yearbook. 1995.
- FAO. International Trade Yearbook. 1996.

- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA:CENARGEN, 1995. 220 p.
- FREARSON, E.M.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, v.33, p.130-137, 1973.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, v.41, n.12, p.1151-1159, 1989.
- GILMOUR, D.M.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.29-32, 1989.
- GMITTER JUNIOR, F.G.; MOORE, G.A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of Citrus: embryo production, germination and plant survival. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.6, p.39-47, 1986.
- GOLDMAN, M.H.S. Cultura de tecidos nucleares, isolamento e radiosensitividade de protoplastos de *Citrus sinensis* (L) Osbeck cv. Pera. Piracicaba, 1988. 127p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo.
- GROSSER, J.W. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion and culture. **HortScience**, v.29, n.11, p.1241-1243, 1994.
- GROSSER, J.W.; CHANLER, J.L. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus X Poncirus* Hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. **Scientia Horticulturae**, v.31, p.253-257, 1987.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. **Plant Breeding Reviews**, v.8, p.339-374, 1990 a.

- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **Hortscience**, v.25, n.2, p.147-151, 1990 b.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybridization of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. 'Flying dragon'. **Plant Cell Reports**, v.7, p.5-8, 1988a.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* e *Severinia disticha*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.397-401, 1988b.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. **HortScience**, v.27, n.10, p.1125-1127, 1992.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; TUSA, N.; CHANDLER, J.L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.656-659, 1990.
- GROSSER, J.W.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; GMITTER JUNIOR, F.G.; LOUZADA, E.S.; JIANG, J.; BAERGEN, K.; QUIROS, A.; CABASSON, C.; SCHELL, J.L.; CHANDLER, J.L. Allotetraploid hybrids between citrus and seven genera produced by somatic hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.577-582, 1996.
- GROSSER, J.W.; MOORE, G.A.; GMITTER JUNIOR, F.G. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key' Lime (*Citrus aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, v.39, p.23-29, 1989.

- GUIRADO, N.; MULLER, G.W.; PRATES, H.S. Declínio dos citros In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.2, São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 722-734.
- HIDAKA, T.; KAJIURA, I. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. **Scientia Horticulturae**, v.34, p.85-92, 1988.
- KANEYOSHI, J.; KANO, T.; KUWATA, Y.; HIRAO, A.; NAKATANI, S.; KOBAYASHI, S. Breeding of triploid citrus cultivars: I. production of triploids from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) X tetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) crosses. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, v.66, n.1, p.9-14, 1997.
- KAO, K.N.; MICHAYLUK, M.R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplast. **Planta**, v.115, p.335-367, 1974.
- KAO, K.N.; MICHAYLUK, M.R. Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. **Planta**, v.126, p.105-110, 1975.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, N. Studies on nucellar embryoids in citrus: III. On the differences in ability to form embryoids in vitro culture of ovules from poly and mono-embryoids cultivars. **Bulletin Fruit Tree Research Station**, v.4, p.237-245, 1982.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, N. Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osb.) ovules, and uniformity of regenerated plants. **Bulletin Fruit Tree Research Station**, v.5, p.43-54, 1984.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; UCHIMIYA, H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.4, p.149-159, 1985.

- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; FUJIWARA, K.; OIYAMA, I. Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and 'Murcot' Tangor. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.6-10. 1991a.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; OHGAWARA, E.; OIYAMA, I.; ISHII, S. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.14, p.63-69, 1988.
- KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Fertility in a intergeneric somatic hybrid plant of Rutaceae. **HortScience**, v.26, n.2, p.207, 1991b.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H.; IKEDA, I. Plant regeneration from 'Trovia' orange protoplasts. **Japanese Journal of Breeding**, v.33, n.2, p.119-122, 1983.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in citrus. **Planta**, v.106, p.237-245, 1972.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. Effect of culture media on embryoid formation for ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*). **Journal of Plant Breeding**, v.69, p.156-162, 1973.
- KUMAR, A.; COCKING, E.C. Protoplast fusion: A novel approach to organelle genetics in higher plants. **American Journal of Botany**, v.74, n.8, p.1289-1303, 1987.
- LING, J.T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. **Plant Cell Reports**, v.13, p.493-497. 1994.
- LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, v.40, p.325-333, 1989.

