

EFICIÊNCIA DE ISOLAMENTO E DE PLAQUEAMENTO DE PROTOPLASTOS DE LARANJA-DOCE¹

LÍVIA MENDES DE CASTRO², FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO²,
BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES³

RESUMO – O isolamento e plaqueamento de protoplastos são fatores fundamentais para o sucesso no cultivo *in vitro* deste tipo de explante visando a manipulações genéticas. A composição da solução enzimática no isolamento, a densidade de cultivo, bem como o próprio genótipo utilizado são variáveis importantes nestas etapas. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de isolamento de protoplastos em função de três soluções enzimáticas e a eficiência de plaqueamento em função de cinco densidades de protoplastos e diferentes composições de meio de cultura em cultivares de laranja-doce. As soluções enzimáticas avaliadas para o isolamento de protoplastos foram: 1. celulase Onozuka RS 1%, macerases R-10 1% e pectoliase 0,2%; 2. celulase Onozuka RS 1%, macerases R-10 1% ; 3. celulase Onozuka R-10 4%, macerases R-10 1%. O plaqueamento dos protoplastos foi realizado nas densidades de 2×10^4 ; 5×10^4 ; 10^5 ; 2×10^5 e 3×10^5 protoplastos.mL⁻¹, nos meios de cultura EME 0,7M, BH₃ 0,7M e BH3 + EME 0,7M em ausência de luz, a 25 ± 1 °C. A solução enzimática 2 proporcionou maior rendimento no isolamento de protoplastos das cultivares Hamlin, Natal e Pera, e a solução enzimática 1 foi a mais adequada para a laranja ‘Westin’. Para a cultivar Lima-Verde, a solução enzimática 3 foi a mais eficiente. A eficiência final de plaqueamento, avaliada aos 90 dias de cultivo, foi superior nas densidades de 3×10^5 e 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹ para as cultivares Hamlin, Natal e Lima-Verde, e nas densidades de 2×10^5 e 10^5 protoplastos.mL⁻¹ para a laranja ‘Westin’.

Termos para indexação: carboidratos, *Citrus sinensis*, cultura de tecidos vegetais, enzima.

ISOLATION AND PROTOPLASTS PLATING EFFICIENCY OF SWEET ORANGE

ABSTRACT – Isolation and protoplast plating are important factors for adequate *in vitro* culture of this type of explants to further genetic manipulations. The composition of the enzymatic solution, protoplast plating density, and plant genotype are important variables in these steps. Therefore, this work aimed to evaluate the isolation efficiency of protoplasts related to three enzymatic solutions and the plating efficiency of protoplasts based on five cell densities in different culture media compositions of sweet oranges cultivars. The enzymatic solutions tested were: 1. cellulase Onozuka RS 1%, macerases R-10 1% and pectoliase 0,2%; 2. cellulase Onozuka RS 1%, macerases R-10 1% ; 3. cellulase Onozuka R-10 4% , macerases R-10 1%. Protoplasts were cultured at densities of 2×10^4 ; 5×10^4 ; 10^5 ; 2×10^5 and 3×10^5 protoplasts.mL⁻¹ in EME 0.7M, BH₃ 0.7M e BH3 + EME 0.7M, in the darkness, at 25 ± 1 °C. The enzymatic solution 2 provided higher yields for ‘Hamlin’, ‘Natal’ and ‘Pêra’ sweet orange cultivars, and enzymatic solution 1 resulted in better protoplast isolation for ‘Westin’ sweet orange. For ‘Lima Verde’ sweet orange, enzymatic solution 3 was the most efficient. Final plating efficiency, evaluated 90 days after culture, was higher at the densities of 3×10^5 and 2×10^5 protoplasts.mL⁻¹ for ‘Hamlin’, ‘Natal’, and ‘Lima Verde’ sweet orange cultivars, and at the density of 2×10^5 e 10^5 protoplasts. mL⁻¹ for ‘Westin’ sweet orange.

Index terms: carbohydrate, *Citrus sinensis*, enzyme, plant tissue culture.

¹(Trabalho 119-10). Recebido em: 10-05-2010. Aceito para publicação em: 21-12-2010.

²Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, 13418-900, Piracicaba-SP. *Autor correspondente: E-mails: francisco.mourao@usp.br; lmcastro@usp.br

³Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Av. Centenário, 303, Caixa Postal 96, 13409-970, Piracicaba-SP. E-mail: bmendes@cena.usp.br

INTRODUÇÃO

A obtenção de cultivares de citros com elevado potencial genético e livre de patógenos é fundamental para garantir altas produtividades. Diversas pesquisas relacionadas ao melhoramento genético de variedades têm sido desenvolvidas, buscando, em sua maioria, tolerância a pragas e doenças. Entretanto, existem dificuldades nos programas de melhoramento tradicional para obtenção destas variedades devido a aspectos da biologia reprodutiva do gênero *Citrus*, tais como o longo período de juvenildade, a presença de embriões nucelares (poliembrião), incompatibilidade, esterilidade sexual e alta heteroziguidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; OLIVARES-FUSTER et al., 2005).

A necessidade de ampliação da base genética atual dos citros, assim como da otimização da exploração do germoplasma já existente impõem a necessidade do desenvolvimento e ampliação de programas de melhoramento. Desta forma, a biotecnologia pode contribuir no ganho ou melhoria de características desejáveis (MACHADO et al., 2005). Atualmente, ferramentas auxiliares podem ser integradas ao melhoramento convencional, tais como técnicas baseadas no cultivo de tecidos vegetais e biologia molecular. Dentre as ferramentas biotecnológicas aplicáveis ao melhoramento de citros, destacam-se a hibridação somática via fusão de protoplastos, transformação genética, mutantes ou variantes somaclonais (CARNEIRO et al., 1998).

As pesquisas sobre protoplastos abriram amplas possibilidades para o melhoramento genético das espécies cítricas (MOURÃO FILHO et al., 1996). Protoplasto é um estado transitório da célula obtido em laboratório, que pode ser manipulado, conservadas ainda as potencialidades de células vegetais completas (CARNEIRO et al., 1998). A ausência de parede celular faz dos protoplastos um sistema útil para diversos estudos, tais como extração de organelas celulares, transferência gênica por transformação genética e produção de novos genótipos por hibridação somática (FUNGARO; VIEIRA, 1989).

Protoplastos de citros têm sido obtidos a partir de mesófilo foliar (LATADO et al., 2002; KOBAYASHI et al., 1991) e calos embriogênicos e células em suspensão (MENDES-DA-GLÓRIA, et al., 2000a). Os principais fatores que determinam a eficiência de isolamento de protoplastos estão relacionados ao genótipo, estado fisiológico das células, tipo e concentração de enzimas e estabilizadores osmóticos, tempo de incubação na solução enzimática, agitação, luminosidade e temperatura (CARNEIRO et al., 1998; COSTA et al., 2002).

Embora os constituintes básicos sejam os mesmos, a composição da parede celular vegetal varia muito entre as espécies vegetais e até mesmo entre os tecidos da mesma planta, o que requer a definição de um sistema específico para a digestão da parede (CARNEIRO et al., 1998). No processo de obtenção de protoplastos, a seleção das enzimas que serão usadas para a digestão da parede celular e a adequação de suas concentrações são muito importantes para obtenção de uma quantidade adequada de protoplastos viáveis.

No que se refere ao cultivo de protoplastos, a densidade de plaqueamento bem como a molaridade do meio de cultivo constituem-se os principais fatores da eficiência final de plaqueamento, definida como a porcentagem de protoplastos que se dividiram e formaram microcalos com 1-2 mm de diâmetro (OCHAT; POWER, 1992), com potencial de regeneração de plantas. A densidade final de protoplastos no meio de cultura (densidade de plaqueamento) é crucial para maximizar a regeneração da parede celular vegetal e, concomitantemente, a formação de células-filhas.

Costa et al. (2002) avaliaram o efeito de diferentes densidades de cultivo na eficiência final de plaqueamento para diversas variedades cítricas e verificaram a formação de um maior número de microcolônias nas densidades de 10^5 e 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹. Segundo Evans e Bravo (1983), para cada espécie, há uma densidade, mínima de plaqueamento na qual não ocorre divisão celular. Em altas densidades, fenômenos de absorção e excreção de protoplastos podem modificar profundamente o meio de cultura (CARNEIRO et al., 1998).

