

Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes

Lilian Povedano¹, Francisco Humberto Henrique¹,
Augusto Tulmann Neto² & Rodrigo Rocha Latado¹

RESUMO

Uma das estratégias para a produção de frutos cítricos sem sementes é a utilização de variedades triploides, resultantes do cruzamento de plantas tetraploides com plantas diploides. Um dos problemas para uso mais intenso desta metodologia está no baixo número de variedades tetraploides disponíveis. O objetivo do presente estudo foi induzir plantas autotetraploides das laranjeiras Lima e Buckeye Navel, tangerineira Clementina e *Fortunella*, pelo método do cultivo *in vitro* temporariamente em meio contendo colchicina, visando o seu uso posterior como parental em cruzamentos com variedades diploides, para obter híbridos triploides sem sementes. Os tratamentos utilizados foram compostos pelo cultivo de segmentos de epicótilo de cada variedade, durante um, dois ou três dias, em meio contendo as concentrações de colchicina de 0,025 e 0,05% p/v, seguido de transferência para placas com o mesmo meio de cultura, mas sem a presença do alcaloide, até a regeneração de brotações. Aos 60 dias de cultivo, foi realizada a avaliação do número de brotações regeneradas por explante. As brotações adventícias regeneradas foram microenxertadas *in vitro* e, em seguida, aclimatizadas as condições ambientais. Para a seleção de plantas tetraploides usou-se a metodologia de citometria de fluxo, seguida da avaliação de densidade estomática na epiderme abaxial das folhas. A colchicina ocasionou um efeito fitotóxico nos explantes, resultando na redução do número de brotações regeneradas por explante, com exceção para a tangerineira Clementina. Esta toxidez variou em função da variedade, do tempo de tratamento e da concentração de colchicina. As etapas de microenxertia *in vitro* e aclimatização foram eficientes, com a obtenção de mais de 40 plantas de cada variedade, sendo que a frequência observada de plantas autotetraploides detectada por citometria de fluxo, variou entre 9,3 e 21,9%. A avaliação da densidade estomática de folhas de plantas de diversas ploidias demonstrou haver uma correlação alta e negativa entre a densidade estomática e a ploidia, chegando a se observar reduções de até 50% nas densidades estomáticas de folhas de plantas autotetraploides, em relação às plantas-controle diploides.

Termos de indexação: citometria de fluxo, colchicina, melhoramento de citros, microenxertia.

¹ Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Rod. Anhangüera, Km 158, Caixa Postal 04, 13490-970, Cordeirópolis, SP.

* Autor correspondente - e-mail: rodrigo@centrodecitricultura.br.

² Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Piracicaba, SP.

SUMMARY

Induction of autotetraploid citrus plants aiming the production of triploid seedless fruits

One of the strategies for the production of citrus seedless fruits is the use of triploid varieties resulting from crosses between tetraploid and diploid plants. One of the problems for more intense use of this methodology is the low number of tetraploid cultivars available. The aim of this study was to induce autotetraploid plants of Lima and Buckeye Navel sweet oranges, Clementine mandarin and *Fortunella*, using the method of *in vitro* temporary cultivation in media containing colchicine, aiming its subsequent use as a parental in crosses with diploid plants, in order to obtain seedless triploid hybrids. The treatments consisted of the cultivation of epicotyl segments of each variety 1, 2 or 3 days in media containing colchicine at concentrations of 0.025 to 0.05% w/v, followed by the transfer of explants to Petri dishes containing the same medium without the presence of the alkaloid. At 60 days, the number of regenerated shoots per explant of all treatments was assessed. The adventitious shoots were *in vitro* micrografted and then, acclimatized to environmental conditions. Flow cytometry method was used for selection of tetraploid plants followed by the evaluation of stomata density in the abaxial epidermis of the leaves. Colchicine caused a phytotoxic effect in the explants, resulting in reduced number of regenerated shoots per explant, except for Clementine mandarin. This toxicity caused by the use of colchicine varied depending on the variety, period of the treatment (1, 2 or 3 days) and concentration of colchicine. The stages of *in vitro* micrografting and acclimatization were efficient with more than 40 acclimatized plants obtained for each variety. The observed frequency of autotetraploid plants ranged between 9.3 and 21.9%. The evaluation of stomata density of the autotetraploid plants showed a high and negative correlation with ploidy, since reductions up to 50% were observed in autotetraploid plants when compared to control plants (diploid).

Index terms: flow cytometry, colchicine, citrus breeding, micrografting.

