

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

**Promotores específicos para expressão gênica no floema na  
transformação genética de citros**

**Luzia Yuriiko Miyata**

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

**Piracicaba**

**2009**

**Luzia Yuriiko Miyata**  
**Engenheira Agrônoma**

**Promotores específicos para expressão gênica no floema na transformação genética  
de citros**

Orientador:

Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

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

Piracicaba

2009

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

Miyata, Luzia Yuriko

Promotores específicos para expressão gênica no floema na transformação genética de citros / Luzia Yuriko Miyata. - - Piracicaba, 2009.  
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.  
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Expressão gênica 3. Frutas cítricas 4. Greening (Doença de planta) 5. Plantas transgênicas 6. Resistência genética vegetal 7. Transferência de genes  
Título

CDD 634.3  
M685p

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

**A Deus pela vida, amor e pelas oportunidades. Por sua fidelidade nas realizações...**

Dedico.



## AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar os meus passos e iluminar a minha caminhada.

Aos orientadores Francisco de Assis Alves Mourão Filho e João Alexio Scarpate Filho pela oportunidade e orientação.

A professora Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA) e ao pesquisador Ricardo Harakava (Instituto Biológico) pela orientação, fornecimento de material e/ou por disponibilizarem seus laboratórios para a realização desse trabalho.

A todos da minha família, pelo apoio e carinho. Ao meu pai Napoleão Tomio Miyata, minha mãe Lúcia Ribeiro Miyata, meus irmãos Cristiano Takashi Miyata e Lucilene Tieme Miyata. Ao meu noivo Higor Alves Pinheiro de Azevedo, ao meu sogro Wilian Pinheiro, minha sogra Wilma Conceição Pinheiro e minha cunhada Erika Conceição Pinheiro.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas Liliane (Lili), Lísia, Marina, Leonardo, Fabiana, Rafaella, Marcus, Janaynna, Pâmela e Felipe. Em especial às minhas amigas e companheiras de trabalho Flávia, Meire e Lívia pela ajuda, compreensão e amizade.

Aos funcionários Eder, Davi e Sr. José pela amizade, paciência e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA Renata, Alessandra, Ana Paula e Eveline.

À secretária da Pós-Graduação Luciane por toda gentileza e carinho nesses anos.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.



“Os teus olhos viram o meu corpo ainda informe, e no teu livro todas estas coisas foram escritas,  
as quais iam sendo dia a dia formadas, quando nem ainda uma delas havia.”

SL. 139;16





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVEATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 A citricultura brasileira.....	23
2.2 Transformação genética de plantas cítricas .....	26
2.3 Promotores e a regulação do padrão de expressão em plantas.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material vegetal.....	33
3.2 Vetores de expressão.....	34
3.3 Cultura e manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	36
3.4 Transformação genética.....	37
3.5 Seleção, regeneração e aclimatização das plantas.....	38
3.6 Detecção da atividade do gene <i>uidA</i> (GUS) pelo ensaio histoquímico.....	38
3.7 Identificação de plantas transgênicas pela técnica de PCR ( <i>polimerase chain reaction</i> ).....	39
3.8 Análise da integração do DNA exógeno pela técnica de <i>Southern blot</i> .....	40
3.9 Análise histológica.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Transformação genética de citrange ‘Carrizo’ [ <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf x <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck] e laranja doce ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’.....	43

4.1.1	Eficiência de transformação genética e porcentagem de brotos escapes.....	43
4.2	Análise de PCR.....	50
4.3	Análise de <i>Southern Blot</i> .....	51
4.4	Análise histológica.....	52
5	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	59

## RESUMO

### Promotores específicos para expressão gênica no floema na transformação genética de citros

O Huanglongbing (HLB) é uma das doenças mais ameaçadoras para citricultura mundial e, até o momento, não foi encontrada resistência na base genética do gênero *Citrus*. A doença é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., endêmica de floema. Portanto, na busca por uma planta transgênica resistente ao HLB é desejável avaliar construções gênicas em que o gene de interesse se expresse preferencialmente na região em que a bactéria coloniza a planta, ou seja, no floema. Assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens*, de citrange ‘Carrizo’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, contendo o gene *uidA* (GUS) sob o controle dos promotores *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2), *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2), para verificar se esses promotores regulam a expressão do gene repórter na região do floema. Foram utilizados segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* e como agente de seleção de regeneração de plantas transgênicas foi utilizado o gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. Dos brotos regenerados foi coletada uma amostra de material para a realização do ensaio histoquímico com X-GLUC. Os brotos que formaram coloração azulada confirmaram a integração do transgene, sendo esses enxertados em porta enxertos previamente germinados e estiolados *in vitro*. A partir do número de explantes introduzidos, número explantes responsivos, número de brotos regenerados e número de brotos regenerados GUS positivos calculou-se a eficiência de transformação genética dos experimentos. Para a confirmação da transformação genética de laranja ‘Hamlin’ foram realizadas análises de PCR e *Southern blot* de três plantas GUS positivas aclimatizadas. Também foram feitos cortes histológicos manuais para melhor visualização da reação histoquímica de GUS das plantas de laranja ‘Hamlin’ *Southern blot* positivas. Todos os experimentos de transformação regeneraram pelo menos um broto GUS positivo. As plantas de laranja ‘Hamlin’ analisadas por PCR e *Southern blot* analisadas foram confirmadas como transformadas com uma inserção do transgene. Plantas nas quais foram realizados cortes histológicos indicaram expressão diferencial das construções gênicas no floema.

Palavras-chave: Citros; Transformação genética; Promotores tecido específico; Gene *uidA* (GUS)



## ABSTRACT

### Specific promoters for gene expression in the phloem in citrus genetic transformation

Huanglongbing (HLB) is one of the most threatening diseases to worldwide citriculture and till the present moment, no resistance has been found in citrus genetic basis. This disease has *Candidatus Liberibacter* spp. as the pathogenic agent, an endemic phloem bacterium. Therefore, in the search for a transgenic plant resistant to HLB, it is desirable to evaluate constructions in which the gene of interest is expressed, preferentially, in tissues where the bacteria grow, i.e., in the phloem. Therefore, this work aimed to obtain transgenic plants of ‘Carrizo’ citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck], and of ‘Hamlin’, ‘Valencia’, and ‘Pera’ sweet oranges [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], via *Agrobacterium tumefaciens*, containing *uidA* (GUS) gene, controlled by the promoters *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2), *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (AtPhP2) and *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2), in order to check if these promoters drive the reporter gene expression in the phloem. For the transformation, *in vitro* germinated seedlings epicotil segments were used. The gene *nptII*, which confers resistance to the antibiotic kanamycin, was used as the selective system. From the regenerated shoots, a tissue sample was collected to perform the X-GLUC histochemical analysis. The regenerated shoots colored in blue were considered transgenic, and these were grafted on *in vitro* grown rootstocks. The transformation efficiency of each experiment was calculated based on the number of introduced explants, responsive explants, number of regenerated shoots, and number of GUS positive regenerated shoots. In order to confirm the genetic transformation of ‘Hamlin’ sweet orange, PCR and *Southern blot* analyses of three positive GUS acclimatized plants were performed. Anatomic slices for better visualization of blue color formed by GUS reaction were also made. All transformation experiments regenerated at least one GUS positive shoot. Plants of ‘Hamlin’ sweet orange analyzed by PCR and *Southern blot* are transformed and have one transgene insertion. Anatomical analyses indicated preferential expression of the transgenes in the phloem.

Keywords: Citrus; Genetic transformation; Specific tissue promoter, *uidA* (GUS) gene



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vetor de expressão pCAMBIA2201/AtPhP2, contendo o gene *uidA* (GUS), sob controle do promotor ATPhP2 (*Arabidopsis thaliana pholem protein 2*) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor constitutivo 35S..... 35
- Figura 2 - Vetor de expressão pCAMBIA2201/AtSuT2, contendo o gene *uidA* (GUS), sob controle do promotor AtSuT2 (*Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2*) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor constitutivo 35S..... 35
- Figura 3- Vetor de expressão pCAMBIA2201/CsPhP2, contendo o gene *uidA* (GUS), sob controle do promotor CsPhP2 (*Citrus pholem protein 2*) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor constitutivo 35S..... 36
- Figura 4- Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens* com diferentes construções gênicas contendo gene *uidA* sob controle dos promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. A) Explante inicial (segmentos de epicótilo). B) Desenvolvimento de gemas adventícias após 30 dias em ausência de luz. C) Brotos obtidos após 60 dias de cultivo. D) Folha expressando o gene *uidA* nos feixes vasculares após teste histoquímico GUS. E) Broto GUS positivo enxertado *in vitro* em citrange ‘Carrizo’. F) Desenvolvimento da planta enxertada *in vitro* após a aclimatização..... 48
- Figura 5- Análise da PCR em plantas de laranja ‘Hamlin’. ..... 51
- Figura 6- Análise de *Southern blot* em plantas PCR+ aclimatizadas transformadas com os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhp2..... 52



Figura 7- Folhas de laranja 'Hamlin' transformadas. A) Folha transformada com construção contendo o promotor AtPhP2, após ensaio de GUS. B) Corte de pecíolo de folha transformada com o construção contendo o promotor AtPhP2, após ensaio de GUS. C) Folha transformada com construção contendo o promotor AtSuT2, após ensaio de GUS. D) Corte de pecíolo de folha transformada com o construção contendo o promotor AtSuT2, após ensaio de GUS. E) Folha transformada com construção contendo o promotor CsPhP2, após ensaio de GUS. F) Corte de pecíolo de folha transformada com o construção contendo o promotor CsPhP2, após ensaio de GUS. G) Folha de planta transformada com promotor 35S após ensaio histoquímico e desidratação no álcool. H) Corte manual de pecíolo de folha de planta transformada com o promotor CaMV35S após ensaio histoquímico de GUS. Barras: 200µm. (e: epiderme; co: córtex; f: floema; m: medula; x: xilema; setas indicam região corada de azul pelo ensaio de GUS).....

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Transformação genética de citrange ‘Carrizo’ [( <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.] e de laranja doce ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, utilizando as construções gênicas pCAMBIA2201/ AtPhP2, pCAMBIA2201/ AtSut2 e pCAMBIA2201/ CsPhP2.....	49
------------	--	----



**LISTA DE ABREVIATURAS**

AtPhP2 – Gene *Arabidopsis thaliana pholem protein 2*

AtPT - *Arabidopsis Phosphate Transporters*

AtSuC2 - *Arabidopsis thaliana sucrose carrier*

AtSuT2 – Gene *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2*

BAP - Benzilaminopurina

CaMV35S - *Cauliflower mosaic virus* - CaMV

CsPhP2 – Gene *Citrus pholem protein 2*

CsPP - Promotor do gene da fenilalanina amônia-liase em citros

CTV - *Citrus tristeza virus*

GFP - *Green Fluorescent Protein*

GUS -  *$\beta$ -glucoronidase*

HLB - Huanglongbing

LUC- *Luciferase*

*manA* – Gene que codifica para a enzima fosfomanose-isomerase

MS – MURASHIGE & SKOOG

MT – MURASHIGE & TUCKER

*nptII* – Gene neomicina fosfotransferase II

PAL - Fenilalanina amônia-liase

pCAMBIA/2201 – Vetor binário dos plasmídeos utilizados (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália)

PCR - Polymerase Chain Reaction

PEG - Polietileno glicol

Pi - Fósforo inorgânico

PME - pectin methylesterase

PMI - Fosfomanose-isomerase

TBE – Tampão Tris, Ácido bórico, EDTA

T-DNA - *Transferred DNA*

*uidA* – Gene  $\beta$ -glucoronidase (GUS),

YEP- Meio de cultura para crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*

X-GLUC - 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida

## 1 INTRODUÇÃO

Embora o seu centro de origem seja as regiões subtropicais e tropicais da Ásia e do arquipélago Malaio (WEBBER; REUHER; LAWTON, 1967), atualmente, as plantas cítricas se encontram dispersas por quase todo o mundo. O Brasil é o país líder mundial em produção de citros, com aproximadamente 20 milhões de toneladas produzidas na safra de 2008 (FAO, 2009). Mesmo com a cultura presente desde a época da colonização e podendo ser cultivada em quase todo território nacional, a citricultura brasileira concentra-se no estado de São Paulo (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Devido à base genética estreita e a continuidade espacial e temporal existentes no cultivo de citros, a cultura tem sofrido ao longo dos anos uma grande oscilação de safras devido às condições climáticas, problemas fitossanitários e baixos preços pagos ao produtor, levando à erradicação de plantas. De modo geral, doenças como o cancro cítrico, clorose variegada dos citros (CVC), declínio, morte súbita e mais recentemente, o Huanglongbing (HLB) têm merecido destaque, uma vez que contribuem para aumento dos custos de produção. A forma mais eficiente de diminuir os problemas fitossanitários na cultura é a utilização de cultivares resistentes e/ou tolerantes a doenças e a pragas. O melhoramento genético convencional dos citros enfrenta uma série de barreiras na sua biologia reprodutiva (OLIVEIRA; CRISTOFANI; MACHADO, 2001). Sendo assim, a maioria dos cultivares existentes nas principais regiões citrícolas do mundo é proveniente de seleções de sementes ou de mutações somáticas espontâneas (POMPEU JUNIOR; FIGUEREDO; PIO, 1983).