- LORDELLO, R.R.A.; LORDELLO, A.I.L. Nematóides parasitos dos citros In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.2, São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 642-667.
- LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; NIELSEN, B; CHANDLER, J.L.; DENG, X.X.; TUSA N. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. **HortScience**, v.27, n.9, p.1033-1036, 1992.
- MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU JUNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v.92, p.321-326, 1996.
- MENCZEL, L.; NAGY, F.; KISS, Z.; MALIGA, P. Streptomycin-resistant and sensitive somatic hybrids of *N. tabacum* + *N. kognitiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.59, p.191-195, 1981.
- MOORE, G. A. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.110, p.66-70, 1985.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de Citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.1 São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.
- MOURÃO FILHO, F.A.A., GMITTER JUNIOR, F.; GROSSER, J.W. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, v.50, n.2, p.76-80. 1996.
- MULLER, G.W.; COSTA, A. S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.2 São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p.735-762.

- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requeriment of citrus tissue culture. In: PROCEEDING FIRST INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, Riverside, 1969. *Anais*. Riverside, 1969. p.1155-1161.
- NEGRUTIU, I.; DE BROUWER, D.; WATTS, J.W.; SIDOROV, V.I.; DIRKS, R.; JACOBS, M. Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*, Viviani. *Theoretical and Applied Genetics*, v.72, p.279-286, 1986.
- NEVES, E.M. Citricultura paulista: importância econômica e perspectivas. *Laranja*, Cordeirópolis, v.13, n.1, p.55-62. 1992
- NEVES, E.M. **A competitividade da agroindústria citrícola brasileira: vantagens comparativas e o dilema das barreiras comerciais**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 125p. (Relatório de Pesquisa para CNPq).
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* X *Poncirus trifoliata*). *Theoretical and Applied Genetics*, v.81, p.141-143, 1991.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.71, p.1-4, 1985.
- OLIVEIRA, R.P. Cultura de calos, células em suspensão e protoplastos de porta-enxertos de citros. Piracicaba, 1993. 117p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- OTONI, W.C. Hibridação e embriogênese somáticas e transformação genética em espécies de *Passiflora*. Viçosa, 1995. 198p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

- POMPEU JUNIOR., J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR., J.; AMARO, A.S. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.1 São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p.265-280.
- POTRIKUS, I.; SHILLITO, R.D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. In: WEISSBACH, A.; WEISSBACH, H. (Eds.) **Methods for plant molecular biology**. New York: Academic press, 1988. p.355-383.
- POWER, J.B.; CHAPMAN, J.V. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In: DIXON, R.A. (Ed.) **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.37-66.
- POWER, J.B.; CUMMING, S.E.; COCKING, E.C. Fusion of isolated plant protoplasts. **Nature**, v.225, p.1016-1018, 1970.
- POWER, J.B.; DAVEY, M.R.; McLELLAN, M.; WILSON, D. **Laboratory manual: plant tissue culture**. Nottingham:University of Nottingham, 1989. 138p. (Manual de Laboratório)
- SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S. Acid citrus somatic hybrids between sudachi (*Citrus sudachi* Hort. Ex Shirai) and lime (*C. aurantifolia* Swing.) produced by electrofusion. **Plant Science**, v.77, p.125-130, 1991.
- SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S.; KOBAYASHI, S. Citrus cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. **Plant Science**, v.88, p.195-201, 1993.
- SAWAZAKI, H.E.; SODEK, L.; PYO, R.M.; MULLER,G.W. Identificação de espécies de citros mediante polimorfismo enzimático. **Bragantia**, v.51, n.2, p. 121-128. 1992.