INTRODUÇÃO

A cadeia citrícola pode ser considerada como um dos segmentos mais globalizados do agronegócio brasileiro com grande parte de sua produção voltada ao mercado externo, trazendo anualmente aproximadamente US\$ 1,5-2,0 bilhões, em divisas para o país (Neves et al., 2010). O Brasil detém a liderança mundial na produção e exportação de suco de laranja com aproximadamente 85% das exportações mundiais em 2009, mas participa pouco do mercado mundial de frutas frescas, com volume aproximado de 0,2% do total de produção de frutos na safra 2008/09 (Neves et al., 2010).

Além de questões de ordem fitossanitária e clima não ideal, outra importante razão para a baixa participação brasileira neste mercado de frutas frescas é a inexistência de variedades que atendam aos requisitos de qua-

lidade exigidos pelo mercado externo, principalmente, a comercialização de frutos sem sementes (apirenos).

Uma estratégia para a produção de frutos cítricos sem sementes é a utilização de variedades triploides ($3x=27$), como é o caso a lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia*), provavelmente originada de hibridação natural (Luchetti et al., 2003). Variedades híbridas triploides também podem ser obtidas a partir de cruzamentos de parentais diploides ($2x$) com tetraploides ($4x$) (Esen & Soost, 1973) e diploides ($2x$) X diploides ($2x$) (Esen & Soost, 1971), sendo que neste último, a frequência natural de obtenção de triploides geralmente foi muito baixa (próxima de 5%), variando em função do genótipo materno.

Um dos problemas para uso mais intenso de cruzamentos entre variedades diploides e tetraploides de citros está no baixo número de genótipos tetraploi-

des disponíveis. Segundo Soost & Cameron (1975), a maioria dos tetraploides foi obtida espontaneamente após seleção em populações de *seedlings*, mas com frequência também muito baixa, variando entre 1 e 11%, dependendo do porta-enxerto analisado (Barrett & Hutchinson, 1978; Saleh et al., 2008) e do efeito ambiental (Barrett & Hutchinson, 1982).

Plantas híbridas alotetraploides podem ser obtidas com o uso da técnica de hibridação somática via fusão de protoplastos (Grosser et al., 2000; Grosser & Gmitter, 2005). Já plantas autotetraploides podem ser obtidas a partir do tratamento *in vivo* ou *in vitro* de diferentes propágulos (Dhooghe et al., 2011), incluindo gemas axilares (Barret, 1974; Wakana et al., 2005), óvulos (Gmitter Jr. & Ling, 1991), calos embriogênicos (Gmitter Jr. et al., 1991; Wu & Mooney, 2002), protoplastos (Zeng et al., 2006), suspensões celulares (Dutt et al., 2010) e segmentos de epicótilo (Latado et al., 2007), com substâncias antimitóticas, tais como a colchicina e a orizalina.

Nos trabalhos de obtenção *in vitro* de plantas cítricas autotetraploides, o aumento da eficiência e a redução no tempo de obtenção das plantas autotetraploides podem ser obtidos com a utilização de protocolos de alta eficiência de regeneração de plantas, por meio da indução de brotações adventícias *in vitro* utilizando-se segmentos de epicótilo (Latado et al., 2007), ou pela indução de embriões a partir de calos (Gmitter et al., 1991). Para superar problemas de enraizamento das brotações regeneradas, a microenxertia *in vitro* sobre plantas estioladas de variedades de porta-enxerto tem sido utilizada com sucesso em vários trabalhos.

Vários autores relataram o uso da técnica de citometria de fluxo para a identificação das plantas auto ou alotetraploides, já que a técnica apresenta como vantagens a precisão, rapidez e facilidade de uso (Wu & Mooney, 2002). No entanto, técnicas citogenéticas como a contagem do número de cromossomos de células de ponta de raiz, também podem ser utilizadas.

O objetivo do presente estudo foi induzir plantas autotetraploides de variedades de copa de citros através do método do cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo temporariamente em meio contendo colchicina, visando o seu uso posterior como parental em cruzamentos com variedades diploides, para obter híbridos triploides com frutos sem sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo sementes de laranjeiras Lima (clone novo 9 = CN 9) e Buckeye Navel (CN 20), tangerineira Clementina (Clone velho = CV 175) e *Fortunella* cv. Meiwa (CV 424), extraídas de frutos resultantes de polinização aberta, colhidos de plantas mantidas no Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira / IAC.

Segmentos de epicótilo, com tamanho de 1,0 cm, foram extraídos de plântulas cultivadas *in vitro*. Estas foram obtidas partir de sementes germinadas *in vitro* e cultivadas durante 30 dias em meio semi-sólido composto por somente sais de MS e 7,0 g L⁻¹ de ágar, em condições de escuro.