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência de isolamento de protoplastos de diferentes cultivares de laranja-doce e verificar a eficiência de plaqueamento em função de diferentes concentrações de protoplastos e diferentes composições de meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de calos embriogênicos de laranja-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) das cultivares Hamlin, Pera, Natal, Lima-Verde e Westin foram cultivadas em meio de cultura sólido EME 0,146M (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Para manutenção, os calos embriogênicos foram subcultivados em meio fresco a cada quatro semanas. Os calos foram utilizados no isolamento de protoplastos.

Foram utilizadas para o isolamento de protoplastos a partir de calos embriogênicos três soluções enzimáticas: 1. Grosser e Chandler (1987), composta

de 1% de celulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha) e 0,2% de pectoliase Y-23 (Seishin); dissolvidas em solução de 0,7M de manitol, 24,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,92 mM NaH_2PO_4 e 6,15 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES), pH 5,7, utilizando 2 mL desta solução por aproximadamente 500 mg de calo, diluído em 2mL de meio de cultura BH₃ 0,7 M; 2. Grosser e Chandler (1987) modificado, composta de 1% de celulase Onozuka RS (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha); dissolvidas em solução de 0,7M de manitol, 24,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,92 mM NaH_2PO_4 e 6,15 mM MES, pH 5,7, utilizando 2 mL desta solução por aproximadamente 500 mg de calo, diluído em 2mL de meio de cultura BH3 0,7 M; 3. Solução enzimática composta de 4% de celulase Onozuka R-10 (Yakult), 1% macerase R-10 (Yakult Honsha); dissolvidas em solução de 0,7 M de manitol, 24,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,92 mM NaH_2PO_4 e 6,15 mM MES, pH 5,7, utilizando 2 mL desta solução por aproximadamente 500 mg de calo, diluído em 2mL de meio de cultura BH3 0,7 M (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Os calos para isolamento de protoplastos foram provenientes daqueles cultivados em meio sólido (EME 0,146M).

As soluções enzimáticas foram esterilizadas por meio de filtro-esterilização (0,22 mm). Os calos de cada variedade foram colocados em placas de Petri (58 x 15 mm, Corning™, não tratadas), juntamente com as soluções enzimáticas. A incubação foi realizada por um período de 15 horas, sob agitação orbital (40 rpm), em ausência de luz, à temperatura de 27 °C.

Após incubação nas soluções enzimáticas, os protoplastos foram purificados em gradiente de sacarose/manitol. Os protoplastos foram filtrados em peneira de náilon com malha de 45 µm e centrifugados por 10 minutos a 100g. O sobrenadante foi removido com pipeta de Pasteur e o pellet ressuspenso em 5 mL de meio CPW (FREASON et al., 1973) contendo sacarose a 25%. Dois mL de meio CPW com manitol a 13% foram cuidadosamente colocados na parte superior da solução ressuspenso a fim de formar um gradiente de densidade. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 100g. Após formação do gradiente sacarose/manitol, os protoplastos foram removidos e diluídos em 5 mL de solução BH3 0,7 M e reservadas para manipulações posteriores. O rendimento dos protoplastos viáveis por peso fresco de calo embriogênico foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 5 (cultivares) x 3 (soluções enzimáticas), com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo 500 mg de calo embriogênico.

Avaliou-se também a eficiência final de cultivo de protoplastos em função de diferentes densidades nos cultivares de laranja-doce Lima-Verde, Natal, Hamlin e Westin. Os protoplastos purificados foram cultivados em cinco densidades, 2×10^4 ; 5×10^4 ; 10^5 ; 2×10^5 e 3×10^5 protoplastos.mL⁻¹, nos meios de cultura EME 0,7 M, BH3 0,7 M ou em BH3 + EME 0,7M (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990) em ausência de luz, a 25 ± 1 °C.