- SHILLITO, R.D.; PASZKOWSKI, J.; POTRYKUS, I. Agarose plating and a bed type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. **Plant Cell Reports**, v.2, p.244-247, 1983.
- SIM, G.E.; LOH, C.S.; GOH, C.J. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. **Plant Cell Reports**, v.7, p.418-420, 1988.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Eds.) **Advances in fruit breeding**, West Lafayette: Univ. Purdue Press, 1975. p. 507-540.
- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBER, H.J. (Eds.) **The Citrus Industry**, v.1, Berkeley: Univ. California Press, 1967. p.190-430.
- TULMANN NETO, A.; POMPEU JR., J.; CERAVOLO, L.; ROSSI, A.C.; MENTEN, J.O.M. Avanços no melhoramento de laranja visando resistência ao cancro e outras características através de mutações induzidas. **Laranja**, v.12, n.2, p.435-447, 1991.
- VARDI, A.; ARZEE-GONEN, P.; FRYDMAN-SHANI, A.; BLEICHMAN, S.; GALUN, E. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. **Theoretical and Applied Genetics**, v.78, p.741-747, 1989.
- VARDI, A.; BREIMAN, A.; GALUN, E. Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. **Theoretical and Applied Genetics**, v.75, p.51-58, 1987.
- VARDI, A.; GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, v.37, p.217-230, 1988.

- VARDI, A.; HUTCHISON, D.J.; GALUN, E. A protoplast-to-tree system in *Microcitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus. **Plant Cell Reports**, v.5, p.412-414, 1986.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Science Letters**, v.4, p.231-236, 1975.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Plant regeneration from Citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, p.171-176, 1982.
- VIÉGAS, F. C.P.; GUIMARÃES, J.A.B. Citrus fruit for processing in Brazil. In: XI INTERNATIONAL CONGRESS OF FRUIT JUICE, São Paulo, 1991. **Anais**. São Paulo, 1991. P.1-27.
- WAARA, S.; GLIMELIUS, K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. **Euphytica**, v.85, p.21-33, 1995.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

## ANEXO 1

Composição de sais e vitaminas do meio MT (Murashige & Tucker, 1969).

SOLUÇÃO ESTOQUE DE MACRONUTRIENTES (50 X)	g.L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5
K NO <sub>3</sub>	95
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0

SOLUÇÃO ESTOQUE DE MICRONUTRIENTES (100 X)	mg.L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.680
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860
KI	83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,5
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,5

SOLUÇÃO ESTOQUE DE Fe-EDTA (200 X)	g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA	7,45
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,57

SOLUÇÃO ESTOQUE DE CaCl <sub>2</sub> (66 X)	g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	29,33

SOLUÇÃO ESTOQUE DE VITAMINAS (100 X)	g.L <sup>-1</sup>
Mio-Inositol	10
Tiamina-HCl	1
Piridoxina-HCl	1
Ácido Nicotínico	0,5
Glicina	0,2

### Preparo de 1 litro de meio MT

- 800 ml água deionizada
- 20 ml de solução estoque de Macronutrientes de MT (50 X)
- 10 ml de solução estoque de Micronutrientes de MT (100 X)
- 15 ml de solução estoque de  $\text{CaCl}_2$  (66 X)
- 5 ml de solução estoque de Fe-Na EDTA (200 X)
- 10 ml de solução estoque de vitaminas de MT (100 X)
- 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose
- completar o volume para 1 litro;
- ajustar o pH para 5,9;
- acrescentar o agente solidificante (8 g.L<sup>-1</sup> de ágar ou 2 g.L<sup>-1</sup> de phytigel);
- esquentar o meio até dissolver o agente solidificante;
- distribuir a solução em frascos, volume de 50 ml;
- autoclavar por 20 min. a 121 °C;
- armazenar frascos no escuro, a 10 °C.

## ANEXO 2

Confecção da solução de CPW 13M

Sais de CPW (Gilmour et al., 1989)

SOLUÇÃO ESTOQUE A (100 X)	g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	148

SOLUÇÃO ESTOQUE B (100 X)	QUANTIDADE
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24,6 g.L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	10,1 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g.L <sup>-1</sup>
KI	16 mg.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,5 mg.L <sup>-1</sup>

OBS: Na confecção da solução estoque B, dissolver primeiro o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Preparo de 1 litro de Solução CPW 13 M

- 800 ml água deionizada
- 10 ml de solução estoque A
- 10 ml de solução estoque B
- 130 g de Manitol
- ajustar o pH para 5,7;
- completar o volume para 1 litro;
- ajustar o pH;
- distribuir a solução em frascos, volume de 50 ml;
- autoclavar por 20 min. a 121 °C;
- armazenar frascos no escuro a -20 °C.