O meio de cultivo utilizado para o tratamento temporário com colchicina e para a regeneração de brotações era composto por sais de MS, acrescido de 0,5 g L⁻¹ de extrato de malte, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 50 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 7,0 g L⁻¹ de ágar e pH, ajustado para 6,0. Quando usada, a solução aquosa contendo colchicina (Sigma Corp.) foi filtro-esterilizada com uso de membrana filtrante de 0,22 µm e, a seguir, adicionada ao meio de cultivo já autoclavado.

Os tratamentos testados foram compostos por cultivo temporário de 100 segmentos de epicótilo de cada variedade, durante 1, 2 ou 3 dias, no meio de cultivo contendo as concentrações de colchicina de 0,025 e 0,05% p/v, em condições de escuro e a temperatura de 25 ± 1 °C. Após este período, os explantes foram transferidos para placas contendo o mesmo meio de cultura, mas sem a presença do alcaloide, sob fotoperíodo de 16 horas de luz (50 µmol m⁻² s⁻¹) e mesma temperatura, até a regeneração de brotações. O controle experimental foi formado por placas de Petri contendo 50 explantes de cada variedade cultivados em meio sem colchicina.

Aos 60 dias de cultivo foi realizada a avaliação do número de brotações regeneradas por explante. Os dados de número de brotações por explante foram transformados pela equação raiz de (X + 0,5) para uso em análises de variância de cada variedade separadamente, considerando o experimento como em delineamento inteiramente casualizado e apenas um fator: tratamento. Foram realizados os testes F e de Tukey a 5% de probabilidade.

As brotações adventícias regeneradas foram microenxertadas *in vitro* em plântulas de citrumelo Swingle, com cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 30 a 60 dias. Para a aclimatização, as brotações desenvolvidas foram sobre-enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) e mantidas em câmara úmida durante 30 dias, sendo a seguir, transferidas para estufas, sob condições de temperatura e umidade relativa não-controladas, mantendo-se sempre a identificação do tratamento utilizado (tempo de cultivo e concentração da colchicina).

Todas as plantas aclimatizadas de cada variedade tiveram a sua ploidia avaliada utilizando o método de citometria de fluxo citado por Latado et al. (2007), utilizando-o equipamento Partec CyFlow Ploidy Analyzer DAPI (PartecGmbH., Alemanha), que é equipado com lâmpada UV-LED (com emissão de luz no comprimento de 365 nm) e um parâmetro ótico, para detecção de fluorescência.

A densidade estomática de folhas de plantas autotetraploides e das plantas-controle foi avaliada em cinco folhas novas, completamente expandidas, coletadas de plantas com idade de um ano. As folhas foram lavadas e, em seguida, segmentos de folhas (0,5 x 0,5 cm) foram excisados e imersos em solução de KOH (5N) fervente, durante 1 minuto, seguido de imersão em água corrente. A epiderme abaxial de cada amostra foi destacada com auxílio de pinça, transferida para uma lâmina e coberta por lamínula. A avaliação do número de estômatos foi realizada com uso de microscópio ótico e aumento de 400X, observando-se cinco

campos de visão por segmento de folha, com área de $0,163 \text{ mm}^2$ por campo de visão. Em seguida calculou-se a densidade estomática média de cada amostra, em mm^2 . As médias foram submetidas à análise de variância, com uso do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do número de brotações adventícias regeneradas por explante, realizada aos 60 dias após a inoculação dos segmentos de epicótilo (Figura 1), demonstrou que, as variedades utilizadas no presente estudo apresentaram baixa taxa de regeneração de brotações por explante, mesmo no tratamento do controle, variando entre 0,18 e 0,55 brotação por segmento de epicótilo (Figura 2).

Almeida (2002) testou diversas concentrações de BAP no meio de indução de organogênese usando segmentos de epicótilo de laranjeiras Natal, Valência e Hamlin e determinaram que a concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi a melhor para as três variedades, com taxas médias de regeneração de 1,6, 1,8 e 2,4 brotações por explante, respectivamente. Moura et al. (2001) também observaram resultado semelhante com laranja Pêra, com a obtenção de média de 2,5 brotações por explante quando adicionaram $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultura.

