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

**Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da
capa protéica e uma sequência conservada antisense
do vírus da tristeza dos citros**

Evandro Henrique Schinor

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

**Piracicaba
2006**

Evandro Henrique Schinor

Engenheiro Agrônomo

Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros

Orientadora:

Profa. Dra. BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

Piracicaba

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Schinor, Evandro Henrique

Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa
protéica e uma sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros
88 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Agrobacterium 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Frutas cítricas 4. Organogênese
5. Resistência genética vegetal 6. Seqüenciamento genético 7. Transformação
genética 8. Tristeza cítrica I. Título

CDD 634.3

Aos meus pais Vivaldo José Schinor e Maria Inês Belon Schinor pelo apoio, pela educação, formação e força dada nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha esposa Simone Bueno de Camargo Schinor pelo amor, companheirismo e pela compreensão.

À minha irmã Elisandra Cristina Schinor e família pela amizade e pelo constante apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela existência de tudo e de todos.

À Profa.. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela orientação e atenção durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela constante colaboração e pelos conselhos dados na realização deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo pela constante contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Resende e ao funcionário José Edivaldo Buriolla do Departamento de Fitopatologia pela ajuda na realização das análises de ELISA.

Aos amigos Alexandra Pavan, Amancio Souza, Dayse Cristina de Carvalho, Leandro Branco, Luis Gustavo de Paoli, Juliana Bonin, Monita Fiori, Rosely Pereira da Silva e Suane Cardoso pelos bons momentos vividos juntos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, pela amizade e pelo apoio constante.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Cena: Jannayna, Liliane, Joyce, Simone, Taciana, Júnior pelos bons momentos e pela ajuda concedida.

Aos amigos de curso de doutorado Fernando Alves de Azevedo e Rafael Pio, agora pesquisadores do APTA, pelos bons momentos vividos juntos, pela amizade e pelo apoio constante.

À Renata Cruz, técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Cena, pela amizade, competência e constante ajuda.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane Aparecida Lopes pela amizade e competência.

Aos amigos Sr. José, Éder e Davi funcionários do Departamento de Produção Vegetal pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento em Pesquisa de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado.

E a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Origem e distribuição dos citros	17
2.2 Importância sócio-econômica da citricultura no Brasil.....	18
2.3 Organogênese <i>in vitro</i> de citros.....	20
2.4 Transformação genética via <i>Agrobacterium</i>	25
2.5 Transformação genética em citros.....	28
2.6 Transformação genética visando resistência a doenças.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Material vegetal.....	36
3.2 Organogênese <i>in vitro</i>	37
3.2.1 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em diferentes regiões do epicótilo de cultivares de citros.....	37
3.2.2 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de citros em função de concentrações de BAP.....	38
3.2.3 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em função de concentrações de BAP.....	39
3.2.4 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos internodais de laranja azeda em função da combinação citocinina:auxina.....	39
3.3 Transformação genética.....	40
3.3.1 Genes e vetores de expressão.....	40
3.3.2 Manutenção e cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
3.3.3 Inoculação e co-cultivo com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.3.4 Seleção, regeneração e aclimatização das plantas.....	42

	7
3.3.5 Avaliação das plantas obtidas.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Organogênese <i>in vitro</i>	45
4.1.1 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em diferentes regiões do epicótilo de cultivares de citros.....	45
4.1.2 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de citros em função de concentrações de BAP.....	49
4.1.3 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em função de concentrações de BAP.....	51
4.1.4 Regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos internodais de laranja azeda em função da combinação citocinina:auxina.....	54
4.2 Transformação genética	56
5 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE.....	85

RESUMO

ORGANOGENESE *IN VITRO* E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM *Citrus* sp. COM O GENE DA CAPA PROTÉICA E UMA SEQUÊNCIA CONSERVADA ANTISENSE DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS

O presente trabalho teve como principal objetivo obter plantas transgênicas, dos cultivares porta-enxerto limão ‘Cravo’ e laranja azeda e de cultivares copa de laranja doce, expressando genes que possam influenciar no nível de resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) e, possivelmente à morte súbita dos citros. Buscou-se ainda estudar a organogênese *in vitro* de espécies cítricas. Experimentos para a indução da organogênese *in vitro* foram realizados a partir de segmentos de epicótilos de plântulas germinadas *in vitro* de espécies cítricas avaliando-se: a resposta organogênica de três diferentes regiões do epicótilo, na presença (1,0 mg.L⁻¹) ou ausência de BAP, em meio MT, e a regeneração em diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) adicionadas ao meio MT. Também avaliou-se a regeneração de segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) em meio MT; e de laranja azeda em meio de cultura MT e DBA3, suplementados com diferentes concentrações de BAP (0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) e ANA (0; 0,3 e 0,5 mg.L⁻¹). Foi utilizado o método de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando-se tecido juvenil coletado de plantas cultivadas *in vitro* (segmentos de epicótilo) ou em casa de vegetação (segmentos internodais) como explantes. Utilizou-se a estirpe EHA105 de *A. tumefaciens*, contendo os plasmídeos: a) pCTV-CP: contendo o gene da capa protéica do CTV; b) pCTV-dsCP: contendo repetições invertidas do gene da capa protéica do CTV, interligadas pelo intron do gene da quitinase de citros; c) pCTVcons: contendo uma sequência conservada antisense do CTV. As construções gênicas foram elaboradas a partir do plasmídeo pCAMBIA 2201, dirigidas pelo promotor 35S e o terminador NOS. Foram utilizados também os genes de seleção *nptII* e o repórter GUS. As gemas adventícias desenvolvidas foram identificadas como transgênicas pelo teste histoquímico GUS e por PCR e a confirmação da transformação genética foi feita por Southern Blot. A expressão da proteína do CTV foi verificada pelo teste serológico de PTA-ELISA. A resposta morfogênica em função da região do epicótilo e das concentrações da citocinina BAP é dependente do cultivar de citros. A suplementação do meio de cultura com a citocinina BAP proporcionou um maior número de gemas adventícias regeneradas por explante, tanto em segmentos de epicótilo como em segmentos internodais dos cultivares de citros estudados. A suplementação do meio de cultura com a citocinina BAP é essencial na regeneração de gemas adventícias em segmentos internodais de laranja azeda. Foi possível regenerar plantas transgênicas, pelo protocolo de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, de limão ‘Cravo’ contendo o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (pCTV-CP) utilizando-se segmentos de epicótilo e segmentos internodais como fonte de explante, e com uma sequência conservada antisense do CTV, utilizando-se segmentos internodais; e de laranja ‘Hamlin’ contendo o gene da capa protéica do CTV, com as construções gênicas pCTV-dsCP e pCTV-CP, e com uma sequência conservada antisense do CTV, utilizando-se segmentos de epicótilo como fonte de explante.

Palavras-chave: Citros, *Agrobacterium tumefaciens*, cultura de tecidos, silenciamento gênico

ABSTRACT

IN VITRO ORGANOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF *Citrus* sp. WITH THE COAT PROTEIN GENE AND AN ANTISENSE UNTRANSLATED REGION OF THE *Citrus tristeza virus*

The objective of the present work was to obtain transgenic plants of rootstocks Rangpur lime and sour orange as well as sweet orange scion varieties, expressing genes that would possibly influence the levels of resistance to the *Citrus tristeza virus* (CTV) and Citrus sudden death disease. The *in vitro* organogenesis of *Citrus* species was also studied. *In vitro* organogenesis experiments were conducted with epicotyl segments obtained from *in vitro* germinated seedlings of different *Citrus* species in order to evaluate: organogenic response of three epicotyl regions, in the presence ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) or absence of BAP, in MT medium, and the regeneration using different BAP concentrations (0; 0,5; 1,0; 1,5; and $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) added to MT medium. The regeneration of internodal segments of Rangpur lime and sour orange was evaluated in MT medium with different BAP concentrations (0; 0,5; 1,0; 2,0 and $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as well as sour orange regeneration in MT and DBA3 mediums, supplemented with different concentrations of BAP (0; 1,0 and $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) and NAA (0; 0,3 and $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$). The *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation method of juvenile tissue obtained from *in vitro* (epicotyls) or green house cultivated plants (internodal segments) was used in this work. The EHA 105 strain was used with the following plasmids: a) pCTV-CP: containing the coat protein gene from CTV; b) pCTV-dsCP: containing inverted repeats of the coat protein gene from CTV interconnected by the *Citrus* quitinase gene intron; c) pCTVcons: containing an antisense sequence of CTV untranslated region. The gene constructs were built from the pCAMBIA 2201 plasmid, and contained the 35S promoter and the NOS terminator. The *nptII* selection gene and the GUS reporter gene were also used. The adventitious buds developed were identified as transgenic by GUS histochemical test and PCR, these results were later confirmed by Southern Blot. The transgenic coat protein expression was detected by the serological test PTA-ELISA. The morphogenic response related to the epicotyl region and BAP cytokinin were dependent on the *Citrus* varieties. The addition of BAP cytokinin to the culture medium showed a greater number of adventitious buds regenerated per explant in both epicotyl and internodal segments of the *Citrus* varieties studied. The addition of BAP to the culture medium is essential for the regeneration of adventitious buds in sour orange internodal segments. Using the *Agrobacterium* mediated genetic transformation protocol it was possible to regenerate transgenic plants of different varieties and gene constructs: Rangpur lime containing the coat protein gene of CTV (pCTV-CP) using epicotyl and internodal segments as explant source, and an antisense sequence of CTV untranslated region using internodal segments as explant source; Hamlin sweet orange containing the coat protein gene of CTV in constructions pCTV-CP and pCTV-dsCP, and an antisense sequence of CTV untranslated region using epicotyl segments as explant source.

Key words: *Citrus*, *Agrobacterium tumefaciens*, tissue culture, gene silencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Plântula germinada <i>in vitro</i> mostrando as regiões apical, mediana e basal do epicótilo, utilizadas como explantes.....	38
Figura 2 -	Representação esquemática das construções gênicas utilizadas nos experimentos de transformação genética de citros, via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
Figura 3 -	Indução de gemas adventícias no cultivo <i>in vitro</i> de segmentos internodais de laranja azeda e limão ‘Cravo’ coletados de plantas mantidas em casa de vegetação.....	53
Figura 4 -	Indução de gemas adventícias no cultivo <i>in vitro</i> de segmentos internodais de plantas de laranja azeda mantidas em casa de vegetação.....	55
Figura 5 -	Transformação genética de citros via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	57
Figura 6 -	Análise da PCR das plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e de laranja ‘Hamlin’ contendo o gene da capa protéica do CTV (CP-CTV).....	60
Figura 7 -	Análise de Southern Blot em plantas de limão ‘Cravo’	60
Figura 8 -	Análise da PCR e de Southern Blot de plantas de laranja ‘Hamlin’ regeneradas após transformação genética com a construção gênica pCTV-dsCP.....	61
Figura 9 -	Teste serológico de PTA-ELISA das plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e de laranja ‘Hamlin’ contendo os genes da CP-CTV e dsCP-CTV e das plantas controles.....	62
Figura 10 -	Análise da PCR das plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ contendo uma sequência conservada antisense do CTV (CTVcons).....	68
Figura 11 -	Análise da PCR e de Southern Blot de planta de limão ‘Cravo’ regenerada após transformação genética com a construção gênica pCTVcons.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de explantes com gemas adventícias/total de explantes (%) em diferentes regiões do epicótilo de cinco cultivares de citros (média de 5 repetições).....	46
Tabela 2 -	Número total de gemas adventícias/total de explantes responsivos (média) de diferentes regiões do epicótilo de cinco cultivares de citros (média de 5 repetições).....	47
Tabela 3 -	Porcentagem de explantes responsivos de quatro cultivares de citros em função de concentrações de BAP.....	49
Tabela 4 -	Número de gemas adventícias regeneradas por explante (média de 5 repetições) de quatro cultivares de citros em função de concentrações de BAP.....	50
Tabela 5 -	Porcentagem de explantes responsivos de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em função de concentrações de BAP.....	52
Tabela 6 -	Número de gemas adventícias regeneradas por explante (média de 5 repetições) de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em função de concentrações de BAP.....	54
Tabela 7 -	Porcentagem de explantes responsivos e no número de gemas adventícias regeneradas por explante de laranja azeda em função da combinação citocinina:auxina adicionada em dois meios de cultura (MT e DBA3).....	55
Tabela 8 -	Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de limão ‘Cravo’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas, contendo o gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP).....	58
Tabela 9 -	Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja ‘Hamlin’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo seqüências gênicas do CTV.....	59

Tabela 10 -	Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de laranja azeda, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo o gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP).....	63
Tabela 11 -	Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja ‘Natal’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo gene da capa protéica do CTV..	63
Tabela 12 -	Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja ‘Pêra’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo o gene da capa protéica do CTV....	64
Tabela 13 -	Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de limão ‘Cravo’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo repetições invertidas do gene da capa protéica do CTV (pCTV-dsCP).....	65
Tabela 14 -	Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de laranja azeda, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo repetições invertidas do gene da capa protéica do CTV (pCTV-dsCP).....	66
Tabela 15 -	Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja ‘Valência’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo seqüências gênicas do CTV.....	66
Tabela 16 -	Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de limão ‘Cravo’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo uma seqüência conservada antisense do CTV (pCTVcons).....	68

Tabela 17 - Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de laranja azeda, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo uma sequência conservada antisense do CTV (pCTVcons).....	69
--	----

1 INTRODUÇÃO

Entre as frutas para consumo *in natura* e para processamento industrial produzidas no mundo em 2005, a produção de citros lidera com cerca de 105 milhões de toneladas, seguida por bananas e uvas, com 72 e 66 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2006). A produção brasileira de laranjas, em 2004, foi de aproximadamente 448 milhões de caixas de 40,8 Kg, com uma área colhida em torno de 819 mil hectares. Além de ser o maior produtor de citros do mundo, o Brasil também se destaca por ser o maior produtor e exportador de suco concentrado, sendo que de 1,33 milhão de toneladas produzidas, mais de 90% foram exportadas, principalmente para Europa e Estados Unidos (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006).

Apesar do impacto na economia brasileira e das condições climáticas favoráveis encontradas no Estado de São Paulo, a citricultura mostra-se vulnerável devido, principalmente, à utilização de poucas combinações copa/porta-enxerto, o que vem ocasionando surtos de pragas e doenças ao longo dos anos. A maior ameaça ocorreu em 1937 com o aparecimento do vírus da tristeza dos citros (CTV), que praticamente eliminou 10 milhões de plantas enxertadas em laranja azeda, atrasando o desenvolvimento da citricultura brasileira em mais de uma década. Outro problema foi o vírus do exocorte, surgido em consequência da solução encontrada para a tristeza, mas foi solucionado com a adoção do emprego dos clones nucelares. Em 1957, surgiu o cancro cítrico, trazido do Japão para o Estado de São Paulo, e mais uma vez a citricultura brasileira teve uma perda significativa, com 300 mil plantas erradicadas. No ano de 1987, surgiu a clorose variegada dos citros (CVC), doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que afetou a produção citrícola e exigiu grande atenção dos pesquisadores. Em 1999, foi identificada em pomares do sul do Triângulo Mineiro, uma nova doença, mais tarde denominada de morte súbita dos citros (MSC), de causa ainda desconhecida, afetando pomares de laranja ‘Valência’ enxertada sobre limão ‘Cravo’, no município de Comendador Gomes-MG. Hoje se sabe que a MSC também afeta plantas enxertadas em limão ‘Volkameriano’. E mais recentemente, em 2004, surgiu o greening ou huanglongbing (HBL), doença causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter americanus* de grande impacto mundial.

O Estado de São Paulo responde por 81% da produção brasileira de frutas cítricas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2005), estando a citricultura localizada praticamente em todo o Estado. As regiões Norte e Noroeste concentram 45% da produção paulista, entretanto estas regiões vêm sofrendo uma perda de participação

devido à morte súbita dos citros, ao aumento da severidade da CVC, e também, pela concorrência com a cultura da cana-de-açúcar, fazendo com que haja um ligeiro deslocamento do cultivo de citros para regiões como Araraquara, São João da Boa Vista, Lins e Botucatu (NEVES; LOPES, 2005).

Com tantos problemas que vêm surgindo, como pragas, doenças e a substituição da área cultivada por outras culturas, o melhoramento genético de cultivares de citros seria de grande importância para se tentar reverter o quadro atual da citricultura. Programas de melhoramento convencional de citros têm sido desenvolvidos desde o final do século XIX, em 1893, na Flórida-EUA (COOPER; REECE; FURR, 1962), e posteriormente, em outros países como Itália, Espanha, África do Sul, França, Java, Filipinas, Japão e Brasil (SOOST; CAMERON, 1975). A ausência de resultados significativos a partir desses programas de melhoramento, pode ser atribuída a barreiras naturais relacionadas à biologia reprodutiva do gênero *Citrus* e afins (GMITTER JUNIOR; GROSSER; MOORE, 1992).

Os desafios ao melhoramento de citros ainda persistem, apesar de todo avanço em produção no Brasil e no mundo. A ampliação das bases genéticas atuais dos citros, assim como o melhoramento do germoplasma já existente, impõem a necessidade de desenvolver novas técnicas para os programas de melhoramento. Com isso, a biotecnologia pode contribuir efetivamente, através da hibridação somática por fusão de protoplastos e da transformação genética (MACHADO et al, 2005). Esta última técnica vem apresentando um grande potencial, por tornar possível a introdução de genes que modificam características de interesse agrônomo, incluindo genes de resistência ou tolerância a doenças, mantendo-se as características originais do cultivar e evitando-se a transferência de características deletérias (FEBRES et al., 2003; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; PEÑA et al., 1997).