## ANEXO 3

Preparo de solução de agarose (tipo VII - baixo ponto de gelificação (a 1,2 %)

- Pesar 1,2 g de agarose;
- acrescentar 100 ml de água deionizada;
- fundir a agarose em forno microondas;
- distribuir em volumes de 10 ml, em frascos com tampa;
- autoclavar a 121 °C, por 15 minutos;
- guardar a -20 °C.

## ANEXO 4

Preparo de 1 litro de meio MT + 1500 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de malte

- 800 ml água deionizada
- 20 ml de solução estoque de Macronutrientes de MT (50 X)
- 10 ml de solução estoque de Micronutrientes de MT (100 X)
- 15 ml de solução estoque de CaCl<sub>2</sub> (66 X)
- 5 ml de solução estoque de Fe-Na EDTA (200 X)
- 10 ml de solução estoque de vitaminas de MT (100 X)
- 1,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte
- 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose
- completar o volume para 1 litro;
- ajustar o pH para 5,9;
- acrescentar o agente solidificante (8 g.L<sup>-1</sup> de ágar);
- esquentar o meio até dissolver o agente solidificante;
- distribuir a solução em frascos, volume de 50 ml;
- autoclavar por 20 min., a 121 °C;
- armazenar frascos no escuro, a 10 °C.

## ANEXO 5

Preparo de 1 litro de meio MT + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico + 20 ml de água de coco

- 800 ml água deionizada
- 20 ml de solução estoque de Macronutrientes de MT
- 10 ml de solução estoque de Macronutrientes de MT
- 15 ml de solução estoque de CaCl<sub>2</sub>
- 5 ml de solução estoque de Fe-Na EDTA
- 10 ml de solução estoque de vitaminas de MT
- 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose
- completar o volume para 1 litro;
- ajustar o pH para 5,9;
- acrescentar o agente solidificante (8 g.L<sup>-1</sup> de ágar);
- autoclavar por 20 min. a 121 °C;
- esperar o meio esfriar até ficar com temperatura amena ( $\pm 60$  °C);
- em câmara de fluxo laminar, filtrar os 20 ml de água de coco e 5 ml de solução estoque (0,2 mg.ml<sup>-1</sup>) de ácido giberélico, acrescentar ao meio autoclavado;
- distribuir o meio em placas;
- armazenar as placas no escuro, a 10 °C.

## ANEXO 6

Método de extração de DNA em pequenas quantidades de tecido (Edward et al., 1991)

1. Retirar em câmara de fluxo laminar, folhas de plantas "in vitro", pesando de 20 a 40 mg, colocar num tubo eppendorf esterilizado de 1,7 ml (novo);
2. Adicionar 100 µl de tampão de extração e macerar durante 20 seg. com auxílio de bastão de vidro (com ponta cônica);
3. Adicionar no tubo mais 400 µl de tampão de extração;
4. Vortexizar por 5 seg.. Deixar os tubos em temperatura ambiente por 30 min.;
5. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 min.;
6. Transferir 400 µl do sobrenadante para outro tubo novo e esterilizado;
7. Precipitar o DNA com 280 µl de isopropanol, homogeneizar suavemente e deixar em repouso por 2 min.;
8. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.;
9. Eliminar o sobrenadante,
10. Lavar o "pellet" com 300 µl de solução de etanol (70 %)
11. Secar bem o precipitado à temperatura ambiente
12. Redissolver em 100 µl de tampão TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA pH 8,0) + RNase (10 µg.ml<sup>-1</sup>).
13. Armazenar a -20 °C

Tampão de extração:

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO FINAL	SOLUÇÃO ESTOQUE	PARA 10 ml TAMPÃO EXTRAÇÃO
Tris-HCl pH 7,5	200 mM	1 M	2 ml da solução estoque
NaCl	250 mM	5 M	0,5 ml da solução estoque
EDTA pH 8,0	25 mM	0,5 M	0,5 ml da solução estoque
SDS	0,5 %	10 %	0,5 ml da solução estoque
Água ultra-pura esterilizada			6,5 ml

Em caso de "pellet" escuro, com excesso de contaminação, acrescentar após o passo 11 (Ferreira & Grattapaglia (1995):

12. Ressuspensão do DNA com 500  $\mu$ l de solução 1 M de NaCl
13. Armazenar por 30 minutos a 4 °C
14. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.
15. Precipitar o DNA com 280  $\mu$ l de isopropanol, homogeneizar suavemente e deixar em repouso por 2 min.
16. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.
17. Eliminar o sobrenadante
18. Lavar o "pellet" com 300  $\mu$ l de solução de etanol (70 %)
19. Secar bem o precipitado à temperatura ambiente Descartar o sobrenadante
20. Redissolver em 100  $\mu$ l de tampão TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA pH 8,0) + RNase ( $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ).
21. Armazenar a -20 °C.