Outra constatação do presente estudo foi a de que a colchicina ocasionou um efeito fitotóxico nos explantes, resultando na redução do número de brotações regeneradas por explante, com exceção para a tangeri-

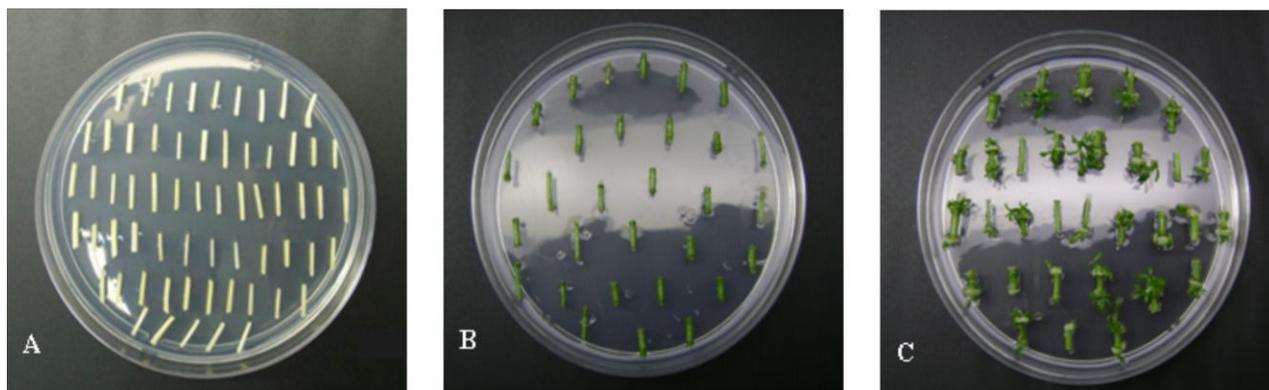


Figura 1. Cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo. A) explantes em meio contendo colchicina; B) explantes após duas semanas de cultivo em meio de regeneração e C) explantes formando brotações adventícias após 60 dias em meio de regeneração.

neira Clementina, em que não se observou diferenças estatísticas significativas (Figura 2). Alguns tratamentos foram tão fitotóxicos que os explantes não conseguiram regenerar nenhuma brotação.

Os efeitos deletérios do tratamento de células e tecidos vegetais com colchicina já foram relatados por vários autores. Gmitter et al. (1991) e Gmitter & Ling (1991) observaram reduções na capacidade de regeneração e até a mortalidade de calos e de óvulos imaturos de várias espécies de citros quando cultivados em meio contendo colchicina.

No presente estudo observou-se que a toxidez causada pelo uso da colchicina variou em função da variedade, assim como do tempo de tratamento e da concentração de colchicina utilizada. A laranjeira Bu-

ckeye Navel demonstrou ser a mais sensível a colchicina, pois apresentou grande redução (estatisticamente significativa) no número de brotações em qualquer tratamento (concentração e tempo de tratamento). Em seguida, vieram a laranjeira Lima e a *Fortunella*, e por último, a tangerineira Clementina, em que não se observou toxidez (Figura 2).

Wu & Mooney (2002) também observaram diferenças entre variedades cítricas quanto à sensibilidade de explantes à colchicina. Segundo estes, os calos de tangerineira Clementina Caffin apresentavam menor sensibilidade ao tratamento comparando-se com os calos de tangoreira Umatilla, enquanto que os calos de tangoreira Dweet e pomeleira Wheeny foram os que apresentaram os sintomas menos pronunciados de toxidez.