Atualmente, com as técnicas de transformação genética e com as estratégias desenvolvidas para obtenção de plantas resistentes a vírus, como a resistência derivada do patógeno pela introdução do gene da capa protéica ou seqüências gênicas conservadas antisense, pode-se obter plantas tolerantes ou resistentes a determinado vírus através do silenciamento gênico. Sabendo-se da hipótese de que a morte súbita dos citros possa ser causada por uma nova estirpe do CTV ou por outro vírus com padrões de disseminação semelhante ao CTV (BASSANEZI et al., 2003), objetivou-se neste trabalho obter plantas transgênicas, via *Agrobacterium tumefaciens*, de limão 'Cravo', laranja azeda e laranja doce expressando o gene

da capa protéica (CTV-CP e CTV-dsCP) e uma sequência conservada antisense do CTV, bem como, estudar a organogênese *in vitro* de espécies cítricas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e distribuição dos citros

O gênero *Citrus* pertence à tribo Citreae, subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, e é originário da região sudeste da Ásia, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão, e do leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SOOST; CAMERON, 1975; SWINGLE; REECE, 1967). O norte da região Indo-Burma também é apontado como centro de origem da maioria das espécies cítricas (ZIEGLER; WOLFE, 1961). A região de Yunnan, no centro sul da China, também pode ter sido importante para a origem e dispersão inicial de um grande número de espécies primitivas, tendo um papel determinante na origem e distribuição das espécies modernas de *Citrus* (DAVIES; ALBRIGO, 1994; GMITTER JUNIOR; HU, 1990).

O primeiro fruto cítrico a ser conhecido pelas civilizações européias foi a cidra (*Citrus medica* L.), seguido pela laranja azeda (*C. aurantium* L.), limão (*C. limon* Burmann) e laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) (CHAPOT, 1975; WEBBER; REUTHER; LAWTON, 1967). Nas Américas, sul da África e Austrália, a introdução dos citros se deu pela expansão colonial européia. Na América do Norte os citros foram introduzidos pelas Ilhas Canárias por Cristóvão Colombo durante a segunda jornada, por volta de 1493 (CHAPOT, 1975). Todas as espécies de *Citrus* economicamente importantes são originárias do continente asiático, exceto o pomelo (*C. paradisi* Macfadyen) que provavelmente surgiu ao redor de 1790, como um mutante, ou talvez, um híbrido natural em Barbados, após a introdução da toranja e da laranja doce pelos colonizadores europeus (CHAPOT, 1975; SCORA et al., 1982).

No Brasil, as plantas cítricas foram introduzidas pelos portugueses no início das expedições colonizadoras, no século XVI, provavelmente na Bahia (MOREIRA; MOREIRA, 1991). Presume-se que as primeiras plantas de citros foram cultivadas a partir de 1501, nas feitorias construídas pelo governo de Portugal para dar sinais de posse no território americano (NEVES; LOPES, 2005), sendo que em 1540 já existiam laranjais espalhados pelo litoral, de norte a sul (MOREIRA; MOREIRA, 1991). A partir daí, o cultivo das plantas cítricas se expandiu por todo o país devido às condições ideais para vegetar e produzir, tornando-se

aparentemente nativas em certas áreas, como em Mato Grosso (MOREIRA; MOREIRA, 1991), sendo que, atualmente, o Brasil se destaca como maior produtor mundial de citros (FAO, 2006).

O número básico de cromossomos dos citros é $x = 9$, sendo que a condição mais freqüente do gênero *Citrus* é a diploidia ($2n = 2x = 18$), mas também, podem ocorrer casos de poliplóides, como a lima ácida Tahiti ($2n = 3x = 27$). Os gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* reúnem os de maior importância econômica da família Rutaceae. Entre eles, é possível a polinização com obtenção de híbridos, alguns de valor comercial (GMITTER JUNIOR; GROSSER; MOORE, 1992; MOREIRA; PIO, 1991). O número de espécies do gênero *Citrus* é motivo de discussão entre os especialistas, sendo que Tanaka admitiu a classificação do gênero com 159 espécies, enquanto que Swingle classificou apenas 16 espécies (CHAPOT, 1975).

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

Entre os citros, a diversidade de gêneros, espécies, cultivares e clones é muito grande, no entanto, um número relativamente pequeno é utilizado nos atuais plantios comerciais, devido a algumas razões botânicas e históricas. Como a propagação comercial das espécies é exclusivamente vegetativa, os citros tiveram, na seleção massal, a via mais rápida de melhoramento, principalmente por apresentarem elevada taxa de mutações somáticas, promovendo com freqüência, o surgimento de novas seleções que se tornaram variedades comerciais. Programas tradicionais de melhoramento genético via hibridação e seleção recorrente sempre esbarram em obstáculos de ordem genética e botânica, características desse grupo de plantas. Com isso, a biotecnologia pode contribuir efetivamente no melhoramento dos citros (MACHADO et al., 2005).

2.2 Importância sócio-econômica da citricultura no Brasil

A citricultura constitui importante segmento na estrutura sócio-econômica do Brasil, podendo ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agro-industriais do país, considerando a geração de empregos, a formação de capital de renda, a agregação de valor

regional, a ativação do setor terciário e a interiorização do desenvolvimento (NEVES et al., 2001). Nas últimas décadas, o Brasil vem liderando a produção mundial de citros, sendo que na safra 2004/2005 foram produzidas 20,142 milhões de toneladas, seguido pela China com 16,019 milhões de toneladas e Estados Unidos com 10,317 milhões de toneladas. No contexto mundial, mesmo sendo cultivado em vários países, Brasil, China e Estados Unidos detêm aproximadamente 45% da produção total de citros (FAO, 2006).

O cultivo de frutas cítricas no Brasil é feito em todas as regiões, com uma área plantada estimada em 930 mil hectares (FAO, 2006), com destaque para os Estados de São Paulo (81%), Sergipe (4%), Bahia (4%) e Minas Gerais (3%) que somam juntos 92% do total da produção (IBGE, 2005).

Em 2004, com 586 mil hectares cultivados no Estado de São Paulo, a citricultura ocupava cerca de 9,4% da área total cultivada, superada apenas pela cana-de-açúcar (46,2%), milho (12,4%) e soja (9,9%). Nesse Estado, o setor citrícola apresenta-se importante não somente em termos econômicos, mas também sociais, sendo que gerou cerca de 11,2% de empregos em 2002 (FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS - SEADE, 2005). O desenvolvimento da citricultura no Estado de São Paulo, nos últimos anos, se deve graças à adoção de novas tecnologias na condução dos pomares e na utilização de mudas de melhor qualidade oriundas de viveiros telados e com melhores materiais genéticos, resultando também em melhores índices de produtividade (NEVES; LOPES, 2005).

A citricultura está localizada em praticamente todo o Estado de São Paulo, sendo que nas regiões Norte e Noroeste concentra-se a maior produção (45%), mas com tendência de perda de participação, dadas às fortes pressões de doenças como a morte súbita dos citros e o aumento da severidade da clorose variegada dos citros, e também, pela concorrência com a cultura da cana-de-açúcar, fazendo com que ocorra um ligeiro deslocamento do cultivo de regiões produtoras tradicionais, como Barretos, Limeira e Catanduva, para regiões como Araraquara, São João da Boa Vista, Lins e Botucatu (NEVES; LOPES, 2005).

Sob o ponto de vista comercial, os pontos fortes da citricultura brasileira, principalmente da paulista, são o seu custo de produção competitivo e um parque industrial que atua em escala global, por outro lado, o ponto fraco encontra-se nos próprios pomares, devido ao aparecimento de severas doenças como a morte súbita dos citros e o greening, que podem ser consideradas um risco econômico para o setor, podendo comprometer o custo e a oferta futura.

Entretanto, a hegemonia da citricultura paulista será garantida se o setor continuar buscando ações de crescimento do mercado consumidor de frutas e de sucos, seja ele interno ou externo. A modernização do setor citrícola destinado ao mercado interno é essencial para melhorar a rentabilidade do setor produtivo e escoar os excedentes da produção paulista. O aumento da exportação, principalmente de suco concentrado, dependerá de reduções das barreiras tarifárias dos países europeus e dos Estados Unidos, tradicionais países compradores, e da expansão do consumo de suco nos países não tradicionais, como a China. Com isso, esforços devem ser direcionados para a produção de frutas cítricas *in natura* de alta qualidade e no crescimento do mercado interno de suco, tornando o setor mais competitivo, mais bem estruturado e menos dependente do comportamento externo do suco concentrado (BOTEON; NEVES, 2005).

2.3 Organogênese *in vitro* de citros

O princípio básico da cultura de tecidos é a totipotência celular, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária para a regeneração de uma planta completa, desde que submetida a tratamentos adequados (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998).

Os primeiros trabalhos envolvendo cultura de tecidos em citros foram iniciados no final da década de 1950 (GAUTHERET, 1959; SCHROEDER; SPECTRO, 1957). Entretanto, foi após o desenvolvimento dos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) que foram constatados os maiores avanços na cultura de tecidos de citros. Ragan; Murashige e Bitters (1968) realizaram trabalhos de cultura de tecidos de citros, objetivando a produção de plantas isentas de vírus a partir do cultivo *in vitro* do tecido nucelar, e obtiveram embriões nucleares de espécies monoembriônicas, incentivando a utilização da técnica para a obtenção de plantas saudáveis e vigorosas.

A regeneração de plantas cítricas *in vitro* pode ocorrer por organogênese ou embriogênese somática. A organogênese pode ser definida como o processo em que as células e os tecidos são induzidos a sofrer mudanças que levam à formação de uma estrutura unipolar, podendo ser um primórdio caulinar ou radicular, cujo sistema vascular se encontra conectado ao explante original. Diferentemente, a embriogênese somática leva à produção de uma estrutura bipolar, contendo ápice caulinar e radicular, com um sistema vascular independente (THORPE,

1994). Estas vias de regeneração podem ocorrer de forma direta ou indireta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. A organogênese direta refere-se à regeneração direta de gemas, sem a formação de calo, a partir de tecidos não meristemáticos, como o câmbio vascular, a base do pecíolo em dicotiledôneas, a base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmento de raízes. Já na organogênese indireta o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo, uma massa de células totalmente indiferenciadas, surgindo gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novos órgãos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, como o genótipo, o tipo, a idade e o tamanho dos explantes, os meios de cultura, as condições de cultivo e os tipos e dosagens de reguladores vegetais, os quais se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (THORPE, 1994; MOREIRA-DIAS et al., 2001). Entre os reguladores vegetais, as citocininas promovem a divisão celular e estimulam a iniciação e o crescimento de gemas adventícias em diversas espécies, e a 6-benzilaminopurina (BAP) parece ser a citocinina mais adequada para a indução de gemas adventícias (BEYL, 2000). Estudos detalhados têm sido realizados para estabelecer protocolos para regeneração *in vitro* de genótipos de citros, e esses trabalhos têm mostrado que a adição da citocinina BAP é essencial para a regeneração de brotos, enquanto que a contribuição das auxinas parece ter um efeito marginal (BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; GARCÍA-LUIS et al., 1999; MOREIRA-DIAS et al., 2000).

A regeneração de plantas cítricas por organogênese *in vitro* tem sido descrita a partir de diferentes explantes como segmento de raiz (BHAT; CHITRALEKHA; CHANDAL, 1992; GOH et al. 1995), discos de folha (ALMEIDA et al., 2003; CHATUVERDI; MITRA, 1974; VANECK; KITTO, 1992), segmento internodal (ALMEIDA et al., 2003; DURÁN-VILA; NAVARRO, 1989; PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997), segmento de epicótilo (ALMEIDA et al, 2002; BESPALHOK FILHO et al., 2001b; EDRISS; BURGER, 1984; GARCÍA-LUIS et al., 2006; MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2005a, 2005b) e segmento de hipocótilo (MAGGON; SINGH, 1995).

Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de se conseguir uma metodologia eficiente para a regeneração de plantas cítricas *in vitro*. Para isso, têm sido estudados diversos fatores que podem influenciar no processo como a concentração de reguladores vegetais, a temperatura de incubação, a taxa de radiação fotossintética, a composição do meio de cultura, o grau de maturidade do tecido, a posição e orientação do explante no meio de cultura e o tipo de explante.

A influência da luz, dos reguladores vegetais e da orientação do explante na regeneração *in vitro* de segmentos de epicótilo de quatro espécies de *Citrus* (*C. aurantium*, *C. macrophylla*, *C. reshni* e *C. sinensis*) e do híbrido citrange ‘Troyer’ (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) foram estudados por Bordón; Guardiola e García-Luis, (2000). Os autores observaram que em qualquer uma das espécies, a região apical dos explantes regeneraram brotos por organogênese direta quando plaqueados verticalmente, enquanto que a região apical dos explantes de citrange ‘Troyer’ regeneraram brotos por organogênese indireta quando plaqueados horizontalmente. A formação de brotos pela organogênese direta foi inibida no escuro, mas este efeito inibitório foi revertido pela adição de BAP ao meio de cultura, para o citrange ‘Troyer’, parcialmente em *C. sinensis*, mas não para *C. macrophylla*. Concluíram também que as diferentes respostas organogênicas obtidas indicaram que as condições de regeneração devem ser otimizadas para cada genótipo.

Moreira-Dias et al. (2001) estudando os efeitos da luz e dos reguladores vegetais na morfogênese de segmentos de epicótilo de citrange ‘Troyer’, demonstraram que a incubação sob fotoperíodo de 8 horas de luz, com uma intensidade de $74 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e na presença de $2,2 \mu\text{M}$ de BAP, foram as condições ideais para a obtenção de gemas adventícias, e que independente das condições de incubação, a capacidade de regeneração dos explantes diminuiu com a distância dos cotilédones.

Objetivando-se avaliar o efeito de concentrações de BAP na organogênese *in vitro* de limão ‘Cravo’ (*C. limonia*) e laranja ‘Pêra’ (*C. sinensis*), bem como o efeito do seccionamento do explante em laranja ‘Valência’ (*C. sinensis*), Moura et al. (2001) utilizaram segmentos internodais de plântulas germinadas *in vitro* de limão ‘Cravo’, e segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* das laranjas ‘Pêra’ e ‘Valência’ como fonte de explantes. Os melhores resultados para o número de brotações adventícias foram obtidos na concentração de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP para limão ‘Cravo’, e nas concentrações $1,0$ e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP para laranja

‘Pêra’. O seccionamento dos explantes favoreceu a organogênese *in vitro* da laranja ‘Valência’, porém as brotações apresentaram menores índices de enraizamento.

Um sistema de regeneração *in vitro* para os cultivares de laranja doce ‘Pêra’, ‘Valência’ e ‘Folha Murcha’ (*C. sinensis*), foi desenvolvido por Besspalhok Filho et al. (2001b). Para a indução de brotações, os autores testaram diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 μM). Os melhores tratamentos para a formação de brotos adventícios em laranja ‘Pêra’ foram aqueles que utilizaram concentrações de 2,0 e 5,0 μM de BAP. Para a laranja ‘Valência’, os melhores resultados foram observados nas concentrações de 1,0 e 2,0 μM de BAP e para ‘Folha Murcha’, na concentração de 2,0 μM de BAP. Os autores também relataram que o maior número de brotos alongados foi obtido em meio de cultura suplementado com 0,5 μM de BAP, e o enraizamento ocorreu em meio MS com a metade da concentração de sais.

Almeida et al. (2002) objetivando definir protocolos para a regeneração *in vitro* via organogênese, para as laranjas ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Hamlin’ e para o limão ‘Cravo’, induziram brotações em segmentos de epicótilo dos cultivares em meio de cultura MT, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mg.L^{-1}). Para o enraizamento, os autores utilizaram meio de cultura MT, com ou sem adição de ANA ou AIB (1,0 mg.L^{-1}). Observaram que a concentração de 1,0 mg.L^{-1} de BAP proporcionou a maior porcentagem de explantes responsivos para ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Hamlin’. Para o limão ‘Cravo’, não houve diferenças entre as concentrações de BAP testadas. A combinação de 1,0 mg.L^{-1} de BAP com 1,0 mg.L^{-1} de AIB, permitiu a regeneração de plantas com bom índice de enraizamento nos três cultivares de laranja. Para o limão ‘Cravo’, a utilização de 0,5 mg.L^{-1} de BAP com 1,0 mg.L^{-1} de AIB, assegurou a regeneração de plantas com alto índice de enraizamento.

Almeida et al. (2003) apresentaram um protocolo para a organogênese *in vitro* dos cultivares de laranja ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Hamlin’, utilizando como fonte de explante, segmentos internodais de plantas adultas mantidas em casa de vegetação. A organogênese foi induzida em meio de cultura DBA3 suplementado com BAP (1,0 mg.L^{-1}) e ANA (0,5 mg.L^{-1}), no escuro a 27 °C. A análise histológica mostrou uma formação indireta dos brotos adventícios pela formação de calo nas extremidades dos explantes. Também utilizaram discos foliares dos mesmos cultivares como fonte explante, mas o desenvolvimento de brotos adventícios foi observado apenas em laranja ‘Hamlin’, entretanto, em uma porcentagem muito baixa quando comparada à regeneração de brotos em segmentos internodais. Em outro trabalho de

caracterização histológica da organogênese *in vitro* de citros, Almeida et al. (2006) induziram a organogênese em segmentos de epicótilo de laranja ‘Valência’ incubando-os horizontalmente em meio de cultura MT suplementado com BAP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), constatando que as gemas adventícias foram regeneradas diretamente da região do câmbio vascular na extremidade dos explantes.

