Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*)

Eveline Carla da Rocha Tavano

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba

2008

Eveline Carla da Rocha Tavano
Bióloga

Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*)

Orientadora:
Profa. Dra. **BEATRIZ M. JANUZZI MENDES**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2008

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

Tavano, Eveline Carla da Rocha
Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) / Eveline Carla da Rocha Tavano. - - Piracicaba, 2008.
72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cultura de tecidos vegetais 2. Genética Vegetal 3. Laranja 4. Limão 5. Morfogênese Vegetal 6. Organogenese vegetal – técnica in vitro 7. Plantas transgênicas I. Título

CDD 634.334
T231o

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

Á Deus

“És minha Força e Segurança,
és meu Apoio, minha Esperança,
és minha Vida e Confiança”
(cântico 433, CCB)

Aos meus pais Luiz Carlos e Maria Benedita pelo imenso amor, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã Elizangela Cláudia e ao meu irmão Luiz Carlos Jr., por estarem sempre presentes em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' pela oportunidade de cursar mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

À Profa. Dra Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA/USP) pela excelente orientação, profissionalismo e pela constante dedicação.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho (ESALQ/USP), pela importante colaboração durante a execução deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo por ter produzido o vetor para a transformação genética.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudos.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva pela competência.

As amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Alessandra C. B. de A. Hara, Alice N. Aranda Perez, Ana Paula Chiaverini Pinto, Andréa Dias koehler, Fabiana Rezende Muniz, Janaynna M. Barbosa-Mendes e Liliane C. L. Stipp pelo convívio e auxílio durante a execução deste trabalho.

A técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Renata Beatriz Cruz pelo auxílio e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Taciana Kanashiro Uehara, Waner de Freitas Junior, Luciana Castelotti, Carolina Monte Bello, Sylvia Rodrigues Silveira e Renan Packer pela amizade e constante auxílio.

Ao João Geraldo Brancalion do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP) pela ajuda na editoração das pranchas.

À Profa. Dra Adriana P.M. Rodriguez do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) e Mônica Lanzoni Rossi, técnica do Laboratório Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP), pelo convívio.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) Sr. José e Davi por terem cuidado das plantas de citros utilizadas nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortículas (ESALQ/USP) Amâncio José de Souza, Luis Gustavo de Paoli, Rosely Pereira da Silva e Suane Coutinho Cardoso, pelo companheirismo.

As minhas amigas Vania Nakano e Katherine D. Batagin pela amizade e apoio durante todo este período.

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

SUMÁRIO

RESUMO..... 7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS..... 9
LISTA DE TABELAS..... 11
LISTA DE ABREVIATURAS..... 13
1 INTRODUÇÃO..... 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 16
2.1 Citricultura no Brasil e no mundo..... 16
2.2 Cultura de tecidos em citros..... 20
2.3 Transformação genética de citros..... 23
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 30
3.1 Material Vegetal..... 30
3.2 Organogênese *in vitro*..... 31
3.3 Análise histológica..... 33
3.4 Transformação genética..... 34
3.4.1 Vetor de expressão e estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*..... 34
3.4.2 Cultura e manutenção de isolados de *Agrobacterium tumefaciens*..... 34
3.4.3 Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*..... 35
3.4.4 Seleção, regeneração e aclimatização das plantas..... 36
3.5 Análise de DNA..... 36
3.6 Análise histológica associada ao teste histoquímico GUS..... 37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 38
4.1 Organogênese *in vitro*..... 38
4.2 Análise histológica da morfogênese..... 48
4.3 Transformação genética..... 52
5 CONCLUSÕES..... 62
REFERÊNCIAS..... 63

RESUMO

Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*)

A transformação genética possibilita a introdução de genes de interesse agronômico no genoma das plantas e pode ser empregada na tentativa de obter plantas resistentes a doenças. No entanto, para se obter uma planta transgênica é necessário primeiramente estabelecer um procotolo eficiente de regeneração de plantas *in vitro*. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a organogênese *in vitro* e a transformação genética de limão 'Volkameriano' e laranja azeda com um fragmento do gene da capa protéica do CTV. Para a organogênese *in vitro* utilizou-se, como explante, segmento internodal, obtido de planta cultivada em casa-de-vegetação, segmento de epicótilo, coletado de plântula cultivada *in vitro* e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo obtido de semente introduzida *in vitro.* Esses explantes foram mantidos em meio de cultura EME suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP – 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg L^{-1}), sendo incubados sob fotoperíodo de 16 h de luz ou em condições de escuro por 30 dias e então transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz. A avaliação foi realizada após 45 dias de cultivo, determinando-se o número de explantes responsivos e o número de gemas por explante. A caracterização anatômica do processo de regeneração foi realizada por meio de cortes histológicos. Pela análise dos dados foi possível verificar que a organogênese *in vitro* ocorreu a partir dos três tipos de explantes testados, sendo que, nas duas espécies em estudo, os melhores resultados foram obtidos com o cultivo de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo. As concentrações de BAP que estimularam as melhores taxas de regeneração foram de 1,0 e 1,5 mg L^{-1}, para limão 'Volkameriano', e 0,5 e 1,0 mg L^{-1} para laranja azeda. A incubação dos explantes em ausência de luz favoreceu a regeneração *in vitro*. Pela análise histológica foi possível observar que o processo de regeneração, a partir dos três tipos de explantes testados, ocorreu por meio de organogênese indireta. O protocolo de desenvolvimento estabelecido durante os experimentos de organogênese *in vitro* foi utilizado para a transformação genética dessas espécies via *Agrobacterium*, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com um fragmento do gene da capa protéida do CTV, em uma construção gênica do tipo 'hairpin'. As gemas de limão 'Volkameriano' e laranja azeda identificadas como transgênicas pelo teste histoquímico GUS foram enxertadas *in vitro* em citrange 'Carrizo'. A confirmação da transformação genética foi realizada pela análise de PCR, a qual mostrou a amplificação de um fragmento de 671 pb, correspondente a parte do gene amplificada.