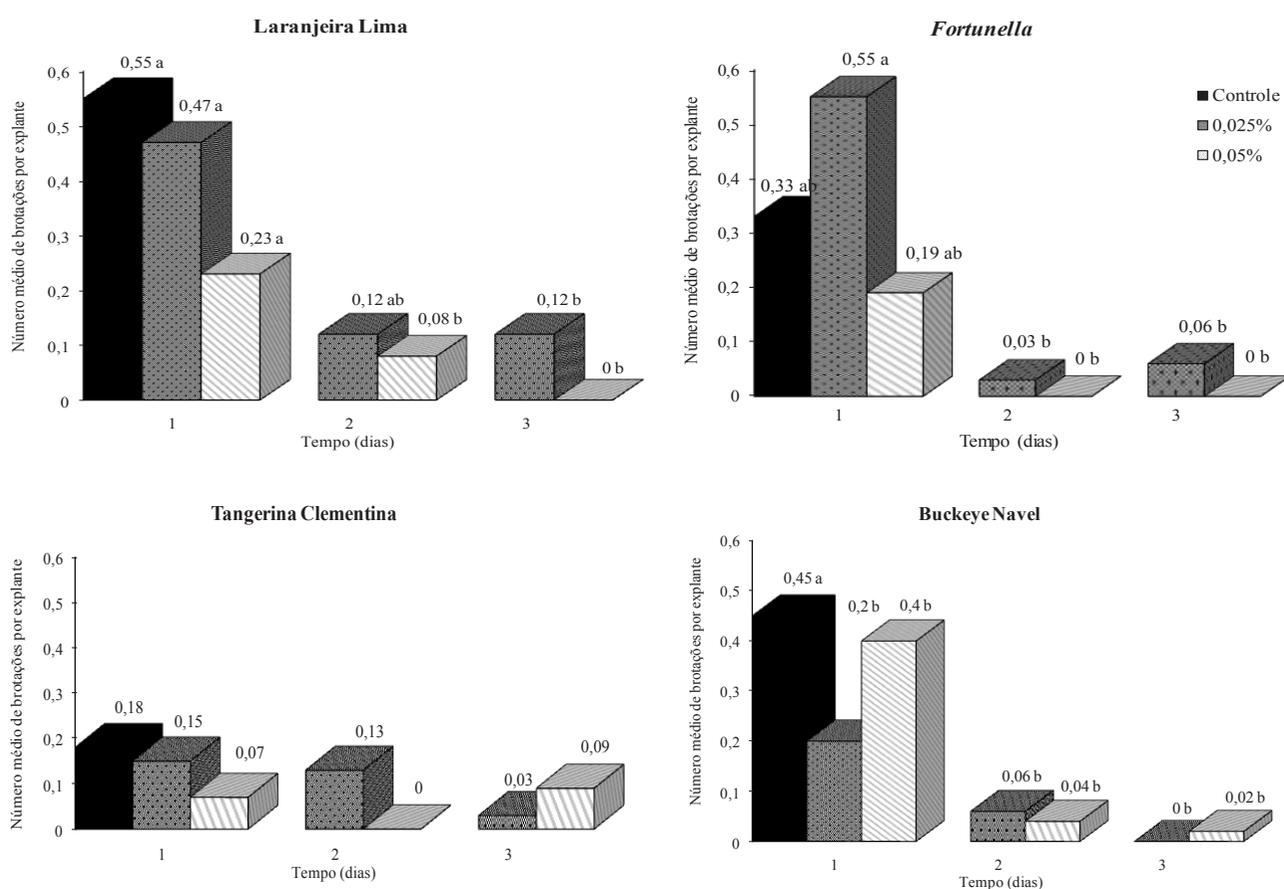


Figura 2. Número médio de brotações adventícias obtidas por segmento de epicótilo de variedades de copa de citros, em função dos diversos tempos de tratamento e das diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo.

Os dados indicam que, para a laranjeira Lima e para a *Fortunella*, o tempo de tratamento foi mais importante para a expressão da toxidez do que a concentração de colchicina, pois pôde-se observar que a exposição dos explantes durante dois dias foi excessivamente tóxica, ocasionando uma redução acentuada no número médio de brotações regeneradas (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Latado et al. (2007), com trabalho de indução de tetraploides em laranjeira Pêra-de-abril, tangoreira Murcote e tangerineira Ponkan.

O total de microenxertias *in vitro* realizadas em cada variedade foi de 52 e 63, para laranjeiras Lima e Buckeye Navel, respectivamente; 55 microenxertias, para tangerineira Clementina, e 46, para *Fortunella* cv. Meiwa, com taxa média de sobrevivência das brotações microenxertadas próxima de 95,3%.

A fase de microenxertias *in vitro* foi considerada como essencial (Figura 3), pois seu objetivo foi desenvolver as brotações de forma mais eficiente e num menor espaço de tempo. Isto ocorre devido ao suporte dado pela planta *in vitro*, usada como porta-enxerto, que tem a capacidade de nutrir mais eficientemente a brotação enxertada, não necessitando de gastos de energia com enraizamento. Assim, torna-se possível evitar a fase de enraizamento direto das brotações, etapa considerada como uma das mais problemáticas nos trabalhos que envolvem organogênese de citros (Figura 3). O método de aclimatização utilizado foi também considerado como eficiente, pois resultou em 100% das plântulas microenxertadas, e num curto espaço de tempo, aproximadamente 45 dias.

O número total de plantas avaliadas por citometria de fluxo, a frequência de obtenção de plantas autotetraploides, assim como a lista de tratamentos que as induziram nas quatro variedades, estão citados na Tabela 1. Estes dados demonstram que foram obtidas várias plantas autotetraploides de cada variedade, o que é excelente para as etapas futuras, em que serão realizados os cruzamentos com as plantas diploides. Isto possibilitará selecionar as melhores plantas tetraploides e eliminar as plantas que porventura apresentem alguma alteração genética (plantas com problemas de desenvolvimento e/ou que produzem flores estéreis).