## ANEXO 7

## Reação de amplificação RAPD

As amplificações do DNA genômico foram preparadas num volume total de 25  $\mu\text{l}$  e constituídas de:

SOLUÇÃO DE TRABALHO	CONCENTRAÇÃO FINAL PARA REAÇÃO	MIX PARA 1 REAÇÃO (25 $\mu\text{l}$ )
Tampão de amplificação (10X)	1X	2,5 $\mu\text{l}$
Mix de nucleotídeos, acrescentar 10 mM de cada (A, C, T, G) resultará em (2,5 mM de cada)	0,1 mM de cada	1,0 $\mu\text{l}$
Primers (15 ng. $\mu\text{l}^{-1}$ )	15 ng	1 $\mu\text{l}$
Taq DNA polimerase (5,0 U. $\mu\text{l}^{-1}$ )	1,0 U	0,2 $\mu\text{l}$
DNA genômico (10ng. $\mu\text{l}^{-1}$ )	20 ng	2,0 $\mu\text{l}$
Água ultra-pura esterilizada		18,3 $\mu\text{l}$

## Tampão de amplificação (10X)

PRODUTO	CONCENTRAÇÃO FINAL	SOLUÇÃO ESTOQUE	PARA 10 ml TAMPÃO AMPLIFICAÇÃO
Tris-HCl (pH 8,8)	10 mM	0,5 M	0,2 ml da solução estoque
KCl	50 mM	0,5 M	1 ml da solução estoque
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	15 mM	1 ml da solução estoque
Triton X-100	0,1 %	1 %	1 ml da solução estoque

1. Depois de preparadas em microtubos próprios para RAPD, as reações foram cobertas com uma gota de óleo mineral (Sigma Chemical Co.);
2. Centrifugar os tubos por 2 a 3 seg. para evitar bolhas de ar;
3. Colocar os tubos no termociclador;
4. Após o término da amplificação, guardar as amostras a 10 °C.

## ANEXO 8

Preparo do gel de agarose a 1,4 % para RAPD (para 350 ml)

- Adicionar num Erlenmeyer de 500 ml;
  - 4,9 g de agarose
  - 350 ml de tampão TAE (1 X)
- Dissolver a agarose no tampão em microondas por alguns minutos;
- Esperar a solução ficar morna;
- Adicionar na solução, 5  $\mu$ l de solução de brometo de etídio (a 10 mg.ml<sup>-1</sup>);
- Verter na cuba a solução de agarose

Tampão TAE (50 X)

Trizma base	242 g.L <sup>-1</sup>
Ácido Acético glacial	57,1 ml.L <sup>-1</sup>
Solução EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml.L <sup>-1</sup>

Preparo de 1 litro de tampão TAE (1 X)

- 20 ml de solução estoque (50 X)
- 980 ml de água destilada deionizada

Tampão de carregamento (6X)

- 0,25 % de azul de bromofenol
- 40 % de sacarose

## ANEXO 9

Solução extratora de isoenzimas "Nankoog" (Alfenas et al., 1991).

PRODUTO	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
Fosfato de sódio bibásico	0,6 g	0,034 M
Sacarose	7 g	0,2 M
Polivinilpirrolidona (PVP-40)	2,56 g	2,56 %
DTT	50 mg	3 mM
L-ácido ascórbico	100 mg	5,7 mM
DIECA	100 mg	5,8 mM
Bissulfito de sódio	50 mg	2,6 mM
Borato de sódio (Bórax)	50 mg	2,5 mM
2- Mercaptoetanol	0,2 ml	0,2 %
Polietilenoglicol- 6000	1 g	1 %
Água deionizada (q.s.p.)	100ml	