Palavras-chave: *Citrus;* Cultura de tecidos; Morfogênese; Gemas adventícias; Transgenia

ABSTRACT

In vitro organogenesis and genetic transformation of the 'Volkamer' lemon (*Citrus volkameriana*) and sour orange (*Citrus aurantium*)

Genetic transformation permits the introduction of agronomically important genes in plant genome and can be utilized in order to produce disease resistant plants. However for the recovery of transgenic plants is required to establish an efficient *in vitro* plant regeneration protocol. In this work the aim was to study an i*n vitro* organogenesis and the genetic transformation of 'Volkamer' lemon and sour orange with a sequence of the CTV coat protein gene. For *in vitro* organogenesis explant internodal segments collected from plants cultivated in greenhouse, epicotyl segments obtained from *in vitro* cultivated seedlings and cotyledon fragment with hypocotyl attached obtained from *in vitro* germinated seed were used as explant. These explants were cultured in EME medium supplemented with benzilaminopurine (BAP – 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg L^{-1}). Cultures were maintained under a 16 h photoperiod or in the dark for 10 d and then transferred to a 16 h photoperiod. The evaluation was performed 45 d after the incubation determining the number of responsive explant and the number of buds per explant. The anatomical characterization of *in vitro* regeneration process was carried out through histological analyses. The *in vitro* organogenesis occurred in the three types of explant tested, however cotyledon fragment with hypocotyl attached showed higher morphogenetic potential in both species. The best responses of regeneration were obtained when the medium was supplementation with 1,0 e 1,5 mg L^{-1} BAP for the 'Volkamer' lemon and 0,5 e 1,0 mg L^{-1} BAP for the sour orange. The incubation in darkness favored the *in vitro* regeneration. The histological analyses showed that the regeneration process occurred through indirect organogenesis in the three types of explants tested. The developed protocol was use for genetic transformation of 'Volkamer' lemon and sour orange with *Agrobacterium*, containing pCAMBIA 2201 plasmid with a sequence of CTV coat protein gene, in a hairpin construction. 'Volkamer' lemon and sour orange shoots identified as transgenic by histochemical test GUS were micrografted into 'Carrizo' citrange. PCR analysis were performed after micrografted showing the presence of the 671 pb fragment of the transgene.

Keywords: *Citrus;* Tissue culture; Morphogenesis; Adventitious bud; Transgenic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Segmento de cotilédone associado a hipocótilo utilizado nos experimentos de organogênese e transformação genética em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*)..... 31

Figura 2 - Esquema do vetor de expressão, contendo um fragmento do gene da capa protéica do CTV, numa construção do tipo 'hairpin', o gene de seleção *npt*II e o gene repórter *uid*A, sob controle do promotor constitutivo 35S 34

Figura 3 - Organogênese *in vitro* em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) 40

Figura 4 - Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium*)..... 41

Figura 5 - Organogênese *in vitro* em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo como explante 47

Figura 6 - Análise histológica do processo organogênico em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) a partir de segmento de epicótilo..... 50

Figura 7 - Análise histológica do processo organogênico em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) a partir de segmento internodal..... 51

Figura 8 - Análise histológica do processo organogênico em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo..... 52

Figura 9 - Transformação genética em citros via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com uma seqüência do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros numa construção gênica tipo ‘hairpin’..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento internodal de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), cultivado em diferentes concentrações de BAP e condições de incubação 38

Tabela 2 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento internodal e de epicótilo, de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP 42

Tabela 3 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento internodal e de epicótilo de laranja azeda (*Citrus aurantium*), cultivados em diferentes concentrações de BAP 43

Tabela 4 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP 45

Tabela 5 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo de laranja azeda (*Citrus aurantium*), cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP..... 46

Tabela 6 - Transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), utilizando segmento internodal 54

Tabela 7 - Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de epicótilo 55

Tabela 8 - Transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo..... 57

Tabela 9 - Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo 57

LISTA DE ABREVIATURAS

ap1 - Gene *apetala1*
BAP - 6-benzilaminopurina
*b*O - Gene bacteriopsina
CSDaV - *Citrus sudden death associated virus*
CTAB - Cetyl trimetyl ammonium bromide
CTV - *Citrus tristeza virus*
gna - Gene lectina (*Galanthus nivalis* aglutinina)
hal2 - Gene 3'(2')5'-bifosfato nucleotidase
hrpN - Gene que codifica a proteína harpina
lfy - Gene *leafy*
manA - Gene da fosfomanose isomerase
MSC - Morte súbita dos citros
NAA - Ácido α-naftalenoacético
nptII - Gene neomicina fosfotransferase II
PEG - Polietilenoglicol
PMI - Enzima fosfomanose-isomerase
PME - Enzima pectina metilesterase
PCR - Polymerase chain reaction
RdRp - RNA-dependent-RNA-polymerase
RISC - RNA-induced silencing complex
SGT - Silenciamento gênico transcricional
SGPT - Silenciamento gênico pós-transcricional
siRNA - Interfering RNA
TBE - Tampão Tris, ácido bórico, EDTA
uidA - Gene β-glucuronidase (GUS)
X-GLUC - 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida
2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-ip - 2-isopentenil-adenina

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira se destaca como a maior do mundo, apresentando uma produção de aproximadamente 20 milhões de toneladas (FAO, 2008), sendo o Estado de São Paulo responsável pela maior parte da produção nacional, a qual se destina principalmente, a indústria de suco concentrado para a exportação. Embora o Brasil seja considerado um importante produtor mundial de citros, diversos problemas fitossanitários têm afetado sua produtividade. Esses problemas têm sido favorecidos pela baixa variabilidade genética das variedades copa e porta-enxerto utilizadas.

O *Citrus tristeza vírus* (CTV) é o agente causal da tristeza dos citros, doença de grande importância econômica para a citricultura mundial, introduzida no Brasil no final da década de 30. Na época em que foi detectada, causou sérios prejuízos a cultura, por atingir plantas enxertadas sobre laranja azeda, até então, o principal porta-enxerto utilizado.

No ano de 1999, a Morte súbita dos citros (MSC) foi detectada nos pomares brasileiros. Essa doença representa uma grande ameaça para a citricultura, uma vez que atinge plantas enxertadas sobre limão 'Volkameriano' e principalmente limão 'Cravo', porta-enxerto mais utilizado nos pomares brasileiros. Embora seu agente causal ainda não foi confirmado, uma das hipóteses é que a MSC seja causada por uma estirpe do vírus da tristeza dos citros (BASSANEZI et al., 2003), uma outra hipótese é que essa doença seja causada por um vírus do gênero *Marafivirus*, ou que uma associação entre dois vírus provoque a doença (MACCHERONI et al., 2005).

A presença da MSC e da tristeza dos citros tem causado grande impacto econômico a citricultura, desta maneira a obtenção de variedades de porta-enxertos resistentes a essas doenças é de grande interesse. No entanto, algumas características relacionadas à biologia reprodutiva dos citros, tais como, alta heterozigose, poliembrionia nucelar, longo período juvenil e auto-incompatibilidade (GROSSER; GMITER Jr., 1990) tem dificultado a aplicação dos métodos convencionais de melhoramento genético.

Assim, a transformação genética representa uma alternativa para a obtenção de plantas resistentes a essas doenças. A estratégia utilizada para a transformação

genética visando a resistência a doenças causadas por vírus, baseia-se na introdução de genes do patógeno no genoma da planta. A resistência pode ser alcançada por meio da expressão do gene introduzido ou por meio do silenciamento gênico, que pode ocorrer no nível transcricional ou pós-transcricional.

