

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de  
explantes de plantas adultas**

**Pâmela Fávero**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba  
2010**

**Pâmela Fávero**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de explantes de plantas adultas**

Orientador:  
Prof. Dr. **FRANCISCO DE A. ALVES MOURÃO FILHO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Fávero, Pâmela

Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de explantes de plantas adultas / Pâmela Fávero. - - Piracicaba, 2010.  
58 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Agrobacterium 2. Biotecnologia de plantas 3. Cultura de tecidos vegetais 4. Laranja  
5. Melhoramento genético vegetal 6. Variação genética em plantas I. Título

CDD 634.31  
F273t

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

## DEDICO

Aos meus pais **Pedro Luiz** e **Regina** pela educação, apoio e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos **Pedro** e **Paola** pela amizade e companheirismo.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar e abençoar todos os dias de minha vida.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, confiança e ensinamentos durante este período.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela constante ajuda e conselhos cedido na elaboração desse trabalho.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane, por toda sua dedicação, disponibilidade e competência para ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (LBPH) Lísia, Tati, Marina, Luzia, Flávia, Luana, Meire, Janaynna, Lívia, Filipe, Rodrigo, Ernani e André pelo convívio e os bons momentos compartilhados. Em especial à minha “irmãzinha” Rafaella, por toda a amizade, conselhos e companhia.

Agradecimento especial à Lili por toda a ajuda durante e principalmente na conclusão do meu trabalho, e ao Leonardo pela ajuda nas fotografias.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Fabiana, Eveline, Alessandra, Renata e Marcelo.

Aos secretários do Departamento de Produção Vegetal Célia, Bete e Paulo.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) Sr. José. Éder, Davi, Aparecido, Toninho e Edileuza pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas Cristiane, Magda, Tuane, Fran, Vanessa, Dalilla e aos meus amigos da Fitotecnia Leonardo, Tiago (Sauípe), Juliano e Rogério por tantos momentos de descontração e alegria.

À minha amiga Íris e aos meus primos Guilherme e Matheus pela companhia.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o curso.

Aos viveiros Sanicitrus e Vasconcellos pelo fornecimento das plantas utilizadas nos experimentos.

À Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ pela oportunidade de cursar mestrado em Fitotecnia.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE TABELAS .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Aspectos gerais da citricultura.....	19
2.2 Melhoramento genético em citros .....	21
2.3 Transformação genética em citros .....	22
2.4 Cultura de tecidos e transformação genética utilizando tecido adulto.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Material vegetal .....	29
3.2 Estirpe de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e vetor de expressão .....	30
3.3 Cultura e manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
3.4 Transformação genética de citros via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
3.5 Seleção, regeneração e microenxertia de gemas adventícias .....	31
3.6 Teste histoquímico gus seguido de análise histológica.....	32
3.7 Análise molecular .....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÕES .....	51
REFERÊNCIAS.....	53





## RESUMO

### **Transformação genética de três cultivares de laranja doce a partir de explantes de plantas adultas**

A dificuldade de transformação de tecido adulto de espécies lenhosas é uma barreira ainda a ser contornada para a maioria das cultivares de laranja doce de importância na citricultura brasileira. Esta dificuldade está relacionada ao alto nível de contaminação, ao baixo potencial regenerativo e à baixa capacidade de transformação de tecidos adultos de espécies lenhosas. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de transformação genética de tecido adulto de três cultivares de laranja doce. Com ajustes no cultivo *in vitro*, foi possível obterem-se gemas adventícias transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens* de três cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência', utilizando material adulto como fonte de explantes. As gemas transgênicas foram identificadas como transgênicas pelo teste histoquímico GUS e confirmados pela análise de PCR, a qual mostrou a amplificação de um fragmento 817 pb, correspondente a parte do gene *uidA* amplificada. A utilização de meio de co-cultivo com a adição de auxinas e citocininas (2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP), foi o mais eficiente para as três cultivares avaliadas. Meios de seleção com altas concentrações de citocinina (3 mg L<sup>-1</sup>) favoreceram a regeneração e, conseqüentemente, a transformação de gemas adventícias para as três cultivares estudadas. O uso da sonicação não foi eficiente para diminuir a contaminação endofítica. Além disso, esta operação diminuiu a eficiência de transformação dos explantes. As eficiências médias de transformação genética encontradas para as três cultivares foram 2,5% para laranja 'Hamlin', 1,4% para laranja 'Pêra' e 3,7% para laranja 'Valência'.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Cultura de tecidos; Biotecnologia; Melhoramento vegetal; *Agrobacterium tumefaciens*



## ABSTRACT

### Genetic transformation of three sweet orange cultivars from explants of adult plants

The difficulty of tissue transformation of adult woody species is still an obstacle to be overcome for most sweet orange cultivars in the Brazilian citrus industry. This difficulty is related to the high level of contamination, low regenerative potential and low transformation capacity of adult tissues of woody species. Thus, the objective of this work was to optimize the protocol for genetic transformation of adult tissue of three cultivars of sweet orange. Therefore, with *in vitro* culture adjustments, it was possible to obtain transgenic adventitious buds through *Agrobacterium tumefaciens* of three sweet orange cultivars (*Citrus sinensis* L. Osbeck), 'Hamlin', 'Pêra' and 'Valencia', using adult material as explants source. The transgenic buds were identified as transgenic by the GUS histochemical test and confirmed by the PCR analysis, which showed fragment amplification of 817 bp corresponding to the part of the amplified *uidA* gene. The use of co-culture media rich in auxins and cytokinins (2.0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D, 2.0 mg L<sup>-1</sup> of AIA and 1.0 mg L<sup>-1</sup> of 2-iP) was more efficient for all three cultivars. Selection media with high concentrations of cytokinin (3 mg L<sup>-1</sup>) promoted the regeneration and, consequently, the transformation of adventitious buds in the three cultivars. The use of sonication was not effective to reduce endophytic contamination. Moreover, this procedure reduced transformation efficiency of explants. The average efficiencies of genetic transformation for the three varieties were 2.5% for 'Hamlin', 1.4% for 'Pêra' and 3.7% for 'Valência'.

Keywords: *Citrus sinensis*; Tissue culture; Biotechnology; Genetic improvement; *Agrobacterium tumefaciens*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema do vetor de expressão pCambia 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália), contendo o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *uidA* (GUS), sob controle do promotor constitutivo CaMV35S.....30
- Figura 2 - Transformação genética de laranja doce, utilizando segmentos internodais de tecido adulto.....39
- Figura 3 - Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis*), utilizando explantes coletados de plantas adultas, via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201.....47
- Figura 4 - Dificuldades encontradas durante a transformação de laranja doce (*Citrus sinensis*) a partir de tecido adulto.....49



**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 - Transformação genética de tecido adulto de laranja doce (*Citrus sinensis*) em função da composição do meio de co-cultivo e efeito da sonicação durante a assepsia.....36
- Tabela 2 - Transformação genética de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis*), utilizando segmentos internodais de tecido adulto.....41
- Tabela 3 - Transformação genética de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis*), utilizando segmentos internodais de tecido adulto.....42
- Tabela 4 - Transformação genética de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis*), utilizando segmentos internodais de tecido adulto.....43





## 1 INTRODUÇÃO

Os frutos cítricos representam 23% de toda a produção mundial de frutas e há décadas o Brasil ocupa posição de destaque na citricultura. Atualmente, o país lidera a produção mundial de laranja, com aproximadamente 18,3 milhões de toneladas de frutas produzidas (FAO, 2010). Para atingir tal produção, o país conta com um parque citrícola de mais de 800 mil hectares, sendo que o estado de São Paulo representa 75% de toda a área cultivada (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2010).

As laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) predominam na maioria dos países citrícolas com, aproximadamente, dois terços dos plantios. Os principais cultivares destinados à produção de suco no Brasil são, basicamente, representados pelas variedades de laranja doce 'Pêra', 'Valência', 'Natal' e 'Hamlin', tendo como principal porta-enxerto o limão 'Cravo' (PIO et al., 2005). Este uso de poucas cultivares copa e porta-enxerto pode acarretar em muitos problemas, incluindo o aumento na incidência de pragas e doenças devido à baixa variabilidade genética, colocando em risco a produtividade dos pomares e a qualidade dos frutos.

Diversos problemas, principalmente, de origem fitossanitária, têm afetado a produtividade de citros nos últimos anos. Doenças bacterianas como a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, e mais recentemente o *Huanglongbing* (HLB), são os maiores desafios enfrentados atualmente. A falta de resistência a estas doenças tem incentivado inúmeros trabalhos de pesquisas voltados ao melhoramento genético.

Ferramentas biotecnológicas podem ser uma opção para que as limitações relacionadas à biologia reprodutiva dos citros, que dificultam a obtenção de variedades melhoradas através de métodos convencionais de melhoramento, sejam superadas. Maiores possibilidades de sucesso no melhoramento dos citros podem ser conseguidas pelo desenvolvimento de programas que associem essas novas técnicas ao melhoramento convencional (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Desta forma, a transformação genética surge como uma ferramenta de grande importância e com potencial significativo para incrementar os programas de

melhoramento de citros, pois, podem ser utilizadas como alternativa para introdução de genes de interesse agrônômico, incluindo aqueles que conferem resistência a doenças, mantendo-se as características originais e também evitando a transferência de características indesejáveis (FEBRES et al., 2003).

Até o momento, a maioria de trabalhos de cultivo *in vitro* e de transformação genética de citros utiliza material vegetal proveniente de tecido juvenil. Entretanto, características genéticas presentes nos citros como alto período de juvenilidade tem atrasado as avaliações das plantas transformadas (RODRÍGUEZ et al., 2008).