A incorporação de instrumentos biotecnológicos, como a cultura de tecidos, fusão de protoplastos, genética molecular e a transformação genética de plantas em programas de melhoramento de citros possibilita a utilização da variabilidade genética disponível (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), além de possibilitar a utilização do germoplasma ainda não explorado, podendo gerar novas combinações que podem ser incluídas em programas de melhoramento convencional, ou resultar em novas variedades (GMITTER JUNIOR; HU, 1990).

A transformação genética de plantas é um instrumento biotecnológico que tem se tornado prática rotineira nos programas de melhoramento, uma vez que permite a obtenção de plantas a

partir da introdução de genes de interesse agrônômico superando as barreiras reprodutivas naturais existentes entre as espécies (GANDER; MARCELINO; ZUMSTEIN, 1996).

De modo geral, a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* é o método de transformação genética mais utilizado em citros (MOLINARI et al., 2004; ANANTHAKRISNAN et al., 2007). Nesta metodologia, a bactéria possui um plasmídeo que contém um T-DNA que é transferido para a planta. O T-DNA é composto por vários genes que são agrupados em um cassete de expressão, contendo basicamente o promotor seguido de uma sequência codificadora (gene de interesse), um gene marcador e um sinal de poliadenilação (terminador).

Na busca por plantas transgênicas que apresentem resistência ou tolerância ao Huanglongbing (HLB), doença causada por uma bactéria endêmica de floema, é desejável avaliar construções gênicas que apresentem maior especificidade, ou seja, aquelas nas quais o gene de interesse seja expresso, preferencialmente, na região em que a bactéria coloniza a planta. Assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de citrange ‘Carrizo’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) das cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o gene *uidA* (GUS), sob o controle dos seguintes promotores específicos para expressão gênica nos tecidos do floema: *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2), *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2), para verificar se esses promotores regulam a expressão do gene repórter na região do floema.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A citricultura brasileira

A origem do citros é atribuída ao sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967; DONADIO; MOURÃO-FILHO; MOREIRA; 2005). Outros centros de origem são apontados, como o norte da região Indo-Burma, assim como a região de Yunnan, no centro sul da China.

De acordo com Swingle e Reece (1967) o gênero *Citrus* é classificado dentro da subtribo Citrinae pertencente à tribo Citrae da família Rutaceae. Na subtribo Citrinae estão 13 gêneros e 65 espécies contendo as principais espécies de interesse comercial dos gêneros *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus*. As espécies do gênero *Citrus* apresentam divergências quanto à classificação. Porém, de acordo com o proposto por Swingle (1943), reconhecem-se 16 espécies, dentre as quais estão as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus clementina* Hort. ex Tan., *Citrus tangerina* Hort. ex Tan.) e limões (*Citrus limon* L. Burm. F.) (ARAÚJO; ROQUE, 2005). Entretanto, dentro do gênero *Citrus* a diversidade genética é baixa, visto que somente três espécies parecem ser os ancestrais básicos do gênero (*Citrus medica*, *Citrus grandis* e *Citrus reticulata*), segundo o proposto por Nicolosi et al. (2000).

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



No Brasil, a cultura do citros foi introduzida pelos portugueses no início do século XVI pelas expedições colonizadoras. A partir dessa época, o cultivo das plantas cítricas se expandiu por todo o território brasileiro devido às condições ideais para crescimento e desenvolvimento encontrados no país, tornando-se aparentemente plantas nativas em certas áreas, como no Mato Grosso (MOREIRA; PIO, 1991). Segundo dados da FAO (2009), na safra 2007-2008, o Brasil foi responsável pela produção de aproximadamente 20 milhões de toneladas de laranja, destinadas, em sua maior parte, para indústria de suco de laranja concentrado congelado, sendo que quase 90% desse total foram produzidos no estado de São Paulo (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009). Atualmente, constata-se uma concentração bastante acentuada na região sudeste, ocupando longas extensões de terra no estado de São Paulo, com cerca de 600 mil ha cultivados com citros (IBGE, 2009).

A história da cultura do citros no Brasil é marcada por perdas devido a pragas e doenças. Apesar do elevado número de espécies, cultivares e clones de citros, são poucas aquelas utilizadas comercialmente, sendo as principais copas as laranjas ‘Pêra’ ‘Valência’ e ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e o principal porta-enxerto o limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck).

Por volta de 1910, os pomares brasileiros foram afetados pela gomose, doença causada por *Phytophthora spp.*, fato este que impossibilitou o uso da laranja ‘Caipira’ como porta-enxerto, sendo substituída pela laranja azeda. Em 1937, constatou-se a presença do vírus da tristeza dos citros (CTV) em grande parte dos pomares brasileiros. Essa doença foi controlada com a utilização de outros porta-enxertos, em substituição à laranja azeda. A partir de 1957, os pomares foram atingidos pelo cancro cítrico, doença causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Mais tarde, no ano de 1987, foi constatada a presença da clorose variegada do citros, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. No ano de 2001, a morte súbita do citros, doença de causa desconhecida foi detectada nos pomares da região sul do triângulo Mineiro, Norte e Noroeste do Estado de São Paulo (MATTOS et al., 2005).

Em maio de 2004, o Huanglongbing (HLB), popularmente conhecido como *greening*, descoberto em 1919 no sul da China foi encontrado no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004), sendo relatada nos últimos anos como uma doença bacteriana de grande importância para os pomares de citros do mundo, causando prejuízos

drásticos ao cultivo e à produção. A bactéria *Candidatus Liberibacter* apresenta suficiente variabilidade genética o que permite classificá-la em grupos ou variantes genéticos distintos. Além disso, um fitoplasma foi recentemente associado ao HLB (CHEN et al.; 2009). No Estado de São Paulo, constatou-se a variante asiática (COLETTA-FILHO et al., 2004) e um variante até então não descrito em nenhum outro país, a *Candidatus Liberibacter americanus* (TEIXEIRA et al., 2004). Até o momento, não foi encontrada fonte resistência para a doença dentro do gênero *Citrus*.

O controle químico de doenças bacterianas é praticamente inviável economicamente. Por outro lado, tratamentos culturais ajudam na convivência com a doença. Porém, no caso do HLB, existe um agravante que é o controle do vetor, o psílideo *Diaphorina citri*, que onera ainda mais o custo de produção da laranja.

Apesar dos problemas fitossanitários, a produção brasileira de citros é a maior do mundo (FAO, 2009). Isso se deve, em grande parte, aos esforços de produtores que insistem na produção de citros mesmo nos momentos de crise (FNP, 2009). Dessa forma, a melhor maneira de aumentar a rentabilidade da citricultura é diminuir o custo da caixa de laranja. Isso pode ser conseguido com a obtenção de cultivares resistente a doenças e pragas, diminuindo o uso de defensivos agrícolas.

Portanto, a obtenção de variedades resistentes consiste no melhor método de controle de pragas e doenças sendo este, hoje, o principal objetivo dos programas de melhoramento. Contudo, programas tradicionais de melhoramento de citros enfrentam limitações quanto à biologia reprodutiva do citros. Programas de melhoramento em citros vêm sendo desenvolvidos desde o século XIX (DAVIES; ALBRIGO, 1994) na busca de maior diversidade genética. Porém, os métodos convencionais que utilizam a hibridação sexual, têm apresentado pouco sucesso (SPIEGEL-ROY; VARDI, 1984) devido a aspectos da biologia reprodutiva dos citros, como alta heterozigose, esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual poliembrionia nucelar e juvenalidade (VARDI; SPIEGEL-ROY; GALUN, 1974; LIN; NITO; IWAMASA, 1989; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Sendo assim, a biotecnologia pode contribuir de forma eficiente no ganho de características desejáveis (MACHADO et al., 2005). Com isso, a obtenção de plantas geneticamente modificadas tornou-se um instrumento biotecnológico de grande utilidade por fornecer vantagens sobre o melhoramento tradicional, já que permite a

introdução de material genético em situações em que os organismos são incompatíveis (espécies, gêneros, famílias e até reinos) (MACHADO et al., 2005).

## 2.2 Transformação genética de plantas cítricas

O primeiro relato de transformação genética em citros foi feito por Kobayashi e Uchimiya (1989), utilizando polietileno glicol (PEG) para introdução direta de DNA em protoplastos de laranja ‘Trovita’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Desde então, outros trabalhos de transformação genética em citros têm sido relatados, pela introdução direta de DNA exógeno em protoplastos de limão rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990), laranja ‘Itaboraí’ (FLEMING et al., 2000), e laranja ‘Valência’ (GUO et al., 2005) com PEG; pelo método de eletroporação de protoplastos embriogênicos (NIEDZ; MCKENDREE, SHATTERS Jr., 2003); bombardeamento de partículas em células embriogênicas de tângelo (YAO et al., 1996) e pelo co-cultivo de segmentos de epicótilos ou segmentos internodais com *Agrobacterium tumefaciens* (BOND; ROOSE, 1998; CERVERA et al., 1998a; 1998b; GHORBEL et al., 2000; GUTIÉRREZ; LUTH; MOOR, 1997; KANEYOSHI et al., 1994; MENDES et al., 2002; MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a; 1995b; 1997; 2004; YANG et al., 2000; RODRÍGUEZ et al., 2008) ou *Agrobacterium rhizogenes* (YANG; SUN; TONG, 2006).

Atualmente, o método de transformação genética em citros mais utilizado é aquele mediado por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando explantes juvenis provenientes de segmentos de epicótilo (YU et al., 2002; PEÑA et al., 2004a; DOMÍNGUEZ et al., 2004; MOLINARI et al., 2004; ANANTHAKRISNAN et al., 2007) ou segmentos internodais coletados de plântulas cultivadas em casa de vegetação (FAGOAGA et al., 2001, DOMÍNGUEZ et al., 2004). A transformação genética também tem sido realizada com explantes coletados de tecidos adultos (ALMEIDA et al., 2003; CERVERA et al., 1998a; 2008; RODRÍGUEZ et al., 2008) para a obtenção de plantas transgênicas que não apresentem juvenilidade ou menor período juvenil.

A cultura de tecidos vegetais é baseada no conceito de totipotência celular, que consiste na capacidade da célula desenvolver uma planta completa, desde que submetida às condições que estimulem sua divisão e diferenciação (TORRES, 1999). Portanto, muitos trabalhos de transformação genética de plantas envolvem o estabelecimento e a otimização de novas

metodologias que visem avaliar os diversos fatores que afetam a eficiência do processo (DURÁN-VILA et al., 1992; PEÑA et al., 1995a; 1995b; BOND; ROOSE, 1998).

A transformação genética de plantas é influenciada por diversos fatores. Por esse motivo, já foi avaliado o emprego de diferentes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997, CEVERA et al., 1998a), o efeito da densidade da suspensão bacteriana (YU et al., 2002; CEVERA et al., 2008), da seleção, da regeneração (RODRIGUEZ et al., 2008), período de co-cultivo (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997) e do seccionamento longitudinal dos explantes (YU et al., 2002) na eficiência de transformação genética de citros.

Muitos cultivares de citros têm sido transformados com relativa facilidade, enquanto que outros têm mostrado uma eficiência muito baixa, ou até mesmo se mostram recalcitrantes ao processo de transformação, mostrando que para cada genótipo deve existir um ajuste no protocolo de cultura de tecidos adotado. Essa dificuldade na transformação tem sido relacionada à dificuldade de regeneração das gemas adventícias a partir de células transformadas (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

Ao realizarem análise histológica de plantas cítricas transformado com o gene *uidA* (GUS), Peña et al. (2004) observaram a expressão em células derivadas do câmbio vascular, as quais poderiam diferenciar em gemas transformadas. A diferenciação de células em gemas ou calos é influenciada pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura de co-cultivo (citocininas/auxinas) (PEÑA et al., 2004; CEVERA et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2008). Além disso, com a adição de auxina no meio de cultura de co-cultivo, há um aumento na proporção de DNA em fase de duplicação (fase S do ciclo celular) favorecendo a integração do DNA exógeno ao DNA vegetal (PEÑA et al., 2004).