Porém, para a obtenção de plantas transgênicas é necessário primeiramente o estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração de plantas *in vitro*, para cada espécie em estudo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a organogênese *in vitro* e a transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*), a fim de obter plantas transgênicas contendo um fragmento do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citricultura no Brasil e no mundo

Os citros utilizados em plantios comerciais pertencem à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantoidea*, sendo a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Citrus* (SWINGLE; REECE, 1967), exceto as espécies, kunquats e trifoliata, que estão incluídas nos gêneros *Fortunella* e *Poncirus*, respectivamente (DAVIES; ALBRIGO, 1994). A classificação do gênero *Citrus* é bastante controversa. Diversos sistemas de classificação têm sido propostos. Para o sistema de classificação apresentado por Swingle (1943) o gênero citros é composto por 16 espécies. Já para Tanaka (1977) o gênero *Citrus* é composto por 162 espécies. Análises filogenéticas sugerem que o gênero *Citrus* seja composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e toranja (*Citrus grandis* L.), sendo os outros genótipos derivados de hibridações entre estas espécies verdadeiras (SCORA, 1975; BARRETT; RHODES, 1976). Estudos com marcadores moleculares têm ajudado a decifrar as relações filogenéticas entre os representantes do gênero *Citros* e gêneros relacionados, e tem confirmado a origem híbrida da maioria das espécies de importância econômica (NICOLOSI et al., 2000).

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

A maioria das espécies de citros são nativas da região sudeste do continente asiático, exceto o pomelo que parece ser a única espécie de *Citrus* não nativa do

oriente, provavelmente originária da Ilha de Barbados no Caribe (DONADIO; MOURÃO-FILHO; MOREIRA, 2005).

Os citros desenvolvem-se principalmente em regiões tropicais e subtropicais a uma latitude de aproximadamente 40º ao norte e ao sul do equador (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Entre os países produtores de citros destacam-se o Brasil, China, EUA, México e Espanha, responsáveis por, aproximadamente, 18,8%, 16,0%, 10,6%, 6,0% e 5,6% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2008).

As frutas cítricas estão incluídas entre as principais frutas produzidas no mundo, apresentando uma produção de aproximadamente, 108 milhões de toneladas. O Brasil é o maior produtor de citros do mundo apresentando uma produção de cerca de 20 milhões de toneladas (FAO, 2008), sendo o Estado de São Paulo responsável por cerca de 80% da produção nacional (BOTEON; NEVES 2005).

Entre as frutas cítricas produzidas no Brasil, a laranja tem maior destaque. Em 2006, a produção de laranja foi de cerca de 17 milhões de toneladas, com uma área colhida de aproximadamente 802 mil hectares (FNP, consultoria e comércio, 2007). A produção de laranja no Brasil corresponde a cerca de 28,1% da produção de laranja no mundo (64 milhões de toneladas). O EUA é considerado o segundo maior produtor sendo responsável por aproximadamente 14% (9 milhões de toneladas) da produção (FAO, 2008). A maior parte da produção brasileira de laranja destina-se à indústria de suco de laranja concentrado, sendo que uma grande parte do suco de laranja produzido no país é exportado, principalmente para União Européia (ABECITRUS, 2008).

Apesar do grande volume de produção dos citros no Brasil e no mundo, a citricultura tem sofrido muitas perdas, causadas por pragas e doenças que afetam a cultura. No Brasil, os pomares têm sido atingidos por diversas doenças, desde o início de sua fase comercial até os dias atuais.

Por volta de 1910, os pomares brasileiros foram afetados pela gomose, doença causada pelo fungo *Phytophthora* spp. que impossibilitou o uso da laranja 'Caipira' como porta-enxerto, sendo substituída pela laranja azeda. Em 1937, constatou-se a presença do vírus da tristeza dos citros (CTV) em grande parte dos pomares brasileiros, essa doença foi controlada com a utilização de novos porta-enxertos em substituição a laranja azeda. A partir de 1957, os pomares foram atingidos pelo cancro cítrico, doença

causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Em seguida, no ano de 1987, foi constatada a presença da clorose variegada do citros, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. No ano de 2001, a morte súbita dos citros, doença de causa desconhecida foi detectada nos pomares da região sul do Triângulo Mineiro, Norte e Noroeste do Estado de São Paulo. A partir de 2004, surgiu o greening ou huanglongbing, causado pela bactéria *Candidatus* Liberibacter ssp (MATTOS et al., 2005).

O *Citrus tristeza virus* (CTV) pertencente ao gênero *Closterovirus,* família *Closteroviridae*, é o agente causal da tristeza dos citros, doença de grande importância econômica para a citricultura mundial. Esse vírus é transmitido principalmente pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida),* e infecta praticamente todas as espécies, variedades, híbridos e muitos afins de citros. O vírus da tristeza dos citros foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1937, no Vale do Paraíba, atingindo plantas enxertadas sobre laranja azeda, que era o principal porta-enxerto da época, causando um sério prejuízo à citricultura (KIMATI et al., 2005).

Plantas afetadas pelo CTV exibem diferentes sintomas da doença dependendo da virulência da estirpe do CTV, condições ambientais, idade da planta, combinação copa/porta-enxerto, capacidade de permitir a multiplicação do vírus e da tolerância dos tecidos, principalmente do floema. Baseado nestes fatores, os sintomas podem ser classificados em tristeza clássica, tristeza que causa sintomas do tipo canelura e tristeza que causa o amarelecimento-do-pé-franco (KIMATI et al., 2005).

Em copas de laranja doce, pomelo e tangerinas, enxertadas sobre laranja azeda são expressos uma série de sintomas da tristeza clássica, como amarelecimento das folhas velhas, clorose da nervura principal, declínio rápido da planta, seca dos galhos, necrose dos tubos crivados do porta-enxerto, podridão das radicelas e pode ocorrer a morte da planta. Já em copas sensíveis ao vírus, como a laranja ‘Pêra’ e os pomelos propagadas sobre porta-enxertos tolerantes são observados sintomas como canelura (‘*stem pitting’*), redução do tamanho da planta, formação de ramos frágeis e quebradiços, diminuição do tamanho médio dos frutos, formação de folhas de tamanho reduzido e cloróticas. Em mudas de pé franco de laranja azeda, alguns limões verdadeiros e limas ácidas infectadas com isolados severos do CTV, a tristeza causa o sintoma conhecido amarelecimento-de-pé-franco, caracterizado pela clorose severa das

folhas e nanismo da planta. O controle da doença consiste basicamente na utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes. Para as variedades copa, laranja 'Pêra' e os pomelos enxertados em porta-enxertos tolerantes, o controle é feito por premunização (FUNDECITRUS, 2008).

A morte súbita dos citros (MSC) foi identificada pela primeira vez em 2001, no município de Comendador Gomes (MG). É uma doença de combinação copa/porta-enxerto, que manifesta os sintomas na região da enxertia em plantas propagadas sobre porta-enxertos intolerantes, tais como, os limões 'Cravo' e o 'Volkameriano', porém em limão 'Volkameriano', esta doença mostra um comportamento diferente apresentando um período maior de incubação e grau de severidade menor (KIMATI et al., 2005).