A transformação de material já em fase adulta surge como uma tentativa de transpor esta barreira nos trabalhos de melhoramento de citros. As plantas regeneradas não apresentariam características juvenis, permitindo mais rápida avaliação e seleção no campo. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar o protocolo de transformação genética de tecido adulto de três cultivares de laranja doce, 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência'.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais da citricultura

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae e tribo Citreae, sendo esta composta por três subtribos. A subtribo Citrinae apresenta 13 gêneros e 65 espécies, contendo as principais espécies de interesse comercial, como as do gênero *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* (SWINGLE; REECE, 1967).

A citricultura está distribuída em todo o mundo, mas é economicamente importante nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições edafoclimáticas são adequadas para o seu desenvolvimento, sendo que as plantas cítricas são cultivadas em regiões compreendidas entre os paralelos 40° N e 40° S e as principais regiões produtoras estão concentradas em latitudes superiores a 22° N e 22° S (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Nas últimas décadas, o Brasil vem liderando a produção mundial de laranja sendo que, no ano de 2009, foram produzidas aproximadamente 18,3 milhões de toneladas, seguido pelos Estados Unidos com 8,2 milhões de toneladas. Na produção de citros em geral a China superou o Brasil em 2008 produzindo 18% do total, seguido pelo Brasil com 17% e Estados Unidos com 9%. Esta alta produção da China foi devido ao incremento na produção de tangerinas (15,6 milhões de toneladas). No contexto mundial, mesmo sendo cultivado em vários países, China, Brasil e Estados Unidos detêm aproximadamente 44% da produção mundial de citros (FAO, 2010).

O estado de São Paulo representa 75% da produção brasileira de citros, com uma área de aproximadamente 600 mil hectares. A importância da citricultura para a economia brasileira é evidente tanto na geração de empregos, como pela movimentação de recursos econômico-financeiros. Entretanto, a cadeia citrícola brasileira tem como foco principal a produção e comercialização industrial da laranja, voltada principalmente para a exportação de suco, absorvendo 80% de toda fruta produzida no país, restando apenas 20% da produção para o mercado interno (BOTEON; NEVES, 2005). Em 2009, a exportação de suco foi da ordem de 1,3 milhão

de toneladas, sendo os Estados Unidos e a União Européia os principais importadores do produto (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2010).

As frutas cítricas de uso comercial podem ser agrupadas em laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm. F.), limas ácidas [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing e *C. latifolia* (Yu. Tanaka)] e pomelos (*C. paradisi* Macfad) (PIO et al., 2005). Algumas espécies são utilizadas principalmente como porta-enxerto, como limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten & Pasq.), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), laranja azeda (*C. aurantium* L.), trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), os híbridos citrange ‘Carrizo’ e citrange ‘Troyer’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck] e citrumelo ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] (POMPEU JUNIOR, 2005).

Diversas doenças vêm surgindo com a expansão no Brasil, a exemplo da pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), verrugose (*Elsinoe* spp.), melanose (*Diaporthe citri*), rubelose (*Erythricium salmonicolor*), podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) e a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), causadas por fungos. Dentre as doenças causadas por vírus, destacam-se a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*). As principais doenças bacterianas são a clorose variegada dos citros (CVC) (*Xylella fastidiosa*), o cancro cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*), e mais recentemente o huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.), também conhecido como greening. Algumas doenças de etiologia ainda desconhecida também são importantes como a morte súbita dos citros (MSC) e o declínio dos citros (FUNDECITRUS, 2010).

O desenvolvimento de variedades tolerantes ou resistentes a doenças tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de citros. No entanto, o melhoramento genético convencional dos citros encontra dificuldades de ordem botânica e genética, tais como, esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, poliembrionia, embrionia nucelar, alta heterozigosidade e longo período de juvenilidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Para transpor estas barreiras, a transformação genética surgiu permitindo a introdução de genes exógenos de interesse agrônomico e reduzindo o período para obtenção de uma nova variedade (PEÑA et al., 1995).

## 2.2 Melhoramento genético em citros

O Estado da Flórida foi pioneiro no programa de melhoramento de citros. Iniciou-se em 1893 por Swingle e Webber, e desde então, vários programas com objetivos diversos foram desenvolvidos em todo o mundo nesta área (DAVIES; ALBRIGO, 1994). O melhoramento genético de citros pode ser dividido em duas categorias: o melhoramento para variedades copa e o melhoramento para variedades porta-enxerto, cada um com seus objetivos específicos (POMPEU JUNIOR, 2005).

O melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa, devido à descontinuidade nos programas estabelecidos e a fatores biológicos característicos da espécie como, por exemplo, longos ciclos de reprodução, juvenilidade, poliembrião nucelar (apomixia), alta heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade gametofítica e poliploidia (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

O uso de novas ferramentas biotecnológicas como a transformação genética e a fusão de protoplastos no melhoramento de espécies cítricas permitem a transposição das barreiras impostas pelas características genéticas e reprodutivas inerentes da cultura, bem como a exploração de germoplasma disponível para a obtenção de novas variedades, combinando características complementares sem ocorrência de segregação gênica (GROSSER et al., 1996). Adicionalmente, a hibridação somática através da fusão de protoplastos e a transformação genética, em associação com os métodos tradicionais de melhoramento, podem contribuir significativamente na produção de novas variedades com características desejáveis (MENDES et al., 2002).

A regeneração de plantas, por organogênese ou embriogênese somática, a partir do cultivo de células e tecidos vegetais *in vitro*, é a base para a utilização da biotecnologia no melhoramento genético (GMITTER JUNIOR et al., 1992). Em citros, protocolos de cultura de tecidos encontram-se descritos para um grande número de espécies e gêneros relacionados, permitindo-se que a técnica de hibridação somática e transformação genética seja parte integrante de programas de melhoramento em vários países (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Existem várias estratégias biotecnológicas para transferência gênica entre espécies. A transformação genética é vantajosa quando se trata da transferência de

caracteres monogênicos, isto é, características gênicas controladas por um único gene e quando esse gene de interesse está disponível e clonado em um vetor (normalmente plasmídeo), que se encarregará de transferi-lo ao genoma da planta. Entretanto, um limitado número de genes identificados e clonados estão disponíveis para serem transferidos (BINSFELD, 1999).

Os desafios ao melhoramento de citros persistem, apesar de todo avanço em produção no Brasil e no mundo. A necessidade de ampliação das bases genéticas atuais dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente, impõem a necessidade de desenvolver programas de melhoramento (MACHADO et al., 2005). A biotecnologia vem contribuindo, em vários aspectos, para facilitar a utilização da variabilidade disponível, incorporando novas variedades em programas de melhoramento ou, até mesmo, com o lançamento direto de novas variedades (GROSSER et al., 1996).

### **2.3 Transformação genética em citros**

O primeiro trabalho de transformação genética realizado em citros foi por Kobayashi e Uchimiya (1989), via polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce 'Trovita' (*C. sinensis*). Porém, os autores não obtiveram sucesso na regeneração das plantas. A primeira laranja transgênica regenerada foi obtida a partir de células embriogênicas em suspensão da cultivar 'Washington Navel' co-cultivadas com *Agrobacterium tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990).

Vários métodos de transformação genética já foram descritos para citros, como a introdução direta de DNA em protoplastos (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989; GUO et al., 2005; OMAR et al., 2007), transformação via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando segmentos de epicótilo (MOORE et al., 1992; DUTT; GROSSER, 2009), segmentos internodais adultos obtidos em casa de vegetação (ALMEIDA et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2008) e por eletroporação de protoplastos (NIEDZ et al., 2003).

O sistema de transformação genética via *A. tumefaciens* utilizando-se segmentos de epicótilos, é, atualmente, o método mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas, porém muitos trabalhos têm mostrado baixas eficiências de

transformação (PEÑA et al., 1995). Com isso, muitos trabalhos de transformação envolvem a otimização de protocolos para as diferentes variedades, sendo que trabalhos mais recentes demonstram que é possível obter-se eficiências de transformação de até 25% para cultivares de laranja doce e 80% para citrange ‘Carrizo’ (DUTT; GROSSER, 2009; YU et al., 2002).

Ressalta-se, no entanto, que a transformação genética mais utilizada em citros ainda enfrenta algumas dificuldades. Dentre estas, destacam-se o elevado número de plantas escape, a baixa eficiência no processo de transferência gênica, a obtenção de plantas quiméricas, as dificuldades de enraizamento das brotações obtidas, a relação cultivar-dependente com as linhagens de *Agrobacterium* e o longo período de juvenilidade (FLEMING et al., 2000).

Diversos fatores podem afetar a eficiência de transformação, como o cultivo (CERVERA et al., 1998), a estirpe de *Agrobacterium* (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997), o tipo de explante (MOORE et al., 1992; MENDES et al., 2002), o genótipo utilizado (BOSCARIOL et al., 2003), as condições de incubação no co-cultivo (DUTT; GROSSER, 2009), e diferentes meios de co-cultivo (CERVERA et al., 2008). Trabalhos mais recentes vêm mostrando um considerável aumento na eficiência de transformação, a exemplo de 80% para citrange ‘Carrizo’ (YU et al., 2002), 23,8 a 25% para as laranjas ‘Valência’ e ‘Hamlin’, respectivamente (BOSCARIOL, 2003; DUTT; GROSSER, 2009) e 87,7% para *Poncirus trifoliata* (KANEYOSHI et al., 1994).