Um dos genes presentes no T-DNA a ser introduzido na planta é o gene de seleção. O gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, é o mais empregado na transformação genética de citros (MOLINARI et al., 2004; PEÑA, 2005; BOSCARIOL et al., 2006). Entretanto, mesmo quando os agentes de seleção estão presentes durante o processo de transformação genética, a ocorrência de escapes é muito comum e tem sido relacionada à proteção das células não transformadas ao agente seletivo pelas células transformadas adjacentes e pela persistência da *Agrobacterium tumefaciens* no tecido inoculado (DOMÍNGUEZ et al., 2004). Uma opção ao uso de genes que codificam para resistência a antibiótico, já que esses

genes se apresentam como um obstáculo para a aceitação futura do transgênico, é a utilização do gene *manA*, que codifica para a enzima fosfomanose-isomerase (PMI), a qual catalisa a conversão de manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, permitindo a regeneração das células transformadas em meio de cultura contendo manose, enquanto as células não transformadas têm seu crescimento inibido (BOSCARIOL et al., 2003).

Depois de obtidos os brotos, via organogênese *in vitro*, normalmente realiza-se a enxertia *in vitro* dos ápices meristemáticos transgênicos sobre porta-enxertos não transgênicos provenientes de plântulas cultivadas *in vitro* (PEÑA, 1995; 2005; DOMÍNGUEZ et al., 2000; FAGOAGA et al., 2001; YU et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2008, CERVERA et al., 2008). A enxertia *in vitro* é realizada devido à grande dificuldade encontrada no enraizamento de algumas espécies de *Citrus*.

A introdução de vários genes de interesse agrônômico tem sido possível em diferentes variedades de citros, como por exemplo, a introdução do gene *hal2* em citrange ‘Carrizo’, conferindo resistência à salinidade (CEVERA et al., 2000), a obtenção de plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ apresentando o gene que codifica a enzima PME (pectin methylesterase) relacionado com a qualidade do fruto (GOU et al., 2005), a transformação de pomelo contendo o gene *gna*, que confere resistência contra afídeos (YANG et al., 2000), e a introdução dos genes *leafy* e *apetala 1* de *Arabidopsis thaliana* em plantas de citrange ‘Carrizo’, que promove uma diminuição no período juvenil, permitindo o florescimento das plantas transformadas já no primeiro ano de cultivo (PEÑA et al., 2001).

A transformação genética de plantas também tem sido utilizada para introdução de seqüências gênicas no genoma da planta visando resistência a doenças causadas por bactérias, vírus e fungos. Como exemplo, citam-se a introdução do gene *atacina* (BOSCARIOL et al., 2006) e do gene *cecropina* (AZEVEDO, 2005), isolados de insetos, responsáveis pela formação de peptídeos que apresentam atividade antibacteriana; a introdução do gene *hrpN*, isolado de *Erwinia amylovora*, relacionado a ativação de mecanismos de defesa da planta (BARBOSA-MENDES et al., 2009) e também a introdução do gene *Xa21* isolado de uma espécie selvagem de arroz (*Oryza longistaminata*), resistente a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, visando a obtenção de plantas resistentes ao cancro cítrico (BOSCARIOL, 2004). Plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ contendo os genes *hrpN* ou o gene *atacina* mostraram uma redução significativa na

severidade dos sintomas de cancro cítrico (BARBOSA-MENDES et al., 2009; BOSCARIOL et al., 2006).

O gene *p23*, isolado de tomate, que codifica a proteína microbiana PR-5, foi introduzido em laranja doce, promovendo maior resistência à infecção por *Phytophthora citrophthora* (FAGOAGA et al., 2001). Em outro trabalho, Azevedo et al. (2006b) na tentativa de obterem plantas transgênicas resistentes a *Phytophthora*, transformaram limão ‘Cravo’ com o gene *bO* isolado de *Halobacterium halobium*, que está relacionado a ativação do mecanismo de defesa da planta.

Para obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus, a estratégia mais utilizada é aquela baseada na resistência derivada do patógeno, obtidas pela introdução de parte do genoma do vírus no genoma da planta. Desta forma, já foram transformadas plantas com seqüência gênica da capa protéica do vírus do CTV (*Citrus tristeza virus*) (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; GHOBEL et al., 2000; DOMÍNGUEZ et al., 2002), seqüência do gene da proteína p23 (FAGOAGA et al., 2006), seqüência do gene que codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e um fragmento do gene da proteína p23 unido a uma seqüência de regiões não transcritas (3UTR) (FEBRES et al., 2003). Estes trabalhos foram desenvolvidos com diferentes genótipos de citros tais como, lima ácida (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; DOMÍNGUEZ et al., 2002), pomelo (FEBRES et al., 2003; FEBRES; LEE; MOORE, 2008), citrange ‘Carrizo’, laranja ‘Pineapple’ (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997) e laranja azeda (GHORBEL et al., 2000).

Em experimentos de linhagens transgênicas com o gene da capa protéica do CTV em lima ácida ‘Galego’, as plantas transgênicas promoveram um aumento na resistência ao CTV quando inoculadas com borbulhas e quando inoculadas com afídeos. A resistência das linhagens transgênicas quando comparada à das linhagens não transgênicas foi atribuída ao acúmulo de proteína viral nas linhagens transgênicas (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Na maioria dos trabalhos relacionados à transformação genética de plantas os genes introduzidos são controlados por promotores constitutivos, como o CaMV35S (BOSCARIOL et al., 2006). No entanto, a expressão constitutiva de genes exógenos no genoma das plantas transformadas pode causar restrições na futura comercialização de plantas transformadas geneticamente, além de poder levar a planta um estresse desnecessário devido à expressão de

forma generalizada da seqüência. Uma maneira de contornar esses problemas pode ser alcançada por meio do uso de promotores capazes de controlar a expressão gênica, tais como aqueles induzidos pelo patógeno ou tecido-específicos (PAOLI et al., 2007; HARAKAVA, 2000; BARBOSA-MENDES et al., 2009).

### 2.3 Promotores e a regulação do padrão de expressão em plantas

Na transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*, ocorre a transferência de um T-DNA (*transferred DNA*), em que são inseridos os genes de interesse (ANDRADE, 2003). Porém, para que esse gene seja expresso na planta transformada é imprescindível que este esteja sob controle de um promotor.

A maioria das construções gênicas utilizadas nas transformações em citros possui o gene de interesse dirigido pelo promotor constitutivo 35S, obtido do vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus* - CaMV) (FLEMING et al., 2000; MOLINARI et al., 2004; DOMÍNGUEZ et al., 2004). Esse promotor é caracterizado pela forte expressão nos tecidos das plantas, não apresentando especificidade. O uso de promotores que confirmam expressão induzida por patógeno ou que sejam tecido-específicos, está ligado à necessidade de obter construções com maior especificidade de expressão (HARAKAVA, 2000; BARBOSA-MENDES et al., 2009).

Um exemplo, neste caso, são os estudos de genes que codificam para transporte de fosfato, fosfatase e promotores específicos para diferentes tecidos, que respondem ao estresse de fósforo inorgânico (Pi). Essas seqüências podem ser utilizadas para gerar transgênicos mais eficientes na utilização de fósforo em solos deficientes em Pi, como é o caso dos solos do cerrado (FUENTE et al., 1997; MUCHAL et al., 1996; RAGHOTHAMA, 1999). Muchhal et al. (1996) isolaram cDNA de *Arabidopsis thaliana*, em condições de deficiência de fósforo e descreveram os genes AtPT1 e AtPT2 (*Arabidopsis Phosphate Transporters*) como transportadores de fosfato, sendo que o gene AtPT2 foi detectado apenas nas raízes. Portanto, buscando comprovar a especificidade de direcionamento desses genes à raiz e a ativação em condições de deficiência de fósforo inorgânico desses promotores, Karthikey et al. (2002) transformaram *Arabidopsis thaliana* com três diferentes genes repórteres, GUS ( $\beta$ -glucoronidase), LUC (*luciferase*) e GFP

(*Green Fluorescent Protein*), sob o controle dos promotores dos genes AtPT1 e AtPT2, e comprovaram a ativação do promotor do gene AtPT1 como tecido-específico sob estresse de fósforo inorgânico. Já o promotor AtPT2 não se mostrou específico, ou seja, sua expressão ocorreu tanto em raízes como em folhas.

Outra estratégia é a utilização de promotores induzidos pelo patógeno para obtenção de plantas transgênicas capazes de expressar o gene de interesse apenas no local e no momento da infecção do patógeno (GURR; RUSHTON, 2005b). O promotor *gst1*, clonado a partir do gene que codifica a proteína glutationa S-transferase de batata, ativou a transcrição gênica em resposta à infecção por *Venturia inaequalis* e *Erwinia amylovora* em plantas transgênicas de maçã (MALNOY et al., 2006). Em citros, esse mesmo promotor promoveu a expressão do gene *uidA* (GUS), em resposta a indução por ferimento ou pelo patógeno *Xanthomonas citri subsp. citri* (MENDES et al., 2009).

Para maior controle da expressão dos genes de interesse, é possível utilizar promotores específicos para regular a expressão de genes no local colonizado por patógenos (GURR; RUSTON, 2005). O promotor do gene fenilalanina amônia-liase (PAL) de citros (CsPP) demonstrou dirigir a expressão do gene *uidA* (GUS) no xilema e em células da epiderme de pecíolos em plantas transgênicas de tabaco e de laranja ‘Valência’ (AZEVEDO et al., 2006a). Esse promotor foi utilizado na transformação genética de citros para dirigir a expressão do gene *cecropin M39* no xilema, local de colonização da bactéria *Xylella fastidiosa* e assim promover o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a Clorose Variegada dos Citros (CVC) (PAOLI, 2007).

Em estudos de transporte e expressão de componentes celulares, Ivashikina et al. (2003) isolaram o promotor do gene AtSuC2 (*Arabidopsis thaliana sucrose carrier*) e transformaram *Arabidopsis thaliana* com uma construção contendo GFP (*Green Fluorescent Protein*) sob o controle desse promotor e verificaram expressão localizada nas células do floema. Da mesma forma, Zhao et al. (2004) trabalhando com morango demonstraram uma expressão específica no floema de plantas transformadas com uma construção gênica contendo o gene repórter *uidA* sob o controle do promotor AtSuC2. Guo et al. (2004) demonstraram a expressão do gene *uidA* (GUS) e luciferase no floema de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformados com esses



genes sob o controle do promotor do gene que codifica a proteína do floema (PP2) de *Curcubita moschata*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), e no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), unidades da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP.

#### 3.1 Material vegetal

Os experimentos de transformação genética foram realizados com o cultivar porta-enxerto citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata* Raf.), e três cultivares copa de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.). A obtenção das sementes do cultivar porta enxerto foi de frutos coletados no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP. Também foram utilizados os cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’ para a realização dos experimentos transformação genética. Os frutos de laranja ‘Valência’ foram obtidos no campo experimental da ESALQ/USP. Os frutos de laranja ‘Hamlin’ e ‘Pêra’ foram obtidos mediante doação no Centro APTA ‘Sylvio Moreira’, em Cordeirópolis, SP.

Os explantes utilizados para a realização dos experimentos de transformação genética foram segmentos de epicótilo de 0,8 a 1 cm, obtidos a partir de plântulas previamente germinadas e estioladas *in vitro*, provenientes de sementes de frutos maduros das cultivares a serem estudadas. As sementes foram retiradas dos frutos e lavadas em água corrente. Em seguida, foram deixadas em local aberto para perder o excesso de umidade, tomando-se o devido cuidado para que não houvesse a desidratação em excesso das mesmas. Após esse processo, as sementes foram armazenadas em local com temperatura de 16 °C por um período de 2 meses para que se procedesse a germinação das mesmas *in vitro* de forma gradual.

Para a germinação *in vitro*, retirou-se o tegumento das sementes e procedeu-se a assepsia das mesmas com uma solução de hipoclorito de sódio (1%) por 20 minutos e, em seguida, em câmara de fluxo laminar as mesmas passaram por tríplice lavagem com água destilada previamente autoclavada. Após a assepsia, as sementes foram colocadas em tubos de ensaio (25 x

125 mm), contendo 30 mL de meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), contendo 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup> e 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e pH ajustado para 5,8. Para esterilização, o meio de cultura foi autoclavado à temperatura de 120 °C.

As sementes foram incubadas no escuro, à temperatura de 27° C por 40 dias, para que as plântulas obtidas sofressem um estiolamento natural do epicótilo. Posteriormente ao período de germinação e estiolamento, os tubos de ensaio contendo as plântulas foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 27 °C, por um período de 10 a 15 dias, quando foram utilizadas para retirada de segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm de comprimento) utilizados como explantes para a transformação genética.

