REGENERACION in vitro MEDIANTE EMBRIOGENESIS SOMATICA DE VARIEDADES DE CITRICOS. II. EFECTO DEL 'PLATEO' DE SUSPENSIONES CELULARES EN MEDIO DE CULTIVO CON DIFERENTES CARBOHIDRATOS SOBRE LA INDUCCION DE EMBRIONES^{1/*}

Víctor M. Jiménez ** Eric Guevara 2/**

ABSTRACT

In vitro plant regeneration of citrus through somatic embryogenesis. II. Effect of 'plating' cell suspension cultures on culture media with different carbohydrates on embryo induction. The effect of 'plating' cell suspension cultures from different citrus cultivars upon somatic embryogenesis was studied. Cells taken from suspensions were cultured on a semisolid medium containing sucrose, glicerol, galactose or lactose. A reduced embryogenic behavior was observed on cells taken from aged cultures. The transfer of cells estimulated by itself the embryogenic process. The carbohydrate source affected the growth and further development of embryos. The higher number and faster formation of embryos was observed on medium containing sucrose, followed by glicerol, lactose and galactose. Only with sucrose was growth and subsequent development of explants achieved. Transfer of embryos obtained to a sucrose-containing medium stimulated their development. The effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in citrus is discussed.

INTRODUCCION

En cítricos, la nucela y los tejidos derivados de ella presentan una alta capacidad embriogénica in vitro. El callo friable embriogénico obtenido a partir de tejido nucelar constituye la fuente más apropiada para la obtención de suspensiones celulares y protoplastos capaces de formar plantas (Kochba et al., 1972).

Este callo está compuesto por conglomerados de proembriones, y su proliferación ocurre por formación a partir de células individuales de nuevos proembriones (Button et al., 1974). Esto permitiría la obtención de mutantes sólidos después de la aplicación de tratamientos mutagénicos, contrario a lo que ocurre con embriones de origen multicelular (Kochba y Spiegel-Roy, 1977a). Si además se toma en cuenta que a diferencia de otros materiales vegetales, los embriones somáticos obtenidos a partir de callo de cítricos conservan identidad genética con la planta madre, se comprende que el conocimiento de este material constituya un aspecto importante de considerar en los programas para el mejoramiento genético, tanto a nivel de variedades productoras

^{1/} Recibido para publicación el 1 de diciembre de 1995.

^{2/} Autor para correspondencia.

Incluye parte de la tesis de M.Sc. presentada por el primer autor al Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales, Universidad de Costa Rica.

Parte de esta investigación fue financiado por el Ministerio de Cooperación Económica de la República Federal de Alemania bajo el Convenio Germano-Israelí: de Investigación para el Beneficio del Tercer Mundo (GIARA).

Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. El segundo autor es beneficiario del Programa de Apoyo a Investigadores que patrocina el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

de fruto como de patrones comerciales (Grosser, 1992).

Los factores que afectan la embriogénesis somática en callos de cítricos han sido ampliamente estudiados (Kochba y Spiegel-Roy, 1977a). Dentro de éstos se encuentran la adición de reguladores de crecimiento (Kochba y Spiegel-Roy, 1973, 1977b y 1977c; Kochba *et al.*, 1978a; Pasqual *et al.*, 1988; Gmitter *et al.*, 1990), de extracto de malta (Kochba y Spiegel-Roy, 1973), y de diferentes carbohidratos (Kochba y Button, 1974; Kochba *et al.*, 1977; Button, 1978; Kochba *et al.*, 1978b y 1982; Ben-Hayyim y Neumann, 1983; Singh *et al.*, 1992).

El callo no representa sin embargo la manera más eficiente de propagación de materiales en los cuales se ha promovido la incorporación de modificaciones genéticas. El establecimiento de suspensiones celulares con un alto potencial embriogénico a partir de estos callos, representaría una forma ideal de multiplicación masiva, ya que su tasa de división es muy elevada. Al estar cada célula en capacidad de producir una planta completa, permitiría una rápida proliferación del material vegetal para su evaluación y selección.