Aos 30 dias de cultivo, foram adicionadas às microcolônias 10 a 12 gotas do meio de cultura de 1:1:1 (v:v:v), com o objetivo de reduzir o potencial osmótico do meio, composto de uma parte de meio BH3 0,7 M, uma parte de EME 0,7 M e uma parte de EME 0,146 M. Em subcultivos posteriores, quando as culturas se apresentaram mais vigorosas, foi adicionado o meio de cultura 1:2 (v:v), composto por uma parte do meio de cultura BH3 0,7 M e duas partes do meio de cultura EME 0,146 M.

Em torno de 90 dias de cultivo, foi avaliado o número de microcalos com 1 a 2 mm de diâmetro, os quais foram transferidos para placa de Petri (100 x 15 mm), com meio de cultura EME. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial de 4 (cultivares) x 3 (densidades de plaqueamento) x 3 (meios de cultura), com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa (60 x 15 mm) de isolamento.

Os dados dos dois experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com transformação de dados, quando necessário. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$). No experimento relacionado à avaliação da eficiência de cultivo em função da densidade de protoplastos, aplicou-se uma análise de regressão polinomial para avaliar o efeito das densidades de plaqueamento sobre o número de microcalos formados em cada meio de cultura para as variedades mais responsivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos fatores estão envolvidos no processo de isolamento de protoplastos, como tipo e concentração de enzimas digestivas, o potencial osmótico da solução de isolamento e a estrutura física da parede das células dos calos embriogênicos em estudo (BENEDITO et al., 2000).

Ao comparar as cinco cultivares estudadas, constata-se o efeito significativo das três soluções enzimáticas na eficiência de isolamento de protoplastos de laranja-doce (Figura 1). A solução enzimática 2, de Grosser e Chandler (1987) modificada, apresentou melhor rendimento de isolamento de protoplastos para laranja 'Hamlin', com média de $37,1 \times 10^4$

protoplastos.mL⁻¹ em 500 mg de calos embriogênicos, seguida pelas cultivares Natal e Pera, com rendimento médio de $30,8 \times 10^4$ protoplastos.mL⁻¹ e $21,6 \times 10^4$ protoplastos.mL⁻¹, respectivamente. A solução enzimática 3 apresentou baixo rendimento no isolamento de protoplastos para as cultivares Westin e Hamlin, provavelmente por apresentar uma enzima celulase mais fraca (Onozuka R-10), o que não foi suficiente para degradação da parede celular. No entanto, para a laranja 'Lima-Verde', a solução enzimática 3 foi a mais eficiente para isolamento de protoplastos, com um rendimento médio de $16,8 \times 10^4$ protoplastos.mL⁻¹ em 500 mg de calos embriogênicos. A mesma cultivar apresentou os menores rendimentos no isolamento para as soluções enzimáticas 1 e 2, com média de $7,3 \times 10^4$ protoplastos.mL⁻¹ e $4,9 \times 10^4$ protoplastos.mL⁻¹, respectivamente. Para a laranja 'Westin', a solução enzimática 1 foi a mais eficiente entre as três soluções avaliadas, com um rendimento médio de $33,1 \times 10^4$ protoplastos.mL⁻¹, em 500 mg de calos embriogênicos.

Tais resultados contrastam-se com aqueles apresentados por Benedito et al. (2000), em que a solução enzimática de Grosser e Chandler (1987), composta de 1% de celulase, 1% macerase e 0,2% de pectoliase (denominada de solução enzimática 1 no presente trabalho) foi considerada a melhor para as cultivares de laranja-doce Baía Cabula, Orvalho de Mel, Rubi e Valência. Neste presente trabalho, a solução enzimática 1 foi a melhor apenas para a cultivar Westin (Figura 1).

Os resultados deste experimento reforçam a hipótese de que as espécies de citros e as cultivares dentro de uma mesma espécie apresentam grande variação na eficiência de isolamento perante as diversas soluções enzimáticas empregadas, concluindo que uma combinação enzimática apropriada deve ser determinada para cada cultivar especificamente (VARDI; GALUN, 1988; 1989). Essas influências das diferentes cultivares dentro de uma mesma espécie cítrica e da solução enzimática no isolamento de protoplastos já foram constatadas anteriormente por outros autores (OLIVEIRA et al., 1994; MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2000b; COSTA et al., 2002). Estas diferenças estão relacionadas com características inerentes à parede celular, que, embora seus constituintes básicos sejam os mesmos, sua composição pode variar muito entre as espécies e cultivares (CARNEIRO et al., 1998).