A fim de maximizar a regeneração *in vitro* de plantas de laranja ‘Pêra’, Silva et al. (2005a) avaliaram concentrações de BAP no meio de cultura (0; 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), tamanho do explante (0,25; 0,5 e 1,0 cm), diferentes regiões do explante (basal, medial e apical), posição do explante no meio (horizontal ou vertical), condições de luminosidade (fotoperíodo de 16 horas e escuro por 30 dias) e seccionamento nas extremidades dos explantes. Como resultados obtiveram que a combinação de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, com segmentos de epicótilo de 0,25 cm de comprimento, foi a mais eficiente na resposta organogênica; os segmentos de epicótilo apicais e mediais apresentaram melhores resultados que os segmentos de epicótilo basais; o cultivo dos segmentos de epicótilo na posição horizontal, em fotoperíodo de 16 horas, foi mais eficiente do que na posição vertical; e não houve melhora na indução da organogênese *in vitro*, quando foram seccionadas as extremidades dos explantes.

Com o objetivo de estabelecer um sistema para regeneração *in vitro* de tangerina ‘Cleópatra’, Silva et al. (2005b) avaliaram concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), condições de cultivo (fotoperíodo de 16 horas e escuro por 30 dias), posição (horizontal ou vertical) e polaridade (basal, medial e apical) do segmento de epicótilo no meio de cultura. Os autores obtiveram a máxima proliferação de gemas na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, em condições de escuro por 30 dias, não havendo efeito da posição do explante na resposta organogênica, e os segmentos apicais e mediais mostraram-se mais eficientes que os basais.

García-Luis et al. (2006) verificaram o efeito da orientação do explante em relação à gravidade e o seu contato com o meio de cultura na regeneração de segmentos de epicótilo de citrange ‘Troyer’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), em meio MS suplementado com $4,4 \mu\text{M}$ de BAP e $0,54 \mu\text{M}$ de ANA. Os resultados obtidos mostraram que a regeneração de gemas não foi afetada pela orientação dos explantes em relação à gravidade, mas foi determinada pela polaridade do explante e pelo contato com o meio de cultura.

Resultados conflitantes são encontrados sobre o padrão de expressão do gradiente morfogênico em explantes originados a partir de epicótilos de citros. Moreira-Dias et al. (2001) obtiveram melhores respostas com a região basal dos epicótilos, outros trabalhos relatam

resultados opostos, onde as regiões apical e sub-apical do epicótilo apresentaram uma maior regeneração de brotos (COSTA et al., 2004; GOH et al., 1995; SILVA et al., 2005a, 2005b). Com o objetivo de avaliar o gradiente morfogênico da regeneração *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo de limão ‘Cravo’ e pomelo ‘Foster’, Costa et al. (2004) observaram um mesmo padrão geral no gradiente morfogênico ao longo do eixo do epicótilo dos dois cultivares, sendo que as regiões apical e sub-apical apresentaram uma máxima resposta à regeneração *in vitro*, sendo influenciada por fatores relacionados ao genótipo, composição do meio de cultura e condições de incubação.

2.4 Transformação genética via *Agrobacterium*

A transformação genética pode ser definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação. É um processo controlado, onde apenas um fragmento definido de DNA é introduzido no genoma do hospedeiro, ou genoma receptor, devendo ser a ele integrado. Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, agrupadas em duas categorias: transferência indireta e direta de genes. A indireta é aquela em que o DNA exógeno é inserido no genoma pela ação de um vetor biológico, enquanto que a direta é baseada em processos físico-bioquímicos. A transformação indireta baseia-se principalmente no sistema mediado por bactérias do gênero *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*) e tem sido o método mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

A produção de plantas transgênicas envolve a integração estável do DNA exógeno dentro do genoma hospedeiro e a subsequente regeneração de plantas inteiras a partir das células transformadas. Estes dois processos independentes são importantes para o sucesso da obtenção de plantas transgênicas. Competência para regeneração de plantas é a primeira limitação do processo, sendo que a frequência de regeneração pode ser baixa ou nula em muitas espécies recalcitrantes (PEÑA et al., 2004).

As agrobactérias (*Agrobacterium* spp.) são bacilos aeróbicos, tipicamente de solo e Gram-negativas. Dentro do gênero *Agrobacterium*, cinco espécies já foram descritas: *A. tumefaciens*, que provoca a doença conhecida como galha-da-coroa; *A. rhizogenes* que causa a síndrome da raiz em cabeleira; *A. rubi*, que induz tumores em *Rubus* spp.; *A. vitis* que induz

tumores em *Vitis* spp. e *A. radiobacter*, que são bactérias não-patogênicas. As agrobactérias pertencem à família Rhizobiaceae, que agrupa, entre outros, o gênero *Rhizobium* que são bactérias fixadoras de nitrogênio (KERSTERS; DE LEY, 1984).

Agrobacterium tumefaciens é o agente causal da doença conhecida como galha da coroa, que é caracterizada pela proliferação descontrolada das células situadas próximo à região do colo da planta (BENEDDRA et al., 1996). Essas galhas, quando isoladas, são capazes de crescer indefinidamente em meio de cultura *in vitro*, sem reguladores vegetais (WHITE; BRAUN, 1941).

A formação da galha ou tumor está diretamente associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado plasmídeo Ti (“tumor inducing”), e parte desse plasmídeo se integra ao genoma das células de plantas infectadas (LEE et al., 1995). O plasmídeo Ti pode ser dividido em duas regiões: uma que possui genes de origem de replicação (*ori*), com funções ligadas à manutenção do plasmídeo Ti dentro da bactéria; genes de transferência (*tra* e *trb*), responsáveis pela conjugação do plasmídeo entre linhagens de *Agrobacterium*; genes de catabolismo de opinas (*opc*), envolvidos na síntese de enzimas específicas responsáveis pela absorção das opinas para dentro da célula e posterior catabolismo das mesmas pela bactéria; genes de virulência (região *vir*), envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA; e uma segunda chamada de região-T que possui o T-DNA (“transferred DNA”), única parte do plasmídeo transferida para o genoma da célula vegetal (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003; VAN SLUYS; HASHIMOTO; SCORTECCI, 1992).

A região-T é delimitada por seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda, e definem a porção do plasmídeo que será transferida, sendo que a presença da borda direita é essencial para que ocorra a transferência (WANG et al., 1984). Os genes presentes no T-DNA codificam enzimas envolvidas na biossíntese de reguladores vegetais (auxinas e citocininas) e estão relacionados à formação da galha nos sítios infectados da planta. O T-DNA também possui genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, constituídas de açúcares e aminoácidos, que serão catabolisadas somente pela linhagem indutora, como fonte de nutrientes (carbono e nitrogênio) (VAN SLUYS; HASHIMOTO; SCORTECCI, 1992).

A região de virulência (*vir*) é ativada pela liberação de compostos fenólicos pelos tecidos lesionados, iniciando o processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (STACHEL et al., 1985). Esta região funciona como um regulon, com sete grupos de complementação: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virH*. O processo de indução e transferência do T-DNA é controlado pela expressão coordenada da região *vir*. O *locus virA* codifica para uma proteína de membrana que percebe a presença dos metabólitos da planta lesionada. As proteínas VirA e VirG são expressas constitutivamente e regulam a expressão dos outros genes *vir*. A proteína VirA ativada, modifica a proteína VirG através da fosforilação, sendo esta responsável pela indução da transcrição de toda a região *vir* (SHENG; CITOVSKY, 1996). Para formar a fita-T, o operon *virD* codifica endonucleases capazes de reconhecer e clivar dentro dos 25 pares de base que delimitam a região-T. A transferência da fita-T é polar, sempre da direita para a esquerda (ZAMBRYSKI; TEMPÉ; SCHELL, 1989). A fita-T é transferida para a célula vegetal na forma fita simples, protegida na porção 5' da molécula pela proteína VirD2 e, ao longo da fita-T, pela proteína VirE2. A ligação das proteínas VirE2, ao longo da fita simples de DNA, seria responsável pela organização estrutural da fita-T, protegendo-a durante o trajeto entre a célula bacteriana e a célula vegetal. Proteínas codificadas pelos *locus virB* garantiriam a passagem pela membrana da bactéria, pela formação de poro de passagem entre a membrana e parede celular (ZAMBRYSKI, 1992).

Estudos recentes sugerem que a fita-T é primeiramente convertida para fita dupla e assim integrada no DNA da planta. Após a integração do T-DNA, inicia-se a tradução dos genes da região *onc* (oncogenes) resultando na produção dos hormônios vegetais ácido indol acético (auxina) e isopentenil-AMP (citocinina). Dessa maneira, ocorre um desbalanço hormonal, que tem como consequência a multiplicação descontrolada das células transformadas e das células vizinhas, resultando na formação do tumor (CHILTON; QUE, 2003; TZIFIRA et al., 2003).

A interação *Agrobacterium*-planta foi demonstrada que poderia ser um eficiente sistema de transformação genética em plantas pela introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo, em 1983, por Herrera-Estrella e colaboradores, confirmando a possibilidade de manipulação do plasmídeo de *Agrobacterium*, permitindo assim, a transferência da informação genética desejada para o interior de uma célula vegetal hospedeira (VAN SLUYS, 1999).

Os vetores utilizados para sistemas de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, são denominados “desarmados” devido à remoção dos oncogenes. No entanto, os genes de virulência (região *vir*), localizados no plasmídeo Ti, juntamente com as extremidades direita e esquerda, devem ser mantidos (KLEE; HORSCH; ROGERS, 1987). Dessa maneira, qualquer outra nova sequência de DNA, inserida entre as extremidades do T-DNA, pode ser transferida e integrada no genoma vegetal.

2.5 Transformação genética em citros

Atualmente, no Brasil, as principais instituições envolvidas na obtenção de plantas transgênicas de citros são: o Instituto Agrônomo do Paraná e a Universidade Estadual de Londrina, desenvolvendo trabalhos com laranja doce e citrumelo ‘Swingle’ (BESPALHOK FILHO et al., 2001a; MOLINARI et al., 2004; VIEIRA et al., 2005) e o Centro de Energia Nuclear na Agricultura e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, pertencentes à USP, desenvolvendo trabalhos com cultivares de laranja doce (ALMEIDA et al., 2003; AZEVEDO, 2005; BOSCARIOL et al., 2003; MENDES et al., 2002) e limão ‘Cravo’ (AZEVEDO, 2005).

O primeiro trabalho realizado na área de transformação genética em citros foi feito por Kobayashi e Uchimiya (1989), via polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce ‘Trovia’ (*C. sinensis*). Porém, os autores não obtiveram sucesso na regeneração das plantas.

A partir daí, alguns trabalhos de introdução direta de DNA em citros vêm sendo desenvolvidos pelo tratamento com PEG em protoplastos de limão ‘Rugoso’ (*C. jambhiri* Lush.) (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990), laranja ‘Itaborai’ (*C. sinensis*) (FLEMING et al., 2000) e laranja ‘Valência’ (*C. sinensis*) (GUO et al., 2005), por eletroporação de protoplastos de tangerina ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco cv. Ohta) (HIDAKA; OMURA, 1993) e de laranja ‘Hamlin’ (*C. sinensis*) (NIEDZ et al., 2003) e por bombardeamento de partículas em células embriogênicas de tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macf.) (YAO et al., 1996). Outras publicações também demonstram a utilização de métodos indiretos de transformação genética a partir do co-cultivo de segmentos de epicótilo e segmentos internodais de citros com *Agrobacterium tumefaciens* (ALMEIDA et al., 2003; BOND; ROOSE, 1998; CERVERA et al., 1998b, 1998a; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; HIDAKA et al., 1990; KANEYOSHI et

al., 1994; LUTH; MOORE, 1999; MENDES et al., 2002; MOLINARI et al., 2004; MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a, 1995b, 1997, 2004; YANG et al., 2000) e com *Agrobacterium rhizogenes* (CHÁVEZ-VELA; CHÁVEZ-ORTIZ; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, 2003; PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1998), e também, a partir do co-cultivo de calos embriogênicos de tangerina 'Ponkan' (*C. reticulata*) com *A. tumefaciens* (LI; SHI; DENG, 2002).

Apesar do grande número de trabalhos realizados com transformação genética de citros mediada por *A. tumefaciens*, a frequência de regeneração de plantas transformadas tem sido muito baixa e algumas espécies de citros, importantes economicamente, apresentam-se recalcitrantes. A eficiência de transformação obtida em segmentos internodais de citrange 'Carrizo' foi de 2% (MOORE et al., 1992), em laranja doce 7,9% (PEÑA et al., 1995a) e em lima ácida 'Galego' de 6,7% (PEÑA et al., 1997). Na tentativa de aumentar a eficiência de transformação, vários trabalhos vêm sendo realizados utilizando diferentes tipos de explantes como segmento internodal (CERVERA et al., 1998b; MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a; PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1998;), células em suspensão (HIDAKA et al., 1990), protoplastos (FLEMING et al., 2000) e segmentos de epicótilo (BOND; ROOSE, 1998; CERVERA et al., 1998a; KANEYOSHI et al., 1994; MENDES et al., 2002; PEÑA et al., 1997; YANG et al., 2000).

A transformação genética dos citros tem sido obtida principalmente com o uso de explantes coletados a partir de tecidos juvenis, sendo que, plantas regeneradas a partir desses tecidos, teriam características de plantas juvenis e levariam alguns anos de cultivo antes de ser possível avaliar suas características hortícolas e comerciais. Poucos trabalhos são encontrados utilizando tecidos maduros como fonte de explantes, demonstrado somente em laranja 'Pineapple' por Cervera et al. (1998b) e em laranja 'Hamlin' por Almeida et al. (2002). No caso da introdução de genes de interesse agrônomo, que permitiriam certa tolerância ou resistência a pragas ou doenças, o uso de explantes provenientes de tecidos maduros seria interessante e desejável, permitindo uma rápida avaliação agrônoma (ALMEIDA, et al., 2002; CERVERA et al., 1998b).

Várias estirpes de *Agrobacterium* também têm sido avaliadas na tentativa de transformar geneticamente os citros, dentre elas, EHA 101 e EHA 105 (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; PEÑA et al., 1995a, 1995b, 1997) vêm mostrando os melhores resultados. Entretanto, Bond e Roose (1998) obtiveram melhores resultados na transformação de laranja

‘Washington Navel’ usando a estirpe C58C1 de *Agrobacterium*, com 45% de eficiência de transformação contra 29%, quando se utilizou a estirpe EHA 101-5. A utilização de outras estirpes, como a LBA 4404, não permitiu a regeneração de plantas transgênicas de laranja ‘Washington Navel’ (BOND; ROOSE, 1998), porém, Kaneyoshi et al. (1994) obtiveram alta eficiência de transformação para o *Poncirus trifoliata*.

Alguns trabalhos têm demonstrado a forte influência do genótipo na transformação genética de citros (ALMEIDA et al., 2002; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a), sugerindo a necessidade de estudos específicos para cada genótipo, visando um melhor ajuste nos protocolos de regeneração *in vitro*. *Poncirus trifoliata* e seus híbridos têm mostrado uma alta afinidade para transformação via *Agrobacterium* (KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1995). Kaneyoshi et al. (1994) obtiveram 87,7% de brotos de *P. trifoliata* expressando o gene GUS, confirmando a integração estável desse gene pelas análises de PCR e Southern Blot, enquanto que outras espécies ou mesmo cultivares são mais recalcitrantes (ALMEIDA et al., 2002; MOORE et al., 1992). Estudos com laranja azeda (*C. aurantium*) demonstraram que esta espécie é recalcitrante para transformação, tendo como resultados uma eficiência em torno de 1% (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997). A partir do uso de tecido maduro como explante de quatro cultivares de laranja doce (*C. sinensis*), para trabalhos de transformação genética via *Agrobacterium*, Almeida et al. (2002) conseguiram apenas a regeneração de plantas de laranja ‘Hamlin’ expressando o gene GUS.

Genes de importância agronômica vêm sendo introduzidos com sucesso em plantas cítricas. O gene *HAL2*, isolado de *Saccharomyces cerevisiae*, foi introduzido em citrange ‘Carrizo’ para tolerância à salinidade (CERVERA et al., 2000), e em pomelo ‘Rio Red’ o gene *GNA*, um gene inseticida derivado de planta, que confere resistência contra afídeos (YANG et al., 2000). Peña et al. (2001) transformaram plantas de citrange ‘Carrizo’ expressando os genes *LEAFY* e *APETALA1* de *Arabidopsis*, que tiveram o período de juvenilidade diminuído, com plantas florescendo já no primeiro ano de cultivo. Mitani et al. (2006) transformaram plantas de *Poncirus trifoliata* com o gene da quitinase do arroz, que está presente na parede celular de várias espécies de plantas e tem sua atividade aumentada após infecção por fungos, bactérias e vírus, estando envolvida em alguns mecanismos de resistência a doenças.

No Brasil, alguns genes de interesse agrônomico vêm sendo introduzidos em citros. Boscardiol (2004) transformou os principais cultivares copa de laranja doce com o gene da atacina

(*attA*), um peptídeo isolado de insetos, e com o gene *Xa21*, um gene maior de resistência (R), isolado de uma espécie selvagem de arroz (*Oryza longistaminata*), visando tolerância a doenças bacterianas, como o cancro cítrico e a clorose variegada dos citros. Testes preliminares mostraram resultados promissores quanto à tolerância dos materiais transformados com o gene da atacina, quanto à suscetibilidade à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, agente etiológico do cancro cítrico. Outros genes também foram introduzidos em citros por Azevedo (2005), como o gene ‘bacterio-opsin’ (*bO*), isolado de *Halobacterium halobium*, que confere resistência a doenças fúngicas, e plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ apresentaram-se mais tolerantes à *Phytophthora nicotianae*. O gene da cecropina, peptídeo lítico isolado da hemolinfa de *Hyalophora cecropia*, apresenta atividade antibacteriana, e também foi introduzido em plantas de laranja ‘Hamlin’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Pêra’. Em testes preliminares com folhas destacadas de plantas transgênicas de laranja ‘Valência’, uma maior tolerância à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foi observada, mostrando menor incidência e severidade que plantas controle.