Visando aumentar a eficiência na transferência gênica, diversos trabalhos têm utilizado compostos fenólicos, principalmente acetoseringona, no meio de co-cultivo obtendo sucesso na infecção por *Agrobacterium* (CERVERA et al., 1998b; BOND; ROOSE, 1998). Porém, outros trabalhos não obtiveram o mesmo sucesso (PEÑA et al., 1995).

A transformação genética também é influenciada pelo genótipo. Embora muitas espécies e variedades de citros tenham sido transformadas com relativa facilidade, algumas espécies como laranja azeda, tangerina ‘Cleópatra’ e laranja ‘Pêra’ têm se mostrado recalcitrantes para transformação. Essa recalcitrância tem sido relacionada à dificuldade de regeneração das gemas adventícias a partir de células transformadas (DOMÍNGUEZ et al., 2004). *Poncirus trifoliata* e seus híbridos têm mostrado uma alta



afinidade para transformação via *Agrobacterium* (KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1995). Kaneyoshi et al. (1994) obtiveram 87,7% de brotos de *P. trifoliata* expressando o gene GUS, confirmando a integração estável desse gene pelas análises de PCR e *Southern Blot*, enquanto que outras cultivares como a laranja azeda e laranja 'Pêra' são mais recalcitrantes (MOORE et al., 1992; BOSCARIOL et al., 2004). Estudos com laranja azeda (*C. aurantium*) demonstraram que esta espécie é recalcitrante para transformação, tendo como resultados uma eficiência em torno de 1% (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997).

A produção de plantas transgênicas tem como foco principal a busca por novas cultivares resistentes a doenças. Diversas estratégias são utilizadas na tentativa de obter resistência, tais como introdução de genes que possam interferir no estabelecimento do patógeno no hospedeiro e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença, pelo uso de genes que codificam proteínas antibacterianas, de genes que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade e/ou estimulam o sistema de defesa das plantas, ou que induzem a resistência derivada do patógeno (GER et al., 2001).

A transformação genética dos citros tem sido obtida principalmente com o uso de explantes coletados a partir de tecidos juvenis, sendo que, plantas regeneradas a partir desses tecidos, teriam características de plantas juvenis e levariam alguns anos de cultivo antes de ser possível avaliar suas características hortícolas e comerciais. No caso da introdução de genes de interesse agrônomico, que permitiriam certa tolerância ou resistência a pragas ou doenças, o uso de explantes provenientes de tecidos adultos seria interessante e desejável, permitindo uma rápida avaliação agrônômica (ALMEIDA, et al., 2003; CERVERA et al., 1998a).

## **2.4 Cultura de tecidos e transformação genética utilizando tecido adulto**

Para algumas espécies, principalmente frutíferas, o material juvenil apresenta características agrônômicas indesejáveis para a produção de mudas e melhoramento genético. Dentre estas características, destacam-se a presença de espinhos, excessivo crescimento vegetativo e o longo período para iniciar o florescimento e frutificação (ALMEIDA et al., 2003).

A utilização de tecidos adultos de espécies frutíferas para o cultivo *in vitro* não é freqüentemente realizado, devido, principalmente, ao alto nível de contaminação, a redução ou perda da capacidade morfo genética, que está relacionada com a repressão ou inativação progressiva da atividade gênica no desenvolvimento vegetal, e ao baixo nível de enraizamento das brotações obtidas (BARCELÓ-MUÑOZ et al., 1999).

A longa fase juvenil também é limitante para o melhoramento genético de outras espécies frutíferas e florestais quando se utiliza métodos tradicionais de propagação vegetativa. A transformação genética pode contornar esta dificuldade por diferentes métodos: superexpressando genes de florescimento levando a um menor tempo de geração ou através de transformação genética direta de tecidos adultos. A primeira estratégia foi usada com sucesso para induzir a floração antecipada em citrange (híbrido de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata*) pela expressão dos genes de *Arabidopsis* *LEAFY* ou *APETALA1* (PEÑA et al., 2001). A vantagem dessa abordagem é um menor tempo de intervalo entre gerações. No entanto, a expressão do transgene pode induzir não só a mudança de fase rápida, mas também efeitos adversos pleiotrópicos, resultando em um desenvolvimento anormal da planta (PEÑA et al., 2001; ENDO et al., 2005).

A transformação de materiais adultos não é facilmente alcançada devido à baixa capacidade de transformação e ao baixo potencial regenerativo de tecidos adultos de espécies lenhosas. Nestas espécies, a transição do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo é brusca, considerando que a transição da fase juvenil para a fase adulta de desenvolvimento vegetativo, envolve mudanças na fisiologia e morfologia dos brotos (POETHING, 1990). Além disso, tecidos adultos e juvenis mostram nítidas diferenças em suas respostas à organogênese e indução da embriogênese na cultura de tecido, com uma progressiva perda de capacidade regenerativa durante a transição para a fase madura (VON ADERKAS; BONGA, 2000). A passagem para o estágio sexual resulta em um drástico remanejamento do genoma e conseqüentemente em alterações nas propriedades do cultivar (CERVERA et al., 1998a).

Para a obtenção de plantas geneticamente transformadas provenientes de tecido adulto é necessário um protocolo de regeneração eficiente para as principais cultivares a serem utilizadas. Diante disso, Kobayashi et al. (2003) desenvolveram um eficiente

protocolo de regeneração para a laranja 'Pêra', a principal cultivar de laranja no Brasil. Neste trabalho, observaram que a maior porcentagem de formação e tamanho de gemas foi encontrado nos explantes cultivados por duas semanas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e então, transferidos para o meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980). A confirmação da maturação do tecido foi relatada após 12 meses em casa de vegetação com o aparecimento de flores. Oliveira et al. (2010) encontraram melhores respostas regenerativas quando os segmentos internodais de tecido adulto de três cultivares de citros foram cultivados em meio de regeneração MS suplementado com o antibiótico cefotaxima sódica para o controle de bactérias endofíticas.

A citometria de fluxo e estudos histológicos têm demonstrado que um meio rico em auxinas durante co-cultivo promove dois processos inter-relacionados. O enriquecimento das zonas de divisão ativa infectadas pela *Agrobacterium*, e a formação de calos na área de câmbio nas extremidades do corte dos explantes, onde as células competentes para transformação de regeneração são mais localizados, favorecendo o desenvolvimento dos eventos transgênicos (PEÑA et al., 2004).

Apesar das dificuldades encontradas nas transformações genéticas e regeneração de tecido adulto de espécies lenhosas, as plantas cítricas podem ser consideradas entre as plantas frutíferas as que mais apresentam resultados e avanços em transformações com esta fonte de tecido vegetal. O primeiro relato de transformação de tecido adulto em citros foi realizado por Cervera et al. (1998a), os quais trabalharam com a cultivar 'Pineapple' de laranja doce que apresentou florescimento normal após 14 meses na estufa, confirmando a maturação de seu tecido. Almeida et al. (2003) trabalhando com quatro cultivares de laranja doce (*C. sinensis*) conseguiram apenas a regeneração de plantas de laranja 'Hamlin' expressando o gene GUS. Na tentativa de obter os mesmos resultados encontrados para a laranja 'Pineapple', Rodríguez et al. (2008) obtiveram efeitos opostos para a cultivar 'Navelina' quando utilizaram o mesmo protocolo de seleção e regeneração dos tecidos utilizados por Cervera et al. (1998). Assim, com pequenos ajustes nas concentrações de auxinas e citocininas presentes no meio de regeneração, obtiveram resultados satisfatórios também para a cultivar 'Navelina'. Devido à importância das tangerinas Clementinas (*Citrus clementina* cv 'Clemenules') no comércio de frutas frescas na Espanha, foi

otimizado um protocolo de transformação genética de tecido adulto especificamente para esta cultivar. Mudanças *in vitro*, como troca de meio de regeneração, aumento da concentração de auxinas nos meio de co-cultivo e diminuição de dias de co-cultivo, e mudanças *ex vitro* como enxertia de borbulhas em porta-enxertos mais vigorosos favoreceram a regeneração e aumentaram a eficiência de transformação da cultivar 'Clemenules' (CERVERA et al., 2008).

Outras espécies frutíferas também apresentam trabalhos relacionados diretamente à transformação genética de tecido adulto de seus cultivares. Escalettes et al. (1994), trabalhando com cultivares de damasco (*Prunus armeniaca*), obtiveram somente a regeneração de plantas quiméricas quando trabalharam com tecido maduro. Yancheva et al. (2002) observaram uma grande redução nas taxas de regeneração de ameixas (*Prunus domestica*) quando explantes de folhas foram cultivadas em meio de seleção com canamicina. Puite e Schaart (1999) transformaram tecido adulto de macieira (*Malus domestica*), mas com eficiências abaixo de 3%. Recentemente, Liu e Pijut (2010), trabalhando com folhas *in vitro* de tecido maduro de cereja "black cherry" (*Prunus serotina*), relataram que a maior dificuldade encontrada foi o crescimento da *Agrobacterium* nos tecidos foliares.