Quanto à densidade de plaqueamento, neste trabalho, verificou-se a formação de um maior número de microcalos (1 a 2 mm de diâmetro) para todas as cultivares avaliadas, de forma geral, nas densidades de 3×10^5 e 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹

(Tabela 1).

Estes resultados discordam daqueles relatados por Costa et al. (2002), que, avaliando cinco densidades de plaqueamento de protoplastos, verificaram formação de um maior número de microcolônias nas densidades de 1×10^5 e 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹, o que foi constatado pela eficiência de plaqueamento tanto para as cultivares de tangerinas avaliadas (tangerina 'Cleópatra', com eficiência de 9,8% na densidade de 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹), quanto para as laranjas ('Ruby Blood' e 'Valência' com eficiência de 9,0% e 8,5%, respectivamente, na densidade de 2×10^5 protoplastos.mL⁻¹). Para os mesmos autores, o incremento na densidade de 3×10^5 protoplastos.mL⁻¹ não demonstrou comportamento linear, e as poucas colônias desenvolvidas cessaram o crescimento e morreram 90 dias após o início do cultivo. Em altas densidades, fenômenos de absorção e excreção de protoplastos podem modificar profundamente a composição do meio de cultura (CARNEIRO et al., 1998). Uma excessiva densidade de plaqueamento rapidamente consome nutrientes, acarretando em menores taxas de divisão das células derivadas destes protoplastos.

Para laranja 'Natal', nos meios de plaqueamento BH3 (0,7M) e BH3 + EME (0,7 M), à medida que as densidades de plaqueamento foram incrementadas, o número de microcalos também aumentou, sendo o ponto ótimo para o meio BH3 a partir da densidade de 10^5 (10×10^4) protoplastos.mL⁻¹. Para o meio BH3 + EME (0,7 M), o ponto ótimo foi na densidade de 3×10^5 (30×10^4) protoplastos.mL⁻¹. Já o meio de cultura EME (0,7 M), apresentou ponto ótimo na densidade de 2×10^5 (20×10^4) protoplastos.mL⁻¹, entretanto sem curva de ajuste por análise de regressão polinomial (Figura 2). Para a cultivar 'Hamlin', à medida que a densidade de plaqueamento aumentou para os três meios de cultura, o número de microcalos aumentou (Figura 3).

A eficiência de plaqueamento foi relativamente baixa quando comparada às demais densidades para as cultivares Hamlin, Lima-Verde e Westin nas densidades de 5×10^4 e 2×10^4 protoplastos.mL⁻¹. Costa et al. (2002) também observaram uma baixa eficiência de plaqueamento nessas duas densidades para todas as espécies cítricas e cultivares estudadas. As células estimulam a divisão mitótica de células adjacentes liberando fatores de crescimento, incluindo aminoácidos no meio ao seu redor. Consequentemente, protoplastos falham ao serem submetidos à divisão quando cultivados abaixo da densidade de plaqueamento mínima limiar (DAVEY et al., 2005).