Generalmente el cultivo en suspensión celular inhibe la embriogénesis somática, la cual sólo se expresa cuando las células se transfieren a medio sólido. Este proceso, conocido como 'plateo', es la vía más directa y simple para la obtención de embriones. No obstante, a diferencia de lo que ocurre con los callos friables, no existen estudios precisos sobre los factores que afectan el desarrollo embriogénico durante el 'plateo' de suspensiones celulares de cítricos, a pesar de su amplia utilización (J.W. Grosser, 1994, Citrus Research and Education Center (CREC), Lake Alfred, Fla., EE.UU., comunicación personal). Dado que las condiciones en que se realice el 'plateo' pueden llegar a ser determinantes en la obtención de materiales promisorios, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes carbohidratos en un medio de cultivo semisólido, sobre la eficiencia de 'plateo' de suspensiones celulares de diferentes cultivares comerciales de cítricos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron suspensiones celulares previamente establecidas a partir de callo friable de los materiales descritos en el Cuadro 1. Las suspensiones provenientes de cultivares del CREC tenían 5 semanas de iniciadas, y las de los cultivares locales 4 meses (Jiménez y Guevara, 1995). Todas las suspensiones se iniciaron en el medio de cultivo ' $\frac{1}{2}$ + $\frac{1}{2}$ ' (Grosser y Gmitter, 1990) y se subcultivaron en el mismo medio cada 2 semanas.

El 'plateo' se realizó colocando alícuotas de 0,5 ml de células asentadas de las suspensiones celulares en medios de cultivo semisólido, contenidos en platos de Petri de 9 cm de diámetro. Esto se efectuó con ayuda de una pipeta de boca ancha. Posteriormente se agregó a cada plato 3-4 gotas del medio de cultivo líquido de la suspensión y se distribuyó el conjunto de manera uniforme con ayuda de tubos de vidrio doblados, con cuidado de no dañar la superficie del medio (Reinert y Yeoman, 1982).

El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales minerales y las vitaminas descritas por Murashige y Tucker (1969) (MT), al cual se añadieron diferentes carbohidratos. En todos los casos el pH se ajustó a 5,8; se gelificó con 8 g/L de

Cuadro 1. Descripción y procedencia de los callos friables utilizados para la obtención de suspensiones celulares.

	Cultivar	Edad del callo	Procedencia ¹	
(C. sinensis cv. 'Ridge'	3 años y 7 meses	CREC	
(C. sinensis cv. Acosta 6	1 año	Costa Rica	
(C. sinensis cv. Washington Navel	1 año	Costa Rica	
	C. jambhiri cv. 'Milam'	3años y 8 meses	CREC	
	C. mitis	2 años y 8 meses	CREC	
	C. reticulata cv. Dancy	4 años y 7 meses	CREC	
	C. reticulata cv. Cleopatra	2 años y 2 meses	CREC	
	C. limon cv. LAC	2 años y 1 meses	CREC	

Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, Fla, EE.UU.

agar y se autoclavó a 121°C y 1,07 kg/cm² durante 25 min.

Para las suspensiones celulares obtenidas a partir de callos provenientes del CREC (Cuadro 1), se evaluaron los siguientes carbohidratos: sacarosa (5% p/v) (Kochba y Button, 1974), glicerol (2% v/v) (Ben-Hayyim y Neumann, 1983) y galactosa (7% p/v) (Kochba *et al.*, 1978b). Para las suspensiones de 'Washington Navel' y 'Acosta 6', se estudió además la adición de lactosa (5,7% p/v) (Button, 1978). Los cultivos se colocaron en luz continua (2600 lux) a 24-28°C. La formación de embriones fue evaluada semanalmente durante 5 semanas, período considerado como aceptable para la expresión embriogénica en cítricos (J.W., Grosser, 1994, comunicación personal).

Se efectuó un total de 3 experimentos, con 4-6 repeticiones por tratamiento y variedad vegetal.

Los embriones obtenidos fueron transferidos para su desarrollo a un medio de cultivo compuesto por las sales minerales y las vitaminas de MT, adicionado con 20 g/L de sacarosa, 0,5 g/L de carbón activado y 8 g/L de agar. El pH y las condiciones de autoclavado fueron similares al medio anterior.

RESULTADOS

Al 'platear' las suspensiones celulares obtenidas a partir de líneas del CREC se observó, al cabo de 20 días de cultivo, en el medio con sacarosa la proliferación de tejido indiferenciado (Cuadro 2). En general en el medio con glicerol hubo menor formación de este tipo de tejido, pero mayor cantidad de pequeños agregados verde oscuro, aparentemente embriogénicos. Estos agregados prácticamente no crecieron, y finalmente se

Cuadro 2. Efecto de diferentes carbohidratos sobre la formación de tejido indiferenciado (+++ alta; ++ media; + baja; - ausente) en suspensiones celulares de diferentes cultivares de cítricos 'plateadas' sobre un medio semisólido.