Sabendo que a maioria das espécies frutíferas lenhosas apresentam poucas cultivares utilizadas em plantios comerciais, o impacto de uma cultivar transgênica com características desejáveis é de grande importância para as culturas perenes. Nestas espécies, a transformação e regeneração não é uma rotina em seus trabalhos, limitando-se a poucas espécies e genótipos. Este é o maior obstáculo para a aplicação de biotecnologia em plantas frutíferas (PETRI; BURGOS, 2005).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas localizado no Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

#### 3.1 Material Vegetal

Para a coleta de explantes, foram utilizadas mudas das laranja ‘Pêra’, ‘Valência’ e ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas em limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) obtidas de dois diferentes viveiros certificados. As plantas adquiridas foram mantidas em casa-de-vegetação e utilizadas como fontes de explantes. Na fase final de experimentação, devido a problemas de contaminação *in vitro* da cultivar ‘Valência’, foram realizadas coletas de materiais diretamente nas estufas dos viveiristas, somente para esta variedade. As plantas foram podadas preservando-se o ramo principal e três ramificações laterais. Nos experimentos utilizaram-se apenas ramos de primeiro e segundo fluxos vegetativos das plantas visando maior eficiência de regeneração já comprovado por Rodríguez et al. (2008). Estas novas ramificações formadas, na haste principal, de aproximadamente 20 a 30 cm de comprimento, foram coletadas e desinfestadas em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%) diluída em água destilada e estéril (1:1) e acrescentadas cinco gotas de Tween 20, durante vinte minutos. Metade dos explantes de cada experimento foi colocada em banho ultrassônico (60 Hz) (sonicação) durante a desinfestação, com a intenção de diminuir a contaminação endofítica. Posteriormente, o material foi lavado três vezes em água destilada e esterilizada em condições assépticas. Para a coleta dos explantes, as gemas laterais dos ramos foram retiradas e descartadas, sendo utilizados segmentos de aproximadamente 0,8 - 1,0 cm de comprimento.

### 3.2 Estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* e vetor de expressão

A estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália) (Figura 1) foi utilizada nos trabalhos de transformação genética. Este plasmídeo contém bordas esquerda e direita de região de transferência do plasmídeo de *A. tumefaciens*, o gene de seleção *nptII* (*neomycin phosphotransferase II*), que confere, em plantas, resistência ao antibiótico canamicina, e o gene repórter *uidA* (GUS), ambos sob controle do promotor constitutivo CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus 35S*). O íntron inserido na região codificadora de proteína do gene GUS bloqueia a expressão do gene em *A. tumefaciens*.

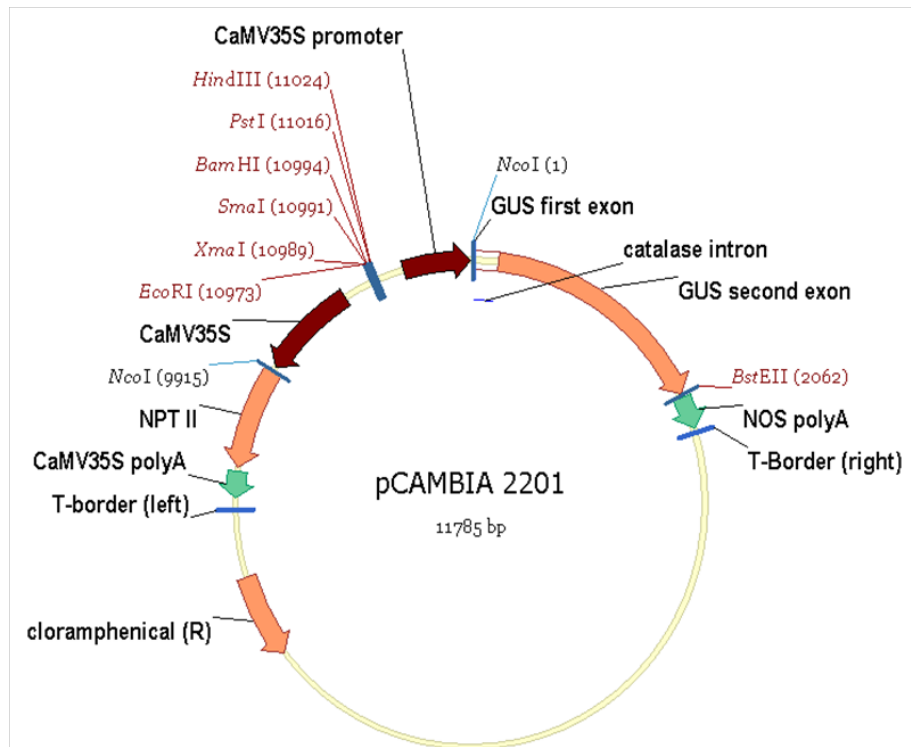


Figura 1 - Esquema do vetor de expressão pCambia 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália), contendo o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *uidA* (GUS), sob controle do promotor constitutivo CaMV35S

### 3.3 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

O isolado de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 utilizado nos experimentos foi conservado em solução contendo glicerol (50%) e meio de cultura (50%) YEP líquido

(extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup> e peptona 10 g L<sup>-1</sup>), suplementado com canamicina (100 mg L<sup>-1</sup>) e rifampicina (50 mg L<sup>-1</sup>), mantido à -80 °C. A partir do estoque, a bactéria foi transferida para meio de cultura YEP sólido, com os mesmos antibióticos e cultivada a 27 °C, por 72 h. Para o preparo do inóculo, uma colônia isolada foi transferida para o meio de cultura YEP líquido, contendo os mesmos antibióticos, e incubado por 16 h, em agitador orbital (28 °C/180 rpm). Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4800 rpm durante 15 min, à temperatura de 15 °C, e então o precipitado formado foi ressuscitado em meio de cultura MS, na concentração de 5 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

#### **3.4 Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens***

A transformação genética foi realizada nas cultivares de laranja 'Pêra', 'Valência' e 'Hamlin'. Os segmentos internodais foram inoculados com a suspensão bacteriana de concentração 5 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> durante 15 minutos, e, em seguida, secos em papel de filtro estéril, para retirada do excesso de bactéria. Dois diferentes meios de co-cultivo foram avaliados: CM1: composto de meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D - 2,0 mg L<sup>-1</sup>), ácido indolacético (AIA - 2,0 mg L<sup>-1</sup>), 2-isopentenil-adenina (2-iP - 1,0 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado para 5.8; e CM2: composto de meio MS, suplementado com 6- benzilaminopurina (BAP - 1,0 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>), acetoseringona (100 mM L<sup>-1</sup>) e pH ajustado para 5.5. Ambos os tratamentos foram incubados por 2 dias, na ausência de luz, à temperatura de 24 °C.

#### **3.5 Seleção, regeneração e microenxertia de gemas adventícias**

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção, MS suplementado com BAP (3,0 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>), canamicina (100 mg L<sup>-1</sup>), cefotaxima sódica (500 mg L<sup>-1</sup>) (para controle do crescimento da *Agrobacterium*), e pH ajustado para 5,8. O primeiro subcultivo foi feito sete dias para melhor controle da contaminação. Entretanto, os próximos subcultivos foram realizados a cada 15 dias. Após o aparecimento de gemas, os explantes foram



transferidos para fotoperíodo de 16 horas e reduzida a concentração de BAP no meio de seleção e regeneração de 3,0 mg L<sup>-1</sup> para 1,0 mg L<sup>-1</sup> visando favorecer o desenvolvimento das gemas. Após 15 dias em fotoperíodo de 16 horas, os explantes foram transferidos para meio MS sem adição de BAP e sem a adição da canamicina, para favorecer o desenvolvimento de brotos. Durante o desenvolvimento das gemas, alguns explantes foram perdidos por oxidação ou por falha no controle da própria *Agrobacterium*. Portanto, quando o explante já apresentava gemas desenvolvidas, as mesmas foram coletadas para o teste histoquímico GUS. As gemas que se desenvolveram até a formação de brotos foram enxertadas *in vitro* em plântula de citrange 'Carrizo', germinada *in vitro*, e incubadas sob fotoperíodo de 16 h, à 27 °C para pegamento da enxertia ou foram enxertadas em plântulas de laranja 'Valência' já aclimatadas em vasos plásticos com substrato, e todos os brotos enxertados tiveram parte de seu tecido também coletados para teste histoquímico GUS. A eficiência de transformação foi obtida pelo cálculo da porcentagem de gemas GUS<sup>+</sup> em relação ao número total de explantes inoculados com a suspensão bacteriana.

### 3.6 Teste histoquímico GUS seguido de análise histológica

Para o teste histoquímico GUS, pequenos segmentos de folhas dos brotos e gemas adventícias formadas foram cortados e incubados em solução X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronideo) a 37 °C, no escuro por 16 h (CARNEIRO et al., 1998). Após este período, o material foi lavado com etanol (70%) para a retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul do tecido vegetal. Para análise histológica, o material selecionado foi desidratado em uma série etílica (80%, 90%, 95% e 100%), seguido de imersão em etanol (100%): meio de infiltração (1:1). A infiltração foi realizada com 100% de meio de infiltração (Historesina, Leica, sob orientação do manual). A emblocagem foi feita em Historesina (hidroxietilmetacrilato). A polimerização foi realizada em temperatura ambiente por 3 a 5 dias. Cortes seriados longitudinais (10 μm) foram preparados em ~~rotário~~ micro rotativo (Leica RM 2155), com navalha de aço, imersos em gotas de água, secos em chapa quente (40 °C) e observados em microscópio para a análise da expressão do gene *uidA* (GUS).

### 3.7 Análise molecular

Brotos desenvolvidos GUS positivos (GUS<sup>+</sup>) foram coletados dos explantes, e seu DNA extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com a solução tampão de extração líquida e o auxílio de pistilos, e analisado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos para a detecção do transgene. A amplificação foi realizada utilizando-se 1 µL de DNA (50-100 ng), 0,2 µL dNTPs (10 mM), 0,8 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µL de tampão (10X), 0,2 µL Taq polimerase (5 U/µL) e 0,3 µL dos *primers* (10 µM). A amplificação do gene GUS foi obtida utilizando-se os *primer*: GUS-F (5' – CAACGAACTGAACTGGCAG – 3') e GUS-R (5'-CATCACCACGCTTGGGTG – 3'), e o programa: 94 °C por 4 min, 40 ciclos de: 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s e 72 °C por 45 s e para finalizar 72 °C por 7 min, amplificando um fragmento de 620 pb. O PCR foi avaliado por eletroforese, em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídeo (0,5µg mL<sup>-1</sup>), visualizado e fotografado em luz UV.