Dentre as variedades estudadas, a laranjeira

Lima (Figuras 4A e 4B) e a *Fortunella* foram as que apresentaram as maiores frequências de plantas autotetraploides, 17,4 e 21,9%, respectivamente, seguido da tangerineira Clementina, com 14,0% e da laranjeira Buckeye Navel, com 9,3% (Tabela 1). As duas concentrações de colchicina utilizadas foram eficientes na indução de plantas autotetraploides, porém a concentração de 0,025% de colchicina foi melhor para a indução de plantas 4x na laranjeira Lima e na *Fortunella*. Em relação ao tempo de tratamento com colchicina, os melhores resultados foram observados quando se mantiveram os explantes durante dois dias no meio contendo o alcaloide (Tabela 1).

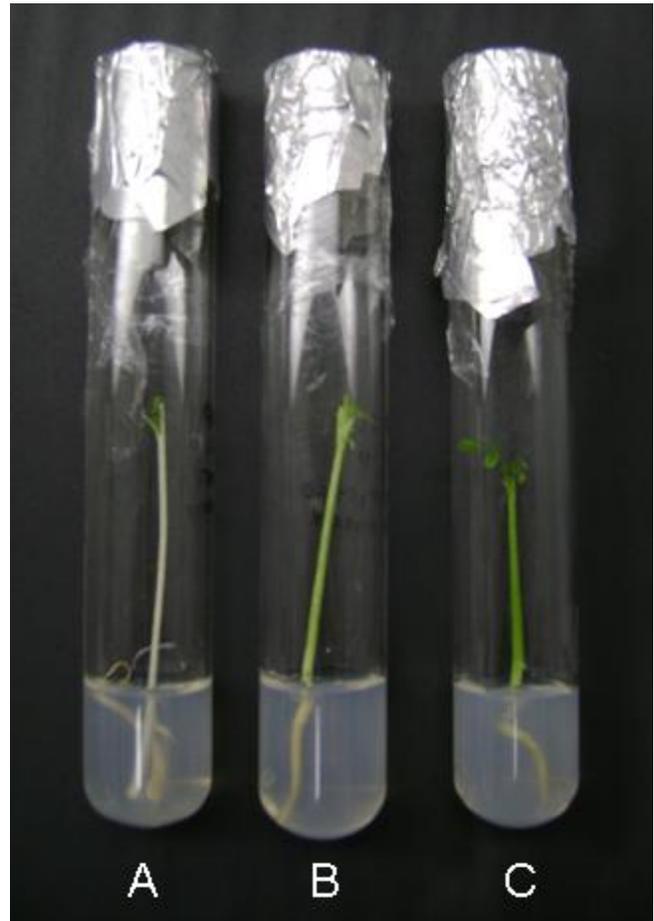


Figura 3. Gemas adventícias microenxertadas *in vitro*. A) um dia após a microenxertia; B) brotação se desenvolvendo uma semana após a microenxertia; C) brotação se desenvolvendo três semanas após a microenxertia.

Tabela 1. Número de plantas com ploidia avaliada pelo método de citometria de fluxo, número e frequência de plantas autotetraploides e os respectivos tratamentos em que foram obtidas

Variedade	Número de plantas avaliadas	Número e frequência de plantas 4x (%)	Tratamentos que induziram plantas 4x
laranjeira Lima	46	8 (17,4)	(0,025%-1d, 1d, 2d, 2d, 2d, e 3d) (0,05%-2d e 3d)
laranjeira Buckeye Navel	54	5 (9,3)	(0,025%-1d, 2d e 2d) (0,05%-1d e 3d)
Tangerineira Clementina	50	7 (14,0)	(0,025%-1d, 2d e 3d) (0,05%-2d, 2d, 2d e 3d)
<i>Fortunella cv. Meiwa</i>	41	9 (21,9)	(0,025%-1d, 1d, 2d, 2d, 2d e 3d) (0,05%-1d, 2d e 3d)

1d = 1 dia de tratamento em meio contendo colchicina, 2d = 2 dias e 3d = 3 dias

0,025% e 0,05% = concentração de colchicina adicionada ao meio de cultivo.