Tratamiento						
	'Ridge'	'Milam'	C. mitis	'Dancy'	'Cleo patra'	'LAC'
sacarosa	++	+++	+++	++	++	+
glicerol	+	+	+	+	+	_
galactosa	-	-	-	-	-	-

oxidaron, sin que ocurriera formación de embriones. El medio con galactosa no provocó ningún cambio en las células 'plateadas' durante el período de evaluación.

El Cuadro 3 presenta los resultados obtenidos en el 'plateo' de las suspensiones de 'Acosta 6' durante 5 semanas. En la primera semana sólo se observó la formación de un embrión en el medio con glicerol. En la segunda, en presencia de sacarosa, se formó gran cantidad (23%) de embriones, la mayoría en estado globular. En el tratamiento con lactosa ocurrió formación de 2 embriones. En el medio con glicerol el embrión formado anteriormente no mostró cambios, ni ocurrió formación de nuevos embriones. Al cabo de 3 semanas, en presencia de sacarosa el número de embriones aumentó de manera importante. y se comenzó a observar que algunos de ellos se encontraban en los estados característicos del proceso embriogénico: globular, acorazonado y torpedo. En esa misma semana, en el medio con glicerol ocurrió una rápida aceleración de la embriogénesis, mientras que se observó el inicio de este proceso en el medio con lactosa y la formación de únicamente 4 embriones en el medio con galactosa. En la cuarta semana, el desarrollo de los embriones formados anteriormente en presencia de sacarosa aumentó. Los embriones que ya se encontraban en estado torpedo continuaron su crecimiento. En presencia de lactosa y glicerol la cantidad de embriones formados se incrementó ligeramente (5%) en comparación con lo obtenido en presencia de sacarosa (20%). Al cabo de cinco semanas de cultivo se observó en este último medio la presencia de embriones de 2-3 mm de longitud. En los otros tratamientos, aunque hubo aumento en la cantidad de embriones formados

Cuadro 3. Efecto de la fuente de carbohidratos sobre el porcentaje de embriones somáticos formados a partir de suspensiones celulares de 'Acosta 6' 'plateadas' en medio de cultivo semisólido (* corresponde a número de embriones).

Tratamiento	Semanas después de iniciado el cultivo						
	1	2	3	4	5		
sacarosa	0	23*	50%	70%	80%		
glicerol	1*	1*	15%	20%	25%		
lactosa	0	2*	5%	10%	15%		
galactosa	0	0	4*	4*	≅ 50*		

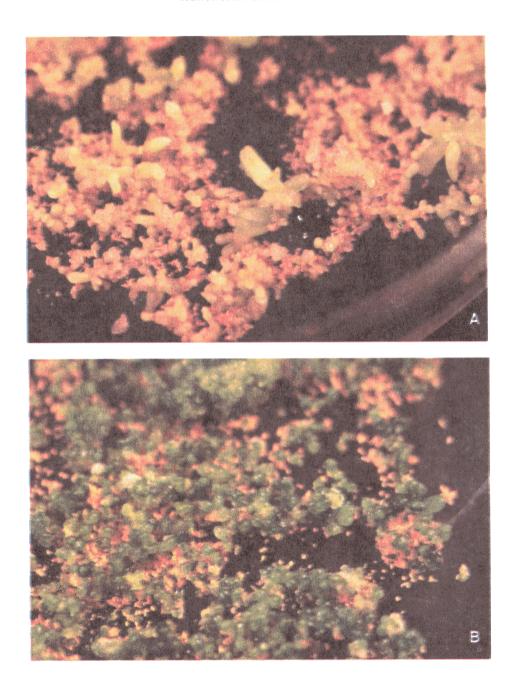


Fig.1. Influencia de la sacarosa (A) y del glicerol (B) sobre el desarrollo de embriones somáticos obtenidos a partir del "plateo" de suspensiones celulares de naranja dulce cv. Acosta 6, después de 5 semanas de cultivo. Ambas fotografías fueron tomadas a la misma distancia.