#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de transformação genética foram realizados com as três variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*), 'Hamlin' (12 experimentos), 'Pêra' (15 experimentos) e 'Valência' (20 experimentos), sendo utilizados como explantes, em todos os experimentos, segmentos internodais de tecido adulto coletados de plantas cultivadas em casa-de-vegetação. A transformação genética foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens*. Os explantes foram mantidos em diferentes meios de co-cultivo e, em seguida, transferidos para o meio de seleção suplementado com antibióticos e BAP. A eficiência de transformação foi obtida pelo cálculo da porcentagem de gemas GUS<sup>+</sup> em relação ao número total de explantes inoculados com a suspensão bacteriana.

Foram realizados ensaios preliminares para definição da concentração bacteriana ( $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> ou de  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e do número de dias de co-cultivo (2 ou 3). Como não ocorreu sobrevivência de explantes na concentração de  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, nem após 3 dias de co-cultivo, devido ao excessivo crescimento da *Agrobacterium* nas primeiras semanas de cultivo (dados não apresentados), foram adotados 2 dias de co-cultivo e  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> como padrão em todos os experimentos de transformação. Cervera et al. (2008), trabalhando com tecido adulto de tangerina Clementina, observaram que, reduzindo o período de co-cultivo de 3 para 2 dias não ocorreu redução na frequência de transformação, além disso, reduziu os danos causados pelo super crescimento da *Agrobacterium*.

Com o objetivo de avaliar qual meio de co-cultivo seria o ideal para as cultivares de laranja doce selecionadas nesse trabalho, foram utilizados dois meios diferentes durante os experimentos. O CM1 composto de meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com citocininas e auxinas ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4 D;  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2-iP), foi o mais eficiente para as três cultivares avaliadas quando comparado com o meio CM2, composto de meio básico MS suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $100 \text{ mM L}^{-1}$  de acetoseringona (Tabela 1). Esse resultado concorda com aqueles relatados por Peña et al. (2004), em que constatou-se uma maior eficiência de transformação genética com segmento juvenil de epicótilo de citrange 'Carrizo' quando os explantes foram mantidos em meio de co-cultivo,

suplementado com auxinas e citocinina (2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-ip) em comparação com aqueles mantidos em meio de co-cultivo suplementado apenas com citocinina (1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) ou sem reguladores vegetais (PEÑA et al., 2004).

Tabela 1 - Transformação genética de tecido adulto de laranja doce (*Citrus sinensis*) em função da composição do meio de co-cultivo e efeito da sonicação durante a assepsia

Variedade	Tratamento	total de explantes	GUS <sup>+</sup>	Eficiência de transformação (%) <sup>*</sup>
'Hamlin'	CM1	420	17	4,0
	CM1 + Sonicação	138	3	2,2
	CM2	240	4	1,7
	CM2 + Sonicação	144	0	0,0
'Pêra'	CM1	600	15	2,5
	CM1 + Sonicação	168	0	0,0
	CM2	168	1	0,6
	CM2 + Sonicação	168	0	0,0
'Valência'	CM1	528	30	5,7
	CM1 + Sonicação	312	2	0,6
	CM2	264	11	4,2
	CM2 + Sonicação	264	7	2,7

CM1: MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP  
 CM2: MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 100 mM L<sup>-1</sup> de acetoseringona

\* Porcentagem de gemas GUS<sup>+</sup> em relação ao número total de explantes inoculados

O meio CM1, rico em auxinas e citocininas, foi escolhido, uma vez que, há relatos indicando que os reguladores vegetais, principalmente as auxinas, presentes no meio de co-cultivo exercem influência na transformação genética de citros. A presença de auxina durante a fase de co-cultivo produz mudanças nas células e induz o desenvolvimento de calos derivados das células do câmbio vascular, os quais podem conter as áreas meristemáticas responsáveis pela formação de gemas adventícias. Ao mesmo tempo, co-cultivo em meios ricos em auxinas pode prevenir diferenciações precoces nas células que muitas vezes resultam em regenerações de escapes (PEÑA et al., 2004). No trabalho com tangerina 'Clementina', recalcitrante à regeneração e à transformação, um aumento na concentração de 2,4-D no meio de co-cultivo de 2 para 4 mg L<sup>-1</sup>, e exposição prolongada à escuridão após co-cultivo, resultou em maior formação de calos e maior frequência de transformação (CERVERA et al., 2008).

O uso da acetoseringona tem promovido um aumento nos níveis de transformação genética em vários genótipos de citrus inclusive de laranja doce (Bond; Rose, 1998; Dutt; Grosser, 2009), citrange 'Carrizo' (CERVERA et al., 1998b; DUTT; GROSSER, 2009) e pomelo 'Duncan' (DUTT; GROSSER, 2009). Porém, a adição de acetoseringona na transformação genética de tecido adulto de laranja 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' não foi tão eficiente, obtendo eficiência de transformação sempre mais baixa em relação ao meio CM1. A única cultivar que respondeu ao acréscimo de acetoseringona foi a laranja 'Valência' com valores de eficiência de 4,2% no meio CM2 e 5,7% no meio CM1.

Outra observação que se pode relatar é que nos experimentos de transformação genética utilizando a acetoseringona ocorreu maior crescimento da *Agrobacterium* durante o período de co-cultivo e também durante sua fase de cultivo em meio de seleção. Isso pode ter ocorrido devido ao mais baixo pH (5,5) que utilizamos quando se utiliza a acetoseringona e a grande afinidade da *Agrobacterium* a compostos fenólicos como a acetoseringona.

Em aproximadamente metade dos experimentos foi utilizado o banho ultrassônico (60 Hz) durante a assepsia do material com a intenção de diminuir a contaminação endofítica. Nakano (2008) trabalhando com helicônias obteve sucesso quando utilizou o banho ultrassônico na limpeza de seus materiais durante a lavagem com hipoclorito de sódio. Entretanto, neste trabalho não foi observada nenhuma diferença entre as perdas por contaminação entre os experimentos sonicados e não sonicados, mas os tratamentos que passaram pelo banho ultrassônico tiveram sua regeneração e conseqüentemente sua eficiência de transformação reduzida. Desse modo podemos observar que o melhor tratamento para transformação genética das três cultivares de laranja doce avaliadas é o meio CM1 sem o banho ultrassônico durante sua assepsia (Tabela 1)

Sabe-se que para a regeneração de tecido adulto de citros, o genótipo, os reguladores vegetais, a composição do meio de cultura e a adição de antibióticos afetam a resposta morfogenética do tecido. Com isso, Oliveira et al. (2010) demonstraram que a utilização de meio de cultura MS suplementado com 500 mg L<sup>-1</sup> de cefotaxima foi eficiente para a regeneração de tecidos maduros de citros e esta dose

além de controlar o crescimento bacteriano influenciou positivamente no processo morfogênico, principalmente em laranjas doces. Nenhum dos antibióticos beta-lactâmicos foi eficiente para o controle da contaminação bacteriana endofítica.

Para ocorrer um melhor desenvolvimento de calos e formação de gemas adventícias foi optado por utilizar uma alta concentração de BAP ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) durante o período de cultivo e seleção dos explantes (CERVERA et al., 1998, 2008). Somente após o desenvolvimento completo das gemas no escuro a concentração de BAP foi diminuída para  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (Figura 2). Após o início do desenvolvimento das gemas sob fotoperíodo de 16 h foi retirada a canamicina e o BAP do meio de regeneração, e transferidos os explantes para caixas magentas, para um melhor desenvolvimento dos brotos (Figura 2).