Os trabalhos de transformação genética de citros visando resistência a doenças têm se concentrado no uso de métodos associados à resistência derivada do patógeno, como a introdução do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (CTV). Esse gene pode promover tolerância ou resistência ao CTV e já foi introduzido em citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) e laranja ‘Pineapple’ (*C. sinensis*) (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997), em laranja azeda (*C. aurantium*) (CHÁVEZ-VELA; CHÁVEZ-ORTIZ; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, 2003; DOMÍNGUEZ et al., 2000; GHORBEL et al., 2000; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997), em lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*) (DOMÍNGUEZ et al., 2000; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997) e em pomelo (*C. paradisi* cv Duncan) (FEBRES et al., 2003).

O primeiro trabalho de transformação genética com o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros foi realizado por Gutiérrez; Luth e Moore (1997), transformando laranja azeda (*C. aurantium*), lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*), citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) e laranja ‘Pineapple’ (*C. sinensis*). Os autores utilizaram duas estirpes de *A. tumefaciens*, EHA 101 e A518, e promoveram ferimentos nos explantes (segmento internodal de 3-4 meses de idade) por bombardeamento de partículas antes da inoculação.

Domínguez et al. (2000) introduziram o gene da capa protéica do CTV em lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*) usando o sistema de transformação genética mediado por *A.*

tumefaciens. Os autores utilizaram segmentos internodais de plantas mantidas em casa de vegetação como fonte de explantes e co-cultivaram com a estirpe EHA 105 de *Agrobacterium*, contendo o plasmídeo binário pBI 121/CTV-CP.

Estudando fatores como meio de cultura, fonte de explante e condições de cultivo, que podem estar relacionados com a eficiência de transformação de laranja azeda via *Agrobacterium*, Ghorbel et al. (2000) introduziram o gene da capa protéica do CTV em laranja azeda, utilizando explantes de plantas de quatro meses de idade, mantidas em casa de vegetação, mostrando uma maior frequência de transformação.

Chávez-Vela; Chávez-Ortiz e Pérez-Molphe-Balch (2003) após estabelecerem as condições ótimas (concentração bacteriana 1×10^8 células mL⁻¹ e 96 horas de co-cultivo) para transformação de raízes de laranja azeda mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, estirpe A4, com o plasmídeo binário B249CP-pGA482GG contendo os genes de seleção *nptII* e o repórter GUS e o gene da capa protéica do CTV, obtiveram a regeneração de plantas transgênicas expressando o gene da capa protéica do CTV.

Febres et al. (2003) obtiveram plantas transgênicas de pomelo via *A. tumefaciens* a partir de segmentos de epicótilo de quatro a seis semanas de idade, com uma variedade de genes derivados de diferentes estirpes e de diferentes partes do genoma do CTV, que poderiam promover resistência ao vírus. Algumas das plantas obtidas foram inoculadas com o CTV por enxertia e todas se mostraram suscetíveis.

Alguns trabalhos têm reportado que a expressão do gene da proteína p23 de estirpes fracas e severas do vírus da tristeza dos citros em lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*), induziu aberrações que se assemelhavam a sintomas virais na folha, e que a intensidade dos sintomas foi independente da patogenicidade da estirpe do CTV, mas se correlacionou com o acúmulo da proteína p23. Transformação com a proteína p23 de outros genótipos de citros suscetíveis e resistentes ao CTV (laranja doce, laranja azeda e *P. trifoliata*) também levaram a sintomas semelhantes ao do CTV que se correlacionaram com os níveis da proteína p23 transcritos, embora a proteína p23 seja pouco detectável nesses hospedeiros. Em contraste, a expressão da proteína p23 em plantas transgênicas não hospedeiras do CTV (*Nicotiana tabacum* e *N. benthamiana*) não induziu a nenhuma aberração fenotípica, mas acumularam a proteína p23. Esses resultados indicam que a proteína p23 é um importante determinante da patogenicidade do CTV e que interfere no desenvolvimento da planta, especificamente com espécies cítricas e

relacionadas (GHORBEL et al., 2001; FAGOAGA et al., 2005). Fagoaga et al. (2006) relataram que cinco linhagens transgênicas de lima ácida 'Galego' apresentaram fenótipo normal, mostrando características típicas de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), com cópias múltiplas do transgene, baixos níveis de mRNA correspondente, metilação do transgene silenciado, e acúmulo de pequenos RNAs interference (siRNAs) específicos da proteína p23. Quando os autores inocularam o CTV por enxertia ou por afídeos, algumas das linhagens silenciadas mostraram-se imunes, não expressando sintomas, nem acumulando virions e RNA viral, estimados por DAS-ELISA e por Northern Blot, respectivamente. Outras linhagens mostraram-se moderadamente resistentes, pois foram infectadas mais tarde e os sintomas mostrados foram mais atenuados quando comparados ao controle. As linhagens suscetíveis, além da expressão dos sintomas, acumularam os siRNAs específicos da proteína p23 em níveis significativamente elevados em relação às linhagens imunes ou controles não inoculados, e mostraram a demetilação do transgene. Esta resposta variável entre transformantes clonais indica que outros fatores podem ter um papel chave na resistência mediada pelo PTGS.

2.6 Transformação genética visando resistência a doenças

O desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças pode ser considerado o melhor método de controle de doenças de plantas, sendo este um dos principais objetivos dos programas de melhoramento. Com as ferramentas biotecnológicas atuais, incorporadas aos programas de melhoramento, genes específicos que podem interferir no estabelecimento da doença vêm sendo selecionados, e então, transferidos para variedades comerciais que já possuem características agronômicas desejáveis, superando as barreiras de incompatibilidade sexual entre espécies.

As estratégias utilizadas na produção de plantas transgênicas resistentes a doenças visam a introdução de genes que possam interferir no estabelecimento do patógeno no hospedeiro e consequentemente no desenvolvimento da doença (PR-proteínas, quitinases, β -1,3-glucanases), de genes de origem não vegetal que codificam proteínas antibacterianas (atacina, cecropina, lactoferrina), de genes que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade e/ou estimulam o sistema de defesa das plantas (genes *hrpN*, *PAP*, *bO*), o uso de genes maiores (R) de resistência e o uso da resistência derivada do patógeno, com a introdução de genes da capa protéica de vírus e seqüências conservadas antisenso do genoma de vírus.

Com relação a doenças causadas por vírus, a estratégia proposta por Sanford e Johnston (1985) da resistência derivada do patógeno, na qual plantas transgênicas contendo genes ou seqüências do genoma do patógeno estariam protegidas contra este ou outros patógenos relacionados, tem sido a mais utilizada. A aplicação desta teoria tem possibilitado a obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus, pela introdução e expressão de parte do genoma viral em plantas hospedeiras, num processo semelhante à proteção cruzada. A proteção pode ser baseada na proteína codificada pelo gene utilizado (*protein-mediated resistance*) como no caso do uso de genes da capa protéica, de proteínas de replicação ou de proteínas de movimento viral, ou no transcrito do gene utilizado (*RNA-based protection*), no caso do uso de RNA-satélite, RNA defeituoso interferente ou RNA antisenso, sem que haja expressão da proteína funcional (RESENDE, 1994; ROMANO; MONTE, 1999).

Na literatura são encontrados vários termos para descrever o silenciamento gênico: cossupressão, RNA de interferência (RNAi) e “quelling” (interrupção da seqüência gênica). A cossupressão seria o termo aplicado ao silenciamento de um gene endógeno pela ação do RNA do transgene, onde ambos os genes, exógeno e endógeno, são coordenadamente suprimidos. “Quelling” é um termo de cossupressão utilizado em *Neurospora crassa*, e RNAi é aplicado ao silenciamento gênico em animais, ocorrendo pela ação de uma fita dupla de RNA, causando a não transcrição e tradução de determinado gene (BAULCOMBE, 2002).

O silenciamento gênico corresponde a uma interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA. Sabe-se que o RNA está envolvido em dois tipos de silenciamento gênico dependente de homologia (SGDH): 1) Silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT), em que a degradação de RNAs homólogos no citoplasma levaria a não tradução e 2) Silenciamento gênico transcricional (SGT), relacionado com o bloqueio na transcrição induzido por um RNA antisenso derivado do próprio DNA, que promoveria uma metilação na região promotora, no núcleo, e a homologia para a metilação dirigida ocorreria nas regiões transcritas (FAGARD; VAUCHERET, 2000; VAUCHERET; BÉCLIN; FAGARD, 2001; WASSENEGGER, 2000).

Estudos recentes têm encontrado a presença de um RNA aberrante (abRNA) de, aproximadamente, 25 nt em senso e antisenso, com homologia ao RNA alvo, em plantas que apresentam cossupressão e resistência a vírus, mas que não são encontradas em plantas usadas como testemunha (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999). A resistência a vírus seria explicada, então, pelo fato destes abRNA serem o molde para que as RNA polimerases dependentes de

RNA do hospedeiro vegetal, possam sintetizar pequenas moléculas de RNA antisense (MATZKE et al., 2001; METTE et al., 1999; MLOTSHWA et al., 2002). Esses pequenos RNA antisense agiriam em trans, em seqüências de RNA complementares (RNA viral), levando à formação de RNA fita dupla (dsRNA). Um complexo de RNases específicas para esses dsRNAs, conhecidas como Complexo DICER ou RNases tipo III, levariam à degradação dessas moléculas híbridas e, em consequência, tornariam a planta resistente ao vírus (CERUTTI, 2003).

Outro modelo que explica o silenciamento de transgenes em cópias múltiplas e invertidas é a formação de um RNA em alça (alRNA), que, posteriormente, se transformaria em dsRNA pela ação de RNA nucleases causando o efeito do silenciamento conforme descrito acima (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001). De modo similar, o dsRNA poderia também ser usado como molde para algumas RNAs polimerases que transcreveriam moléculas de RNA antisense, homólogos aos mRNAs, formando os dsRNA e continuando o ciclo de silenciamento por indução do SGT e SGPT (FAGARD; VAUCHERET, 2000; KOOTER; MATZKE; MEYER, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pertencentes à Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

3.1 Material vegetal

Os experimentos de transformação genética foram realizados com os seguintes cultivares: limão ‘Cravo’ (*C. limonia*), laranja azeda (*C. aurantium*) e as laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ (*C. sinensis*). Para os experimentos de organogênese utilizaram-se limão ‘Cravo’, laranja azeda, limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana*), citrange ‘Carrizo’ (*P. trifoliata* x *C. sinensis*) e as laranjas ‘Natal’ e ‘Pêra’.

Para os experimentos de transformação genética e de organogênese desenvolvidos neste trabalho, utilizaram-se dois tipos de explantes, sendo um proveniente de segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* e o outro de segmentos internodais de plantas cultivadas em casa de vegetação.

Os explantes provenientes de segmentos de epicótilo foram obtidos a partir de sementes extraídas de frutos maduros, coletados no campo experimental de citros da ESALQ-USP, em Piracicaba-SP. Primeiramente, as sementes foram lavadas para retirada da mucilagem e secas. Em seguida foram retirados seus tegumentos e realizou-se a desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), durante 20 minutos, sob agitação. Após este período, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas, e germinadas *in vitro*, em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com 2 g.L⁻¹ de PhytagelTM e 25 g.L⁻¹ de sacarose, e pH ajustado para 5,8. A incubação foi realizada em ausência de luz durante 30 dias, à temperatura de 27 °C, para o alongamento do epicótilo. As plântulas germinadas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas por 7-10 dias, quando foram utilizadas como fonte de explantes, que se constituíram de segmentos de epicótilo de 0,8-1,0 cm de comprimento.

Outra fonte de explante utilizada foram os segmentos internodais de ramos de plantas juvenis de limão ‘Cravo’ e laranja azeda cultivadas em casa de vegetação. As plantas foram mantidas em sacolas plásticas (35 cm x 20 cm) contendo substrato Rendmax CitrusTM, sobre bancadas de concreto de 30 cm de altura. As plantas foram podadas constantemente preservando-se a haste principal. Os ramos laterais formados na haste principal, com cerca de 2-3 semanas de idade, foram coletados como fonte de explantes e desinfestados em solução de hipoclorito de sódio (1,0%), durante 30 minutos. Os ramos foram lavados três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas. As gemas laterais dos ramos foram retiradas e descartadas, sendo que utilizaram-se segmentos internodais de 0,8-1,0 cm de comprimento, como fonte de explante.

3.2 Organogênese *in vitro*

3.2.1 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em diferentes regiões do epicótilo de cultivares de citros

Utilizou-se como fonte de explantes segmentos de epicótilo de aproximadamente 0,8-1,0 cm de comprimento, de plântulas germinadas *in vitro* de laranja azeda, limão ‘Volkameriano’, citrange ‘Carrizo’ e das laranjas ‘Natal’ e ‘Pêra’. Os segmentos de epicótilo foram divididos em três diferentes regiões: basal, mediana e apical em função da distância do nó cotiledonar (Figura 1). Os explantes foram introduzidos em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura MT, suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP ou sem o regulador, e mantidos no escuro por 20 dias, e em seguida submetidos a fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de 27 °C. Após 40 dias, avaliaram-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de brotos por explante. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em um esquema de parcela subdividida 3x2 (região x regulador), com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo quinze segmentos de epicótilo.

Figura 1 - Plântula germinada *in vitro* mostrando as regiões apical (A), mediana (B) e basal (C) do epicótilo, utilizadas como explantes

3.2.2 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de citros em função de concentrações de BAP

Segmentos de epicótilo de aproximadamente 0,8-1,0 cm de comprimento de plântulas germinadas *in vitro* de limão ‘Cravo’, limão ‘Volkameriano’, laranja azeda e laranja ‘Natal’ foram introduzidos em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura MT, suplementado com BAP nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹, no escuro, por 20 dias, e em seguida submetidos a fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de 27 °C. Após 25 dias, avaliaram-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de brotos por explante. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5 (quatro cultivares e cinco concentrações de BAP), com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo doze segmentos de epicótilo.

3.2.3 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em função de concentrações de BAP

Segmentos internodais de 0,8-1,0 cm de comprimento de ramos juvenis de plantas de limão ‘Cravo’ e laranja azeda cultivadas em casa de vegetação foram desinfestados e introduzidos em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura MT, suplementado com BAP nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ no escuro, por 20 dias, e em seguida submetidos a fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de 27 °C. Após 25 dias, avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de brotos por explante. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5 (dois cultivares e cinco concentrações de BAP), com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo dez segmentos internodais.

3.2.4 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos internodais de laranja azeda em função da combinação citocinina:auxina

Segmentos internodais de 0,8-1,0 cm de comprimento de ramos juvenis de plantas de laranja azeda cultivadas em casa de vegetação foram desinfestados e introduzidos em placas de Petri, contendo 20 mL dos meios de cultura MT e DBA3 (DENG; GROSSER; GMITER, 1992), suplementados com BAP nas concentrações de 0; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ e ANA (ácido naftaleno acético) nas concentrações de 0; 0,3 e 0,5 mg.L⁻¹, no escuro, por 20 dias, e em seguida submetidos a fotoperíodo de 16 horas de luz, à temperatura de 27 °C. Após 25 dias, avaliaram-se a porcentagem de explantes responsivos e o número de brotos por explante. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo quatorze segmentos internodais.

3.3 Transformação genética

3.3.1 Genes e vetores de expressão

As construções gênicas foram cedidas pelo Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo e elaboradas com base no plasmídeo pCAMBIA 2201. As seqüências gênicas estão dirigidas pelo promotor 35S e o terminador NOS. Foram utilizados também os genes de seleção *nptII* e o repórter GUS. Para os experimentos de transformação genética, utilizou-se a estirpe EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os plasmídeos:

- a) pCTV-CP: contendo o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (Figura 2a);
- b) pCTV-dsCP: contendo repetições invertidas do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros interligadas pelo intron do gene da quitinase de citros (Figura 2b);
- c) pCTVcons: contendo uma seqüência conservada antisense de 559 pb clonado próximo à extremidade 3' do genoma (região de menor variabilidade entre as diferentes estirpes do vírus da tristeza dos citros). Tomando-se o genoma da estirpe T36 do CTV como referência (19293 bases ao todo, GenBank AY170468), a região amplificada corresponde ao fragmento de 18668 a 19226, compreendendo uma parte do gene da proteína p23 e uma parte da região 3' não traduzida (Figura 2c).

3.3.2 Manutenção e cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Os isolados de *Agrobacterium* foram conservados em solução de glicerol (50%), à temperatura de -80 °C, mantendo-se um estoque de trabalho em geladeira (5 °C), em tubos contendo 1 mL de meio de cultura YEP sólido (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 10 g.L⁻¹ de peptona e 15 g.L⁻¹ de ágar). A partir do estoque de geladeira, os isolados foram cultivados em meio de cultura YEP sólido, suplementado com os antibióticos canamicina (50 mg.L⁻¹) e rifampicina (50 mg.L⁻¹), por 48 horas. Para os experimentos de transformação genética, uma colônia isolada foi transferida para meio de cultura YEP líquido suplementado com os antibióticos canamicina (50 mg.L⁻¹) e rifampicina (50 mg.L⁻¹), incubando-se por 16 horas, em

agitador orbital (170 rpm), à temperatura de 27 °C. Após este período, a suspensão bacteriana foi centrifugada (4800 rpm) à temperatura de 15 °C durante 20 minutos. O precipitado obtido foi ressuspensionado em meio de cultura líquido contendo sais do meio MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), na concentração de 5×10^8 ou 10^9 UFC/mL.