(Cuadro 3), no se observó crecimiento de los mismos. Los embriones desarrollados en el medio con sacarosa presentaron una coloración verde claro y continuaron su crecimiento (Figura 1A), contrastando con el color más oscuro y la permanencia de muchos de ellos en estado globular, de los obtenidos en los otros tratamientos, en particular glicerol (Figura 1B).

La transferencia de los embriones formados en todos los tratamientos, al medio con sacarosa y carbón activado estimuló el crecimiento y desarrollo de los mismos, llegando en su mayoría a formar plántulas con características normales. Los explantes cultivados inicialmente en presencia de sacarosa desarrollaron plantas completas con más facilidad y en un tiempo menor que los de los otros tratamientos.

Las suspensiones celulares de 'Washington Navel' no formaron embriones ni crecieron en ninguno de los tratamientos. Las células comenzaron a oxidarse rápidamente y finalmente murieron.

DISCUSION

Las suspensiones celulares originadas a partir de callo friable de cítricos pueden permanecer en estado embriogénico por períodos prolongados de tiempo (incluso por varios años) mientras se mantengan en condiciones adecuadas de cultivo (Vardi et al., 1982; y Gavish et al., 1991). No obstante, se ha observado un efecto desfavorable del cultivo prolongado sobre la capacidad de expresión embriogénica y de regeneración de plantas con características normales (J.W. Grosser, 1994, Lake Alfred, Fla., CREC, comunicación personal). Al respecto, Burns y Wetzstein (1994) observaron que la baja formación de embriones somáticos en suspensiones celulares de Carva illinoinensis estaba asociada con una reducción en el acúmulo de carbohidratos de reserva. De manera similar, Grosser (1994) atribuye la menor capacidad embriogénica presente a veces en cítricos a una disminución en los niveles de almidón de las células, por causa del cultivo prolongado. Probablemente por esta razón, las suspensiones celulares provenientes de líneas del CREC, con mucho tiempo de cultivo, no respondieron a ninguno de los tratamientos en cuanto a la formación de embriones (Cuadro 2).

En el caso de 'Washington Navel', no se logró la inducción de embriones somáticos mediante su 'plateo', a pesar de que su establecimiento *in* vitro fue relativamente reciente. Sin embargo, se ha observado embriogénesis espontánea en callos friables en cultivo (Jiménez y Guevara, 1995). Es probable que el estado de la suspensión celular en ese momento fuera un factor determinante, ya que coincidió con una disminución notable en su tasa de multiplicación (resultados no publicados). Esto sugiere que las condiciones en las que se encuentra el material del cual se toman los explantes para su cultivo *in vitro*, pueden ser determinantes en la respuesta del mismo (Pierik, 1987).

En el caso de 'Acosta 6', el tratamiento con sacarosa produjo la mayor cantidad de embriones. seguido en orden decreciente por los medios con glicerol, lactosa y galactosa. Ello contrasta con lo observado en trabajos anteriores (Kochba y Button, 1974; Kochba et al., 1977; Button, 1978; Kochba et al., 1978b, 1982; Ben-Hayyim y Neumann, 1983; Hidaka y Omura, 1989; Singh et al.. 1992) en los cuales la adición de sacarosa resultó ser poco eficiente. Kochba y Button (1974) postulan que este carbohidrato sincroniza el tejido embriogénico de cítricos hacia la proliferación de proembriones, y en consecuencia inhibe la embriogénesis. Esta inhibición ocurre en forma tan generalizada, que incluso este carbohidrato se utiliza con frecuencia para suprimir la embriogénesis en protoplastos nucelares en los protocolos de hibridación somática en cítricos (Ohgawara et al., 1994).

Los resultados de este trabajo sugieren que, en el caso del cv. 'Acosta 6', el 'plateo' produjo un efecto estimulador sobre la embriogénesis independientemente del carbohidrato utilizado. Transferir los explantes de una condición de cultivo líquido en agitación a una en cultivo semisólido inmoviliza las células, lo que permite el desarrollo de polaridad en el transporte de auxinas e inicia la simetría bilateral, característica de las primeras etapas de la embriogénesis (Bangerth, 1995, Stuttgart, Alemania, Universidad de Hohenheim, comunicación personal). En consecuencia, es probable que el efecto del carbohidrato fuera posterior al estímulo embriogénico.