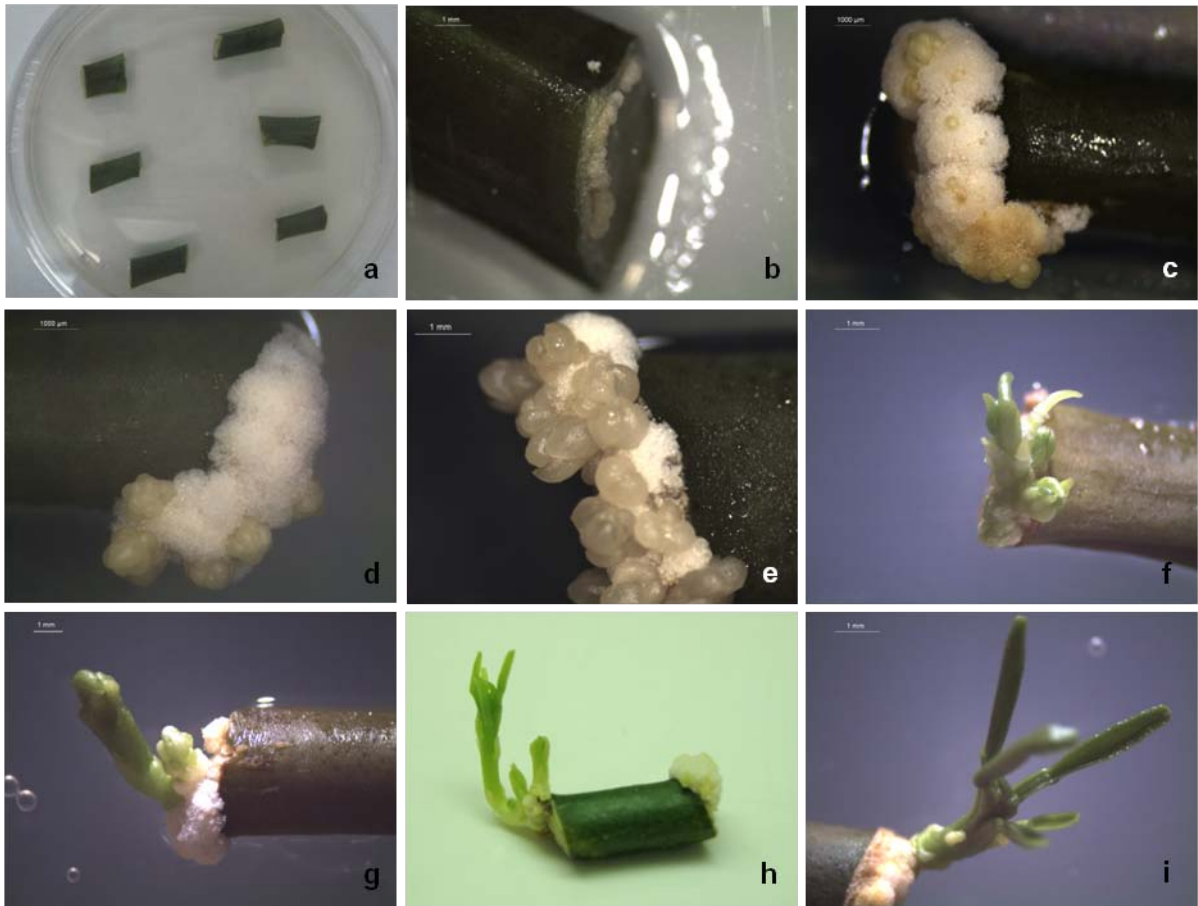


Figura 2 - Transformação genética de laranja doce, utilizando segmentos internodais de tecido adulto. a) Explantes cultivados no meio de seleção após período de co-cultivo. b) Início do desenvolvimento de calos na região cambial de laranja 'Valência' após 15 dias no escuro. c) Início do desenvolvimento de gemas via organogênese indireta em explantes de laranja 'Pêra' após 30 dias de escuro. d) Gemas desenvolvidas de laranja 'Hamlin' aos 30 dias mantidos no escuro. e) Formação de gemas adventícias com primórdios foliares de laranja 'Valência', após 50 dias de cultivo *in vitro*, no escuro. f) Desenvolvimento de gemas adventícias de laranja 'Hamlin', sob fotoperíodo de 16h. g) Início da formação de brotos de laranja 'Hamlin' após 15 dias sob fotoperíodo de 16h. h) Brotos de laranja 'Valência' no início da expansão foliar sob fotoperíodo de 16h por 30 dias. i) Broto de laranja 'Hamlin' em seu grau máximo de desenvolvimento *in vitro* mantido sob fotoperíodo de 16h. Barras: 100µm (c, d) e 1 mm (b, e, f, g, i)

Nos experimentos de transformação genética de laranja 'Hamlin', verificou-se o aparecimento de gemas adventícias em 50 explantes (explantes responsivos) de um total de 942 explantes inoculados com a suspensão bacteriana (Tabela 2). Para a identificação das gemas transgênicas, realizou-se o teste histoquímico GUS em todas as gemas provenientes dos 50 explantes responsivos, sendo que 24 mostraram reação



positiva. A eficiência de transformação média para laranja 'Hamlin' foi de 2,5%, com variação de 0 a 8,3% entre os 12 experimentos realizados (Tabela 2).

Nos experimentos realizados com laranja 'Pêra', observou-se apenas 19 explantes com gemas adventícias dos 1104 explantes inoculados, sendo que desses 19 explantes responsivos, 16 apresentaram reação positiva para GUS. Entretanto, esta foi a única cultivar em que não ocorreu formação completa de brotos transformados, encerrando seu desenvolvimento até a formação de gemas que, mesmo mantidas em meio de regeneração sem a adição de BAP e canamicina, foram se oxidando e então coletadas para os ensaios de GUS. Esse início de desenvolvimento de gemas adventícias também foi observado em experimentos de transformação genética realizados com tangerina 'Clementina', utilizando segmento internodal adultos como explante (CERVERA et al., 2008), porém, esses pesquisadores observaram um maior desenvolvimento dessas gemas, quando os explantes foram mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) em substituição ao meio MS. A eficiência média encontrada para a laranja 'Pêra' foi de 1,4%, a mais baixa entre as cultivares estudadas, mas seu melhor experimento apresentou eficiência de 10,2% (Tabela 3), sendo alto até mesmo quando comparado com trabalhos de tecido jovem dessa variedade (BOSCARIOL et al., 2003).

Tabela 2 – Transformação genética de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis*), utilizando segmentos internodais de tecido adulto

Experimento	total de explantes	explantes responsivos*	gemas GUS <sup>+</sup>	eficiência de transformação** (%)
1 <sup>a</sup>	108	5	2	1,9
2 <sup>a</sup>	108	1	1	0,9
3 <sup>a,c</sup>	78	10	2	2,6
4 <sup>a</sup>	60	5	5	8,3
5 <sup>b,c</sup>	84	0	0	0
6 <sup>b</sup>	84	0	0	0
7 <sup>b,c</sup>	60	0	0	0
8 <sup>b</sup>	84	4	2	2,4
9 <sup>a,c</sup>	60	2	1	1,7
10 <sup>a</sup>	72	8	5	6,9
11 <sup>a</sup>	72	10	4	5,6
12 <sup>b</sup>	72	5	2	2,8
Total	942	50	24	m=2,5

<sup>a</sup> Explantes cultivados em meio de co-cultivo CM1 (MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP)

<sup>b</sup> Explantes cultivados em meio de co-cultivo CM2 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 100 mM L<sup>-1</sup> de acetoseringona)

<sup>c</sup> Experimentos sonicados durante a assepsia

\* Explantes que apresentaram formação de gemas adventícias

\*\* Porcentagem de gemas GUS<sup>+</sup> em relação ao número total de explantes inoculados

Nos experimentos envolvendo laranja ‘Valência’, foram observados 66 explantes responsivos dos 1368 explantes inoculados com a suspensão bacteriana, sendo que desses 66 explantes com gemas adventícias, 50 deles apresentaram reação positiva ao teste GUS. A eficiência média obtida para a laranja ‘Valência’ foi de 3,7%, a maior encontrada entre as três cultivares avaliadas, sendo que o melhor experimento chegou a 13,9% de eficiência (Tabela 4). Uma das razões dessa melhor eficiência na laranja ‘Valência’ pode ser atribuída à troca de fonte de material vegetal no decorrer do experimento, pois, devido à dificuldade encontrada com excessivas contaminações, especialmente com esta variedade, no começo dos experimentos, foi coletado material vegetal diretamente na estufa de outro viveiro, e assim, foram obtidas as melhores

eficiências entre todos os experimentos anteriormente realizados. Este fato demonstra a total dependência da fonte de origem vegetal com a eficiência de transformação para material adulto, pois, comprovadamente, materiais que apresentam características mais vigorosas e saudáveis, são melhores estabelecidos na cultura de tecido e conseqüentemente aumentam a eficiência de transformação (CERVERA, 2008).

Tabela 3 – Transformação genética de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis*), utilizando segmentos internodais de tecido adulto

Experimento	total de explantes	explantes responsivos*	gemas GUS <sup>+</sup>	eficiência de transformação** (%)
1 <sup>a</sup>	216	0	0	0
2 <sup>a</sup>	108	14	11	10,2
3 <sup>a</sup>	108	2	2	1,9
4 <sup>b,c</sup>	60	0	0	0
5 <sup>b</sup>	60	0	0	0
6 <sup>a,c</sup>	60	0	0	0
7 <sup>a</sup>	60	0	0	0
8 <sup>b,c</sup>	60	0	0	0
9 <sup>b</sup>	60	1	1	1,7
10 <sup>a,c</sup>	60	0	0	0
11 <sup>a</sup>	60	2	2	3,3
12 <sup>b,c</sup>	48	0	0	0
13 <sup>b</sup>	48	0	0	0
14 <sup>a,c</sup>	48	0	0	0
15 <sup>a</sup>	48	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1104</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>1,4</b>

<sup>a</sup> Explantes cultivados em meio de co-cultivo CM1 (MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP)

<sup>b</sup> Explantes cultivados em meio de co-cultivo CM2 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 100 mM L<sup>-1</sup> de acetoseringona)

<sup>c</sup> Experimentos sonicados durante a assepsia

\* Explantes que apresentaram formação de gemas adventícias

\*\* Porcentagem de gemas GUS<sup>+</sup> em relação ao número total de explantes inoculados

Tabela 4 – Transformação genética de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis*), utilizando segmentos internodais de tecido adulto

Experimento***	total de explantes	explantes responsivos*	gemas GUS <sup>+</sup>	eficiência de transformação** (%)
1 <sup>a</sup>	120	0	0	0
2 <sup>a</sup>	108	0	0	0
3 <sup>a,c</sup>	60	0	0	0
4 <sup>a</sup>	60	16	14	23,3
5 <sup>b,c</sup>	60	0	0	0
6 <sup>b</sup>	60	0	0	0
7 <sup>a,c</sup>	30	0	0	0
8 <sup>a</sup>	30	0	0	0
9 <sup>b,c</sup>	48	0	0	0
10 <sup>b</sup>	48	7	4	8,3
11 <sup>a,c</sup>	48	0	0	0
12 <sup>a</sup>	54	5	3	5,6
13 <sup>b,c</sup>	84	1	1	1,2
14 <sup>b</sup>	84	2	1	1,2
15 <sup>a,c</sup>	84	1	0	0
16 <sup>a</sup>	84	4	3	3,6
17 <sup>b,c</sup>	72	7	6	8,3
18 <sup>b</sup>	72	6	6	8,3
19 <sup>a,c</sup>	90	5	2	2,2
20 <sup>a</sup>	72	12	10	13,9
<b>Total</b>	<b>1368</b>	<b>66</b>	<b>50</b>	<b>3,7</b>