### 3.2 Vetores de expressão

As construções gênicas utilizadas foram obtidas pelo Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo, SP.

Para os experimentos de transformação genética, foram utilizadas três construções gênicas clonadas em plasmídeo pCAMBIA 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália), inserido em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105. O plasmídeo pCAMBIA 2201 é composto do gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina, do gene repórter *uidA* (GUS) sob o controle de um promotor e de um terminador NOS.

As construções gênicas utilizadas foram AtPhP2-GUS, contendo o gene *uidA*, sob o controle do promotor *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (Figura 1), AtSuT2-GUS, contendo o gene *uidA* sob o controle do promotor *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (Figura 2) e CsPhP2-GUS, contendo o gene *uidA* sob o controle do promotor *Citrus pholem protein 2* (Figura 3).

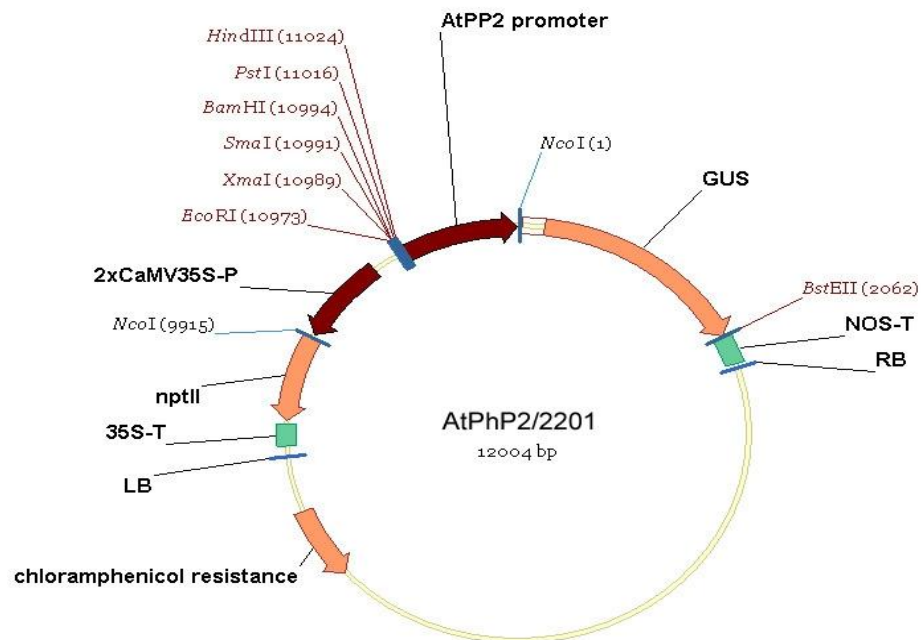


Figura 1 – Vetor de expressão pCAMBIA2201/AtPhP2, contendo o gene *uidA* (GUS), sob controle do promotor AtPhP2 (*Arabidopsis thaliana pholem protein 2*) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor constitutivo 35S.

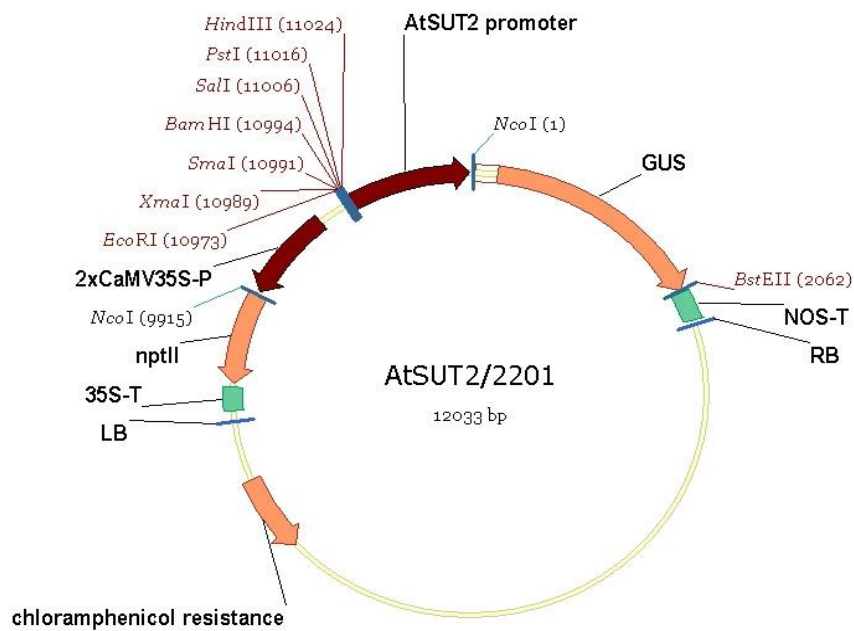


Figura 2 – Vetor de expressão pCAMBIA2201/AtSuT2, contendo o gene *uidA* (GUS), sob controle do promotor AtSuT2 (*Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2*) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor constitutivo 35S.

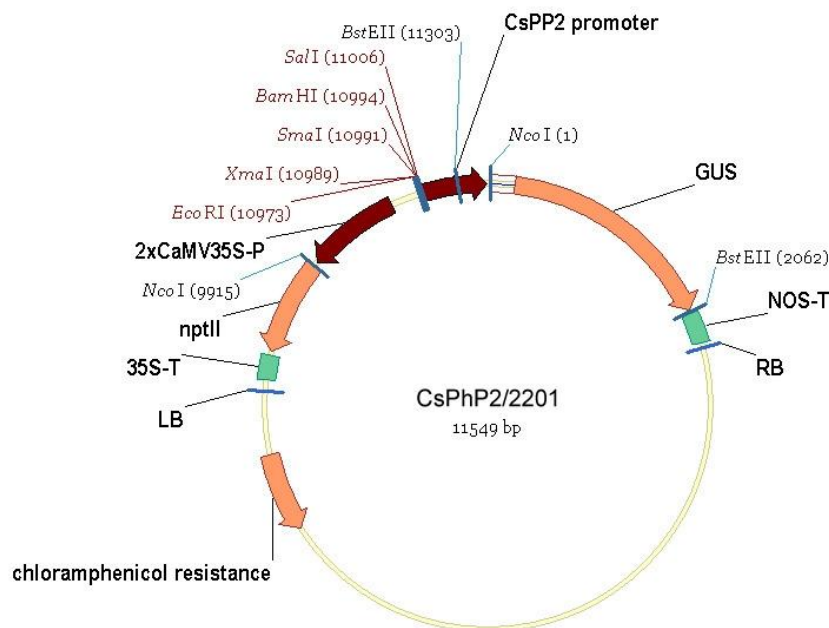


Figura 3 – Vetor de expressão pCAMBIA2201/CsPhP2, contendo o gene *uidA* (GUS), sob controle do promotor CsPhP2 (*Citrus pholem protein 2*) e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor constitutivo 35S.

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

Os isolados de *Agrobacterium tumefaciens* utilizados para transformação genética foram recebidos em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura YEP [10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, solidificado com 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar e suplementado com os antibióticos canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (500 mg.L<sup>-1</sup>).

Dessas culturas, duas colônias foram transferidas para frascos contendo 50 ml de meio de cultura YEP líquido, suplementado com os antibióticos canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (500 mg.L<sup>-1</sup>), sendo então incubadas por 16 horas, a 28 °C e sob agitação (160 rpm). Após o crescimento da bactéria, mediu-se a absorbância da solução bacteriana e ao atingir absorbância correspondente a concentração de 5 x 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/mL retirou-se o material da agitação. Essa solução contendo a suspensão bacteriana foi utilizada para fazer o estoque permanente.

Para conservação da bactéria, foi feito um estoque permanente, utilizando-se 50% da suspensão bacteriana cultivada em meio YEP e 50% de solução de glicerol 50% (sendo 1 parte de água destilada autoclavada para 1 parte de glicerol). Em tubos criogênicos (2,5 ml), foi colocado

1 mL de solução bacteriana e 1 ml de solução de glicerol, que foi agitado para homogeneização da mistura. Em seguida, o tubo foi transferido para ultra freezer (-80 °C).

A partir do estoque permanente, para cada experimento de transformação genética, foi preparado meio YEP sólido contendo os antibióticos canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (500 mg.L<sup>-1</sup>) e distribuído em placas de Petri (90 x 15 mm), onde colônias de *Agrobacterium tumefaciens* do estoque permanente foram cultivadas para que formassem colônias isoladas. Após esse período, duas colônias da bactéria foram retiradas da placa e transferidas para meio YEP líquido acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg.L<sup>-1</sup>) e rifampicina (500 mg.L<sup>-1</sup>), em erlenmayer de 250 ml contendo 50 ml de meio YEP. Esses erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 160 rpm e temperatura de 28°C, até a solução bacteriana atingir absorvância correspondente a concentração de  $5 \times 10^8$  a  $10^9$  UFC/mL. Posteriormente, a suspensão formada foi transferida para tubos de centrífuga (Falcon<sup>®</sup>, 50 mL) que foram levados à centrífuga por 20 minutos a 4800 rpm, à temperatura de 20 °C.

Após centrifugação, o sobrenadante (meio YEP líquido) foi descartado e o precipitado formado foi ressuspendido em meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), na concentração de  $5 \times 10^8$  a  $10^9$  UFC/ml para ser utilizada na transformação.

### 3.4 Transformação genética

As plântulas germinadas *in vitro* foram seccionadas para obtenção dos explantes de 0,8 a 1,0 cm, que foram sendo reservados em placa de Petri (60 x 15 mm) contendo meio de cultura MS líquido, suplementado com 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,2. Em seguida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril foi retirada a solução de meio MS líquido da placa de Petri e foi colocado suspensão bacteriana. Este material foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse procedimento, foi retirada a suspensão bacteriana com auxílio de pipeta de Pasteur estéril e os explantes foram secos em folha de papel absorvente estéril.

Após secos, os explantes foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1962), suplementado com 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 8 g.L<sup>-1</sup> de ágar, pH 5,8, acrescido de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Benzilaminopurina) e sem antibióticos por um período de 2 dias (co-cultivo) à temperatura de 24 °C em ausência de luz.

### 3.5 Seleção, regeneração e aclimatização das plantas

Após 2 dias de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura MT, suplementado com sacarose (25 g.L<sup>-1</sup>), ágar (8 g.L<sup>-1</sup>), BAP (1 mg.L<sup>-1</sup>), canamicina (50 mg.L<sup>-1</sup>) e cefatoxima (500 mg.L<sup>-1</sup>), e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias, por um período de 60 dias quando o material foi transferido para a sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz e à temperatura de 27°C.

Os brotos obtidos foram subcultivados até atingirem 1 cm de comprimento quando foram microenxertados em plântulas germinadas e estioladas *in vitro*. Neste momento, também foi retirada uma amostra do material vegetal para que fosse realizado o ensaio histoquímico com a solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida). Apenas o material que apresentou reação positiva (coloração azul) foi mantido e subcultivado em tubos de ensaio (25 x 125 mm) contendo 30 mL de meio de cultura MT por 40 dias.

Após a cicatrização dos ferimentos da enxertia *in vitro*, as plântulas foram aclimatizadas em vasos de polipropileno de 500 mL contendo substrato esterilizado (Plantmax<sup>TM</sup>). Esses vasos foram envoltos por um saco plástico para formar uma câmara úmida e as plantas foram aclimatizadas gradualmente até poderem ser transferidas para casa de vegetação certificada para o recebimento e manutenção de plantas transgênicas.

### 3.6 Detecção da atividade do gene *uidA* (GUS) pelo ensaio histoquímico

Os brotos foram avaliados pelo ensaio histoquímico de GUS para identificação das plantas transformadas segundo a metodologia apresentada por Brasileiro e Carneiro (1998). Pequenos segmentos de tecido foliar com aproximadamente 5 mm foram coletados e inoculados em solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida), à temperatura de 37 °C, em ausência de luz, por 16 h. Após este período, o material foi lavado com álcool etílico (70%) para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul no tecido vegetal.

### 3.7 Identificação de plantas transgênicas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para a confirmação da transformação genética, foi utilizada a técnica da PCR utilizando-se amostras de tecidos frescos de onde foi extraído o DNA de plantas de laranja 'Hamlin' transformada com construções contendo os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2 (três plantas de cada construção) e amostras de DNA de uma planta transformada com o gene *uidA* (GUS) sob controle do promotor CaMV 35S. Como controle positivo, foi utilizado o DNA de plasmídeo utilizado para a clonagem das construções. DNA de plantas não transformadas funcionaram como controle negativo.