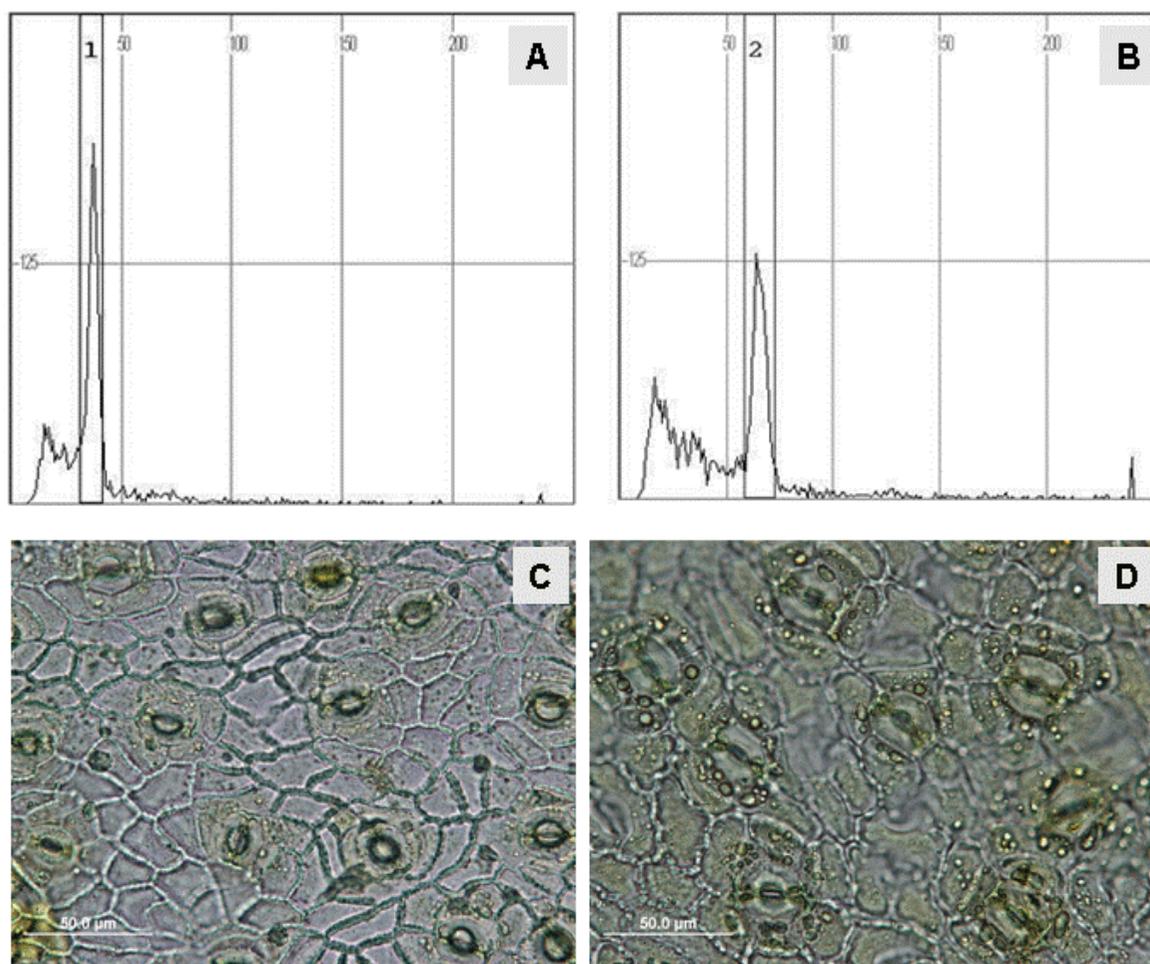


Figura 4. Histogramas obtidos por análises de citometria de fluxo de suspensões nucleares de: A) laranja Lima controle (2x); B) laranja Lima autotetraploide (4x). Face abaxial da folha de: C) laranja Lima controle (2x) e D) laranja Lima autotetraploide (4x), contendo os estômatos.

Tabela 2. Ploidia estimada e densidade estomática de folhas de três plantas autotetraploides (4x) de diversas variedades de copa e das respectivas plantas-controle

Amostra	Densidade estomática (estômatos/mm ²) *	Ploidia estimada **
laranjeira Lima	362,7 a	2x
planta 1	185,5 b	4x
planta 2	198,7 b	4x
planta 4	214,0 b	4x
laranjeira Buckeye Navel	421,2 a	2x
planta 12	204,7 b	4x
planta 14	226,6 b	4x
planta 18	200,5 b	4x
tangerineira Clementina	538,8 a	2x
planta 2	280,7 b	4x
planta 3	270,5 b	4x
planta 4	312,4 b	4x
<i>Fortunella</i> cv. Meiwa	366,5 a	2x
planta 7	189,4 b	4x
planta 9	137,8 b	4x
planta 10	165,9 b	4x

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey com 5% de probabilidade * média de 25 leituras, sendo cada média composta por cinco segmentos de folha de uma mesma planta e com observação de cinco campos de visão, por segmento de folha

** ploidia estimada, considerando a respectiva planta controle como sendo diploide.

A avaliação da densidade estomática de folhas de plantas de diversas ploidias demonstrou haver alta correlação alta, porém negativa, entre a densidade estomática e a ploidia, chegando a se observar reduções de 50% nas densidades estomáticas de folhas de plantas autotetraploides, em relação às plantas-controle diploides (Tabela 2, Figuras 4C e 4D). Assim, as plantas do controle (diploides) apresentaram densidade estomática variando entre 362,7 e 538,8 estômatos/mm², enquanto que as plantas autotetraploides apresentam folhas com densidade variando entre 137,8 e 312,4 estômatos por mm² (Tabela 2).