<sup>a</sup> Explantes cultivados em meio de co-cultivo CM1 (MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP)

<sup>b</sup> Explantes cultivados em meio de co-cultivo CM2 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 100 mM L<sup>-1</sup> de acetoseringona)

<sup>c</sup> Experimentos sonificados durante a assepsia

\* Explantes que apresentaram formação de gemas adventícias

\*\* Porcentagem de gemas GUS<sup>+</sup> em relação ao número total de explantes inoculados

\*\*\* Experimentos 9 ao 20 foi trocada a fonte de material vegetal (coletados diretamente no viveiro)

Os valores de eficiência de transformação de tecido adulto de laranja doce comparada à eficiência de tecido jovem diferem significativamente, pois, enquanto encontramos eficiências de 25% (DUTT; GROSSER, 2009) para tecido jovem de laranja 'Hamlin', o valor máximo encontrado para esta mesma cultivar em tecido adulto foi de 6% (ALMEIDA et al., 2003). Para as laranjas 'Valência' e 'Pêra', as maiores eficiências de transformação de tecido jovem encontradas foram por Boscariol et al. (2003) com 23,8% e 7,6%, respectivamente, sendo que para estas duas cultivares de laranja doce não se encontra relatos de eficiência de transformação em tecido adulto.

Os valores de eficiência de transformação genética encontradas neste trabalho para as três cultivares avaliadas são considerados adequados quando comparados aos valores registrados em poucos trabalho de tecido adulto em citros. As maiores eficiências de transformação genética encontradas para tecido adulto desta espécie foram de 6% para laranja 'Hamlin' (ALMEIDA et al., 2003) e laranja 'Pineapple' (CERVERA et al., 1998). Rodríguez et al. (2008) ao tentarem utilizar o mesmo protocolo utilizado por Cervera et al. (1998) para a variedade de laranja doce 'Navelina' não obtiveram sucesso nas transformações e regeneração de brotos. No entanto, ao adicionar  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (NAA) ao meio de regeneração, conseguiram uma eficiência de transformação de 3% em tecido adulto desta cultivar, demonstrando, mais uma vez, que as diferenças entre genótipos têm grande influência na eficiência de transformação e regeneração dos materiais. Com ajustes no protocolo de regeneração, a eficiência de transformação genética da tangerina Clementina foi de 0,3% para 3% de eficiência (CERVERA et al., 2008).

Esta grande influência do genótipo na eficiência de transformação é normalmente encontrada para citrus mesmo em tecido juvenil, variando de 2% (MOORE et al., 1992), 20,6% (PEÑA et al., 1995b) e até 80% (YU et al., 2002) para citrange 'Carrizo'; 3,6% para laranja azeda (GHORBEL et al., 2000); 6,7% para lima ácida 'Galego' (PEÑA et al., 1997) e 7,9% para laranja 'Pineapple' (PEÑA et al., 1995). Entre os cultivares de laranja doce, também ocorrem variações na eficiência de transformação. No entanto, a cultivar 'Pêra' tem-se mostrado um genótipo mais difícil de regenerar plantas transformadas, independentemente do gene utilizado (BOSCARIOL et al., 2004; AZEVEDO et al., 2005).

A baixa eficiência de transformação e, muitas vezes nula, nos trabalhos com tecido adulto deve-se principalmente à maior recalcitrância do tecido para regeneração e conseqüentemente para a transformação (CERVERA et al., 2008). Outro fator de extrema importância nos experimentos de tecido adulto é seu elevado índice de contaminação do material por agentes endofíticos, o que levou a perdas de 50 a 100% de material dos experimentos (Figura 4a). Além disso, devido à grande área de contato que os explantes derivados de tecido adulto apresentam, o controle da *Agrobacterium* é outra barreira para uma melhor eficiência nas transformações, pois, é muito comum depois de vários dias de cultivo em meio de seleção com antibióticos, ocorrer o crescimento da *Agrobacterium* nos tecidos vegetais.

A oxidação seguida de necrose dos explantes também é outro fator de perdas de material transformado, pois, a demora na produção de gemas e regeneração dos brotos permite que a oxidação seja muito maior em material de tecido adulto em relação ao tecido juvenil. Entretanto, Ghorbel et al. (2000) também observaram necrose nas extremidades dos explantes e ausência no desenvolvimento de gemas adventícias, quando segmentos juvenis de epicótilo de laranja azeda foram utilizados como explante em experimentos de transformação genética.

A dificuldade de transformação de tecido adulto de espécies lenhosas é relatada por diversos autores como Escalettes et al. (1994) que, trabalhando com cultivares de damasco obtiveram bons resultados na transformação de embriões imaturos, mas quando avaliaram material maduro, obtiveram apenas três plantas quiméricas como resposta. A maior eficiência de transformação de tecido adulto encontrada em ameixas foi de 2,7% utilizando folhas como explantes (YANCHEVA et al., 2002). Em macieiras, o estabelecimento de protocolos de transformação de tecido adulto resultou em eficiências menores de 3% (PUITE; SCHAART, 1999). Liu e Pijut (2010), trabalhando com folhas *in vitro* de tecido maduro de cereja “black cherry”, não tiveram problemas com contaminação endofítica, porém, o crescimento da *Agrobacterium* foi a maior dificuldade encontrada e assim a eficiência de transformação obtida para esta espécie foi 1,2%.

A confirmação da transgenia e suas respectivas eficiências foram feitas através do teste histoquímico GUS das gemas adventícias e análise histológica das mesmas

(Figura 3). Para a confirmação da inserção do gene repórter *uidA* (GUS), foram extraídos DNA de 3 brotos GUS<sup>+</sup> de laranja 'Hamlin' e 6 brotos GUS<sup>+</sup> de laranja 'Valência' e analisado por PCR (Figura 3).