Com o intuito de identificar as três diferentes construções, utilizaram-se três pares de primers para a identificação das seqüências dos promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. Para identificar as construções contendo os promotores AtPhP2 e AtSuT2, utilizaram-se pares de primers que identificam a seqüência específica ao promotor. Para a identificação da construção contendo o promotor CsPhP2, utilizou-se um par de primers que identifica a seqüência do gene *uidA* (GUS), visto que existe no genoma de citros seqüência similar à seqüência do promotor CsPhP2.

Primer AtPhP2-F: 5' - AAGCTTTATGCAACACATGATTG - 3'

Primer AtPhP2-R: 5' - CCATGGACCAGTATGATGTATTTATTT - 3'

Primer AtSuT2-F: 5' - AAGCTTCACACCACATTTAAATAGTTTA - 3'

Primer AtSuT2-R: 5' - CCATGGTTGACAAACCAAGAAAGTAAG - 3'

Primer GUS-F: 5' CAA CGA ACT GAA CTG GCA - 3'

Primer GUS-R: 5'CAT CAC CAC GCT TGG GTG - 3'.

O DNA foi extraído a partir de folhas coletadas de plântulas regeneradas nos experimentos de transformação genética, usando o método de extração CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). As reações foram realizadas em termociclador utilizando-se 1 ciclo de 94°C por 2 min para a primeira desnaturação, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2,5 min, com um ciclo final de 72 °C por 4 min, para detecção da construção



de interesse. O programa utilizado foi de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C 2,5 min, amplificando o fragmento de interesse.

Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos a separação em gel de eletroforese, amplificando as amostras em gel de agarose 1%, tampão TBE (0,5%), a uma voltagem de 85 V. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µm por ml) e posteriormente, visualizados e fotografados em luz UV, como auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

### **3.8 Análise da integração do DNA exógeno pela técnica de *Southern blot***

A análise de *Southern blot* foi realizada para a confirmação da integração do transgene no genoma das plantas de laranja ‘Hamlin’ PCR positivas, e também, para verificar o número de inserções do T-DNA no genoma das plantas geneticamente transformadas, com as construções contendo gene *uidA* (GUS) sob controle dos promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. Para isto, utilizaram-se 40 µg de DNA total de três plantas de laranja ‘Hamlin’ PCR positivas transformadas com cada construção (nove plantas), e o DNA de mais uma planta PCR positiva transformada com construção contendo o gene *uidA* (GUS) sob controle do promotor CaMV35S e uma planta não transformada.

O DNA foi extraído segundo o método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e digerido com a enzima de restrição *Eco* R1. Esta enzima corta o T-DNA apenas uma vez e não corta a seqüência do gene, permitindo que seja identificado o número de eventos de inserção do gene no genoma da planta analisada. Os fragmentos gerados na digestão foram separados em gel de agarose 0,8% e transferidos para membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). A hibridização foi realizada a 60°C em forno de hibridização (Amersham Biosciences), durante 16 h, com sonda do gene *uidA* (GUS) obtida por PCR. O fragmento obtido por PCR, foi separado em gel de agarose 0,8% e em seguida purificado, utilizando o kit “QIAEX® II Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Germany), e posteriormente marcado para sua utilização como sonda. A marcação da sonda foi realizada com fluoresceína utilizando-se kit “Gene Images™ Random Primer Labelling Module” (Amersham Biosciences)

e para a adoção da hibridização foi utilizado o kit “Gene Images CDP-Star Detection kit” (Amersham Biosciences), seguindo-se as instruções do fabricante.

### 3.9 Análise histológica

Para a visualização do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS), foram realizados cortes histológicos manuais de pecíolo de folhas de plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o promotor CaMV35S e com os promotores *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2), *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2). Para isso, retirou-se uma folha de uma planta transformada com cada construção contendo o pecíolo e esta foi colocada em solução de X-GLUC, para o procedimento de ensaio histoquímico segundo Brasileiro e Carneiro (1998). Com o auxílio de uma lamina de barbear (gilatte<sup>®</sup>), foram feitos cortes transversais do pecíolo das folhas, que posteriormente foram lavados em hipoclorito de sódio 10 % por 1 minuto. Em seguida, os mesmos foram colocados em água destilada por 10 minutos para posterior montagem das lâminas a serem observadas no microscópio estereoscópico.

A partir desse material realizou-se a comparação do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) pela observação da coloração dos cortes das plantas transformadas com o promotor 35S e das plantas transformadas com os promotores: *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2), *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Transformação genética de citrange ‘Carrizo’ (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) e laranja doce (*Citrus sinensis*) cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’

Plantas de citrange ‘Carrizo’ e de laranjas ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’ foram transformadas com as construções gênicas pCAMBIA2201/AtPhP2, pCAMBIA2201/AtSuT2 e pCAMBIA2201/CsPhP2. Cada experimento foi repetido 10 vezes, resultando em 120 experimentos de transformação genética. Desta forma, na realização destes trabalhos, foram utilizados 26402 segmentos de epicótilo (Figura 4 A) que regeneraram 1031 brotos GUS positivos (Figura 4 C e 4 D) (Tabela 1).

Foram obtidas plantas de citrange ‘Carrizo’, laranjas ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’ com todas as construções gênicas utilizadas. A eficiência de transformação foi calculada a partir do ensaio histoquímico de GUS realizado no momento da enxertia *in vitro* (Figura 4 E). As plantas GUS positivas obtidas foram aclimatizadas (Figura 4 F) e levadas para casa de vegetação certificadas para serem analisadas por PCR e *Southern blot*.

#### 4.1.1 Eficiência de transformação genética e porcentagem de brotos escapes

A eficiência de transformação pode variar muito entre genótipos e dentro do mesmo genótipo, sendo encontrados valores de 2% (MOORE et al., 1992) a 20,6% (PEÑA et al., 199b). Trabalhos envolvendo outras espécies de citros indicaram valores de transformação variando de 3,6% a 6,6% 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., 1995a).

No presente trabalho, todos os experimentos de transformação genética regeneraram brotos GUS positivos, sendo as eficiências de transformação genética maiores para citrange ‘Carrizo’, seguidas de laranja ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, independentemente da construção utilizada (Tabela 1). Resultados similares foram obtidos por Mendes et al. (2009), Peña et al. (1995b) e Moore et al. (1992).

O cultivar citrange ‘Carrizo’ apresentou as maiores médias de eficiência de transformação e as menores porcentagens de brotos escapes. A maior eficiência de transformação foi de (8,31%), obtida pelo cultivar citrange ‘Carrizo’, com a construção contendo o promotor AtSuT2.

A menor porcentagem de brotos escapes foi de 9,37%, obtida no cultivar citrange ‘Carrizo’ com a construção contendo o promotor AtPhP2. Resultados superiores de eficiência de transformação foram obtidos por Dutt e Grosser (2009), que registraram valores de 15% a 47% para eficiência de transformação de citrange ‘Carrizo’ em experimentos de estabelecimento de protocolo de transformação genética de citros.

Em trabalho realizado por Mendes et al. (2009) utilizando o gene *Xa21* foi obtida uma eficiência de transformação de 18,6% para a laranja ‘Hamlin’, 11,3% para a laranja ‘Valência’, 8,3% para laranja ‘Natal’ e 3% para laranja ‘Pêra’. No presente trabalho, também foram registradas médias de eficiência de transformação diferentes entre os cultivares de laranja doce, sendo observados valores de 2,06% a 6,08% para a laranja ‘Hamlin’, 2,87% a 3,68% para a laranja ‘Valência’ e 1,54% a 1,70% para a laranja ‘Pêra’ (Tabela 1).

A maior média de eficiência de transformação obtida para laranja doce foi de 6,08%, para transformação genética de laranja ‘Hamlin’, com a construção contendo o promotor CsPhP2. A menor média de eficiência de transformação obtida foi de 1,54%, na transformação de laranja ‘Pêra’ com a construção contendo o promotor AtPhP2 (Tabela 1). Boscariol et al. (2003) utilizando sistema de seleção positiva PMI/manose com cultivares de laranja ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Hamlin’, obtiveram eficiências de transformação genética que variaram de 3 a 7,6 %.

Boscariol et al. (2006) obtiveram 14% de eficiência de transformação genética de laranja ‘Hamlin’, trabalhando com o gene *atacina*, sob controle do promotor CaMV35S. Neste trabalho, a eficiência de transformação genética em laranja ‘Hamlin’ variou de 2,06% a 6,08% correspondendo às construções contendo o promotor AtPhP2 e CsPhP2, respectivamente (Tabela 1). Entretanto, Mendes et al. (2002) obtiveram até 15% de eficiência de transformação genética em laranja ‘Hamlin’ quando trabalharam com estabelecimento de protocolo de transformação de citros.

As médias de eficiência de transformação genética de laranja ‘Valência’ variaram de 2,87% a 3,68% (Tabela 1). Resultados superiores foram verificados por Almeida et al. (2003b), que trabalhando com o estabelecimento de protocolo de transformação genética de laranja doce, obtiveram uma eficiência de transformação de até 13,8% para este cultivar. Barbosa-Mendes (2007), trabalhando com o gene *hrpN* sob controle do promotor *gst1*, obteve uma eficiência de transformação de 5,6% para a laranja ‘Valência’ quando avaliou as plantas por PCR. Paoli et al.

(2007) também transformaram plantas de laranja ‘Valência’ com o gene *cecropin* MB39, sob controle do promotor da *PAL* e obtiveram uma eficiência de transformação genética de 7,3%.

No presente trabalho, o cultivar ‘Pêra’ mostrou-se o genótipo mais difícil de regenerar plantas geneticamente transformadas, com baixos valores de eficiência de transformação e altos valores de porcentagem de brotos escapes independentemente da construção utilizada (Tabela 1). Barbosa-Mendes (2007) trabalhando com transformação genética de laranja doce também regenerou plantas transgênicas do cultivar ‘Pêra’. Entretanto, a eficiência de transformação para esse cultivar também foi a mais baixa obtida naquele trabalho. Mendes et al. (2009) trabalhando com o gene *Xa21*, também transformaram laranja ‘Pêra’ e obtiveram uma eficiência de transformação genética de 3%. Em trabalho de transformação genética de laranja doce, Boscarriol et al. (2003), trabalhando com sistema de seleção positiva PI/manose, obtiveram uma eficiência de transformação de 7,6% para laranja ‘Pêra’. Entretanto, Almeida et al. (2003a), trabalhando com estabelecimento de protocolo de transformação de tecido adulto, não conseguiram regenerar plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas.

Trabalhos têm sido realizados para o estabelecimento de um protocolo eficiente de transformação genética em plantas cítricas. Entretanto, a eficiência de transformação é variável em função de diversos fatores, tais como, condições de incubação das plantas para coleta do explante, tempo de incubação dos explantes com *Agrobacterium tumefaciens*, condições de co-cultivo, espécies e variedades cítricas utilizadas na transformação e idade/maturação do tecido (DUTT; GROSSER, 2009, BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2009; ALMEIDA et al., 2003a; 2003b; MENDES et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Muitos cultivares de citros têm sido transformados com relativa facilidade, enquanto que outros têm mostrado uma eficiência muito baixa, ou até mesmo se mostram recalcitrantes ao processo de transformação. Os dados apresentados neste trabalho também confirmam essa influência do genótipo no processo de transformação genética de citros. Em citros, a variação na eficiência de transformação entre os cultivares é comum, sendo encontrados valores de 0,52% a 55,2% para citrange ‘Carrizo’ (MOORE et al., 1992; KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1995a; DUTT; GROSSER, 2009), de 10% a 20% para laranja azeda (GUTIÉRREZ-E et al., 1997; PEÑA et al., 1997; DOMINGUEZ et al., 2000), 3,6% para a transformação de pomelo (YANG et al., 2000) de 7,6% para laranja ‘Pineapple’ (PEÑA et al., 1995a).