Figura 2 - Representação esquemática das construções gênicas utilizadas nos experimentos de transformação genética de citros, via *Agrobacterium tumefaciens*. a) gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP); b) repetições invertidas do gene da capa protéica do CTV interligadas pelo intron do gene da quitinase de citros (pCTV-dsCP); c) seqüência conservada antisense do CTV (pCTVcons)

3.3.3 Inoculação e co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*

Após cortados em segmentos de 0,8-1,0 cm de comprimento, tanto os explantes provenientes de segmentos de epicótilo como os segmentos internodais foram imersos em solução bacteriana por um período de 20 minutos em placas de Petri nos tamanhos de 58 x 15 mm e 100 x 15 mm, respectivamente. Após a inoculação, os explantes foram secos em papel

filtro autoclavado e transferidos para placa de Petri (100 x 15 mm), contendo meio de cultura MT sólido suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), para segmentos de epicótilo de limão ‘Cravo’, laranja azeda (*C. aurantium*) e laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’. Os segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda foram transferidos para meio de cultura MT sólido suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP e 0,3 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético). A incubação, durante o período de co-cultivo, foi realizada à temperatura de 24 °C, em ausência de luz, por 3 dias para os cultivares de laranja doce e por 2 dias para limão ‘Cravo’ e laranja azeda, independente do explante utilizado.

3.3.4 Seleção, regeneração e aclimatização das plantas

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura (MT) de seleção e regeneração de plantas, suplementado com os antibióticos canamicina (100 mg.L⁻¹) e cefotaxima (500 mg.L⁻¹). A incubação foi realizada à temperatura de 27 °C, em ausência de luz, até o início do desenvolvimento das gemas adventícias, quando foram então, transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz. A cada 15 dias os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura, até que as gemas atingissem cerca de 1 cm de altura.

As gemas desenvolvidas foram avaliadas para verificação da integração do gene de interesse, e aquelas supostamente transformadas foram microenxertadas em plântulas de citrange ‘Carrizo’ germinadas *in vitro*, para crescimento e posterior aclimatização. As plantas microenxertadas foram mantidas *in vitro* e incubadas sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C. Após o desenvolvimento dos brotos microenxertados, as plantas foram transferidas para vaso plástico contendo substrato autoclavado (PlantmaxTM) e incubadas em condições de alta umidade relativa por um período de 15 dias, quando foi iniciada a redução da umidade até a completa aclimatização para condições ambiente. Plantas desenvolvidas e aclimatizadas foram transplantadas para vasos maiores e mantidas em casa de vegetação.

3.3.5 Avaliação das plantas regeneradas

Primeiramente, os brotos regenerados foram avaliados pelo teste histoquímico GUS, sendo que segmentos de folhas de 3-5 mm, foram incubados em solução de X-GLUC (5-bromo-

4cloro-3-indolil glucuronida), à temperatura de 37 °C, durante 16 horas, no escuro. Após este período, o material foi lavado em álcool (70%), para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação, pela presença da coloração azul do tecido da planta transgênica. A visualização foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópio. A eficiência de transformação foi calculada pelo número de gemas adventícias GUS positivas (GUS+) dividido pelo total de explantes introduzidos de cada cultivar estudado e multiplicado por 100.

As plantas GUS positivas foram analisadas pela reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando-se "primers" específicos para detecção do gene e das seqüências do DNA em estudo, e por Southern Blot, utilizando-se sondas marcadoras para detecção dos genes.

Para as reações de PCR, o DNA de plântulas microenxertadas, cultivadas *in vitro*, ou de plantas aclimatizadas em casa de vegetação, foi extraído pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com a maceração de fragmentos de folhas diretamente no tampão de extração para confirmar a integração dos genes CP-CTV, dsCP-CTV e da seqüência conservada do CTV (CTVcons). A amplificação foi realizada utilizando-se 3 µL de DNA (50-100 ng), 0,2 µL dNTPs (10 mM), 0,6 µL MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de tampão (10x), 0,3 µL Taq polimerase (5 U/µL) e 0,3 µL dos primers (10µM) para detecção do gene da capa protéica do CTV (5'-GGG CCC ATG GAC GAC GAR ACA AAG-3' e 5'-CTC GAG TCA ACG TGT GTT RAA TTT CC-3'), amplificando um fragmento de 684 pb, e para detecção da seqüência conservada do CTV (5'-AGA ACG AGG TGG CGC ATA-3' e 5'-CTT TGG TTC ACG CAT ACG TT-3'), amplificando um fragmento de 559 pb. As reações foram submetidas ao termociclador (PTC-100tm, MJ Research, Inc.) nas seguintes condições: 39 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C e 40 segundos a 72 °C mais uma extensão final a 72 °C por 5 minutos para o gene da capa protéica do CTV e, 39 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C mais uma extensão final a 72 °C por 5 minutos para a seqüência conservada do CTV. Os produtos de amplificação, da reação em cadeia da polimerase, foram separados por eletroforese, utilizando-se gel de agarose 1%, tampão TBE (0,5 x), a uma voltagem de 60 V. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹) e posteriormente, visualizado e fotografado em luz UV.

A análise de Southern Blot foi realizada para confirmar a integração estável dos genes nas plantas transgênicas. O DNA total das plantas aclimatizadas foi extraído de folhas jovens pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) acrescentando-se uma lavagem com fenol e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para uma melhor purificação. Aproximadamente

20 µg de DNA foram digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI, para as três construções estudadas, e separados em gel de agarose 1% por eletroforese e transferidos para membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences).

As sondas para o gene da capa protéica do CTV e para a sequência conservada do CTV foram preparadas por PCR e os fragmentos amplificados de 684 e 559 pb, respectivamente, foram purificados e submetidos à marcação com fluoresceína com auxílio do kit “Gene ImagesTM Random Primer Labelling Module” (Amersham Biosciences). As hibridações foram realizadas a 60 °C e a detecção com CDP-StarTM (Amersham Biosciences).

O teste serológico de PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) foi realizado para verificar a expressão da proteína da capa protéica do CTV nas plantas transformadas com os genes da CP-CTV e dsCP-CTV. A absorbância foi mensurada a 405 nm. Como controle negativo, foi utilizado tecido juvenil de sementes de laranja azeda germinadas *in vitro*, livre do CTV, e como controle positivo, foi utilizado tecido de planta adulta de laranja ‘Hamlin’ pré-imunizada, ou seja, que possui uma estirpe fraca do CTV. A expressão da proteína da capa protéica do CTV foi considerada significativa quando os valores de absorbância medidos nas amostras foram superiores 2-3 vezes ao valor do controle negativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Organogênese *in vitro*

A otimização de protocolos de organogênese *in vitro* tem sido estudada para diferentes cultivares de citros com a variação de fatores que podem afetá-la, como por exemplo, intensidade de luz, diferentes meios de cultura e reguladores vegetais, bem como o material vegetal utilizado como fonte de explante. A suplementação do meio de cultura com citocinina, principalmente 6-benzilaminopurina (BAP), vem sendo considerada essencial para o desenvolvimento da organogênese *in vitro* em diferentes espécies cítricas (MOREIRA-DIAS et al., 2001; SILVA et al., 2005a, 2005b). Os resultados também têm demonstrado que a organogênese *in vitro* de citros tem sido obtida cultivando-se segmento de epicótilo ou segmento internodal em meios de cultura suplementados com BAP (MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002, 2003; SILVA et al., 2005a, 2005b) ou com a combinação BAP + ANA (ácido naftaleno acético) (BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; MOREIRA-DIAS et al., 2000, 2001; ALMEIDA et al., 2003).

4.1.1 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em diferentes regiões do epicótilo de cultivares de citros

Explantos foram coletados de diferentes regiões do epicótilo para avaliar a resposta à organogênese *in vitro* de cultivares de citros, na presença e ausência da citocinina BAP no meio de cultura. O maior número de explantes responsivos, isto é, com o desenvolvimento de gemas adventícias, foi obtido com a utilização da região basal do epicótilo para laranja ‘Natal’, citrange ‘Carrizo’ e laranja azeda, e com a utilização da região apical do epicótilo para o limão ‘Volkameriano’ (Tabela 1). Para laranja ‘Pêra’, não foi possível detectar diferenças quanto ao número de explantes responsivos entre as três regiões avaliadas.

A suplementação do meio de cultura com BAP se mostrou essencial para citrange ‘Carrizo’, em que a adição de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ do regulador vegetal proporcionou um aumento de 40 para 93% do número de explantes responsivos, independente da região avaliada. Para laranja azeda e laranjas ‘Natal’ e ‘Pêra’, a porcentagem de explantes responsivos foi maior quando os

explantes foram incubados em meio de cultura basal, não suplementado com regulador vegetal. Para limão ‘Volkameriano’ não foi possível detectar diferenças com relação à utilização ou não da citocinina.

Tabela 1 - Número de explantes com gemas adventícias/total de explantes (%) em diferentes regiões do epicótilo de cinco cultivares de citros (média de 5 repetições)

Cultivar	Região	Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)		
		0	1,0	Média
Laranja azeda	Apical	10,4/15 (69,3) NS	3,0/15 (20,0) NS	6,7/15 (44,7) b
	Mediano	11,6/15 (77,3)	6,8/15 (45,3)	9,2/15 (61,3) ab
	Basal	12,8/15 (85,3)	7,8/15 (52,0)	10,3/15 (68,7) a
	Média	11,6/15 (77,3) A	5,9/15 (39,1) B	
Limão ‘Volkameriano’	Apical	12,2/15 (81,3) NS	11,0/15 (73,3) NS	11,6/15 (77,3) a
	Mediano	9,6/15 (64,0)	11,8/15 (78,7)	10,7/15 (71,3) ab
	Basal	8,6/15 (57,3)	8,4/15 (56,0)	8,5/15 (56,7) b
	Média	10,1/15 (67,6) A	10,4/15 (69,3) A	
Laranja ‘Natal’	Apical	13,6/15 (90,7) a A	7,6/15 (50,7) b B	10,6/15 (70,7) b
	Mediano	13,0/15 (86,7) a A	9,8/15 (65,3) b B	11,4/15 (76,0) b
	Basal	14,8/15 (98,7) a A	14,0/15 (93,3) a A	14,4/15 (96,0) a
	Média	13,8/15 (92,0) A	10,5/15 (69,8) B	
Citrange ‘Carrizo’	Apical	2,0/10 (20,0) b B	8,6/10 (86,0) a A	5,3/10 (53,0) b
	Mediano	3,6/10 (36,0) b B	9,4/10 (94,0) a A	6,5/10 (65,0) b
	Basal	6,6/10 (66,0) a B	10/10 (100,0) a A	8,3/10 (83,0) a
	Média	4,1/10 (40,7) B	9,3/10 (93,3) A	
Laranja ‘Pêra’	Apical	8,6/12 (71,7) NS	4,6/12 (38,3) NS	6,6/12 (55,0) a
	Mediano	9,4/12 (78,3)	5,2/12 (43,8)	7,3/12 (61,0) a
	Basal	9,8/12 (81,7)	6,4/12 (53,3)	8,1/12 (67,5) a
	Média	9,3/12 (77,2) A	5,4/12 (45,1) B	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Com relação ao número de brotos desenvolvidos por explante, pode-se verificar que não houve influência da região do epicótilo utilizada (Tabela 2). Apenas para citrange ‘Carrizo’ ocorreu um desenvolvimento de um maior número de gemas adventícias nos explantes coletados na região basal. A suplementação do meio de cultura com BAP favoreceu o desenvolvimento de gemas adventícias, tendo-se obtido um maior número de gemas por explante para citrange

‘Carrizo’, limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Natal’. Para laranja azeda e laranja ‘Pêra’, não foi possível detectar diferenças em relação à adição ou não do BAP no meio de cultura.

Tabela 2 - Número total de gemas adventícias/total de explantes responsivos (média) de diferentes regiões do epicótilo de cinco cultivares de citros (média de 5 repetições)

Cultivar	Região	Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)		
		0	1,0	Média
Laranja azeda	Apical	65/52 (1,3) NS	23/15 (1,4) NS	88/67 (1,4) a
	Mediano	77/58 (1,3)	50/34 (1,5)	127/92 (1,4) a
	Basal	81/64 (1,2)	49/39 (1,3)	130/103 (1,3) a
	Média	223/174 (1,29) A	122/88 (1,39) A	
Limão ‘Volkameriano’	Apical	75/61 (1,2) NS	75/55 (1,4) NS	150/116 (1,3) a
	Mediano	54/48 (1,1)	96/59 (1,6)	150/107 (1,4) a
	Basal	46/43 (1,1)	71/42 (1,6)	117/85 (1,3) a
	Média	175/152 (1,1) B	242/156 (1,5) A	
Laranja ‘Natal’	Apical	74/68 (1,1) NS	50/38 (1,3) NS	124/106 (1,2) a
	Mediano	79/65 (1,2)	71/49 (1,4)	150/114 (1,3) a
	Basal	88/74 (1,2)	105/70 (1,5)	193/144 (1,3) a
	Média	241/207 (1,16) B	226/157 (1,42) A	
Citrange ‘Carrizo’	Apical	10/10 (1,0) a B	112/43 (2,6) b A	122/53 (1,8) b
	Mediano	18/18 (1,0) a B	140/47 (3,0) b A	158/65 (2,0) b
	Basal	34/33 (1,0) a B	199/50 (4,0) a A	233/83 (2,5) a
	Média	62/61 (1,0) B	451/140 (3,2) A	
Laranja ‘Pêra’	Apical	56/43 (1,3) ab A	34/23 (1,3) a A	90/66 (1,3) a
	Mediano	61/49 (1,2) b A	35/26 (1,3) a A	96/75 (1,3) a
	Basal	78/49 (1,6) a A	40/32 (1,2) a B	118/81 (1,4) a
	Média	195/141 (1,4) A	102/76 (1,3) A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Houve efeito da interação BAP x regiões do epicótilo para laranja ‘Natal’, sendo que a presença do regulador vegetal aumentou o número de explantes responsivos na região basal do epicótilo. Para citrange ‘Carrizo’, a região basal diferiu das demais apenas na ausência do regulador vegetal. Entretanto, a adição de BAP parece ser fundamental para a regeneração desse cultivar. Quanto ao número de gemas adventícias por explante, verificou-se uma interação BAP x regiões do epicótilo para citrange ‘Carrizo’ e laranja ‘Pêra’, sendo que a região basal do epicótilo diferiu das demais, regenerando um maior número de gemas adventícias. Para a laranja ‘Pêra’,

esse resultado foi observado na ausência do regulador vegetal, entretanto, para citrange ‘Carrizo’ a presença do BAP aumentou o número de gemas adventícias por explante.

Embora o uso dos reguladores vegetais estimulem a organogênese, nem sempre a suplementação do meio de cultura pode ser considerada essencial, conforme foi demonstrado para laranjas ‘Natal’ e ‘Pêra’ e para laranja azeda neste trabalho. Almeida et al. (2002) não detectaram diferenças na suplementação do meio de cultura com concentrações de 0-2,5 mg.L⁻¹ BAP para laranjas ‘Natal’, ‘Valência’, ‘Hamlin’ e para limão ‘Cravo’. Um efeito significativo do uso de reguladores vegetais na organogênese *in vitro* de citros tem sido mais relacionado com o número de gemas adventícias por explante (Silva et al., 2005b) como também verificado neste trabalho para laranja ‘Natal’, limão ‘Volkameriano’ e citrange ‘Carrizo’. Estas variações nos resultados com relação ao uso ou não de citocinina devem estar relacionadas à concentração interna de auxinas e citocininas no tecido dos explantes.

As concentrações internas de hormônios vegetais também podem variar em função da região do epicótilo onde o explante foi coletado. Moreira-Dias et al. (2001) relataram que independente do meio de cultura e das condições de incubação, a organogênese diminui em função da distância do nó cotiledonar, ou seja, quanto mais distante do nó cotiledonar menor a frequência de desenvolvimento de gemas adventícias. Resultados semelhantes também foram verificados neste trabalho para laranja ‘Natal’, citrange ‘Carrizo’ e laranja azeda, onde a região basal do epicótilo respondeu melhor à organogênese. Porém, alguns trabalhos demonstraram que quanto mais distante do nó cotiledonar for a coleta dos explantes, maior a frequência de desenvolvimento de gemas adventícias (COSTA et al., 2004; SILVA et al., 2005a, 2005b), conforme demonstrado para limão ‘Volkameriano’ neste trabalho.

Estes resultados divergentes encontrados na literatura e no presente estudo no que diz respeito aos padrões de resposta organogênica ao longo do eixo de epicótilo de citros, podem ser atribuídos também, a fatores relacionados ao material vegetal, como o genótipo e a idade do explante; à composição do meio de cultura, como concentrações e tipos de reguladores vegetais; e às condições de incubação, como orientação do explante e regime de luminosidade, conforme demonstrado por Costa et al. (2004).

4.1.2 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de citros em função de concentrações de BAP

No presente experimento foi estudado o efeito de diferentes concentrações de BAP na organogênese *in vitro* de cultivares de citros. A maior porcentagem de explantes responsivos, com o desenvolvimento de gemas adventícias, foi obtida na ausência do regulador vegetal para limão ‘Cravo’, limão ‘Volkameriano’ e laranja azeda. O BAP apresentou um efeito negativo na organogênese *in vitro* de laranja azeda, diminuindo drasticamente a porcentagem de explantes que desenvolveram gemas adventícias (Tabela 3). Almeida et al. (2002) também não detectaram diferenças na suplementação do meio de cultura com concentrações de 0-2,5 mg.L⁻¹ de BAP para os cultivares de laranja ‘Natal’, ‘Valência’, ‘Hamlin’ e para limão ‘Cravo’. Entretanto, no presente trabalho, a suplementação do meio de cultura com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP proporcionou maior porcentagem de regeneração de gemas adventícias para a laranja ‘Natal’ (Tabela 3). Silva et al. (2005a) relatam um efeito positivo do BAP na indução de gemas adventícias em laranja ‘Pêra’ quando utilizaram 3,0 mg.L⁻¹ daquele regulador vegetal e segmentos de epicótilo de 0,25 cm de comprimento como fonte de explante.