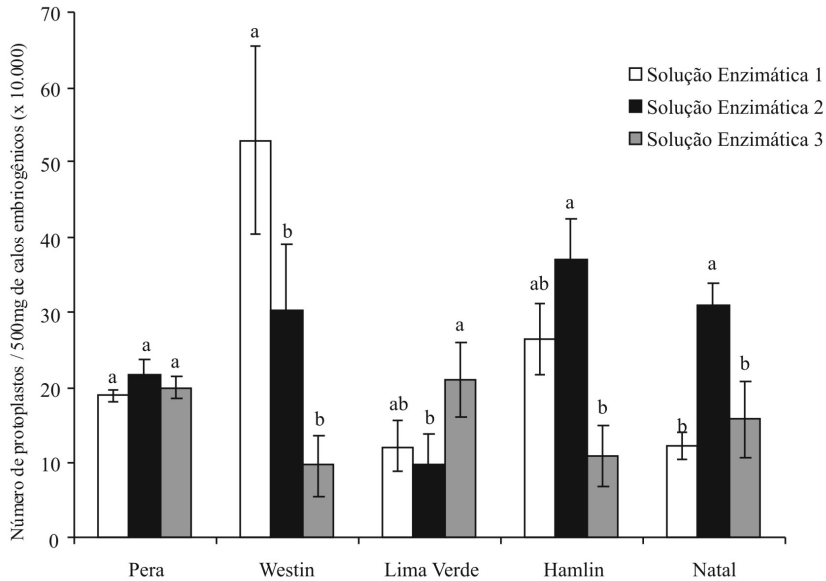
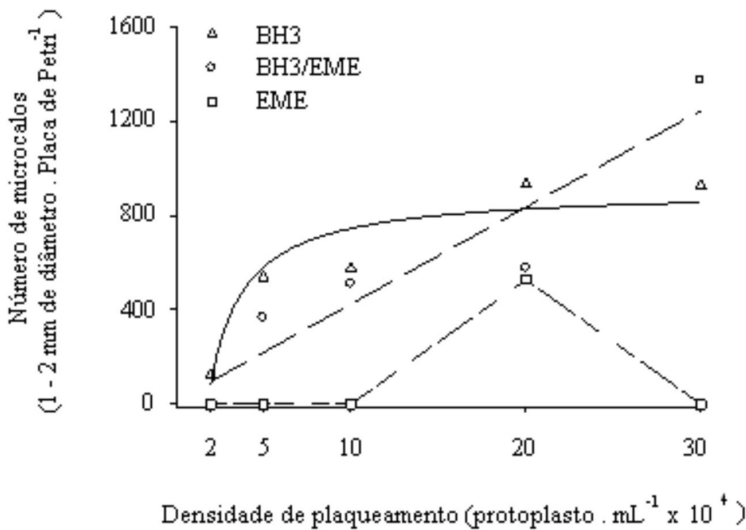


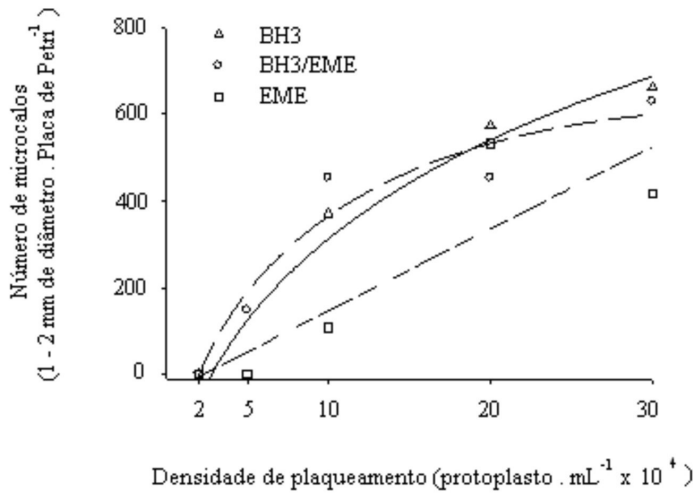
FIGURA 1 - Eficiência de isolamento de protoplastos de laranja-doce (*Citrus sinensis*). Solução enzimática 1: Grosser e Chandler (1987), 1% de celulase Onozuka RS, 1% macerase R-10 e 0,2% de pectoliase Y-23; Solução enzimática 2: Grosser e Chandler (1987) modificada, composta de 1% de celulase Onozuka RS e 1% macerase R-10; Solução enzimática 3: 4% de celulase Onozuka R-10 e 1% macerase R-10. (Barra = ± erro-padrão).



$$Y_{\text{Natal-BH3}} = 909,30 + \left(\frac{1,642 \times 10^4}{X} \right) \quad (R^2 = 0,893)$$

$$Y_{\text{Natal-BH3/EME}} = 15,46 + 0,0041X \quad (R^2 = 0,881)$$

FIGURA 2 - Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta do número de microcalos formados de laranja 'Natal' às densidades e meio de cultura no plaqueamento.