## ANEXO 10

1. Solução estoque para tampão de gel de amido e de cuba (TC - Tris-Citrato / pH 7,5)

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
Tris	27 g	0,223 M
Ácido cítrico	18,07 g	0,086 M
Água (q.s.p.)	1 litro	
Tampão da Cuba:	concentração normal	
Tmpão do Gel:	concentração 3,5 % do tampão da cuba	

## 2. Solução estoque para tampão de gel de amido e de cuba (CM - Citrato-Morfolina / pH 6,1)

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
N (3 aminopropil) morfolina	± 10 ml	Acertar o pH do tampão acrescentando este produto
Ácido cítrico	16,8 g	0,04 M
Água (q.s.p.)	1 litro	
Tampão da Cuba:	concentração normal	
Tmpão do Gel:	concentração 5,0 % do tampão da cuba	

## 3. Solução estoque para tampão de gel de amido (TCB - Tris-Citrato / pH 8,3)

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
Tris	0,454 g	0,015 M
Ácido cítrico	1,9 g	0,036 M
Água (q.s.p.)	1 litro	

## 3.1 . Solução estoque para tampão de cuba (TCB - Tris-Citrato- Borato / pH 8,3)

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
ácido bóricos	18,5	0,3 M
NaOH	acertar o pH com NaOH 4N	
Água (q.s.p.)	1 litro	

## ANEXO 11

Procedimentos para eletroforese horizontal em tampão TC (Tris-Citrato / pH 7,5), em gel de Penetrose (13 %)

1. Após a aplicação dos “weaks” no gel, conectar o gel às cubas com auxílio de tecido de algodão previamente embebido em tampão da cuba;
2. Ligar a fonte e manter a voltagem constante (130V)
3. Após 30 minutos de corrida, desligar a fonte e retirar as tiras de papel filtro (“weaks”);
4. Retirar o excesso de amostra no gel, com auxílio de um cotonete;
5. Cobrir o gel com plástico, para evitar a desidratação do gel;
6. Religar a fonte e manter a voltagem constante (130 V) por aproximadamente 14 horas;

Procedimentos para eletroforese horizontal em tampão CM (Citrato-Morfolina / pH 6,1), em gel de Penetrose (13 %)

1. Após a aplicação dos “weaks” no gel, conectar o gel às cubas com auxílio de tecido de algodão previamente embebido em tampão da cuba;
2. Ligar a fonte e manter a corrente constante (20 mA)
3. Após 30 minutos de corrida, desligar a fonte e retirar as tiras de papel filtro (“weaks”);
4. Retirar o excesso de amostra no gel, com auxílio de um cotonete;
5. Cobrir o gel com plástico, para evitar a desidratação do gel;
6. Religar a fonte e manter a corrente constante (20 mA) por aproximadamente 14 horas;

Procedimentos para eletroforese horizontal em tampão TCB (Tris-Citrato-Borato / pH 8,3), em gel de Penetrose (13 %)

1. Após a aplicação dos “weaks” no gel, conectar o gel às cubas com auxílio de tecido de algodão previamente embebido em tampão da cuba;
2. Ligar a fonte e manter a voltagem constante (150 V)
3. Após 1 hora de corrida, desligar a fonte e retirar as tiras de papel filtro (“weaks”);
4. Retirar o excesso de amostra no gel, com auxílio de um cotonete;
5. Cobrir o gel com plástico, para evitar a desidratação do gel;
6. Religar a fonte e manter a voltagem constante (300 V) por aproximadamente 7 horas;

## ANEXO 12

## Colorações de sistemas isoenzimáticos em géis de Penetrose (Amido)

## 1. PRX (Peroxidase)

- Etanol	25 ml
- Orto-Dianisidina	0,03 g
- Tampão Acetato de Sódio 0,2 M pH 5,0	25 ml
- Água oxigenada 30 % (30 volumes)	1,5 ml

Dissolver a orto-dianisidina em Etanol e depois acrescentar o tampão Acetato. Incubar o gel por 10 minutos na solução, no escuro, a 37 °C. Acrescentar a Água oxigenada. Esperar as bandas aparecerem, descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).