Tabela 3 - Porcentagem de explantes responsivos de quatro cultivares de citros em função de concentrações de BAP

Cultivares	Concentrações de BAP (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Laranja ‘Natal’	56,70 ab A	43,36 ab AB	33,32 b A	64,55 a A	60,00 ab A
Limão ‘Cravo’	66,68 a A	33,94 b BC	35,60 b A	55,43 ab A	61,70 ab A
Limão ‘Volkameriano’	66,66 a A	66,66 a A	38,34 b A	27,10 b B	18,00 b B
Laranja azeda	60,00 a A	8,33 b C	0,00 b B	1,66 b B	3,32 b B

Médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e maiúscula (na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Sem a suplementação do regulador vegetal no meio de cultura, o limão ‘Cravo’ apresentou menor número de gemas adventícias regeneradas por explante, apesar de ter apresentado maior porcentagem de explantes responsivos, no entanto, não diferiu das demais concentrações em estudo. A laranja azeda apresentou maior número de gemas por explante na ausência do BAP, e foi o cultivar que apresentou menores quantidades de gemas regeneradas nas

demais concentrações de BAP estudadas. A laranja ‘Natal’ apresentou um maior número de gemas adventícias regeneradas por explante quando se utilizou doses mais elevadas do regulador vegetal (1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) diferindo das doses mais baixas (0 e 0,5 mg.L⁻¹). Para o limão ‘Volkameriano’, concentrações entre 0,5 e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP estimularam a regeneração de um maior número de gemas por explante e a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP apresentou um efeito negativo, tanto para o número de gemas regeneradas quanto para a porcentagem de explantes responsivos (Tabela 4). O efeito do BAP na organogênese *in vitro* de citros parece estar mais correlacionando com o número de gemas adventícias desenvolvidas por explante do que com a porcentagem de explantes responsivos, como verificado para laranja ‘Natal’, limão ‘Cravo’ e limão ‘Volkameriano’.

Tabela 4 - Número de gemas adventícias regeneradas por explante (média de 5 repetições) de quatro cultivares de citros em função de concentrações de BAP

Cultivares	Concentrações de BAP (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Laranja Natal	42 (1,2) c A	47 (1,8) bc AB	31 (2,0) bc A	106 (2,8) ab A	119 (3,2) a A
Limão Cravo	51 (1,3) a A	51 (1,7) a B	39 (1,9) a A	71 (2,4) a A	83 (2,3) a A
Limão Volk.	44 (1,1) b A	116 (2,9) a A	70 (2,9) a A	32 (2,0) ab A	10 (0,8) b B
Laranja azeda	50 (1,4) a A	6 (1,0) ab B	0 (0,0) b B	1 (0,2) b B	3 (0,6) ab B

Médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e maiúscula (na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Em resultados de trabalhos sobre organogênese *in vitro* de diversos cultivares de citros, a suplementação do meio de cultura com concentrações mais baixas de BAP promovem um efeito positivo na regeneração *in vitro* de gemas adventícias, e doses mais elevadas do regulador vegetal podem ter efeito tóxico aos explantes, reduzindo a regeneração de gemas (COSTA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997; MAGGON; SINGH, 1995), como constatado para o limão ‘Volkameriano’ neste trabalho.

Em síntese, a partir dos resultados apresentados no presente trabalho, pode-se dizer que doses mais altas da citocinina BAP (1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) favoreceram o desenvolvimento de um maior número de gemas adventícias em explantes de segmentos de epicótilo de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Natal’, enquanto que, doses mais baixas (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) promoveram um maior número de gemas adventícias em limão ‘Volkameriano’. Na ausência do BAP, não houve

diferenças entre os cultivares estudados. Essas diferentes respostas de genótipos de citros com relação ao requerimento de reguladores vegetais para o sucesso da organogênese *in vitro* são encontradas na literatura podendo ser influenciada por condições de incubação e a fatores relacionados ao material vegetal (BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; MOREIRA-DIAS et al., 2000; COSTA et al., 2004), sendo necessário o desenvolvimento de protocolos específicos de regeneração *in vitro*, para se obter sucesso em experimentos de transformação genética.

4.1.3 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda em função de concentrações de BAP

A indução de gemas adventícias ocorreu de forma eficiente nos segmentos internodais de limão ‘Cravo’ e laranja azeda e a melhor resposta quanto à porcentagem de explantes responsivos ocorreu quando se utilizou $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP adicionadas ao meio de cultura para os dois cultivares, entretanto, o limão ‘Cravo’ diferiu da laranja azeda, com 82% de explantes responsivos contra 49%, respectivamente. (Tabela 5 e Figura 3). Moura et al. (2001) verificaram que a concentração de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP foi aquela que promoveu o maior percentual de explantes responsivos (62,5%) para limão ‘Cravo’, entretanto, os autores utilizaram segmentos internodais de plântulas germinadas *in vitro*. Ghorbel; Navarro e Duran-Vila (1998) obtiveram melhores resultados na regeneração *in vitro* de pomelo, laranja azeda e *Citrus macrophylla*, de plantas cultivados em casa de vegetação, quando utilizaram $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP no meio de cultura. Cervera et al. (1998b) obtiveram a regeneração *in vitro* de tecidos maduros e tecidos juvenis de plantas de laranja doce mantidas em casa de vegetação utilizando-se $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Entretanto, os autores observaram maiores frequências de regeneração em ramos juvenis (53%). Peña et al. (1997) conduzindo experimentos para determinar a eficácia de incubação de explantes de segmentos internodais de lima ácida, obtiveram melhores resultados quando os explantes foram cultivados em meio de cultura MS, suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, e mantidos por 15 dias no escuro e então transferidos para condições de luminosidade, sendo que 41,9% dos explantes foram responsivos.

Tabela 5 - Porcentagem de explantes responsivos de limão 'Cravo' e laranja azeda em função de concentrações de BAP

Cultivares	Concentrações de BAP (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1,0	2,0	4,0
Limão 'Cravo'	52,0 ab A	36,6 b A	62,0 ab A	82,0 a A	54,0 ab A
Laranja azeda	0,0 c B	40,0 ab A	38,0 ab B	48,8 a B	10,0 bc B

Médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e maiúscula (na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

A concentração de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP reduziu a organogênese de laranja azeda, sendo que apenas 10% dos explantes regeneraram gemas adventícias e alguns oxidaram (Figura 3). Quando não se utilizou o regulador vegetal, não houve resposta organogênica para a laranja azeda e a maioria dos explantes oxidaram, e aqueles que se mantiveram vivos apresentaram apenas uma ligeira formação de calo em suas extremidades. Resultados semelhantes também foram obtidos por Ghorbel; Navarro e Duran-Vila (1998), onde a regeneração de gemas adventícias foi nula na concentração de 10,0 mg.L⁻¹ e na ausência de BAP, mostrando que a citocinina BAP pode ser essencial na organogênese *in vitro* de citros, mas que concentrações muito elevadas do regulador pode resultar em um efeito inibitório na regeneração de gemas adventícias, dependendo do cultivar de citros estudado e também do tipo de explante utilizado.

Quanto ao número de gemas adventícias regeneradas por explante de laranja azeda, não houve diferenças entre as concentrações de BAP estudadas (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹), no entanto, na ausência do regulador vegetal, não ocorreu o desenvolvimento de gemas adventícias. Para o limão 'Cravo', 4,0 mg.L⁻¹ de BAP proporcionou pouco mais de dois brotos regenerados por explante, diferindo apenas da concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, com cerca de um broto regenerado por explante (Tabela 6). Os explantes de limão 'Cravo' apresentaram grande formação de calo nas extremidades quando se utilizou 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, e nessa concentração também houve alguns explantes que apresentaram rachaduras longitudinais (Figura 3). Ghorbel; Navarro e Duran-Vila (1998) obtiveram um maior número de gemas por explante quando utilizaram 1,0 mg.L⁻¹ de BAP em pomelo e *Citrus macrophylla* e 3,0 mg.L⁻¹ de BAP para a laranja azeda.

Figura 3 - Indução de gemas adventícias no cultivo *in vitro* de segmentos internodais de laranja azeda e limão 'Cravo' coletados de plantas mantidas em casa de vegetação. **a.** Segmentos internodais de limão 'Cravo' cultivados em meio MT suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, apresentando grande regeneração de brotos adventícios; **b.** Detalhe de um explante de limão 'Cravo' cultivado em meio MT suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, apresentando desenvolvimento normal de um broto adventício. **c.** Segmentos internodais de laranja azeda cultivados em meio MT suplementado com $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, apresentando um efeito negativo para organogênese; **d.** Explantes de limão 'Cravo' cultivados em meio MT suplementado com $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, apresentando grande formação de calo nas extremidades e rachaduras longitudinais

Tabela 6 - Número de gemas adventícias regeneradas por explante (média de 5 repetições) de limão 'Cravo' e laranja azeda em função de concentrações de BAP

Cultivares	Concentrações de BAP (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1,0	2,0	4,0
Limão 'Cravo'	35 (1,3) ab A	21 (1,2) b A	43 (1,4) ab A	76 (1,9) ab A	57 (2,1) a A
Laranja azeda	0 (0,0) b B	30 (1,4) a A	24 (1,2) a A	36 (1,6) a A	10 (1,2) a B

Médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) e maiúscula (na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

4.1.4 Regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos internodais de laranja azeda em função da combinação citocinina:auxina

Algumas combinações entre os reguladores vegetais BAP e ANA foram avaliadas em relação à indução da organogênese de laranja azeda. A maior porcentagem de explantes responsivos foi obtida adicionando-se 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,3 mg.L⁻¹ de ANA ao meio de cultura MT, onde 52% dos explantes de laranja azeda regeneraram gemas adventícias, diferindo apenas das concentrações de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,3 mg.L⁻¹ de ANA (Tabela 7). Na ausência do BAP, não houve resposta organogênica e os explantes oxidaram e morreram (Figura 4). Quanto ao número de brotos regenerados por explante, não houve diferenças entre os tratamentos em que se utilizou a citocinina.

Quando se utilizou o meio de cultura DBA3, não houve diferenças entre os tratamentos em que se adicionou o BAP, entretanto a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA proporcionou cerca de 63% de explantes que regeneraram gemas adventícias. Para os tratamentos em que a citocinina estava ausente, persistiram os resultados anteriores, não havendo resposta organogênica (Figura 4). Nos tratamentos em que se adicionou o BAP na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ houve uma melhor resposta quanto ao número de brotos por explante (Tabela 7). Almeida et al. (2003) obtiveram melhores resultados na organogênese *in vitro* de segmentos internodais de tecidos maduros de quatro cultivares de laranja doce quando utilizaram 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA adicionados ao meio DBA3. Os autores também relataram que todos os cultivares responderam similarmente em termos de número de explantes com gemas, qualidade das gemas e número de gemas por explante, mas evidenciaram que a laranja 'Hamlin' apresentou um alto potencial morfogênico, sugerindo a influência do genótipo no processo de regeneração *in vitro* de tecidos maduros de citros.

Tabela 7 - Porcentagem de explantes responsivos e no número de gemas adventícias regeneradas por explante de laranja azeda em função da combinação citocinina:auxina adicionada em dois meios de cultura (MT e DBA3)

Concentrações BAP + ANA (mg.L ⁻¹)	Explantes responsivos (%)		Número de gemas/explante	
	MT	DBA3	MT	DBA3
0 + 0	0,00 c	0,00 b	0 (0,0) b	0 (0,0) c
0 + 0,3	0,00 c	0,00 b	0 (0,0) b	0 (0,0) c
0 + 0,5	0,00 c	0,00 b	0 (0,0) b	0 (0,0) c
1 + 0	17,58 bc	37,50 a	12 (1,0) a	34 (1,3) b
1 + 0,3	14,91 bc	39,92 a	10 (1,1) a	36 (1,2) b
1 + 0,5	36,35 ab	45,26 a	39 (1,5) a	37 (1,3) b
2 + 0	21,03 abc	42,10 a	16 (1,3) a	50 (1,7) ab
2 + 0,3	51,89 a	31,96 ab	44 (1,6) a	33 (1,8) ab
2 + 0,5	37,08 ab	62,98 a	28 (1,6) a	77 (2,2) a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Figura 4 - Indução de gemas adventícias no cultivo *in vitro* de segmentos internodais de plantas de laranja azeda mantidas em casa de vegetação. À esquerda, segmentos internodais cultivados em meio DBA3 sem regulador de crescimento, apresentando oxidação e morte dos tecidos; À direita, segmentos internodais cultivados em meio DBA3 suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, apresentando um efeito positivo para organogênese

Os dois meios de cultura testados se mostraram adequados para a regeneração *in vitro* de laranja azeda, entretanto, a presença da citocinina (BAP) foi fundamental no desenvolvimento de gemas adventícias. A suplementação de combinações de citocinina (BAP) com baixos níveis de auxina (ANA) nos meios de cultura, tem estimulado a regeneração de gemas adventícias em lima ácida ‘Galego’ e tangerina ‘Mônica’ (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997), em citrange ‘Troyer’ (MOREIRA-DIAS et al., 2000) e em laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ (ALMEIDA et al., 2003), como verificado neste trabalho para a laranja azeda.

4.2 Transformação genética

Foi possível regenerar plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Hamlin’ contendo o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (CP-CTV) pelo protocolo de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando-se segmentos de epicótilo de plântulas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Hamlin’ germinadas *in vitro* e segmentos internodais provenientes de plantas de limão ‘Cravo’ mantidas em casa de vegetação como fonte de explante (Figura 5).

Oito gemas GUS-positivas de limão ‘Cravo’ contendo o gene CP-CTV foram regeneradas, sendo que seis foram provenientes de segmentos de epicótilo e duas de segmento internodal, totalizando quatro plantas de limão ‘Cravo’ microenxertadas e aclimatizadas em casa de vegetação (Tabela 8). Para laranja ‘Hamlin’, sete gemas adventícias mostraram-se GUS-positivas e apenas uma planta contendo o gene CP-CTV foi aclimatizada (Tabela 9).

A inserção do gene CP-CTV no genoma das plantas de limão ‘Cravo’ (Figura 6a) e laranja ‘Hamlin’ (Figura 6b) supostamente transformadas foi confirmada pelo teste histoquímico de GUS e pela análise da PCR, amplificando um fragmento de 684pb, correspondente à sequência introduzida. O DNA das plantas foi digerido pela enzima de restrição *Bam*HI e hibridizado com sonda específica, pela técnica de Southern Blot, confirmando a transformação com um evento de inserção do gene da capa protéica do CTV no genoma das plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ (Figura 7).

Figura 5 - Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*. **a.** Plântulas germinadas *in vitro*, em ausência de luz para estiolamento do epicótilo (esquerda), e plântula, após período de 15 dias em fotoperíodo de 16 h de luz (direita); **b.** Segmentos de epicótilo (0,8-1,0 cm) utilizados como fonte de explante; **c.** Segmentos internodais (0,8-1,0 cm) utilizados como fonte de explante **d.** Inoculação dos segmentos de epicótilo com *Agrobacterium tumefaciens*; **e.** Plaqueamento dos explantes em meio de cultura para co-cultivo; **f.** Regeneração de gemas adventícias em meio de cultura de seleção; **g.** Teste histoquímico de GUS em segmento de folha de gema adventícia desenvolvida; **h.** Gema adventícia GUS+ microenxertada *in vitro*; **i.** Aclimatização das plântulas desenvolvidas; **j.** Planta aclimatizada; **k.** Planta em casa de vegetação

Tabela 8 - Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de limão 'Cravo', total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas, contendo o gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP)

Experimentos*	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
1	9/100	0	0	0
2	0/100	0	0	0
3	52/200	0	0	0
4	12/100	0	0	0
5	17/200	3	1,5	2
6	24/200	0	0	0
7	8/200	0	0	0
8	23/200	2	1,0	0
9	2/100	0	0	0
10	5/100	0	0	0
11	0/100	0	0	0
12	0/100	0	0	0
13	1/100	0	0	0
14	0/100	0	0	0
15	6/200	0	0	0
16	1/60	0	0	0
17	10/200	0	0	0
18	0/160	0	0	0
19	0/200	0	0	0
20	2/140	0	0	0
21	4/200	0	0	0
22	0/140	0	0	0
23	1/360	0	0	0
24	5/300	1	0,33	1
25	42/500	1	0,2	0
26	36/300	0	0	0
27	44/300	0	0	0
28	11/300	0	0	0
29	13/300	0	0	0
30	35/380	1	0,26	1
31	9/180	0	0	0
TOTAL	372/6120	8	0,13	4

*Experimentos 1-24 utilizou-se segmentos de epicótilo e experimentos 25-31 utilizou-se segmentos internodais, como fonte de explante

Com a construção gênica pCTV-dsCP, que contém repetições invertidas do gene da capa protéica do CTV, transformou-se geneticamente apenas a laranja ‘Hamlin’, utilizando-se segmentos de epicótilo como fonte de explante. Dez gemas GUS-positivas foram regeneradas e três plantas foram aclimatizadas (Tabela 9).