Una vez inducida la formación de embriones, aquellos cultivados en presencia de sacarosa pudieron utilizar rápidamente este carbohidrato como fuente energética y metabolito, lo cual permitió el crecimiento de estructuras diferenciadas. La sacarosa ha mostrado ser un compuesto muy usado y efectivo para el cultivo *in vitro* de cítricos (Button, 1978), y se utiliza generalmente como única fuente de carbohidratos para 'platear' y regenerar protoplastos (J.W. Grosser, 1994, Comunicación personal).

En el caso del glicerol, sólo algunos cultivares de cítricos son capaces de utilizarlo y metabolizarlo. En éstos la membrana plasmática posee características que permiten el transporte de este compuesto dentro de la célula (Ben-Hayvim y Neumann, 1983), y una vez ahí, por medio de algún mecanismo todavía no conocido, libera las células de una fase de arresto embriogénico (Gavish et al., 1991). Además de la embriogénesis, el glicerol estimula la síntesis de clorofila (Vu et al., 1993) lo que explica la coloración más oscura de estos cultivares. Tanto la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEP) como la sacarosa fosfato sintetasa (SPP) son además, más activas en presencia de glicerol (Vu et al., 1993). Es probable que el glicerol tuviera un efecto inductor sobre la embriogénesis, pero que al no poder ser metabolizado rápidamente como fuente energética por los embriones recién formados, éstos no pudieran desarrollarse. Al respecto, la tinción con lugol de callos de los diferentes cultivares estudiados, luego de su digestión con una solución enzimática, mostró la presencia de gran cantidad de gránulos de almidón, en la cv. 'Acosta 6' en contraste con la menor presencia de estos en los cultivares procedentes del CREC (resultados no publicados). Esto concuerda con los resultados de Kobayashi et al. (1984), quienes mencionan que callos con poco tiempo de cultivo presentan niveles elevados de almidón. Esto permite explicar la mayor expresión embriogénica en el caso del cv. 'Acosta 6' (Figura 1b). Por otra parte, Vu et al. (1993) han observado que callos cultivados en presencia de sacarosa presentan una mayor concentración de azúcares solubles, en comparación con callos cultivados con glicerol.

A pesar de que se ha encontrado que la galactosa induce la embriogénesis en varios cultivares de cítricos (Kochba *et al.*, 1978b y 1982), se considera que es un compuesto tóxico para muchos tejidos, ya que la acumulación de galactosal-fosfato impide la conversión de UDP-glucosa a glucosal-fosfato, con lo cual la biosíntesis de almidón y celulosa son inhibidos, limitando el crecimiento y el desarrollo embriogénico.

Button (1978) y Singh *et al.* (1992) encontraron que la lactosa estimuló la embriogénesis en callos de cítricos, probablemente debido a un efecto fisiológico más que de suplemento de

energía. Button (1978) postuló la posibilidad de que parte de la lactosa fuera degradada en sus monosacáridos componentes (glucosa y galactosa) durante el autoclavado (tal y como se probó posteriormente que ocurre con la sacarosa, Schenk *et al.*, 1991). Es probable que la galactosa liberada de esta manera ejerciera cierto efecto tóxico sobre las células de 'Acosta 6', aunque menos notorio que en el tratamiento con galactosa, debido a la menor concentración en el medio.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las condiciones en que se encuentra el material vegetal previo al proceso de 'plateo' influyen en la respuesta del mismo, lo cual constituye un indicador de la capacidad embriogénica de las suspensiones. La importancia de la presencia de sacarosa en el medio de cultivo debe considerarse en el caso de ciertos cultivares, y se puede pensar que su combinación con otros carbohidratos inductores del proceso embriogénico, tales como el glicerol, podría incrementar la obtención de embriones y su posterior desarrollo.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a J.W. Grosser por la donación de los callos friables de cítricos provenientes de su laboratorio.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de 'platear' suspensiones celulares de cultivares de cítricos sobre la inducción de la embriogénesis somática. Células provenientes de esas suspensiones fueron cultivadas en medios semisólidos con sacarosa, glicerol, galactosa o lactosa. La capacidad embriogénica fue menor en los materiales vegetales con más tiempo de cultivo en condiciones in vitro. Para el 'Acosta 6', la transferencia de las células en suspensión a un medio sólido constituye por sí mismo un estímulo inductor de la formación de embriones. El carbohidrato presente en el medio de cultivo afectó el desarrollo subsecuente de los embriones formados. El tratamiento con sacarosa fue el que estimuló en mayor grado el desarrollo embriogénico, seguido por los tratamientos con glicerol, lactosa y galactosa. Se discuten los efectos de los carbohidratos en la embriogénesis somática de los cítricos.