Atualmente, o material mais utilizado para a transformação genética de citros são os explantes juvenis provenientes de segmento de epicótilo (YU et al., 2002; PEÑA et al., 2004a; DOMÍNGUEZ et al., 2004; MOLINARI et al., 2004; ANANTHAKRISNAN et al., 2007). Entretanto, a transformação genética também é possível de ser realizada com explantes coletados de tecidos adultos (ALMEIDA et al., 2003b; CEVERA et al., 1998a; 2008; RODRIGUEZ et al., 2008) para a obtenção de plantas transgênicas que não apresentem juvenilidade ou menor período juvenil. A eficiência de regeneração de plantas transgênicas a partir de tecido adulto também apresenta variação em função do tecido utilizado. Almeida et al. (2003a) utilizaram tecido adulto para a transformação de laranja ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Hamlin’ e ‘Natal’, e obtiveram 6% de eficiência de transformação para laranja ‘Hamlin’, mas não relatam transformação genética para as demais cultivares de laranja doce. Essa dificuldade na transformação tem sido relacionada à menor regeneração das gemas adventícias a partir de células transformadas (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

Outro fator relacionado à dificuldade de obtenção de plantas transgênicas é o aparecimento de brotos escapes, ou seja, brotos regenerados, mas não transformados. Os resultados obtidos neste trabalho mostram alta frequência de brotos escapes, principalmente para as cultivares de laranja doce (‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’) (Tabela 1). Em espécies cítricas, a regeneração de brotos escapes é comum (PEÑA et al.; 1995a; 1995b, MOORE et al.; 1992). Peña et al. (1995a) transformando geneticamente laranja ‘Pineapple’ obtiveram até 92% de brotos escapes. O mesmo foi observado por Moore et al. (1992), que relatam mais de 95% de brotos escapes regenerados de citrange ‘Carrizo’, citrumelo ‘Swingle’ e lima ácida ‘Galego’.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para diminuir a regeneração de brotos escapes no processo de transformação genética de citros, incluindo o co-cultivo na ausência de luz para favorecer a formação de calos e a regeneração de gemas adventícias por organogênese indireta (CEVERA et al., 1999), e posicionamento do explante inoculado na placa contendo meio de cultura com canamicina (GUTIÉRREZ-E et al., 1997; YANG et al., 2000) aumentando o tempo de exposição dos explantes ao agente de seleção (PEÑA et al., 1995 b). No entanto, no presente experimento a utilização de canamicina durante o período de formação dos brotos não impediu o aparecimento de uma alta porcentagem de brotos escapes.

Barbosa-Mendes et al. (2009), trabalhando com segmentos de epicótilo de laranja ‘Hamlin’ transformada geneticamente com gene *hrpN* sob controle do promotor *gst1* e utilizando

canamicina como agente de seleção, também relataram uma alta frequência de brotos escapes. Rodríguez et al. (2008) observaram em transformação genética de tecido adulto de laranja 'Navelina' e de laranja 'Pineapple' o aparecimento de brotos escapes no processo de transformação.

Neste trabalho, a menor porcentagem de brotos escapes foi de 9,37%, observada em citrange 'Carrizo' transformado com construção contendo o promotor AtPhP2. A maior porcentagem de brotos escapes foi de 68,51 %, obtida para a laranja 'Pêra' transformada com construção contendo o promotor CsPhP2 (Tabela 1). Esses resultados mostram que o aparecimento de brotos escapes também varia de acordo com o cultivar.

Em trabalho de transformação genética de pomelo (*Citrus paradisi*) do cultivar 'Rio Red', a regeneração de brotos escapes atingiu até 95% do total de brotos formados (YANG et al., 2000). A ocorrência de brotos escapes na transformação genética de plantas pode ser explicada pela ineficiência do agente de seleção, selecionando células não transformadas ou ainda pela proteção de células não transformadas pelas transformadas (GHORBELL et al., 1999).



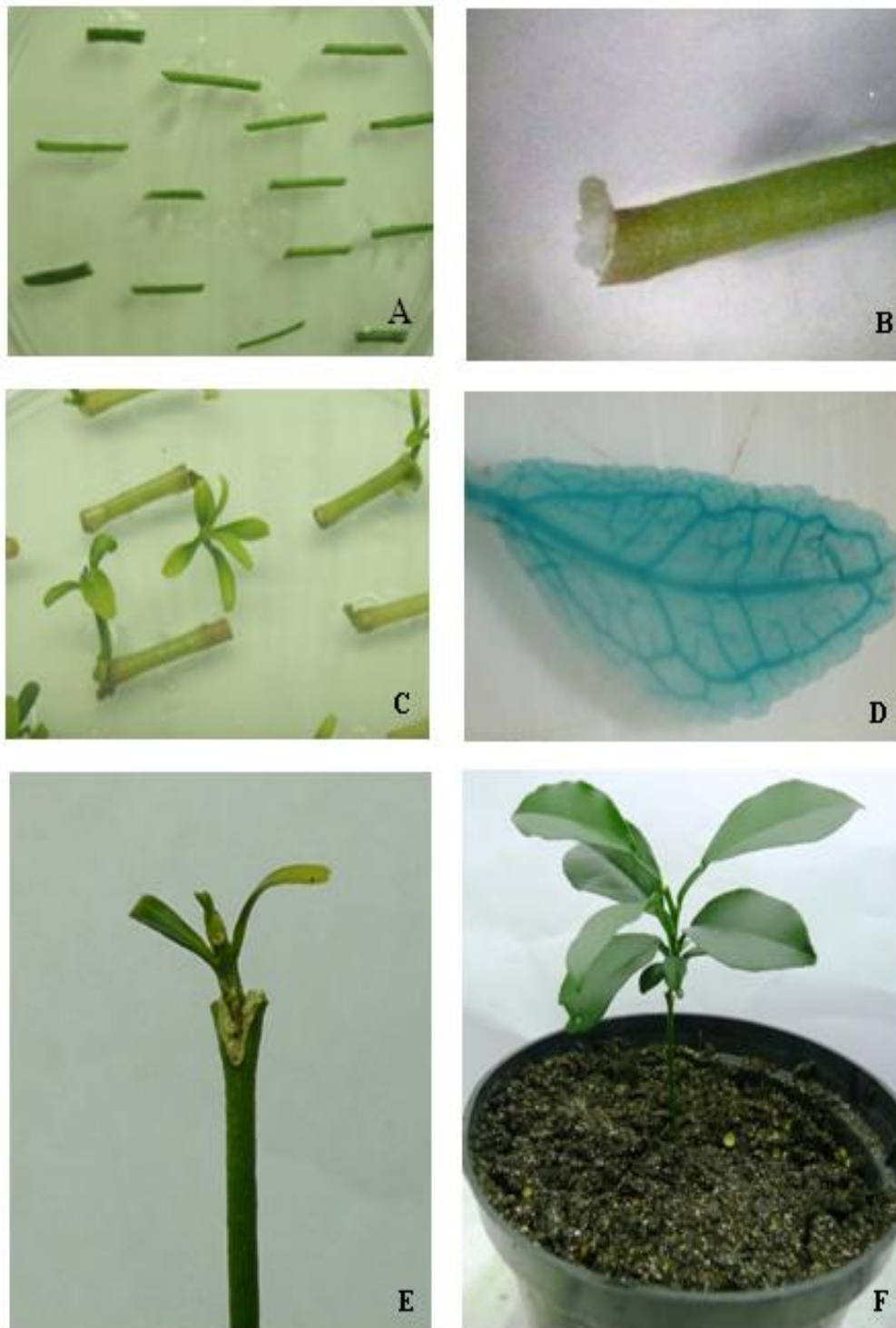


Figura 4 - Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens* com diferentes construções gênicas contendo gene *uidA* sob controle dos promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. A) Explante inicial (segmentos de epicótilo). B) Desenvolvimento de gemas adventícias após 30 dias em ausência de luz. C) Brotos obtidos após 60 dias de cultivo. D) Folha expressando o gene *uidA* nos feixes vasculares após teste histoquímico GUS. E) Broto GUS positivo enxertado *in vitro* em citrange 'Carrizo'. F) Desenvolvimento da planta enxertada *in vitro* após a aclimatização.

Tabela 1 – Transformação genética de citrange ‘Carrizo’ [(C. sinensis (L.) Osbeck x Poncirus trifoliata (L.) Raf.] e de laranja doce (Citrus sinensis (L.) Osbeck) cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, utilizando as construções gênicas pCAMBIA2201/ AtPhP2, pCAMBIA2201/ AtSuT2 e pCAMBIA2201/ CsPhP2.

Promotor	Explantes responsivos / Explantes introduzidos **	Brotos GUS positivos / Brotos avaliados**	Brotos escapes (%)***	Eficiência de transformação (%)****
Citrange ‘Carrizo’				
AtPhP2	134/2700	163/183	9,37*	6,05*
AtSuT2	279/2090	203/393	39,23	8,31
CsPhP2	148/2100	108/160	19,70	4,94
Laranja ‘Hamlin’				
AtPhP2	451/724	34/51	29,74	2,06
AtSuT2	81/1730	77/108	29,10	4,40
CsPhP2	115/2020	123/157	19,85	6,08
Laranja ‘Valência’				
AtPhP2	394/2318	93/523	66,17	3,68
AtSuT2	170/1770	62/205	31	3,56
CsPhP2	153/2360	17/67	63,9	2,87
Laranja ‘Pêra’				
AtPhP2	127/2210	34/174	65,84	1,54
AtSuT2	111/2480	36/145	64,17	1,59
CsPhP2	134/2900	31/154	68,51	1,70
<b>Total</b>	<b>2297/26402</b>	<b>1031/2470</b>		

\*Média de 10 experimentos.

\*\*Número ao final de 10 experimentos.

\*\*\* A porcentagem de brotos escapes correspondente foi obtido pela divisão do número de brotos GUS positivos pelo número de brotos avaliados multiplicado por 100 e subtraído de 100.

\*\*\*\*A eficiência de transformação foi obtida dividindo-se o número de brotos GUS positivos pelo número de explantes transformados e multiplicado por 100.

## 4.2 Análise da PCR

Plantas GUS positivas de laranja ‘Hamlin’ de cada construção gênica aclimatizadas em casa de vegetação foram analisadas por PCR para a confirmação da inserção dos transgenes no genoma das plantas transformadas (Figura 5).

Para a amplificação das seqüências dos promotores estudados foram realizadas reações de PCR. As reações A e B contaram com a amplificação da seqüência dos promotores AtPhP2 e AtSuT2 (Figura 5 A e B), pela utilização de primers específicos para identificação da inserção do DNA exógeno em três plantas transformadas com cada construção. A amplificação do fragmento correspondente à seqüência do promotor AtPhP2 amplifica seqüência de 986 pares de base (Figura 5 A), e a amplificação correspondente a seqüência do promotor AtSuT2 amplifica seqüência de 1118 pares de base (Figura 5 B).

Para a identificação da integração da seqüência correspondente ao promotor CsPhP2, foram utilizados primers que amplificam seqüência correspondente ao gene *uidA* (GUS). A identificação do gene *uidA* (GUS) amplificou um fragmento de 817 pares de base (Figura 5 C). A utilização de primers que identificam a seqüência correspondente ao gene *uidA* (GUS) foi realizada devido à existência da mesma seqüência do gene *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2) no genoma do citros.

Nas análises da PCR foram utilizados o DNA de plasmídeo correspondente ao utilizado na clonagem do transgene como controle positivo e o DNA de uma planta não transformada como controle negativo. O DNA de uma planta CaMV35S também foi utilizado para servir como controle negativo nas análises de PCR correspondentes à identificação dos promotores AtPhP2 e AtSuT2 (Figura A S e B S), e como controle positivo para a PCR correspondente a identificação do gene *uidA* (GUS) (Figura 5 S).

Todas as três plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com construções contendo os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2, confirmadas pelo ensaio de GUS, apresentam-se previamente transformadas pela análise da PCR.