A inserção do gene dsCP-CTV no genoma das plantas de laranja ‘Hamlin’ supostamente transformadas foi confirmada pelo teste histoquímico de GUS e pela análise da PCR (Figura 8a), mostrando a amplificação de um fragmento de 684pb, correspondente à sequência introduzida. O DNA das plantas foi digerido pela enzima de restrição *Bam*HI e hibridizado com sonda específica, pela técnica de Southern Blot (Figura 8b), confirmando a transformação com um evento de inserção do gene da capa protéica do CTV.

Tabela 9 - Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja ‘Hamlin’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo sequências gênicas do CTV

Construção gênica		Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
pCTV-CP	Exp.1	22/560	5	0,89	0
	Exp.2	16/560	2	0,36	1
	Exp.3	0/390	0	0	0
	Exp.4	41/250	0	0	0
pCTV-dsCP	Exp.1	29/560	5	0,89	0
	Exp.2	20/560	0	0	0
	Exp.3	22/800	0	0	0
	Exp.4	34/300	0	0	0
	Exp.5	149/500	1	0,20	0
	Exp.6	13/300	1	0,20	0
	Exp.7	37/300	3	1,00	3
	Exp.8	0/390	0	0	0
	Exp.9	86/500	0	0	0
	Exp.10	26/250	0	0	0
pCTVcons	Exp.1	0/600	0	0	0
	Exp.2	102/600	8	1,33	2
	Exp.3	96/500	2	0,4	1
	Exp.4	76/300	6	2,0	1
	Exp.5	24/300	3	1,0	1
	Exp.6	51/300	3	1,0	0

Figura 6 - Análise da PCR das plantas transgênicas de limão 'Cravo' e de laranja 'Hamlin' contendo o gene da capa protéica do CTV (CP-CTV). **a.** Limão 'Cravo'. M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle negativo (DNA de planta não transgênica); 2 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201); 3-6 = plantas aclimatizadas. **b.** 'Hamlin'. M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle negativo (DNA de planta não transgênica); 2 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201); 3 = planta aclimatizada

Figura 7 - Análise de Southern Blot em plantas de limão 'Cravo': 1 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201), contendo o gene CP-CTV, digerido com a enzima *Bam*HI); 2 = controle negativo (DNA de planta de limão 'Cravo' não transgênica); 3 e 4 = DNA de duas plantas de limão 'Cravo' (DNA digerido com a enzima *Bam*HI)

Figura 8 - Análise da PCR e de Southern Blot de plantas de laranja 'Hamlin' regeneradas após transformação genética com a construção gênica pCTV-dsCP. **a.** PCR do DNA das plantas GUS positivas: M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle negativo (DNA de planta não transformada); 2 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201); 3-5 = plantas de laranja 'Hamlin' aclimatizadas; **b.** Southern Blot: 1 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201, contendo o gene CP-CTV, digerido com a enzima *Bam*HI); 2 = controle negativo (DNA de planta de laranja 'Hamlin' não transgênica); 3 = DNA de uma planta de laranja 'Hamlin' (DNA digerido com a enzima *Bam*HI)

O teste serológico de PTA-ELISA confirmou a expressão do gene da capa protéica do CTV em duas plantas de limão 'Cravo' transformadas com o gene da CP-CTV, indicadas na Figura 9 como LC1 (CP) e LC3 (CP). Níveis variáveis da expressão da capa protéica foram encontrados entre as plantas transgênicas analisadas, sendo que em algumas não foi possível detectá-la. Domínguez et al. (2000) também detectaram níveis variáveis da expressão da capa protéica em plantas transgênicas de lima ácida 'Galego' pelo teste de DAS-ELISA, que corresponderam aos níveis obtidos pela análise de Western Blot, entretanto, os resultados não se correlacionaram com o número de cópias e com os padrões de integração do transgene obtidos por análise de Southern Blot.

Não foi possível detectar a expressão da proteína da capa protéica do CTV, pelo teste PTA-ELISA, nas três plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' contendo o gene dsCP-CTV. Provavelmente, possa estar ocorrendo o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) nessas plantas, devido à construção gênica, que possui repetições invertidas do gene da CP-CTV interligadas por um intron, que irá formar RNA fita dupla (dsRNA), levando ao desencadeamento

do silenciamento gênico pela degradação desses dsRNA. Alguns estudos têm demonstrado que construções gênicas, onde repetições invertidas (sense e antisense) de um gene interligadas por um intron, formariam os hpRNAs (RNA hairpin) por complementariedade, e que a presença do intron auxiliaria na hibridização do RNA, promovendo a formação do dsRNA, silenciando de 90-100% de plantas transformadas com determinado gene (SMITH et al., 2000; WESLEY et al., 2001). Segundo Cerutti (2003) um complexo de RNases específicas para esses dsRNAs, conhecidas como Complexo DICER ou RNases tipo III, são responsáveis pela degradação dessas moléculas e, em consequência, levariam ao PTGS, tornando a planta resistente a determinado vírus.

Figura 9 - Teste serológico de PTA-ELISA das plantas transgênicas de limão 'Cravo' (LC) e de laranja 'Hamlin' (H) contendo os genes da CP-CTV e dsCP-CTV e das plantas controles (C), negativo (-) e positivo (+). As barras indicam a absorbância da média de duas amostras (405 nm)

Não foi possível obter plantas transformadas geneticamente com o gene da capa protéica do CTV (CP-CTV), de laranja azeda (Tabela 10), utilizando-se segmentos de epicótilo e internodais, e das laranjas ‘Natal’ (Tabela 11) e ‘Pêra’ (Tabela 12), utilizando-se segmentos de epicótilo. Houve a regeneração de apenas quatro gemas adventícias de laranja azeda em 2380 explantes, uma gema em 300 explantes de laranja ‘Natal’ e 29 gemas em 500 explantes de laranja ‘Pêra’ inoculados com *Agrobacterium* e introduzidos em meio de cultura, entretanto todas se mostraram GUS negativas.

Tabela 10- Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de laranja azeda, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo o gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP)

Experimentos*	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
1	0/100	0	0	0
2	0/240	0	0	0
3	0/100	0	0	0
4	0/100	0	0	0
5	0/100	0	0	0
6	0/200	0	0	0
7	0/160	0	0	0
8	2/300	0	0	0
9	0/300	0	0	0
10	0/120	0	0	0
11	2/360	0	0	0
12	0/300	0	0	0
TOTAL	4/2380	0	0	0

*Experimentos 1-9 utilizou-se segmentos de epicótilo e experimentos 10-12 utilizou-se segmentos internodais, como fonte de explante

Tabela 11- Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja ‘Natal’, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo gene da capa protéica do CTV

Construção gênica	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
pCTV-CP	1/300	0	0	0
pCTV-dsCP	2/300	0	0	0

Tabela 12 - Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja 'Pêra', total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo o gene da capa protéica do CTV

Construção gênica		Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
pCTV-CP	Exp.1	13/250	0	0	0
	Exp.2	16/250	0	0	0
pCTV-dsCP	Exp.1	16/250	0	0	0
	Exp.2	20/250	0	0	0

Com a construção pCTV-dsCP não foi possível regenerar plantas transgênicas de limão 'Cravo' (Tabela 13), laranja azeda (Tabela 14), laranja 'Natal' (Tabela 11), laranja 'Pêra' (Tabela 12) e laranja 'Valência' (Tabela 15). Houve a regeneração de 654 gemas adventícias de limão 'Cravo' em 12710 explantes e 22 gemas de laranja azeda em 3220 explantes inoculados com *Agrobacterium* e introduzidos em meio de cultura, somando-se experimentos realizados com segmentos de epicótilo e segmento internodal como fonte de explante para os dois cultivares, e todas as gemas foram escapes. Regeneraram-se duas gemas adventícias de laranja 'Natal' em 300 segmentos de epicótilo, 36 gemas de laranja 'Pêra' em 500 segmentos de epicótilo e 109 gemas de laranja 'Valência' em 1300 segmentos de epicótilo inoculados com *Agrobacterium* e introduzidos em meio de cultura, entretanto, todas essas gemas desenvolvidas foram GUS-negativas. Gutiérrez; Luth e Moore (1997) estudando fatores que poderiam afetar a transformação genética de citros com o gene da capa protéica CTV, também observaram grande quantidade de gemas escapes de laranja azeda e laranja 'Pineapple', entretanto, conseguiram 2,4% e 2,0% de eficiência de transformação para os dois cultivares, respectivamente.

Tabela 13 - Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de limão 'Cravo', total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo repetições invertidas do gene da capa protéica do CTV (pCTV-dsCP)

Experimentos*	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
1	14/100	0	0	0
2	29/200	0	0	0
3	3/200	0	0	0
4	4/200	0	0	0
5	10/200	0	0	0
6	26/200	0	0	0
7	5/400	0	0	0
8	0/400	0	0	0
9	4/200	0	0	0
10	3/200	0	0	0
11	4/340	0	0	0
12	4/490	0	0	0
13	11/300	0	0	0
14	16/600	0	0	0
15	5/600	0	0	0
16	0/600	0	0	0
17	15/300	0	0	0
18	0/540	0	0	0
19	0/300	0	0	0
20	9/480	0	0	0
21	48/400	0	0	0
22	16/260	0	0	0
23	35/300	0	0	0
24	20/300	0	0	0
25	3/320	0	0	0
26	57/300	0	0	0
27	6/360	0	0	0
28	20/300	0	0	0
29	4/280	0	0	0
30	14/300	0	0	0
31	9/300	0	0	0
32	20/300	0	0	0
33	20/280	0	0	0
34	43/520	0	0	0
35	20/560	0	0	0
36	12/160	0	0	0
37	15/200	0	0	0
38	130/420	0	0	0
TOTAL	654/12710	0	0	0

*Experimentos 1-20 utilizou-se segmentos de epicótilo e experimentos 30-38 utilizou-se segmentos internodais, como fonte de explante

Tabela 14 - Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de laranja azeda, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo repetições invertidas do gene da capa protetora do CTV (pCTV-dsCP)

Experimentos*	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
1	0/100	0	0	0
2	0/240	0	0	0
3	1/100	0	0	0
4	0/100	0	0	0
5	0/100	0	0	0
6	0/100	0	0	0
7	1/300	0	0	0
8	0/300	0	0	0
9	0/300	0	0	0
10	5/360	0	0	0
11	0/280	0	0	0
12	4/80	0	0	0
13	2/240	0	0	0
14	9/310	0	0	0
15	0/310	0	0	0
TOTAL	22/3220	0	0	0

*Experimentos 1-9 utilizou-se segmentos de epicótilo e experimentos 10-15 utilizou-se segmentos internodais, como fonte de explante

Tabela 15 - Número de gemas adventícias regeneradas em segmentos de epicótilo de laranja 'Valência', total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo seqüências gênicas do CTV

Construção gênica		Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
pCTV-dsCP	Exp.1	30/300	0	0	0
	Exp.2	0/300	0	0	0
	Exp.3	26/300	0	0	0
	Exp.4	53/400	0	0	0
pCTVcons	Exp.1	41/300	4	1,33	0
	Exp.2	16/300	2	0,67	0

Com a sequência conservada antisense do CTV (CTVcons), transformou-se geneticamente laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’, utilizando-se segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* como fonte de explante, e limão ‘Cravo’, utilizando-se segmentos internodais de ramos juvenis de plantas mantidas em casa de vegetação. Foram regeneradas 22 gemas GUS-positivas de laranja ‘Hamlin’ e cinco plantas foram aclimatizadas (Tabela 9). Seis gemas GUS-positivas de laranja ‘Valência’ foram obtidas (Tabela 15), entretanto, essas gemas não se desenvolveram adequadamente até atingirem um ponto ideal para microenxertia. Três gemas GUS-positivas de limão ‘Cravo’ foram regeneradas (Tabela 16) e uma planta foi aclimatizada e está sendo mantida em casa de vegetação.

A inserção da sequência conservada do CTV no genoma das plantas de laranja ‘Hamlin’ (Figura 10) e limão ‘Cravo’ (Figura 11a) supostamente transformadas, foi confirmada pelo teste histoquímico de GUS e pela análise da PCR, com a amplificação de um fragmento de 559 pb, correspondente à sequência introduzida. O DNA da planta de limão ‘Cravo’ foi digerido pela enzima de restrição *Bam*HI e hibridizado com sonda específica, pela técnica de Southern Blot (Figura 11b), confirmando a transformação com um evento de inserção da sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros (CTVcons) no genoma da planta transgênica de limão ‘Cravo’.

Não houve sucesso na regeneração de gemas adventícias geneticamente transformadas com a construção pCTVcons, em limão ‘Cravo’, utilizando-se segmentos de epicótilo como explante (Tabela 16), e em laranja azeda, utilizando-se segmentos de epicótilo e segmento internodal como explante (Tabela 17). Houve a regeneração de 16 gemas adventícias de limão ‘Cravo’ em 4250 segmentos de epicótilo inoculados com *Agrobacterium* e introduzidos em meio de cultura, e apenas quatro gemas de laranja azeda, entretanto, todas mostraram-se GUS-negativas.

Tabela 16 - Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de limão 'Cravo', total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo uma sequência conservada antisense do CTV (pCTVcons)

Experimentos*	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
1	6/750	0	0	0
2	0/400	0	0	0
3	6/600	0	0	0
4	0/600	0	0	0
5	0/300	0	0	0
6	0/600	0	0	0
7	0/300	0	0	0
8	4/300	0	0	0
9	0/400	0	0	0
10	72/380	3	0,79	1
11	16/260	0	0	0
12	5/220	0	0	0
13	5/320	0	0	0
14	24/280	0	0	0
15	19/300	0	0	0
16	27/300	0	0	0
TOTAL	184/6310	3	0,05	1

*Experimentos 1-9 utilizou-se segmentos de epicótilo e experimentos 10-16 utilizou-se segmentos internodais, como fonte de explante

Figura 10 - Análise da PCR das plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' contendo uma sequência conservada antisense do CTV (CTVcons). M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle negativo (DNA de planta não transformada); 2 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201); 3-7 = plantas de laranja 'Hamlin' aclimatizadas contendo a sequência conservada do CTV

Figura 11 - Análise da PCR e de Southern Blot de planta de limão 'Cravo' regenerada após transformação genética com a construção gênica pCTVcons. **a.** PCR do DNA das plantas GUS positivas: M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle negativo (DNA de planta não transformada); 2 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201); 3 = planta de limão 'Cravo' aclimatizada; **b.** Southern Blot: 1 = controle positivo (plasmídeo pCambia 2201 digerido com a enzima *Bam*HI); 2 = DNA de uma planta de limão 'Cravo' (DNA digerido com a enzima *Bam*HI); 3 = controle negativo (DNA de planta de limão 'Cravo' não transgênica)

Tabela 17- Número de gemas adventícias regeneradas pelo total de explantes introduzidos de laranja azeda, total de gemas GUS+, eficiência de transformação (%) e total de plantas transgênicas aclimatizadas contendo uma sequência conservada antisense do CTV (pCTVcons)

Experimentos*	Número de gemas/ Total de explantes	Gemas GUS +	Eficiência de transformação (%)	Total de plantas aclimatizadas
1	0/600	0	0	0
2	0/600	0	0	0
3	2/520	0	0	0
4	0/220	0	0	0
5	0/220	0	0	0
6	0/260	0	0	0
7	2/80	0	0	0
TOTAL	4/2500	0	0	0

*Experimentos 1-3 utilizou-se segmentos de epicótilo e experimentos 4-7 utilizou-se segmentos internodais, como fonte de explante

As plantas transgênicas obtidas pela transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, que passaram pelos processos de microenxertia e aclimatização, estão sendo mantidas em casa de vegetação autorizada ao cultivo de plantas geneticamente modificadas, e até o momento, apresentam bom desenvolvimento vegetativo, sem nenhuma alteração fenotípica. Na maioria dos trabalhos de transformação genética de citros, as alterações fenotípicas não são comuns, entretanto, plantas de lima ácida ‘Galego’ expressando constitutivamente o gene da proteína p23 da capa protéica do CTV, induziu a alterações fenotípicas que lembravam sintomas iniciais causados pelo CTV em plantas de lima ácida ‘Galego’ não transformadas, demonstrando que a proteína p23 pode estar envolvida no desenvolvimento de sintomas do CTV (GHORBEL et al., 2001).

A quantidade de gemas escapes, ou seja, gemas adventícias regeneradas, mas não transformadas, foi observada em alta frequência nos experimentos realizados, principalmente, em laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’ (segmento de epicótilo), e em limão ‘Cravo’ independente do explante utilizado (segmento de epicótilo ou segmento internodal). Em espécies cítricas, a regeneração de brotos escapes ou quiméricos em alta frequência é comum e tem sido reportada. Moore et al. (1992) relataram que 95% ou mais dos brotos regenerados de citrange ‘Carrizo’, citrumelo ‘Swingle’ e lima ácida ‘Galego’ foram escapes, quando utilizaram 100 µg/mL de canamicina. Peña et al. (1995a) transformando geneticamente laranja Pineapple obtiveram 92% de brotos escapes. Segundo Domínguez et al. (2004) essa alta frequência de brotos escapes poderia ser atribuída à proteção das células não-transformadas da ação do agente seletivo (canamicina) proporcionada pelas células transformadas que as circundam, e pela persistência da *Agrobacterium* no tecido do explante por um longo período após o co-cultivo, favorecendo, também, a formação de brotos quiméricos.