O agente causal da MSC ainda não foi confirmado, entretanto, uma hipótese provável é que esta doença seja causada por uma estirpe mutante do vírus da tristeza. Esta hipótese é baseada nas semelhanças entre a MSC e a tristeza quanto à sintomatologia, velocidade de progresso da doença e distribuição espacial das plantas afetadas nos talhões, e por serem doenças de combinação copa/porta-enxerto. Além disso, partículas de vírus semelhantes ao CTV foram detectadas, por testes serológicos e moleculares em plantas com sintomas de MSC (BASSANEZI et al., 2003). Uma outra hipótese sobre a etiologia da doença é que esta seja causada por um novo vírus do gênero *Marafivirus* chamado de *Citrus sudden death associated virus* (CSDaV), pertencente à família *Tymoviridae.* Este vírus foi encontrado associado exclusivamente a plantas afetadas pela morte súbita e portanto foi sugerido que sua presença é uma condição necessária se não suficiente para o desenvolvimento desta doença (MACCHERONI et al., 2005). As semelhanças entre a MSC e tristeza dos citros sugerem que ambas sejam transmitidas pelo mesmo vetor (*Toxoptera citricicida*) (FUNDECITRUS, 2008).

Os sintomas da MSC são parecidos com os sintomas causados pelo CTV quando as plantas são enxertadas sobre laranja azeda. O sintoma inicial da MSC é caracterizado por uma descoloração foliar, desfolha parcial, poucas brotações novas e ausência de brotações internas. A doença causa um bloqueio nos vasos do floema do porta-enxerto, impedindo que produtos gerados durante a fotossíntese sejam translocados para as raízes, assim, elas tornam-se podres e morrem. As plantas

afetadas apresentam uma coloração amarelada a alaranjada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto abaixo da região da enxertia. No estádio final da doença todas as folhas caem e a árvore morre permanecendo com alguns frutos presos aos galhos. O controle da doença é realizado por meio da produção de mudas em porta-enxertos tolerantes, já nas áreas afetadas o controle é feito pela subenxertia das árvores produzidas sobre limão 'Cravo' e limão 'Volkameriano', com porta-enxertos tolerantes, tais como, tangerina 'Cleópatra', 'Sunki' ou citrumelo 'Swingle' (FUNDECITRUS, 2008).

2.2 Cultura de tecidos em citros

A cultura de tecidos é uma técnica baseada na totipotência celular, que consiste na capacidade da célula vegetal de desenvolver uma planta inteira, desde que submetida a condições que estimulem sua divisão e diferenciação (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999).

As células e tecidos cultivados *in vitro* podem seguir duas rotas morfogênicas diferentes: organogênese e a embriogênese somática. Na organogênese as células desenvolvem uma estrutura unipolar podendo ser um ápice caulinar ou radicular, cujo sistema vascular permanece conectado ao tecido do explante. Na embriogênese somática tem-se o desenvolvimento de uma estrutura bipolar constituída por um ápice caulinar e um ápice radicular que apresentam sistema vascular fechado, isto é, sem conexão com o tecido do explante. Estas duas vias de regeneração podem ocorrer de forma direta, a partir do tecido do explante ou indireta, neste caso primeiramente desenvolvem-se calos que diferenciam-se em gemas adventícias, raízes ou embriões somáticos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999).

Os primeiros trabalhos envolvendo cultura de tecidos em citros foram realizados visando a produção de plantas isentas de vírus (RAGAN; MURASHIGE; BITTERS, 1968; GRINBLAT, 1972). Desde então, muitos trabalhos relacionados com cultura de tecidos em citros estão sendo realizados. Estes trabalhos permitem a obtenção de protocolos que possibilitam o isolamento e cultivo de protoplastos (BENEDITO; MOURÃO FILHO; MENDES, 2000, COSTA; OTONI; MOORE, 2002), e a regeneração por meio da organogênese *in vitro* e embriogênese somática de diferentes espécies e

cultivares de citros. A disponibilidade destes protocolos permite o uso destas técnicas no melhoramento genético por meio da hibridação somática e transformação genética.

A maioria dos trabalhos relacionados com o estabelecimento de protocolos de organogênese *in vitro*, em citros, têm sido desenvolvidos, principalmente, a partir de tecido juvenil, tais como, segmentos de epicótilo coletados de plântulas cultivadas *in vitro* (GARCÍA-LUIS et al., 1999, BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; MOURA et al., 2001; COSTA et al., 2004; SILVA et al., 2005a, 2005b; SCHINOR et al., 2006; GARCÍA-LUIS et al., 2006) e segmentos internodal coletados de plantas jovens cultivadas em casa-de-vegetação (MOURA et al., 2001). Porém também existem relatos de obtenção de gemas adventícias a partir de segmento de raiz (BURGER; HACKETT, 1986) e segmento de hipocótilo (MAGGON; SINGH, 1995).

A organogênese *in vitro* também tem sido obtida a partir do cultivo de tecido adulto como discos de folha (ALMEIDA et al., 2003) e segmentos internodal coletados de plantas adultas cultivadas em casa-de-vegetação (CERVERA et al., 1998a; ALMEIDA et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2003; CERVERA et al., 2008). Com a utilização de tecido adulto é possível obter plantas a partir da organogênese *in vitro* que apresentem características de plantas adultas e floresçam rapidamente após o seu desenvolvimento (KOBAYASHI et al., 2003).

Os tecidos adulto e juvenil respondem de maneira diferente à indução para a organogênese *in vitro* e embriogênese somática. No tecido adulto a competência para a regeneração diminui (CERVERA et al., 2008), portanto o emprego de tecidos menos diferenciados como, cotilédone, segmentos de epicótilo e segmentos hipocótilo deve favorecer a organogênese, principalmente em cultivares mais recalcitrantes.

A resposta morfogênica do explante pode ser influenciada em função de diversos fatores, como a posição do explante (horizontal ou vertical) introduzido no meio de cultura (GARCÍA-LUIS et al., 1999; BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; SILVA et al., 2005a; GARCÍA-LUIS et al., 2006), seccionamento longitudinal (MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2005a) e polaridade, apical ou basal, do segmento de epicótilo em relação ao nó cotiledonar (GARCÍA-LUIS et al., 1999; BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; COSTA et al., 2004; SILVA et al., 2005a; SCHINOR et al., 2006).

Para a indução da organogênese *in vitro* de citros, normalmente é necessária a adição de reguladores de crescimento, como citocininas e auxinas. Na maioria dos trabalhos o desenvolvimento de gemas adventícias tem sido obtido a partir do cultivo dos explantes na presença da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) (MOREIRA-DIAS et al., 2001; MOURA et al., 2001; COSTA et al., 2004; SILVA et al., 2005a, 2005b; GARCÍA-LUIZ et al., 2006).

As concentrações dos reguladores de crescimento, como o BAP, adicionados ao meio de cultura exercem grande influência sobre a regeneração dos explantes. Quando os explantes são cultivados na ausência de BAP, normalmente, não se observa a regeneração de gemas adventícias e nem a formação de calos, já aqueles cultivados na presença de concentrações elevadas de BAP, observa-se a formação de calos, mas o desenvolvimento de gemas adventícias é reduzido (MOREIRA-DIAS et al., 2000). A concentração de BAP que melhor favorece o desenvolvimento de gemas adventícias é muito variável e depende de cada genótipo em estudo (BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000).