Em citros, Allario et al. (2011), comparando plantas diploides e autotetraploides de limão Cravo, verificaram que o tamanho dos estômatos, expresso pela área da célula-guarda, das plantas tetraploides

eram significativamente maiores, com valores de 490 μm^2 , enquanto que as plantas diploides apresentavam estômatos com 290 μm^2 . Já em relação à densidade estomática, foi possível observar uma redução deste parâmetro nas plantas tetraploides (270 estômatos/mm²) em relação as plantas diploides (400 estômatos/mm²).

As plantas autotetraploides foram multiplicadas vegetativamente por meio de enxertia, com plantio de clones no campo e em casa de vegetação. Enquanto aguarda-se o início da fase reprodutiva destas plantas, observou-se que as plantas tetraploides apresentam algumas características morfológicas comuns, mas diferenciais em relação às suas respectivas plantas originais: folhas mais espessas, com coloração verde mais intensa e com a presença de glândulas de óleo mais protuberantes na superfície.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Tadeo F, Froelicher Y, Talon M, Navarro L, Ollitrault P, Morillon R (2011) Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany* 62(8):2507–2519.
- Almeida WAB (2002) Caracterização Anatômica da Organogênese *in vitro* e Transformação Genética Via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus* sp. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 138p.
- Barret HC (1974) Colchicine-induced polyploidy in *Citrus*. *Botanical Gazette* 135:29-34.
- Barrett HC, Hutchinson DJ (1978) Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. *Economical Botany* 32:27–45.
- Barrett HC, Hutchinson DJ (1982) Occurrence of a spontaneous octaploid in apomictic seedlings of a tetraploid *Citrus* hybrid. In: *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1:29–30.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104(3):359-373.
- Dutt M, Vasconcellos M, Song KJ, Gmitter Jr FG, Grosser JW (2010) *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. *Euphytica* 173:235–242.
- Esen A, Soost RK (1973) Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in *Citrus*. *The Journal of Heredity* 64:147-154.
- Esen A, Soost RK (1971) Unexpected triploids in citrus: their origin, identification and possible use. *The Journal of Heredity* 62:329–333.
- Gmitter FG, Ling XB, Cai CY, Grosser JW (1991) Colchicine induced polyploidy in citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science* 74:135–141.
- Gmitter Jr FG, Ling XB (1991) Embryogenesis *in vitro* and non-chimeric tetraploid plant-recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. *Journal of the American Society for Horticultural Science, Geneva* 116:317-321.
- Grosser JW, Gmitter Jr FG (2005) Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Gaithersburg 41:220-225.
- Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster (2000) Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Gaithersburg 36:434-449.
- Latado RR, Cristofani-Yaly MC, Carvalho CR, Machado MA (2007) Plantas autotetraploides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:1429-1435.
- Luchetti MA, Mattos Jr D, De Negri JD, Figueiredo JO (2003) Aspectos gerais e distribuição de cultivo. In: Mattos Jr D, De Negri JD, Figueiredo JO (Ed.). *Lima ácida Tahiti*, Campinas: IAC 1:1-12.
- Moura TL, Almeida WAB, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA (2001) Organogênese *in vitro* de citros em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23(2):240-245.
- Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R (2010) *O Retrato da Citricultura Brasileira*, Markestrat, São Paulo, 137 p.
- Saleh B, Allario T, Dambier D, Ollitrault P, Morillon R (2008) Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes rendus biologies* 331:703–710.
- Soost RK, Cameron JW *Citrus*. In: Jannick J, Moore JN (Ed.) (1975) *Advances in fruit breeding*. West Lafayette: Purdue University Press: 507-540.
- Wakana A, Hanada N, Park SM, Fukudome I, Kajiwara K (2005) Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axillary buds treated with colchicine. *Journal of the*

Faculty of Agriculture Kyushu University, Fukuoka
50: 93-102.

Wu JH, Mooney P (2002) Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70:99-104.

Zeng SH, Chen CW, Hong L, Liu JH, Deng X X (2006) In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in Citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87(1):85-93.

Recebido: 27/06/2012 – Aceito: 30/10/2012
(CRT 054-12)