Nos últimos anos, um grande número de trabalhos foram realizados para estabelecer um sistema eficiente de transformação genética em espécies cítricas, entretanto, a frequência de regeneração de plantas transformadas tem sido muito baixa e algumas espécies de citros, importantes economicamente, apresentam-se recalcitrantes. No presente trabalho, houve uma variação na eficiência de transformação, dependendo do cultivar e da construção gênica em estudo. Nos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-CP, foi possível obter uma eficiência de transformação variando entre 0,2-1,5% e 0,36-0,89% para limão ‘Cravo’ e laranja ‘Hamlin’, respectivamente. Com a construção gênica pCTV-dsCP foi possível

obter plantas transgênicas apenas de laranja ‘Hamlin’ com uma eficiência de transformação que variou de 0,2-1,0%. A eficiência de transformação com a construção gênica pCTVcons variou de 0,67-1,33% e 0,4-2,0% para laranjas ‘Valência’ e ‘Hamlin’, respectivamente, sendo que apesar da regeneração de gemas GUS-positivas, não foi possível obter plantas aclimatizadas de laranja ‘Valência’. Para o limão ‘Cravo’, obtiveram-se gemas transformadas com a sequência conservada do CTV em um único experimento e a eficiência de transformação foi de 0,79%.

Esses resultados de eficiência de transformação obtidos no presente trabalho podem ser considerados baixo em relação aos resultados reportados em outros trabalhos. Há grande variação na eficiência de transformação genética entre as diferentes espécies cítricas, sendo encontrados valores de 2% (MOORE et al., 1992), 20,6% (PEÑA et al., 1995b) e até 80% (YU et al., 2002) para citrange ‘Carrizo’; 3,6 a 6,6% para laranja azeda, dependendo do vetor utilizado (GHORBEL, et al., 2000) e 1,2 a 2,4 para laranja azeda, na presença ou ausência do BAP no meio de cultura, respectivamente (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997); 6,7% para lima ácida ‘Galego’ (PEÑA et al., 1997) e 7,9% para laranja ‘Pineapple’ (PEÑA et al., 1995a). Bons resultados têm sido obtidos com as laranjas doce, a exemplo da laranja ‘Hamlin’, sendo obtidos índices de até 81,5% de eficiência de transformação (MENDES et al., 2002). Para limão ‘Cravo’, alguns resultados mostram baixa eficiência de transformação (ALMEIDA et al., 2003). Com isso, pode-se dizer que há uma forte relação entre a espécie ou cultivar e a eficiência de transformação genética de citros e também, que há necessidade de se estabelecer um sistema eficiente de transformação genética, seja este por métodos diretos ou indiretos, para cada cultivar de citros estudado.

A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* com o gene da capa protéica do CTV tem sido reportada nos últimos dez anos, utilizando-se diferentes tipos de explantes de alguns cultivares de citros. Gutiérrez; Luth e Moore (1997) obtiveram plantas transgênicas estabelecidas em casa de vegetação de citrange ‘Carrizo’, lima ácida ‘Galego’ e laranja azeda. Domínguez et al. (2000) conseguiram regenerar 42 plantas transgênicas de lima ácida ‘Galego’ com eficiência de 3,5%. Ghorbel et al. (2000) relataram uma eficiência de transformação de 3,6%, utilizando segmentos internodais de plantas de laranja azeda com quatro meses de idade mantidas em casa de vegetação. Febres et al. (2003) obtiveram plantas transgênicas de pomelo ‘Duncan’ a partir de segmentos de epicótilo de 4-6 semanas de idade. Chávez-Vela; Chávez-Ortiz e Pérez-Molphe-Balch (2003) também demonstraram que é possível transformar a laranja azeda

com o gene da capa protéica do CTV via *Agrobacterium rhizogenes*, utilizando-se segmentos de raízes como fonte de explante.

Este trabalho vem a ser o primeiro relato da transformação genética com genes da capa protéica e com uma sequência conservada antisense do CTV em limão ‘Cravo’, porta-enxerto de maior importância para a citricultura brasileira, e em laranja ‘Hamlin’, variedade copa de maturação precoce de grande importância nacional. As plantas de laranja ‘Hamlin’ obtidas contendo esses genes deverão ser avaliadas quanto à resistência ou tolerância ao CTV. Se borbulhas dessas plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ forem enxertadas em laranja azeda (porta-enxerto intolerante ao CTV), a combinação copa-porta-enxerto, provavelmente, poderá apresentar alguma tolerância ao CTV pelo desencadeamento do processo de silenciamento gênico, que pode ser induzido em um local da planta, copa de laranja ‘Hamlin’ transgênica, e se mover de célula em célula para locais distantes, no caso o porta-enxerto de laranja azeda. Segundo Voinnet et al. (1998), esse sinal, sendo parte do processo de silenciamento, parece interagir com proteínas de membranas, movendo-se de célula em célula através do floema, assemelhando-se com o padrão de infecção de vírus nas plantas. As plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ obtidas deverão ser avaliadas quanto à resistência ou tolerância à morte súbita dos citros. Apesar de permanecer desconhecido o agente causal dessa doença, ainda não se descartou a hipótese de ser causada por um mutante do CTV ou por outro vírus em associação com o CTV.

5 CONCLUSÕES

A resposta morfogênica em função da região do epicótilo e das concentrações da citocinina BAP é dependente do cultivar de citros.

A suplementação do meio de cultura com a citocinina BAP proporcionou um maior número de gemas adventícias regeneradas por explante, tanto em segmentos de epicótilo como em segmentos internodais dos cultivares de citros estudados.

A suplementação do meio de cultura com a citocinina BAP é essencial na regeneração de gemas adventícias em segmentos internodais de laranja azeda.

Foi possível regenerar plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP) utilizando-se explantes de segmentos de epicótilo e segmentos internodais, e com uma seqüência conservada antisense do CTV (pCTVcons), utilizando-se segmentos internodais; e plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ com o gene da capa protéica do CTV (pCTV-dsCP e pCTV-CP), e com uma seqüência conservada antisense do CTV (pCTVcons), utilizando-se explantes de segmentos de epicótilo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. **Biologia Plantarum**, Praha, v.50, n.3, p.321-325, 2006.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.35-40, 2002.
- 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**, Limerick, v.164, p.203-211, 2003.
- 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.
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (*bO*), *cecropina* e *gus***. 2005. 76p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T.R.; BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analyses of Citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, p.502-512, 2003.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Current Biology**, London, v.12, n.3, p.82-84, 2002.
- BENEDDRA, T.; PICARD, C.; PETIT, A.; NESME, X. Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p.225-231, 1996.
- 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. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.28, p.229-234, 2001a.
- BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; HISSANO, Z.; VIEIRA, L.G.E. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, p.27-34, 2001b.
- BEYL, C.A. Getting started with tissue culture. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap.3, p.21-38.

BHAT, S.R.; CHITRALEKHA, P.; CHANDAL, K.P.S., Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Christm.) swing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.19-25, 1992.

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.

BORDÓN Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, London, v.86, p.159-166, 2000.

BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21***. 2004. 87p. 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, p.122-128, 2003.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. cap.2, p.19-36.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: 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, p.679-735.

CERUTTI, H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.19, n.1, p.39-46, 2003.

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, 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, 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, p.51-59, 1998b.

CHAPOT, H. The *Citrus* plant. In: HAFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**. Basle: Ciba-Geigy Agrochemicals, 1975. p.6-13. (Technical Monograph, 4)

- CHATUVERDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. **HortScience**, Alexandria, v.9, p.118-120, 1974.
- CHÁVEZ-VELA, N.A.; CHÁVEZ-ORTIZ, L.I.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Tranformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. **Agrociencia**, Montecillo, v.37, n.6, p.629-639, 2003.
- CHILTON, M.D.; QUE, Q. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-strand breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.133, p.956-965, 2003.
- COOPER, W.C.; REECE, P.C.; FURR, J.R. Citrus breeding in Florida - past, present and future. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Tallahassee, v.75, p.5-13, 1962.
- COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G.; MOSQUIMA, P.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, p.63-74, 2004.
- DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254p.
- DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITER, F.G.J. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cv. 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.49, p.55-62, 1992.
- DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.14, p. 171-183, 2004.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.427-433, 2000.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue cultures of three *Citrus* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.16, p.123-133, 1989.
- EDRISS, M.H.; BURGER, D.W. *In vitro* propagation of 'Troyer' citrange from epicotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, p.159-162, 1984.
- FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.167-194, 2000.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of citrus tristeza virus are citrus-specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.18, p.435-445, 2005.

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, p.153-165, 2006.

FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 maio 2006.

FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza clostovirus genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.23, p.421-428, 2003.

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2006**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. 504p.

FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br>>. Acesso em: 02 dez. 2005.

GARCÍA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, London, v.84, p.715-723, 1999.

GARCÍA-LUIS, A.; MOLINA, R.V.; VARONA, V.; CASTELLÓ, S.; GUARDIOLA, J.L. The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.85, n.2, p.137-144, 2006.

GAUTHERET, R.J. **La culture des tissus végétaux: techniques et réalisation**. Paris: Masson, 1959. 863p.

GHORBEL, R.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.73, n.3, p.323-327, 1998.

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

GHORBEL, R.; LÓPEZ, C.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. **Molecular Plant Pathology**, London, v.2, p.27-36, 2001.

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

GMITTER JUNIOR, F.G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economic Botany**, Bronx, v.44, n.2, p.267-277, 1990.

GOH, C.J.; SIM, G.E.; MORALES, C.L.; LOH, C.S. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pummelo tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.43, p.301-303, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética da plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1998. v.1, p.184-250.

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

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

HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, v.286, p.950-952, 1999.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DE BLOCK, M.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J.P.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **EMBO Journal**, Oxford, v.2, p.987-995, 1983.

HIDAKA, T.; OMURA, M. Transformation of citrus protoplasts by electroporation. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Nagoya, v.62, p.371-376, 1993.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 nov. 2005.

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, p.541-545, 1994.

KERSTERS, K.; DE LEY, J. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systemic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkin, 1984. p.244-254.

KLEE, H.J.; HORSCH, R.B.; ROGERS, S.G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.38, p.467-486, 1987.

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, p.91-97, 1989.

KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, n.9, p.340-346, 1999.

LEE, Y.W.; JIN, S.; SIM, W.S.; NESTER, E.W. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v.92, p.12245-12249, 1995.

LI, D.D.; SHI, W.; DENG, X.X. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.21, p.153-156, 2002.

LUTH, D.; MOORE, G. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.57, p. 219-222, 1999.

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: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap.9, p.223-277.

MAGGON, R.; SINGH, B.D. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and Hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.63, p.123-128, 1995.

MATZKE, M.; MATZKE, A.J.M.; PRUSS, G.; VANCE, V. RNA-based silencing strategies in plants. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v.11, p.221-227, 2001.

MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Hamlin sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.7, p.955-961, 2002.

METTE, M.F.; VAN DER WIDEN, J.; MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J.M. Production of aberrant promotor transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. **EMBO Journal**, Oxford, v.18, n.1, p.241-248, 1999.

- MITANI, N.; KOBAYASHI, S.; NISHIZAWA, Y.; KUNIGA, T.; MATSUMOTO, R. Transformation of trifoliolate orange with rice chitinase gene and the use of the transformed plant as a rootstock. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, p.439-441, 2006.
- MLOTSHWA, S.; VOINNET, O.; METTE, M.F.; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S.; PRUSS, G.; VANCE, V. RNA silencing and the mobile silencing signal. **Plant Cell**, Rockville, v.14, p.289-301, 2002. Supplement.
- 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. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, p.379-385, 2004.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, p.238-242, 1992.
- MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.1-21.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.116-144.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.87, p.275-290, 2001.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, London, v.85, p.103-110, 2000.
- MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays 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., Riverside. **Proceeding...** Riverside: University of California, 1969. p.1155-1169.
- NEVES, E.M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S.; NEVES, M.F. Citricultura brasileira: efeitos econômicos-financeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.432-436, 2001.

- NEVES, M.F.; LOPES, F.F. (Org.). **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2005. 225p.
- 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.
- PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany**, London, v.94, p.67-74, 2004.
- 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.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, M. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* OR *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, London, v.19, p.263-267, 2001.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, p.616-619, 1995a.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v.104, p.183-191, 1995b.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v.32, p.931-934, 1997.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, p.591-596, 1998.
- RAGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. *In vitro* initiation for nucellar embryos in monoembryonics *Citrus*. **HortScience**, Alexandria, v.3, p.226-227, 1968.
- RESENDE, R.O. Perspectivas de plantas transgênicas no controle de fitoviroses. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.2, p.123-152, 1994.
- ROMANO, E.; MONTE, D.C. Plantas transgênicas resistentes a vírus. In: 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, p.783-814.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, London, v.113, p.395-405, 1985.

- SCHROEDER, C.A.; SPECTRO, C. Effect of giberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. **Science**, Washington, v.126, p.701-702, 1957.
- SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; SOOST, R.K.; NAUER, E.M. Contribution to the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). **Systematic Botany**, Kent, v.7, n.2, p.170-177, 1982.
- SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **Plant Cell**, Rockville, v.8, n.19, p.1699-1710, 1996.
- SILVA, R.P.; COSTA, M.A.P.C; SOUZA, A.S. ALMEIDA, W.A.B. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.12, p.1153-1159, 2005a.
- SILVA, R.P.; SOUZA, E.S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.484-487, 2005b.
- SMITH, N.A.; SINGH, S.P.; WANG, M.-B.; STOUTJESDIJK, P.A.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, London, v.407, p.319-320, 2000.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in Fruit Breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v.318, p.624-629, 1985.
- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p.190-430.
- THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. chap.2, p.17-36.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1998. v.1, p.11-20.
- TZFIRA, T.; FRANKMEN, I.; VAIDYA, M.; CITOVSKY, V. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA via molecules that walk through the walls. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.133, p.1011-1023, 2003.
- VAN SLUYS, M.A. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1999. p.737-759.

- VAN SLUYS, M.A.; HASHIMOTO, R.Y.; SCORTECCI, K.C. Gene transfer from *Agrobacterium* to plants. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.44, n.5, p.296-300, 1992.
- VANECK, J.M.; KITTO S.L. Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.41-49, 1992.
- 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.
- VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, London, v.114, p.308-309, 2001.
- VIEIRA, J.G.Z.; FARIA R.T.; VIEIRA, L.G.E.; MOLINARI, H.B.C. Transformação genética de citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) com o gene marcador fosfomanose isomerase (*pmi*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.27, n.3, p.541-547, 2005.
- VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promotorless DNA. **Cell**, Cambridge, v.95, p.177-187, 1998.
- WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Right 25-bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, Cambridge, v.38, p.455-462, 1984.
- WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.43, p.203-220, 2000.
- WATERHOUSE, P.; WANG, M.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. **Nature**, London, v.411, p.834-842, 2001.
- WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, J.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p.1-39.
- WESLEY, S.V.; HELLIWELL, C.A.; SMITH, N.A.; WANG, M.-B.; ROUSE, D.T.; LIU, Q.; GOODING, P.S.; SINGH, S.P.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P.A.; ROBINSON, S.P.; GLEAVE, A.P.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, York, v.27, n.6, p.581-590, 2001.
- WHITE, P.R.; BRAUN, A.C. Crown-gall production by bacteria-free tumor tissues. **Science**, Washington, v.94, p.239-241, 1941.
- 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, 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, p.175-183, 1996.

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

ZAMBRYSKI, P.; TEMPÉ, J.; SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. **Cell**, Cambridge, v.56, p.193-201, 1989.

ZAMBRYSKI, P.C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.43, p.465-490, 1992.

ZIEGLER, L.W.; WOLFE, H.S. **Citrus growing in Florida**. Gainesville: University of Florida Press, 1961. 248p.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA

Soluções estoque do meio MT (Murashige & Tucker, 1969)

MT Macronutrientes estoque (50x)	g.L⁻¹
NH ₄ NO ₃	82,5
KNO ₃	95,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5
KO ₂ PO ₄	7,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MT Micronutrientes estoque (100x)	g.L⁻¹
H ₃ BO ₃	0,62
MnSO ₄ .H ₂ O	1,68
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
KI	0,083
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
MT Ferro estoque (200x)	g.L⁻¹
Na ₂ EDTA	7,45
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,57
MT Vitaminas estoque (100x)	g.L⁻¹
Myo-inositol	10,0
Tiamina-HCL	1,0
Pyridoxina-HCL	1,0
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2

MT Cálcio estoque (66x)**g.L⁻¹**CaCl₂.2H₂O

22,0

MT

MT Macronutrientes estoque (50x)

20,0 mL.L⁻¹

MT Micronutrientes estoque (100x)

10,0 mL.L⁻¹

MT Vitaminas estoque (100x)

10,0 mL.L⁻¹

MT Cálcio estoque (66x)

15,0 mL.L⁻¹

MT Ferro estoque (200x)

5,0 mL.L⁻¹

Sacarose

25,0 g.L⁻¹

Ágar

8,0 g.L⁻¹

Obs: o meio de cultura MT teve o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o ágar e foi autoclavado por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg/cm²).

DBA₃

MT Macronutrientes estoque (50x)

18,0 mL.L⁻¹

MT Micronutrientes estoque (100x)

9,0 mL.L⁻¹

MT Vitaminas estoque (100x)

9,0 mL.L⁻¹

MT Cálcio estoque (66x)

15,0 mL.L⁻¹

MT Ferro estoque (200x)

5,0 mL.L⁻¹

Água de côco

20,0 mL.L⁻¹

Sacarose

25,0 g.L⁻¹

Ágar

8,0 g.L⁻¹

Obs: o meio de cultura DBA₃ teve o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o ágar e foi autoclavado por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg/cm²).

YEP	g.L⁻¹
Peptona	10,0
Extrato de Levedura	10,0
NaCl	5,0

Obs: o meio de cultura YEP teve o pH ajustado para 7,0 antes de adicionar o ágar, e autoclavados por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg/cm²). Meio YEP sólido: adição de 15 g.L⁻¹ de ágar.