Para algumas espécies e variedades de citros, a organogênese *in vitro* tem sido melhor induzida a partir da combinação de citocininas e auxinas (MOREIRA-DIAS et al., 2000), sendo o ácido α-naftalenoacético (NAA), a auxina mais empregada (MOREIRA-DIAS et al., 2001; GARCÍA-LUIZ et al., 1999; BORDÓN; GUARDIOLA; GARCIA-LUIS, 2000; GARCÍA-LUIZ et al., 2006). Neste caso, para o desenvolvimento de gemas adventícias, normalmente, utiliza-se uma alta concentração de citocinina combinada com uma dose baixa de auxina (MOREIRA-DIAS et al., 2000).

A análise histológica da morfogênese *in vitro* tem mostrado que o desenvolvimento das gemas adventícias ocorrem a partir de divisões periclinais das células do câmbio (GARCÍA-LUIS et al., 1999). Essas divisões celulares iniciam-se durante os primeiros dias de cultivo e promovem a formação de áreas meristemáticas na zonal cambial, as quais são responsáveis pelo desenvolvimento das gemas adventícias que se regeneram por meio da organogênese direta (ALMEIDA et al., 2006). As divisões celulares do câmbio também podem promover o desenvolvimento de calos e posterior formação de gemas adventícias caracterizando um processo de organogênese indireta (GARCÍA-LUIS et al., 1999; ALMEIDA et al., 2003).

O regime de luz na qual o explante é submetido influencia o processo de desenvolvimento das gemas adventícias. Normalmente, quando os explantes são incubados em ausência de luz têm-se um desenvolvimento maior de calos e a formação de gemas adventícias ocorre por meio de organogênese indireta (COSTA et al., 2004; MOREIRA-DIAS et al., 2000), porém, quando os explantes são cultivados diretamente na presença de luz, o desenvolvimento das gemas adventícias ocorre por meio de organogênese direta (MOREIRA-DIAS et al., 2000).

A obtenção de plantas inteiras a partir de brotos desenvolvidos *in vitro*, pode ser feita a partir do alongamento (MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2005a) e posterior enraizamento das brotações (MOREIRA-DIAS et al., 2000; MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2005a, 2005b) que são induzidos com a adição de giberelinas e auxinas, respectivamente. A forma mais empregada para a obtenção de plantas a partir de brotos desenvolvidos consiste na enxertia *in vitro* dos ápices caulinares das brotações em plântulas germinadas *in vitro* (SILVA et al., 2005a). Muitas vezes os brotos regenerados são muito pequenos, assim Kobayashi et al. (2003) e Cervera et al. (2008) sugerem a transferência destes brotos para o meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) que promove seu alongamento e facilita o pegamento da enxertia *in vitro*.

As repostas dos diferentes genótipos de citros com relação aos diversos parâmetros testados durante o estabelecimento de protocolos de regeneração são muito variáveis. Na literatura tem se observado resultados conflitantes com relação às concentrações de reguladores de crescimento utilizadas, condição de cultivo, tipo, orientação e polaridade do explante, que melhor promovem o desenvolvimento de gemas. Assim é necessário o estabelecimento de protocolos para cada espécie em estudo que possam ser utilizados para a transformação genética.

2.3 Transformação genética de citros

Os citros apresentam algumas características relacionadas à sua biologia reprodutiva, tais como, alta heterozigose, poliembrionia nucelar (apomixia), longo período juvenil e auto-incompatibilidade (GROSSER; GMITER Jr., 1990) que dificultam

a aplicação dos métodos convencionais de melhoramento genético. Deste modo, as técnicas biotecnológicas como a fusão de protoplasto e a transformação genética constituem importantes ferramentas que podem auxiliar os programas de melhoramento de citros.

A transformação genética de citros foi realizada pela primeira vez utilizando polietilenoglicol (PEG) para introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce 'Trovita' (*Citrus sinensis*) (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). Desde então, diversas espécies e variedades de citros já foram transformadas geneticamente, como laranjas doces (ALMEIDA et al., 2003; BOSCARIOL et al., 2003; YU et al., 2002), limas ácidas (PEÑA et al., 1997; DOMÍNGUEZ et al., 2000, 2004), pomelo (FEBRES et al., 2003), laranja azeda (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997, GHORBEL et al., 2000), os híbridos citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradise* x *Poncirus trifoliata*) (MOLINARI et al., 2004) e citrange 'Carrizo' (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) (PEÑA et al., 2001, 2004a).

A transformação genética de citros tem sido realizada por métodos que permitem a introdução direta de DNA, como o bombardeamento de partículas (YAO et al., 1996) e transformação de protoplastos mediada por PEG (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990; GUO; GROSSER, 2004; GUO et al., 2005), e por métodos indiretos utilizando como vetores *Agrobacterium rhizogenes* (YANG; SUN; TONG, 2006) e principalmente *Agrobacterium tumefaciens,* sendo esse o método mais empregado para a obtenção de plantas transgênicas de citros (HIDAKA et al., 1990; KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1995; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; CERVERA et al., 1998a, 1998b; GHORBEL et al., 2000, 2001; ALMEIDA et al., 2003; MOLINARI et al., 2004; PEÑA et al., 2004b; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Para a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens,* tem sido utilizado principalmente explantes provenientes de tecido juvenil, tais como segmentos de epicótilo obtido de plântulas cultivadas *in vitro* (YU et al., 2002; PEÑA et al., 2004a; DOMÍNGUEZ et al., 2004; MOLINARI et al., 2004; ANANTHAKRISHNAN et al., 2007) e segmentos internodal coletados de plantas jovens cultivadas em casa-de-vegetação (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997, FAGOAGA et al., 2001; DOMÍNGUEZ et al., 2004). A transformação genética também tem sido realizada a partir de tecido adulto, utilizando segmento internodal obtido a partir de plantas adultas mantidas em

casa-de-vegetação (ALMEIDA et al.; 2003; CERVERA et al., 1998a, 2008; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Diversos fatores podem influenciar a transformação genética de citros. Desta maneira, já foram testados o emprego de diferentes estirpes de *Agobacterium tumefaciens* (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; CERVERA et al.,1998a), o efeito da densidade da suspensão bacteriana (YU et al., 2002), a otimização do meio de cultura utilizado nas fases de co-cultivo (DOMÍNGUEZ et al., 2000, CERVERA et al., 2008), seleção/regeneração (RODRÍGUEZ et al., 2008), período de co-cultivo (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997), posição (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997) e seccionamento longitudinal dos explantes (YU et al., 2002).

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

A análise histológica de tecidos transformados tem mostrado a expressão do gene *uidA* (GUS) em células derivadas do câmbio vascular (PEÑA et al., 2004a), as quais, poderão se diferenciar em gemas adventícias. O desenvolvimento de calos é favorecido pela presença de auxina durante a fase de co-cultivo (PEÑA et al., 2004a; CERVERA et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2008), além disso, com adição de auxina no meio de co-cultivo, há um aumento na proporção do DNA em fase de duplicação (fase S do ciclo celular) favorecendo a integração do DNA exógeno no genoma da planta (PEÑA et al., 2004a).