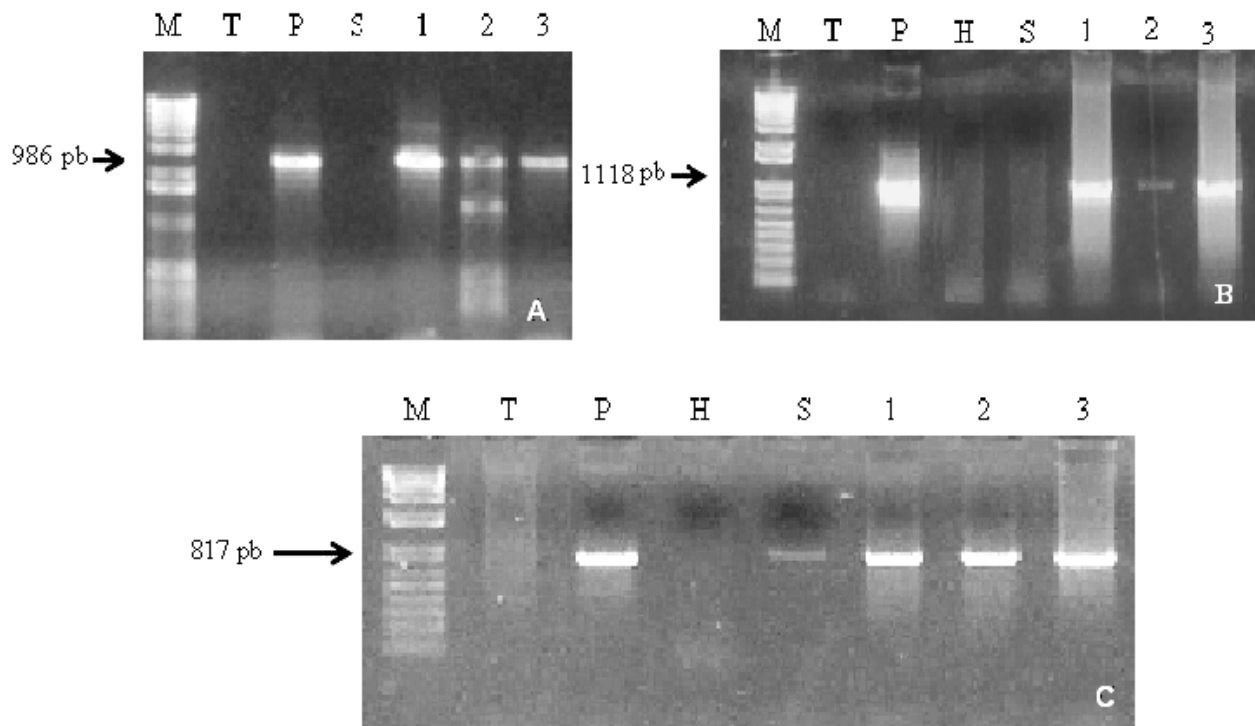


Figura 5 - Análise da PCR em plantas de laranja 'Hamlin'. M) Marcador (1Kb Invitrogen®). T) Planta não transformada. P) Controle positivo (plasmídeo contendo o gene *uidA* (GUS) sob controle do promotor correspondente a construção. H) Água miliQ. S) Planta CaMV35S. Colunas enumeradas correspondem a plantas transformadas com construções contendo os promotores AtPhP2 (A), AtSuT2 (B) e CsPhP2 (C)

### 4.3 Análise de *Southern blot*

As plantas aclimatizadas PCR positivas foram analisadas por *Southern blot* para confirmar a integração do gene *uidA* (GUS) e para analisar o número de eventos de inserções do transgene no genoma das plantas. Foram analisadas nove plantas de laranja 'Hamlin' transformadas, três de cada construção, mais uma planta CaMV35S e uma planta não transformada (Figura 6).

Através da análise de *Southern blot*, foi possível confirmar a integração dos transgenes. O número de cópias estimado (inserções) no genoma das plantas foi de apenas um para cada clone analisado. Este mesmo número de inserções foi observado por Boscariol et al. (2003), ao analisarem a integração do gene *manA* no genoma das plantas de laranja 'Natal' e 'Valência'. Outros trabalhos de transformação genética envolvendo laranja doce revelaram mais de um evento de inserção do transgene (MENDES et al., 2009; BARBOSA-MENDES et al., 2009, PAOLI et al., 2007, BOSCARIOL et al.; 2006 AZEVEDO et al., 2006).

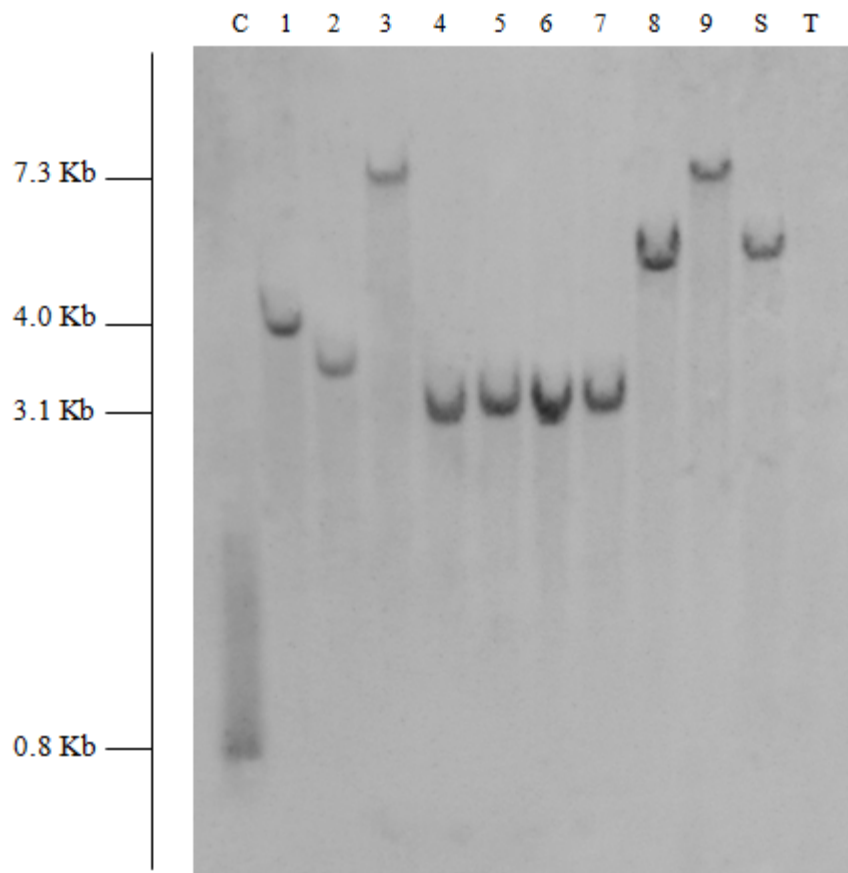


Figura 6 - Análise de *Southern blot* em plantas PCR+ aclimatizadas transformadas com os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. C) Controle positivo (fragmento do gene *uidA* (GUS) amplificado por PCR). 1,2 e 3) Plantas transformadas com construção contendo o promotor AtPhP2. 4, 5 e 6) Plantas transformadas com construção contendo o promotor AtSuT2. 7, 8 e 9) Plantas transformadas com construção contendo o promotor CsPhP2. S) Planta CaMV35S. T) Planta Não transformada

#### 4.4 Análise histológica

Neste trabalho foi realizada a localização histológica do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) sob controle do promotor CaMV35S e dos promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. A análise histológica do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) foi realizada através da comparação de cortes transversais de pecíolo de folhas das plantas transgênicas confirmadas por *Southern blot*. Foram realizados ensaios histoquímicos de folhas e posterior corte transversal de pecíolo das mesmas. Para isto, foram utilizadas folhas de uma planta transformada com promotor CaMV35S e folhas das plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com as construções contendo os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2 (Figura 7).

Após o ensaio de GUS e desidratação em álcool de folhas de plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2, foi possível visualizar o padrão de

expressão do gene *uidA* (GUS) na região correspondente aos feixes vasculares das folhas analisadas (Figura 7 A, C e E).

A expressão do gene *uidA* (GUS) pelo teste histoquímico ocorreu em todas as plantas transformadas. Ao observamos os cortes histológicos de pecíolo das plantas transformadas com as construções contendo os promotores AtPhP2, AtSut2 e CsPhP2, foi possível verificar um padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) localizado na região do floema (Figura 7 B, D e F). O mesmo padrão não pôde ser observado em um corte de pecíolo de planta transformada com o promotor CaMV35S, pois a expressão do gene *uidA* (GUS), neste caso, ocorre em todos os tecidos da planta (Figura 7 H).

A utilização de genes repórteres, tais como a enzima beta-glucoronidase, tem sido utilizada para analisar a expressão em tecido específico (GRAY-MITSUMMUNE et al., 1999; GUO et al., 2004, ZHAO; LIU; DAVIS, et al., 2004). Porém, esse método é destrutivo. Assim outros estudos vêm sendo realizados utilizando o gene repórter da ‘*Green Fluorescent Protein*’ (GFP), que pode ser visualizada facilmente em tecidos vivos, por microscopia fluorescente. Esse método foi utilizado com sucesso por Staler et al. (2005) em estudo de expressão do promotor AtSuC2 nos tecidos do floema de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*.

Em estudo do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) em laranja ‘Valência’ e tabaco, Azevedo et al. (2006b) demonstraram que plantas transformadas com o gene *uidA* (GUS) sob controle do promotor do gene da *fenilalanina amônia-liase* (PAL) de citros, apresentam expressão preferencial, não exclusiva, na região do xilema das plantas transformadas. Barbosa-Mendes et al. (2009) demonstraram a ativação do promotor *gst1*, induzido pelo patógeno, através da visualização da reação de GUS.

Conforme resultados observados no presente trabalho, foi possível demonstrar a expressão do gene *uidA* (GUS) no tecido do floema de plantas cítricas transformadas com os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhao, Liu e Davis (2004), que demonstraram que o promotor AtSuC2 controla a expressão do gene *uidA* (GUS) nos tecidos do floema de morango geneticamente transformado, e que esse promotor pode se utilizado em construções que visem a obtenção de plantas resistentes a doenças causadas por fitoplasmas endêmicos do floema na cultura do morango. A caracterização de promotores tecido específicos de floema de abóbora foi demonstrada através do padrão de expressão dos genes *uidA* (GUS) e

do gene *Luciferase* (LUC) em planta transgênica de tabaco na região do floema utilizando construções gênicas com os promotores tecido específicos de floema (GUO et al., 2004).

Karthikey et al. (2002) transformaram *Arabidopsis thaliana* com três diferentes genes repórteres, *uidA* (GUS) (*β-glucoronidase*), LUC (*luciferase*) e GFP (*Green Fluorescent Protein*), sob o controle dos promotores dos genes *AtPT1* e *AtPT2*, comprovando a ativação do promotor do gene *AtPT1* como tecido específico sob estresse de fósforo inorgânico nas raízes das plantas. Por outro lado, o promotor *AtPT2* não se mostrou específico, ou seja, sua expressão ocorreu tanto em raízes como em folhas.

A maioria das construções gênicas utilizadas nas transformações em citros possui o gene de interesse dirigido pelo promotor constitutivo CaMV35S, obtido do vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus* - CaMV) (FLEMING et al., 2000; MOLINARI et al., 2004; DOMÍNGUEZ et al., 2004). Esse promotor é caracterizado pela forte expressão em todos os tecidos das plantas, não apresentando especificidade. Contudo, no estudo realizado por Barbosa-Mendes et al. (2009) com promotor induzido pelo patógeno *pgst1*, controlando a expressão de uma harpina, os autores relataram até 79% de redução na severidade da doença causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em linhagens transgênicas de laranja ‘Hamlin’.

O uso de promotores que confirmam expressão localizada no tempo e no espaço está ligado à necessidade de se obterem construções com maior especificidade de expressão (HARAKAVA, 2000; BARBOSA-MENDES et al., 2009). Portanto, uma estratégia para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a patógenos é a utilização de construções gênicas que se expressem no tecido onde há colonização pelo patógeno. Azevedo et al. (2006a) buscaram demonstrar expressão preferencialmente tecido específico em laranja ‘Valência’ transformada com o gene *uidA* (GUS) dirigido pelo promotor do gene da *PAL*, na região do tecido do xilema, na busca de conseguir laranjas resistentes a *Xylella fastidiosa*. Entretanto, as plantas transformadas não apresentaram especificidade na expressão do gene *uidA* na região do floema.

O presente trabalho é, provavelmente, o primeiro a demonstrar a expressão do gene *uidA* (GUS) sob controle de promotores expressos no floema em plantas de citros. Ivashikina et al. (2003) identificaram e isolaram famílias de proteínas envolvidas com canais de K<sup>+</sup> nas membranas de células do floema de *Arabidopsis thaliana*. Após sua identificação, os autores

demonstraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas geneticamente com o gene GFP sob controle do promotor AtSuC2 demonstraram expressão no floema das plantas.

O uso de promotores expressos no floema pode gerar transgênicos de expressão mais específica, facilitando a obtenção de plantas resistentes a doenças causadas por patógenos que colonizam esse tecido, como é o caso do Huanglongbing (HLB). Portanto, mais pesquisas que visem demonstrar a expressão de promotores devem ser realizadas, incluindo outras construções com os promotores AtPhP2, AtSuT2 e CsPhP2 controlando a expressão de substâncias antibacterianas para demonstrar se, efetivamente, as plantas geradas podem apresentar resistência ao HLB.