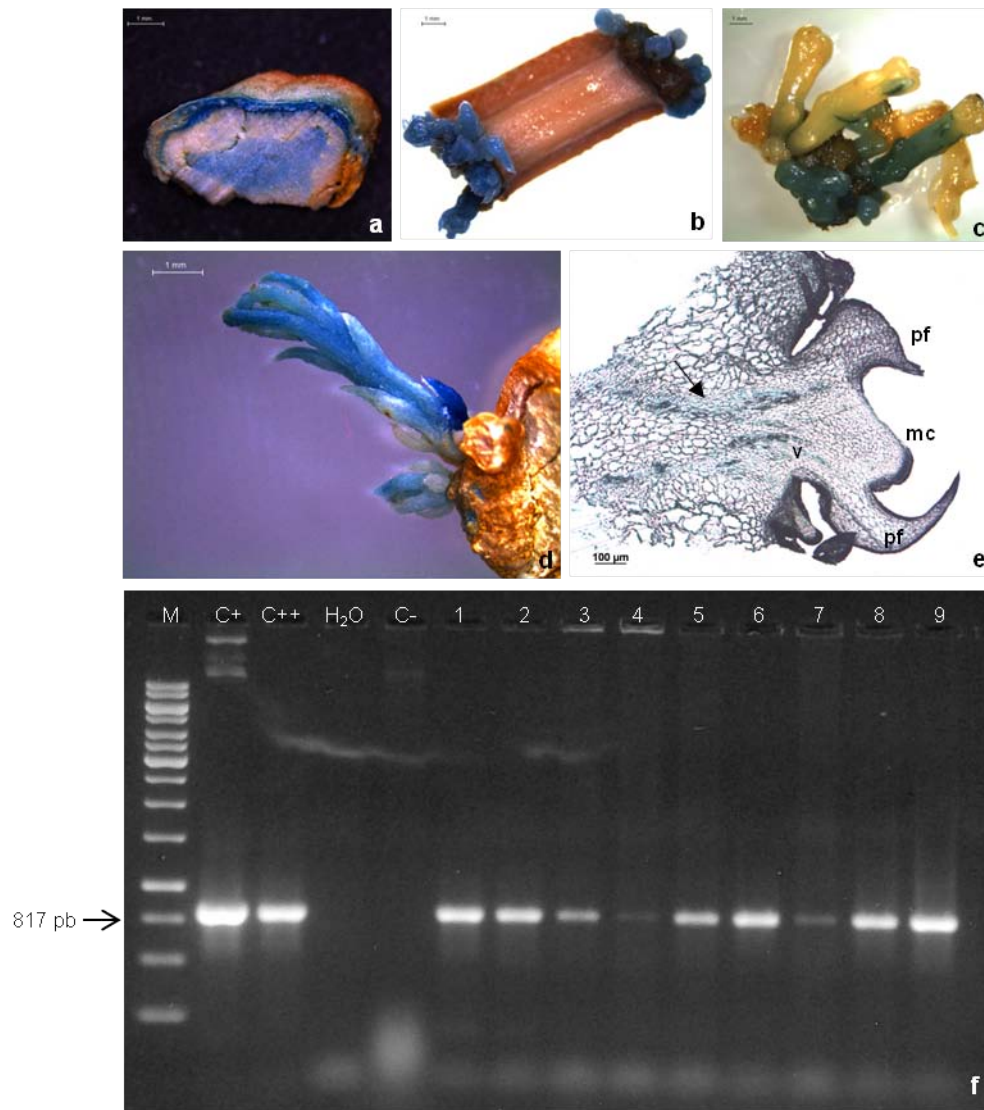


Figura 3 - Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis*), utilizando explantes coletados de plantas adultas, via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201. a) Corte transversal de segmento internodal de laranja 'Valência', 30 dias após a inoculação com suspensão bacteriana, incubado com a solução X-GLUC mostrando a expressão do gene *uidA*. b) Explante de laranja 'Hamlin', regenerado em meio de seleção, incubado com a solução X-GLUC. c) Gemas de laranja 'Hamlin' desenvolvidas em meio de seleção, apresentando gema escape, gema quimérica e gema transformada expressando o gene *uidA*. d) Broto de laranja 'Valência', desenvolvido sob fotoperíodo de 16h por 30 dias, incubado com a solução X-GLUC mostrando a expressão do gene *uidA*. e) Corte histológico de gema adventícia de laranja 'Hamlin' após 40 dias da inoculação, incubado com a solução X-GLUC, mostrado a presença de meristema caulinar (mc), primórdios foliares (pf), sistema vascular (v) e expressão do gene *uidA* no tecido (seta). f) Análise de PCR dos brotos das laranjas 'Hamlin' e 'Valência' GUS positivo: M = marcador de 1kb (Fermentas); C+ = controle positivo (DNA de *Agrobacterium*); C++ = controle positivo (DNA de planta transgênica); H<sub>2</sub>O = controle negativo; C- = controle negativo (DNA de planta não transformada); 1 a 3 = brotos transgênicos de laranja 'Hamlin'; 4 a 9 = brotos transgênicos de laranja 'Valência'. O fragmento de 817 pb corresponde à seqüência amplificada do gene *uidA*



Durante o desenvolvimento dos brotos, diversos explantes apresentaram queda prematura dos brotos, como demonstrado (Figura 4 b). Tal fato pode estar correlacionado à baixa translocação de nutrientes, produção de etileno, alta luminosidade ou até mesmo alta temperatura. No entanto, não são encontrados relatos desse fato em outros trabalhos, ficando difícil afirmar exatamente qual seria a real razão desses desprendimentos dos brotos.

Outra dificuldade encontrada na finalização dos experimentos de transformação genética foi durante a enxertia dos brotos transformados. Primeiramente, foi testada a enxertia *in vitro* utilizando como porta-enxerto plântulas de citrange 'Carrizo', como é normalmente utilizada em trabalhos de tecido jovem. Porém, nenhum dos brotos transgênicos enxertados sobreviveu à enxertia (Figura 4 d). A outra tentativa foi de enxertar brotos de laranja 'Valência' sobre porta-enxerto da mesma laranja 'Valência', mas dessa vez o porta-enxerto já estava aclimatado em vasos plásticos com substrato (Figura 4 c), sendo considerada uma enxertia *in vivo*, porém, os brotos enxertados em plantas já aclimatadas apresentaram as mesmas características de definhamento que os brotos enxertados *in vitro*. Através de cortes histológicos foi possível observar a presença de meristema caulinar nas gemas adventícias desenvolvidas (Figura 3 e), não sendo esta a razão dos insucessos das enxertias. E assim, não foi possível obter plantas transgênicas de tecido adulto para as análises moleculares como o Southern blot.



Figura 4 - Dificuldades encontradas durante a transformação de laranja doce a partir de tecido adulto. a) Contaminação endofítica freqüentemente encontrada em explantes provenientes de material de estufa. b) Queda prematura de brotos já desenvolvidos mantidos em meio de cultura basal (não suplementado com BAP e canamicina). c) Enxertia *ex vitro* de brotos transgênicos de laranja 'Valência' sobre porta-enxerto de laranja 'Valência'. d) Enxertia *in vitro* de brotos transgênicos de laranja 'Hamlin' sobre porta-enxerto de citrange 'Carrizo'



## 5 CONCLUSÕES

- Foi possível obter gemas transgênicas GUS<sup>+</sup> nas três cultivares de laranjas doce, 'Hamlin', Pêra e 'Valência' via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando segmentos internodais de tecido adulto via organogênese indireta.
- O meio de co-cultivo CM1 composto de meio básico MS, suplementado com citocininas e auxinas (2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4 D; 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP), foi o mais eficiente para a transformação genética.
- O uso da sonicação não foi eficiente para diminuir contaminação endofítica dos materiais selecionados. Além disso, reduziu a regeneração e a transformação dos explantes.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerik, v. 164, n. 2, p. 203-211, 2003.
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (bO), cecropina e gus**. 2005. 76 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A.; ENSINA, C.L.; SIMÓN-PÉREZ, E.; PLIEGO-ALFARO, F. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, p.11 – 17, 1999.
- BINSFELD, P.C. Transferência genômica parcial. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Taubaté, v. 2, n.8, p. 86-88, 1999.
- BOND, J.E.; ROOSE, M.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 229-234, 1998.
- BOSCARIOL, R.L.; ALMEIDA, W.A.B.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A. MENDES, B.M.J. The use of the PML/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 2, p. 122-128, 2003.
- BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21***. 2004. 87 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. cap. 2, p. 21-34.
- 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. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 413-458.
- CERVERA, M.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA L. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, n., 1 p. 55-66, 2008.
- CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 3-4, p. 271-278, 1998b.

CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 1, p. 51-59, 1998a.

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMEO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 171-183, 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**. Dordrecht. v. 98, p.331-340, 2009.

ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H., KOBAYASHI, Y.; ARAKI, T.; OMURA, M. Ectopic expression of an FT homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliolate* L. Raf.). **Transgenic Research**, London, v. 14, p. 703-712, 2005.

ESCALETTES, V.; DAHURON, F.; RAVELONANDRO, M.; DOSBA, F. Utilisation de la transgé nese pour l'obtention de pruniers et d'abricotiers exprimant le ge`ne de la prote´ine capside du plum pox potyvirus. **Bulletin OEPP/EPPO**, Oxford, v. 24, p. 705–711, 1994.

FAO. Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 27 out. 2010.

FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 5, p. 421-428, 2003.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; FATTA DEL-BOSCO, S. GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, p. 450-455, 2000.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agriannual 2010**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2010. 520 p.

FUNDECITRUS. Disponível em: < <http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 21 out. 2010.

GER, M.; CHEN, C.; HWANG, S.; HUANG, H.; PODILE, A.R.; DAYAKAR, B.V.; FENG, T. Constitutive expression of *hrap* gene in transgenic tobacco plant enhances resistance against virulent bacterial pathogens by induction of hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 764-773, 2001.

GHORBEL, R.; DOMÍNGUEZ, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, n. 17, p. 1183-1189, 2000.

GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.) **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. chap. 14, p. 335-369.

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; TUSA, N.; REFORGIATO RECUPERO, G.; CUCINOTTA, P. Further evidence of a hybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 672-676, 1996.

GUO, W.W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, n. 8, p. 482-486, 2005.

GUTIÉRREZ-E, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 11, p. 745-753, 1997.

HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAKI, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; OHSHIMA, M.; MOTOYOSHI, F. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 40, p. 199-207, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2010.

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



- KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 1, p. 99-102, 2003.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 64, n. 2, p. 91-97, 1989.
- LIU, X.; PIJUT, P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature *Prunus serotina* (Black cherry) and regeneration of transgenic shoots. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, Dordrecht, v.101, p.49-57, 2010.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.
- 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. cap. 9, p. 223-277.
- MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Hamlin sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 955-961, 2002.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, p. 238-242, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAKANO, V.A. **Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes**. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- NIEDZ, R.P.; MCKENDREE, W.L.; SHATTERS JUNIOR, R.G. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and regeneration of transformed plants. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 39, p. 586-594, 2003.
- OLIVEIRA, M.L.P.; COSTA, M.G.C.; Da SILVA, C.V.; OTONI, W.C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.

OMAR, A.A.; SONG, W.Y.; GROSSER, J.W. Introduction of Xa21, Xanthomonas-resistance gene from rice, into 'Hamlin' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 82, p. 914-923, 2007.

PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 1, p. 67-74, 2004a.

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

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZZAPATER, M. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, London, v. 19, n. 3, p. 263-267, 2001.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; PÉREZ, R.; ROMERO, J.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus. In: CURTIS, I.S. (Ed.). **Transgenic crops of the world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. chap. 11, p. 145–157.

PETRI, C.; BURGOS, L. Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? **Transgenic Research**, London, v. 14, p. 15-26, 2005.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S. CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 3, p. 39-60.

POETHIG, R.S. Phase change and the regulation of shoot orphogenesis in plants. **Science**, Washington, v. 250, p. 923–930, 1990.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 4, p. 63-104.

PUITE, K.; SCHAART, J. *Agrobacterium* mediated transformation of the apple cultivars 'Gala', 'Golden' and 'Elstar', and the strawberry cultivars 'Gariguette', 'Polka' and 'Elsanta'. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 484 p. 547–553. 1999.

RODRÍGUEZ, A.; CERVERA, M.; PERIS, J.E.; PEÑA, L. The same treatment for transgenic shoot regeneration elicits the opposite effect in mature explants from two closely related sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n.1, p. 97-106, 2008.

SWINGLE, W.T.; REECE, R.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELLOR, L.D.; WEBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p. 190-430.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J.M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20 p. 921–928, 2000.

YANCHEVA, S.D.; DRUART, P.; WATILLON, B. Agrobacterium-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.). **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 577 p. 215–217, 2002.

YU, C.; HUANG, S.; CHEN, C.; DENG, Z.; LING, P.; GMITTER Jr., F.G. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 2, p. 147–155, 2002.