LITERATURA CITADA

- BEN-HAYYIM, G.; NEUMANN, H. 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. Z. Pflanzenphysiol. 110:331-337.
- BURNS, J.A.; WETZTEIN, H.Y. 1994. Storage reserves in pecan somatic embryos derived from suspension culture. Plant Sci. 102:213-219.
- BUTTON, J. 1978. The effects of some carbohydrates on the growth and organization of *Citrus* ovular callus. Z. Pflanzenphysiol. 88:61-68.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. 1974. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). J. Exp. Bot. 25:446-457.
- GAVISH, H.; VARDI, A.; FLUHR, R. 1991. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. Physiol. Plant. 82:606-616.
- GMITTER, F.G., Jr.; LING, X.B.; DENG, X.X. 1990. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. Theor. Appl. Genet. 80:785-790.
- GROSSER, J.W. 1992. The role of biotechnology in the development of improved *Citrus* scion and rootstock cultivars. In Transactions of the 1992 Citrus Engineering Conference. Florida Section of the American Society of Mechanical Engineers, 38:24-37.
- GROSSER, J.W. 1994. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion and culture. HortScience 29(11):1241-1243.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, Jr., F.G. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breeding Rev. 8:339-374.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. 1989. Control of embryogenesis in Citrus cell culture: Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. Bull. Fruit Tree Res. Stn. B 16:1-17.
- JIMENEZ, V.; GUEVARA, E. 1995. Regeneración in vitro mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos. I. Obtención de callo friable y suspensiones celulares de naranja dulce (Citrus sinensis) y naranja agria (C. aurantium) cultivadas en Costa Rica. Agronomía Costarricense 19(2): 7-18.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. 1984. Inductions of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osb) ovules, and uniformity of regenerated plants. Bull. Fruit Tree Res. Stn E. 5:43-54.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzenphysiol. 73:415-421.

- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of 'Shamouti' orange (Citrus sinensis). Z. Pflanzenzücht. 69:156-162.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. 1977a. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of citrus. HortScience 12(2):110-114.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. 1977b. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange as affected by auxin and tissue age. Env. Exp. Bot. 17:151-159.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. 1977c. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (Citrus sinensis). Z. Pflanzenphysiol. 81:283-288.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. Planta 106:237-245.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. 1978a. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, Ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA3. Z. Pflanzenphysiol. 89:427-432.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S.; NEUMANN, H. 1977. Effect of galactose and galactose containing sugars on embryogenesis in *Citrus* callus. Acta Hort. 78:185.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAAD, S.; NEUMANN, H. 1978b. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* tissue culture by galactose. Naturwissenschaften 65:261-262.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. 1982. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. Z. Pflanzenphysiol. 105:359-368.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. First Intl. Citrus Symp. 3:1155-1161.
- OHGAWARA, T.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S.; KOBAYASHI, S. 1994. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. In Somatic hybridization in crop improvement I. Ed. by Y.P.S. Bajaj. Berlin, Springer-Verlag. v. 27, p. 439-454.
- PASQUAL, M.; ANDO, A.; CROCOMO, O.J. 1988. Influência de reguladores de crescimento sobre a embriogênese in vitro de nucelos de *Citrus sinensis* cv. Valência. Pesq. Agropec. Bras. 23(3):255-259.
- PIERIK, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Dordrecht, Holanda, Martinus Nijhoff. 344 p.
- REINERT, J.; YEOMAN, M.M. 1982. Plant Cell and Tissue Culture. A Laboratory Manual. Heidelberg, Springer-Verlag. 83 p.

- SCHENK, N.; HSIAO, K.-C.; BORNMAN, C.H. 1991. Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. Plant Cell Rep. 10:115-119.
- SINGH, A.K.; NITO, N.; IWAMASA, M. 1992. Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of *Citrus callus*. Acta Hort. 321:606-609.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Appl. Genet. 62:171-176.
- VU, J.C.V.; NIEDZ, R.P.; YELENOSKY, E. 1993. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis and carboxylation and sacarose metabolism enzymes in nucellar callus of 'Hamlin' sweet orange. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:75:80.