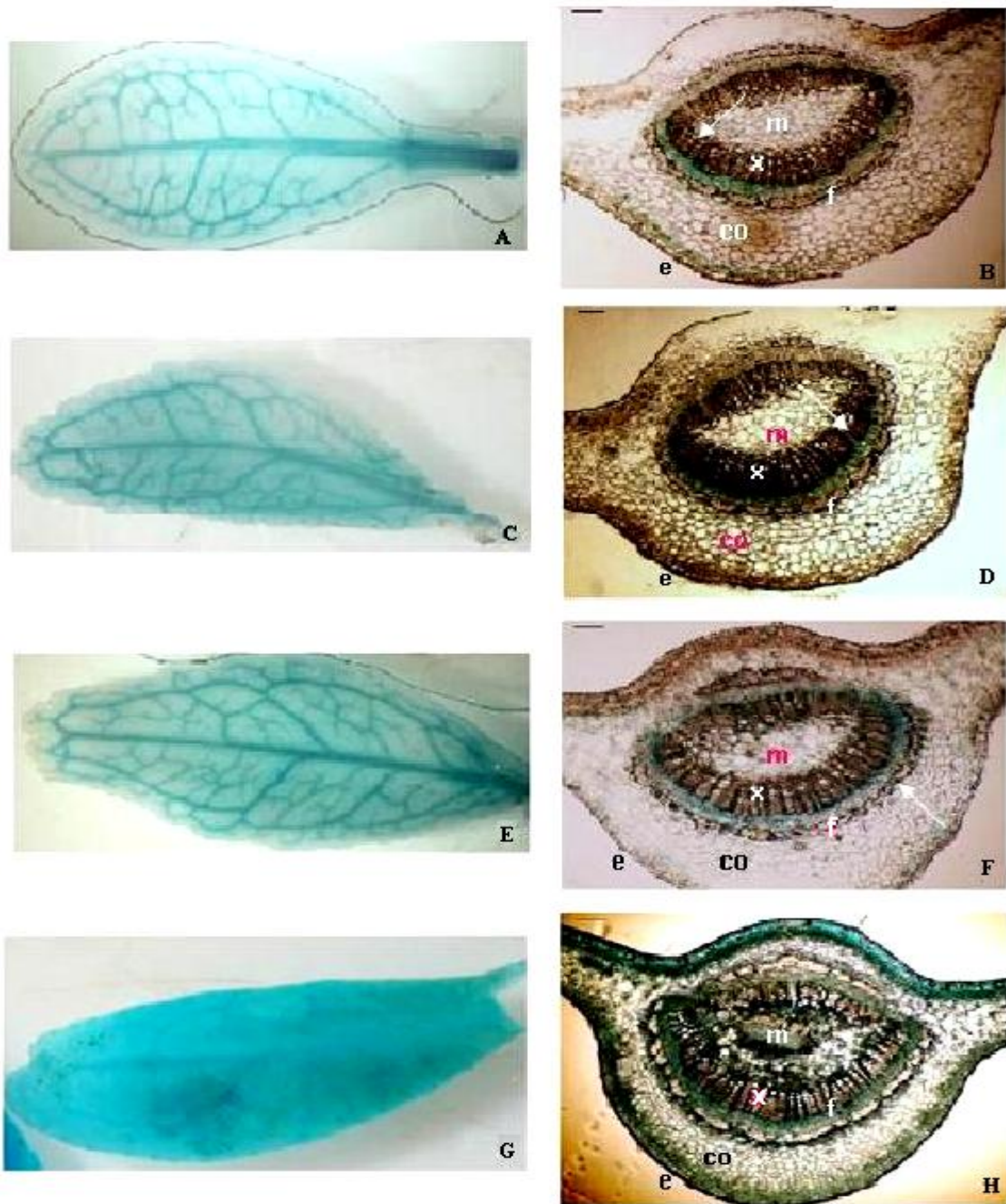


Figura 7 - Folhas de laranja 'Hamlin' transformadas. A) Folha transformada com construção contendo o promotor AtPhP2, após ensaio de GUS. B) Corte de pecíolo de folha transformada com o construção contendo o promotor AtPhP2, após ensaio de GUS. C) Folha transformada com construção contendo o promotor AtSuT2, após ensaio de GUS. D) Corte de pecíolo de folha transformada com o construção contendo o promotor AtSuT2, após ensaio de GUS. E) Folha transformada com construção contendo o promotor CsPhP2, após ensaio de GUS. F) Corte de pecíolo de folha transformada com o construção contendo o promotor CsPhP2, após ensaio de GUS. G) Folha de planta transformada com promotor 35S após ensaio histoquímico e desidratação no álcool. H) Corte manual de pecíolo de folha de planta transformada com o promotor CaMV35S após ensaio histoquímico de GUS. Barras: 200 $\mu$ m. (e: epiderme; co: córtex; f: floema; m: medula; x: xilema; setas indicam região corada de azul pelo ensaio de GUS).

## 5 CONCLUSÕES

As plantas obtidas a partir da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* de citrange ‘Carrizo’, de laranja doce cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, contendo o gene *uidA* (GUS) sob o controle dos promotores *Citrus pholem protein 2* (CsPhP2), *Arabidopsis thaliana pholem protein 2* (AtPhP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSuT2) apresentaram padrão de expressão preferencial do gene *uidA* (GUS) na região do floema.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba. v.60, n.1, p.23-29, 2003a.
- 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, 2003b.
- ANANTHAKRISHNAN, G.; ORBOVIC, V.; PASQUALI, G.; CALOVIC, M.; GROSSER, J.W. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **In vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 593-601, 2007.
- ANDRADE, G.M.; SARTORETTO L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium spp.* **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.
- ARAUJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. p. 115-123.
- AZEVEDO, F.A; MOURÃO FILHO, F.A.A; SCHINOR, E.H; PAOLI, L.G; MENDES, B.N.J; HARAKAVA, R; GABRIEL, D.W; LEE, R.F. *GUS* gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valência' sweet orange. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.41, n.11, p. 1623-1628, 2006a.
- AZEVEDO, F.A; MOURÃO FILHO, F.A.A; MENDES, B.N.J; ALMEIDA, W.A.B; SCHINOR, E.H; PIO, R; BARBOSA, J.M; GUDETTI-GONZALEZ, S; CARRER, H; LAM, E. Genetic transformation of 'Rangpur Lime' (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (bacterio-opsin) gene and initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**. Amsterdam, v. 24, p. 185-196, 2006b.
- BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *hrpN* (harpina) e aviação da ressitencia ao cancro cítrico (*Xantomonas axonopodis* pv. citri)**. 2007. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BARBOSA-MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v. 122, p. 109-115, 2009.
- BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 28, p. 229-234, 2001.
- 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. **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.

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 PMI/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.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, G.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C., CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.

BRASILEIRO, M.C.A.; CARNEIRO, C.T.V. **Manual de plantas de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998.

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.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 1, p. 26-30, 2000.

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, 1998a.

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. 5159, 1998b.

CHEN, J., PU, X., DENG, X., LIU, S., LI, H., CIVEROLO, E. A phytoplasma related to ‘*Candidatus Phytoplasma asteri*’ detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, Cidade Guangdong, n. 99, p. 236-242, 1999.

COLETA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J.; DO AMRAL, A.M.; MULLER, G.W. & MACHADO, M.A. First report of the casual agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, New York, v. 88, p.1382, 2004.

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

DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2000.

DOMÍNGUEZ, A.; MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican

lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, n. 1/2, p. 1-10, 2002.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMEO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterization 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.

DONADIO, L.C.; MOURÃO-FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. cap. 1, p. 3-18.

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

DURÁN-VILLA, N.; GOGORCENA, Y.; ORTEGA, V.; ORTIZ, J.; NAVARRO, L.; Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): effect of temperature and photosynthetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 11-18, 1992.

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.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ C., MENDOZA, A.H.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES,R.; PEÑA L. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 153-165, 2006.

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V., HINAREJOS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU,J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 175-185, 2001.

FAO. Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 09 out. 2009.

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 93-104, 2008.

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 Desenvolpmental Biology-Plant**, Columbia, v.36, p. 450-455, 2000.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2009**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2009.

- FUENTE, J.M.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate. **Synthesis. Science**, London, v. 276, p. 1566-1568, 1997.
- GANDER, E.S.; MARCELINO, L. H.; ZUMSTEIN, P. **Biotecnología para pedestres**. Brasília: Embrapa, SPI, 1996. 66 p.
- GHOBEL, B.R.; JUÁREZ, J; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating woody fruit plants*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 350-358, 1999.
- 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**, Oxford, v. 20, n. 17, p. 1183-1189, 2000.
- GMITTER Jr., F.G.; HU, X. The possible role of Ynan, China, in the origin of contemporary citrus species (Rutaceae). **Economy Botany**, New York, v. 44, n. 2, p. 267-277, 1990.
- GRAY-MITSUMMUNE, M.; MOLITOR, E.K.; CUKOVIC, D.; CARLSON, J.E.; DOUGLAS, C.J. Developmentally in regulated patterns of expression directed by poplar PAL promoters in transgenic tobacco and poplar. **Plant Molecular Biology**. Amsterdam.v.39, p. 657-669. 1999.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990.
- GUO, H.; CHEN, X.; ZHANG, H.; FANG, R.; YUAN, Z.; ZHANG, Z.; TIAN, Y. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin *PP2* gene promoter. **Transgenic Research**, London, v. 13, p. 559-566, 2004.
- 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 'Valência' sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, n. 8, p. 482-486, 2005.
- GURR, S.J.; RUSHTON, P.J. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? **Trends in Biotechnology**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 275-282, 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.
- HARAKAVA, R. **Citrus variegated chorosis: development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis**. 2000. 70 p. Thesis (Ph.D.) - University Florida, Gainesville.
- IVASHIKINA, N.; DEEKEN, D.; ACHE, P.; KRANZ, E.; POMMERENIG, B.; SAUER, N.; HEDRICH, R. Isolation of AtSuC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp. Studies and expression profiling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 36, p. 931-945, 2003.
- 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.

- KARTHIKETYAN, A. S.; VARADARAJAN, D. K.; MUKATIRA, U. T.; D'USZO, M.P.; DAMZ, B.; RAGHOTAMA, K. G. Regulated expression of *Arabidopsis phosphate transporters 1*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 1, p. 221-233, Sept. 2002.
- 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.
- LI, B.; XIE, C.; QIU, H. Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 28, p. 373-386, 2008.
- LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of 'Calamondin' (*Citrus madurensis* Lour.) **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 39, p. 325-333, 1989.
- 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.
- MALNOY, M.; REYNOIRD, J.P.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; ALDWINCKLE, H.S. Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus x Domestica*). **Transgenic Research**, Oxford, v. 15, p. 83-93, 2006.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. 929 p.
- MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. **Plant Pathology**. Bristol. Doi: 11111/j.1365-3059.2009.02148.x
- MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 955-961, 2002.
- MOLINARI, H.B.C.; BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 3/4, p. 379-385, 2004.
- MOORE, G.A.; JACONO, 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.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas; Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.
- MUCHHAL, U.S.; PARDO, J.M.; RAGHOTAMA, K.G. Phosphate transporters. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 93, n. 19, p. 10519-10523, 1996.
- 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.



MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1169.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

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.

OLIVERIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

PAOLI, L.G.; CAMARGO, R.L.B.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F. A.A. Transformação genética de laranja 'Valencia' com o gene *cecropin* MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1663-1666, nov. 2007.

PEÑA, L. Transgenic plants: methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 286, p. 176 -187, 2005.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p.731-737, 1997.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, p. 183-191, 1995a.

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.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, p. 616-619, 1995b.

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.

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.

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.

POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEREDO, J.O.; PIO, R.M. Melhoramento de variedades copas e porta-enxerto. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 4, p. 3005-318, 1983.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

REYNOIRD, J.P.; MOURGUES, F.; NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H.S.; BRISSET, M.N.; CHEVREAU, E. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacin E* gene from *Hyalophora cecropia*. **Plant Science**, Limerick, v. 149, p. 23-31, 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.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006.88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de Citrus sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 463-466, 2006.

SHARMA, A.; SHARMA, R.; IMAMURA, M.; YAMAKAWA, M.; MACHII, H. Transgenic expression of *ceropina b*, na antibacterial peptide from bomby mori, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. **Federation of European Biochemical Societies**, Copenhagen, v. 48, p. 7-11, 2000.

SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Citrus. In: AMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHAP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. p. 355-372.

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.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; JAGOUREIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. A new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, is associated with Hunglongbing in São Paulo. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004, Monterrey. **Program & abstracts...** Monterrey: IOCV, 2004. p. 81.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1999. v. 2, 864 p.

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, Limerick, v.69, p.199-206. 1990.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell cultural, isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Science Letters**, San Francisco, v. 4, p. 231-236, 1974.

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; LAWTON, H. J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 1-39.

YANG, X.H.; SUN, Z.H.; TONG, R.J. Optimizing culture system of Ri T-DNA transformed roots for *Citrus grandis* cv. Changshou Shatian You. **Agricultural Sciences in China**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 90-97, 2006.

YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.) **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 12, p.1203-1211, 2000.

YAO, J.L.; WU, J.H.; GLEAVE, A.P.; MORRIS, B.A.M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, Limerick, v. 113, n. 2, p. 175-183, 1996.

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.

ZHAO, Y.; LIU, Q.; DAVIS, R.E. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 224-230, 2004.