Para a seleção das células transformadas é essencial a presença de marcadores de seleção, sendo os genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas, os mais utilizados. Em citros o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina tem sido muito empregado (MOLINARI et al., 2004; PEÑA et al., 2005; BOSCARIOL et al., 2006). Embora os agentes de seleção estejam sempre presentes durante o processo de transformação genética, a ocorrência de escapes é muito comum e tem sido relacionada à proteção das células não transformadas ao agente seletivo pelas

células transformadas adjacentes e pela persistência da *Agrobacterium tumefaciens* no tecido inoculado (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

O emprego de genes que conferem resistência a antibióticos representa um obstáculo para a aceitação pública e futura comercialização de plantas transgênicas. Como alternativa ao sistema de seleção por antibiótico, tem sido proposto o uso de sistema de seleção positiva, no qual o agente de seleção pode ser um composto não metabolizado pela planta, como por exemplo a manose. A utilização da manose como agente de seleção consiste na introdução do gene *manA,* derivado de *Escherichia coli,* que codifica a enzima fosfomanose-isomerase (PMI), a qual catalisa conversão de manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, favorecendo o crescimento de células transformadas em meio de cultura contendo manose, enquanto que as demais células têm seu crescimento inibido (BOSCARIOL et al., 2003).

Para a obtenção de plantas transrmadas geneticamente a partir das gemas adventícias regeneradas, normalmente realiza-se a enxertia *in vitro* dos ápices meristemáticos transgênicos sobre porta-enxerto não transgênico proveniente de plântulas cultivadas *in vitro* (PEÑA et al., 1995; DOMÍNGUEZ et al., 2000; FAGOAGA et al., 2001; YU et al., 2002; PEÑA et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2008; CERVERA et al., 2008). Esta técnica é utilizada devido a dificuldade de enraizamento da maioria das espécies de citros.

A transformação genética de citros tem sido realizada com sucesso possibilitando a introdução de diversos genes de interesse agronômico em diferentes variedades de citros. Podemos citar a introdução em citrange ‘Carrizo’ do gene *hal2* que confere tolerância à salinidade (CERVERA et al., 2000), a obtenção de plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ apresentando o gene que codifica a enzima PME (pectin methylesterase) relacionada com a qualidade do fruto (GUO et al., 2005), a transformação de pomelo contendo o gene *gna* promovendo resistência contra afídeos (YANG et al., 2000), a introdução dos genes *leafy* e *apetala1* de *Arabidopsis,* em plantas de citrange ‘Carrizo’, promovendo uma diminuição no período de juvenilidade e permitindo o florescimento das plantas transformadas já no primeiro ano de cultivo (PEÑA et al., 2001).

A transformação genética também tem sido realizada com o propósito de integrar seqüências gênicas no genoma da planta visando a resistência a doenças causadas por bactérias, fungos e vírus.

Desta maneira, vários genes já foram introduzidos em laranjas doces com o objetivo de promover resistência a doenças bacterianas, como o cancro cítrico e a clorose variegada dos citros. Podemos citar a introdução do gene atacina (BOSCARIOL et al., 2006) e do gene cecropina (AZEVEDO, 2005), isolados de insetos, responsáveis pela formação de peptídeos que apresentam atividade antibacteriana; a introdução do gene *hrpN*, isolado de *Erwinia amylovora,* relacionado a ativação de mecanismos de defesa da planta (BARBOSA-MENDES, 2007) e também a introdução do gene *Xa21* isolado de uma espécie selvagem de arroz (*Oryza longistaminata*), resistente a *Xanthomonas oryzae* pv*. oryzae*, visando a obtenção de plantas resistentes ao cancro cítrico (BOSCARIOL, 2004). Plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' contendo os genes *hrpN* ou o gene atacina mostraram uma redução significativa na severidade dos sintomas causados pelo cancro cítrico (BARBOSA-MENDES, 2007; BOSCARIOL et al., 2006).

Na tentativa de obter plantas resistentes a doenças causadas por fungos como a gomose de *Phytophthora*, o gene bacteriopsina (*bO*), isolado de *Halobacterium halobium,* relacionado a ativação de mecanismos de defesa da planta foi incorporado em limão 'Cravo' (AZEVEDO, 2005), assim como, o gene que codifica a proteína antimicrobiana P23 (PR-5), isolado de tomate, foi introduzido em laranja doce, promovendo maior resistência a infecção por *Phytophthora citrophthor*a (FAGOAGA et al., 2001).

Para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus a estratégia mais utilizada é baseada na resistência derivada do patógeno. O primeiro relato de utilização deste método foi descrito por Powell-Abel et al. (1986) que obteve plantas transgênicas de tabaco resistentes à infecção pelo vírus do mosaico do tabaco.

Esta estratégia tem sido utilizada por diversos pesquisadores na tentativa de obter plantas transgênicas de citros resistentes a tristeza. Deste modo, partes do genoma do CTV de diferentes estirpes, já foram introduzidos em citros, como a seqüência do gene da capa protéica (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; GHORBEL

et al., 2000; DOMÍNGUEZ et al., 2002), seqüência do gene da proteína p23 (FAGOAGA et al., 2006), seqüência do gene que codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e um fragmento do gene da proteína p23 unido a uma seqüência de regiões não transcritas (3'UTR) (FEBRES et al., 2003). Estes trabalhos foram desenvolvidos com diferentes genótipos de citros como, lima ácida (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; DOMÍNGUEZ et al., 2002), pomelo (FEBRES et al., 2003; FEBRES; LEE; MOORE, 2008), citrange 'Carrizo', laranja doce 'Pineapple' (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997) e laranja azeda (GHORBEL et al., 2000).

A introdução do gene da capa protéica do CTV em lima ácida 'Galego' promoveu um aumento na resistência destas plantas quando inoculadas com isolado do CTV por enxertia ou inoculação por afídeos. A resistência foi relacionada ao acúmulo da proteína viral nas linhagens transgênicas (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

No entanto, a resistência ao vírus nem sempre é mediada pela presença da proteína viral no genoma da planta. Um dos mecanismos empregados na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus, envolve o silenciamento gênico que pode ocorrer no nível transcricional ou no nível pós-transcricional.

O silenciamento gênico transcricional (SGT) esta associado a metilações na região do promotor inibindo a transcrição gênica. Este foi o tipo de mecanismo proposto para explicar a resistência ao CTV observada em plantas transgênicas de pomelo apresentando seqüências derivadas do genoma do CTV, como a seqüência do gene que codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) ou um fragmento do gene da proteína p23 unido a uma seqüência de regiões não transcritas (3'UTR) (FEBRES; LEE; MOORE, 2008).

O silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT) esta relacionado com a degradação de mRNA homólogo ao RNA do transgene. O SGPT pode ser induzido em plantas transgênicas a partir da introdução de seqüências do genoma viral nas orientações sense, antisense ou na forma de RNA dupla fita que é formado a partir de cópias invertidas de um fragmento do gene viral, nas orientações, sense e antisense, separadas por uma seqüência íntron, promovendo a formação de uma estrutura em forma de grampo, denominada '*hairpin'* (FAGARD; VAUCHERET, 2000). Seqüências do

genoma do CTV, em uma construção gênica do tipo *'hairpin'* já foram introduzidas em pomelo por Ananthakrishnan et al. (2007).

O mecanismo de resistência mediado pelo SGPT é desencadeado quando o RNA dupla fita é clivado por uma enzima denominada 'dicer' gerando pequenos RNAs (siRNA) que são ligados ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex) e promovem a degradação do RNA homólogo (SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007). Essa estratégia foi sugerida como o mecanismo desencadeado em algumas linhagens transgênicas de lima ácida 'Galego' contendo o gene que codifica para a proteína p23 do genoma do CTV. Essas linhagens apresentaram características típicas de SGPT, como cópias múltiplas do transgene, baixos níveis de mRNA correspondente, metilação do transgene silenciado e acúmulo de pequenos RNAs de interferência (siRNA) específicos da proteína p23 (FAGOAGA et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Os experimentos de organogênese *in vitro* e transformação genética foram realizados para as variedades limão 'Volkameriano' e laranja azeda, utilizando-se como explantes segmento internodal coletado de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, segmento de epicótilo coletado de plântulas cultivadas *in vitro* e segmento de cotilédone (2 - 3 mm) associado ao hipocótilo (1 - 2 mm) coletados de sementes germinadas *in vitro.*

As plantas de limão 'Volkameriano' e laranja azeda mantidas em casa-de-vegetação e utilizadas como matrizes para a coleta de explantes foram podadas periodicamente, preservando-se a haste principal. As brotações novas, formadas na haste principal, com cerca de 20 cm de comprimento foram coletadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) diluída em água destilada (1:1), durante 15 min. e lavadas (3x) em água destilada e esterilizada, em condições assépticas. Para a coleta dos explantes, as gemas laterais dos ramos foram retiradas e descartadas, sendo utilizados segmentos de aproximadamente 0,8 - 1,0 cm de comprimento.

As plântulas para a coleta de segmentos de epicótilo foram obtidas pela germinação *in vitro* de sementes, extraídas de frutos maduros, coletados no campo experimental de citros da ESALQ/USP, em Piracicaba/SP. As sementes foram lavadas para a retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente, por 24 h. Para a germinação, retirou-se o tegumento da semente e realizou-se a desinfestação, em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água na proporção de 3:1, durante 15 min. sob agitação constante. Após o tratamento, as sementes foram lavadas (3x) em água destilada estéril, em condições assépticas e introduzidas em tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com Phytagel ^{TM} (2,0 g L^{-1}) e sacarose (30 g L^{-1}), e pH ajustado para 5,8. A incubação foi realizada a 27 ºC, em ausência de luz, para o alongamento do epicótilo. As plântulas obtidas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h, por 10 dias e então

utilizadas para a coleta dos explantes, segmentos de epicótilo de 0,8 - 1,0 cm de comprimento.

Para a coleta dos explantes segmentos de cotilédone associados ao hipocótilo (1 - 2 mm), foram utilizadas sementes introduzidas *in vitro,* sob as mesmas condições citadas acima, e incubadas a 27 ºC, em ausência de luz, durante um período 20 dias. Para a obtenção desses explantes as sementes recém-germinadas foram cortadas em segmentos formados pela região do proximal do cotilédone (3 - 5 mm) mais o hipocótilo (1 - 2 mm) (Figura 1). Esses explantes foram incubados com a superfície abaxial em contato com meio de cultura.

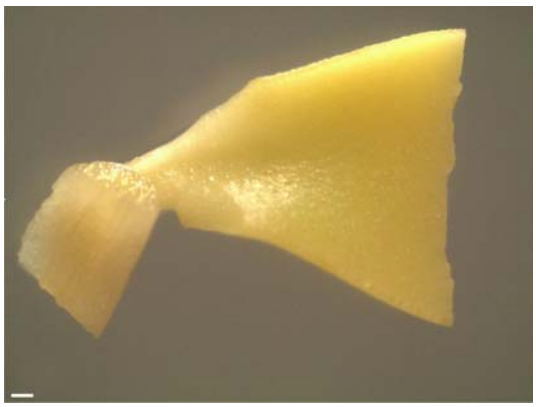

Figura 1 - Segmento de cotilédone associado a hipocótilo utilizado nos experimentos de organogênese e transformação genética em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*). Barra: 500 µm

3.2 Organogênese *in vitro*

O desenvolvimento de gemas adventícias foi estudado em função da suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg L^{-1}) e do tipo de explante (segmento internodal, segmento de epicótilo ou segmento de cotilédone associado ao hipocótilo), para as variedades limão 'Volkameriano' e laranja azeda. Para limão 'Volkameriano' avaliou-se também o efeito da incubação em ausência de luz, e posterior transferência para fotoperíodo de 16 h de luz, ou diretamente sob fotoperíodo de 16 h de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (concentrações de BAP x tipo de explante ou concentrações de BAP x condições de incubação). Nos experimentos realizados com segmento internodal e de epicótilo utilizou-se 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri, contendo 10 explantes. Cada experimento foi repetido 3 vezes. Já nos experimentos realizados com segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, foram realizadas 5 repetições, com 8 explantes cada para laranja azeda, e 4 repeticões contendo 6 explantes para limão 'Volkameriano', esses experimentos foram repetidos uma e duas vezes, respectivamente.

A avaliação dos experimento foi feita após 45 dias de cultivo, determinando-se o número de explantes com desenvolvimento de gemas adventícias (explantes responsivos) e o número de gemas desenvolvidas por explante. As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Assim, foram realizados os experimentos:

Experimento 1: avaliação do desenvolvimento de gemas adventícias em limão 'Volkameriano', utilizando-se como explante segmento internodal, incubado durante 30 dias em ausência de luz e posteriormente transferido para fotoperíodo de 16 h de luz, ou incubado diretamente sob fotoperíodo de 16 h de luz.

Experimento 2: avaliação do desenvolvimento de gemas adventícias em limão 'Volkameriano', utilizando-se como explante segmento de epicótilo e segmento internodal, introduzidos horizontalmente em meio de cultura EME (GROSSER; GMITER, 1990), suplementado com diferentes concentrações de BAP e incubados durante 30 dias em ausência de luz e posteriormente transferido para fotoperíodo de 16 h de luz.

Experimento 3: avaliação do desenvolvimento de gemas adventícias em limão 'Volkameriano', utilizando-se como explante segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, introduzidos horizontalmente em meio de cultura EME, suplementado com

diferentes concentrações de BAP e incubados durante 30 dias em ausência de luz e posteriormente transferido para fotoperíodo de 16 h de luz.