## 2. GOT (Glutamato oxaloácetico transaminase)

## Solução de substrato pH 7,4

- Ácido $\alpha$ -Ketoglutárico	146,1 mg
- Ácido $\alpha$ -Aspártico Orto-Dianisidina	532,4 mg
- PVP-40	2 g
- EDTA	200 mg
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,68 g
- Água deionizada (q.s.p.)	400 ml

## Coloração

- Fast Blue BB salt	0,08 g
- Solução substrato	50 ml

Dissolver o corante (Fast blue BB salt) em 50 ml de solução substrato. Incubar o gel nesta solução, no escuro, a 37 °C, até as bandas aparecerem. descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).

## 3. SKDH (Ácido Shiquímico desidrogenase)

- Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 (q.s.p.)	50 ml
- MTT (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- NADP (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml

- PMS (1 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- Ácido shiquímico	0,05 g

Misturar os quatro produtos no tampão Tris-HCl. Incubar o gel nesta solução, no escuro, a 37 °C, até as bandas aparecerem, descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).

#### 4. IDH (Isocitrato desidrogenase)

- Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (q.s.p.)	50 ml
- MTT (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- NADP (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- PMS (1 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- MgCl <sub>2</sub> (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- Ácido shiquímico	0,1 g

Misturar os cinco produtos no tampão Tris-HCl. Incubar o gel nesta solução, no escuro, a 37 °C, até as bandas aparecerem, descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).

#### 5. MDH (Malato desidrogenase)

- Tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (q.s.p.)	50 ml
- MTT (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- NAD <sup>+</sup> (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- PMS (1 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- Ácido Málico 0,5 M pH 8,0	2 ml

Misturar os quatro produtos no tampão Tris-HCl. Incubar o gel nesta solução, no escuro, a 37 °C, até as bandas aparecerem, descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).

#### 6. . PGI (Fosfoglucoase isomerase)

- Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (q.s.p.)	50 ml
- Frutose 6-fosfato	0,0375 g
- MTT (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- NADP (10 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml
- PMS (1 mg.ml <sup>-1</sup> )	1 ml

- $\text{MgCl}_2$  ( $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) 1 ml
- Glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) ( $1000 \text{ Un.ml}^{-1}$ ) 0,01 ml - (10 Un.)

Acrescentar o G6PDH por último, incubar o gel na solução no escuro, a  $37^\circ\text{C}$ , até as bandas aparecerem, descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).

### ANEXO 13

#### Gel de Poliacrilamida a 7 % (sistema Davis)

##### Solução estoque A

Tris base	36,6 g
TEMED	0,23 ml
HCl 1N	$\pm 48 \text{ ml}$
Água (q.s.p)	100 ml pH 8.9

##### Solução estoque B

Tris base	5,98 g
TEMED	0,46 ml
HCl 1N	$\pm 48 \text{ ml}$
Água (q.s.p)	100 ml pH 6,7

##### Solução estoque C

	para fazer gel a 7 % de acrilamida	para fazer gel a 10 % de acrilamida
Acrlamida	18 g	40 g
Bis acrlamida	0,735 g	1,0 g
Água (q.s.p)	100 ml	100 ml

##### Solução estoque D

Acrlamida	10 g
Bis acrlamida	2,5 g
Água (q.s.p)	100 ml

##### Solução estoque E

Riboflavina	4 mg
$\text{H}_2\text{O}$ q.s.p	100 ml

##### Solução estoque G

persulfato de sódio	6 g
Água (q.s.p)	100 ml

### Confecção do gel separador a 7 %

Solução A	4 ml
Solução B com acrilamida a 28 %	8 ml
Solução G	4 ml
Água (q.s.p)	16 ml

### Confecção do gel espaçador

Solução B	2 ml
Solução D	4 ml
Solução E	2 ml
Água (q.s.p)	18,5ml

## ANEXO 14

### Coloração do sistema da peroxidase em géis de Poliacrilamida.

#### 1. PRX (Peroxidase)

- Orto-Dianisidina	0,03 g
- Ácido acético a 10 %	80 ml
- Água oxigenada 30 % (30 volumes)	10 µl

Dissolver a orto-dianisidina em Ácido acético (10%). Incubar o gel por 10 minutos na solução, no escuro, a 37 °C. Acrescentar a água oxigenada. Esperar as bandas aparecerem (cor verde), descartar a solução. Fixar o gel em solução Glicerol (10 %).