$$Y_{\text{Hamlin-BH3}} = -416,54 - 0,0013X + 2,71 \sqrt{X} \quad (R^2 = 0,938)$$

$$Y_{\text{Hamlin-BH3+EME}} = -421,61 - 0,0027X + 3,34 \sqrt{X} \quad (R^2 = 0,936)$$

$$Y_{\text{Hamlin-EME}} = -42,31 + 0,0019X \quad (R^2 = 0,777)$$

FIGURA 3 - Valores observados (símbolos) e estimados (linhas) da resposta do número de microcalos formados de laranja 'Hamlin' às densidades e meio de cultura no plaqueamento.

TABELA 1 - Desenvolvimento de protoplastos de laranja-doce (*Citrus sinensis*) cultivares Lima-Verde, Natal, Hamlin e Westin em função da densidade de plaqueamento (protoplastos.mL⁻¹) e da composição do meio de cultura.

Cultivares	Densidades de Plaqueamento (protoplastos.mL ⁻¹)	Meio de cultura		
		BH3	BH3/EME	EME
		Número de microcalos (1 - 2 mm de diâmetro).placa de Petri ¹ (± erro padrão)		
Lima-Verde	3 x 10 ⁵	0	502 ± 31	0
	2 x 10 ⁵	0	699 ± 138	0
	1 x 10 ⁵	0	408 ± 113	0
	5 x 10 ⁴	0	0	0
	2 x 10 ⁴	0	0	0
Natal	3 x 10 ⁵	926 ± 139	1372 ± 86	0
	2 x 10 ⁵	932 ± 9	576 ± 16	528 ± 38
	1 x 10 ⁵	576 ± 23	509 ± 54	0
	5 x 10 ⁴	538 ± 83	366 ± 57	0
	2 x 10 ⁴	124 ± 14	0	0
Hamlin	3 x 10 ⁵	662 ± 136	629 ± 75	416 ± 10
	2 x 10 ⁵	574 ± 67	453 ± 8	532 ± 75
	1 x 10 ⁵	370 ± 15	453 ± 11	108 ± 16
	5 x 10 ⁴	0	148 ± 37	0
	2 x 10 ⁴	0	0	0
Westin	3 x 10 ⁵	0	0	0
	2 x 10 ⁵	0	1133 ± 61	1323 ± 204
	1 x 10 ⁵	0	581 ± 53	0
	5 x 10 ⁴	0	396 ± 85	0
	2 x 10 ⁴	0	0	0

CONCLUSÕES

1-A eficiência de isolamento de protoplastos é influenciada pela cultivar de laranja-doce e pela composição da solução enzimática.

2-A eficiência de plaqueamento varia em função da cultivar de laranja-doce, da densidade de cultivo dos protoplastos e do meio de cultura empregado.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos à primeira autora. Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pelo auxílio financeiro. Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira, pelo fornecimento de material vegetal para obtenção de parte dos calos embriogênicos utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos de laranja-doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.1, p.33-38, 2000.

CARNEIRO, V.T.C.; CONROI, T.; BARROS, L. M.G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v.1, p.413-458.

COSTA, M.A.P.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.472-476, 2002.

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

EVANS, D.A.; BRAVO, J.E. Protoplast isolation and culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: McMillan Press, v.1, p.124-176, 1983.

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

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

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

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

KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of *Rutaceae*. **HortScience**, Alexandria, v.26, p.207-210, 1991.

LATADO, R.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; TSAI, S.M.; TULMANN NETO, A. Obtenção de híbridos somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.12, p.1735-1741, 2002.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/Fundag, 2005, p.223-277.

MENDES-DA-GLORIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplasts of brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p. 727-732, 2000b.

MENDES-DA-GLORIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CAMARGO, L.E.A.; MENDES, B.M.J. 'Caipira' sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potencial for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.661-665, 2000a.

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

OCHATT, S.J.; POWER, J.B. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: FOWLER, M.W.; WARREN, G.S.; MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Plant biotechnology: comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 99-127.

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

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

VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of citrus protoplasts. In: BAJAJ, Y.P.S., (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.147-159.

VARDI, A.; GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.37, p.217-230, 1988.