Experimento 4: avaliação do desenvolvimento de gemas adventícias em laranja azeda, utilizando-se como explante segmento de epicótilo e segmento internodal, introduzidos horizontalmente em meio de cultura EME, suplementado com diferentes concentrações de BAP e incubados durante 30 dias em ausência de luz e posteriormente transferido para fotoperíodo de 16 h de luz.

Experimento 5: avaliação do desenvolvimento de gemas adventícias em laranja azeda, utilizando-se como explante segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, introduzidos horizontalmente em meio de cultura EME, suplementado com diferentes concentrações de BAP e incubados durante 30 dias em ausência de luz e posteriormente transferido para fotoperíodo de 16 h de luz.

3.3 Análise histológica

A análise histológica da morfogênese foi realizada com os explantes segmento de epicótilo, internodal e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo para limão 'Volkameriano' e laranja azeda, cultivados em meio de cultura para indução de organogênese, constituído de meio nutritivo EME, suplementado com sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), e BAP (0,5 - 1,5 mg L^{-1}), e incubados durante 30 dias na ausência de luz.

Para a análise histológica realizada com segmentos de epicótilo e internodal, as amostras foram coletadas, após 0, 13 e 20 dias de cultivo para limão 'Volkameriano' e após 0, 10 e 24 dias de cultivo, para laranja azeda. As coletas dos segmentos de cotilédone associado ao hipocótilo foram realizadas aos 0, 13, e 20 dias de cultivo para limão 'Volkameriano' e laranja azeda.

As amostras foram fixadas em paraformaldeído (4%) e submetidas a vácuo (20 min). A desidratação foi realizada à temperatura ambiente, em série de 100% metil celosolve, etanol, propanol e butanol, seguido de imersão em butanol:meio de infiltração (1:1) (Historesina, Leica). A infiltração foi finalizada com 100% de meio de infiltração. A

emblocagem foi feita em Historesina (hidroxietilmetacrilato). A polimerização foi realizada em temperatura ambiente por 3 - 5 dias. Cortes seriados longitudinais (5 µm) foram preparados em micrótomo rotativo (Leica RM 2155), com navalha de aço, imersos em gotas de água, desidratados em chapa quente (40º) e coloridos em fuccina ácida (0,1%) e azul de toluidina (0,05%).

3.4 Transformação genética

3.4.1 Vetor de expressão e estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*

Para os experimentos de transformação genética foi utilizada a estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens,* contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com o gene de seleção *npt*II, o gene repórter *uid*A (GUS) e um fragmento do gene da capa protéica do CTV (CP), em uma construção gênica tipo "hairpin", ou seja, cópias invertidas do transgene, na orientação sense e antisense, separadas por uma seqüência íntron, como mostra a Figura 2.

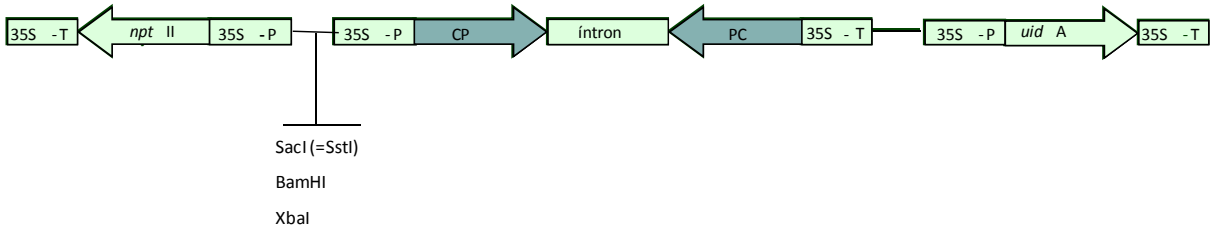

Figura 2 - Esquema do vetor de expressão, contendo um fragmento do gene da capa protéica do CTV, numa construção do tipo 'hairpin', o gene de seleção *npt*II e o gene repórter *uid*A, sob controle do promotor constitutivo 35S.

3.4.2 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

O isolado de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 utilizado para os experimentos foi conservado (-80 ºC) em solução contendo glicerol (50%) e meio de cultura YEP líquido (extrato de levedura 10 g L^{-1}, NaCl 5 g L^{-1} e peptona 10 g L^{-1}), suplementado com canamicina (50 mg L^{-1}) e rifampicina (50 mg L^{-1}). A partir desse isolado, foi

preparado um estoque de trabalho, constituído de bactéria cultivada em tubo de 2 ml contendo meio de cultura YEP sólido, suplementado com os antibióticos mencionados acima e armazenado a 4 ºC. A partir do estoque de trabalho, a bactéria foi transferida para meio de cultura YEP sólido, com os mesmos antibióticos e cultivada a 27 ºC, por 72 h. Para o preparo do inóculo, uma colônia isolada foi transferida para o meio de cultura YEP líquido, contendo os mesmos antibióticos, e incubado por 16 h, em agitador orbital (28ºC/180 rpm). Posteriormente a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4800 rpm durante 15 min, à temperatura de 15 ºC, e então o precipitado formado foi ressuspendido em meio de cultura MS, na concentração de 5 x 10^8 a 10^9 UFC/ml.

3.4.3 Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética foi realizada com as variedades limão 'Volkameriano' e laranja azeda, utilizando-se segmentos internodal (± 0,8 cm), coletados de plantas mantidas em casa-de-vegetação, segmentos de epicótilo, obtido de plântulas cultivadas *in vitro* e segmento de cotilédone (3 - 2 mm) associado ao hipocótilo (1 - 2 mm), obtidos de sementes germinadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados com a suspensão bacteriana, em placa de Petri, durante 15 min. Em seguida, secos em papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactéria, e então introduzidos em meio de cultura de co-cultivo EME suplementado com 1,0 mg L^{-1} de BAP para limão 'Volkameriano' e 0,5 mg L^{-1} de BAP para laranja azeda, acetoseringona (100 mM L^{-1}), ácido ascórbico (5 mg L^{-1}), sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), e pH ajustado para 5,5. Os explantes, segmento internodal e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, também foram introduzidos em meio de co-cultivo EME suplementado com ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D - 2,0 mg L^{-1}), ácido α-naftalenoacético (NAA - 1,0 mg L^{-1}) e 2-isopentenil-adenina (2-ip - 1,0 mg L^{-1}). A incubação foi realizada à temperatura de 24 °C, por 2 dias, em ausência de luz.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de transformação, foi testada a sonicação (50/60 Hz/30 s) dos explantes, antes ou durante a inoculação com a suspensão bacteriana.

3.4.4 Seleção, regeneração e aclimatização das plantas

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção, EME suplementado com a mesma concentração de BAP utilizada durante o período de co-cultivo, sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), ácido ascórbico (5 mg L^{-1}), canamicina (100 mg L^{-1}), cefotaxima sódica (500 mg L^{-1}) ou timentin (400 mg L^{-1}), para controle do crescimento da *Agrobacterium,* e pH ajustado para 5,8*.* Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias.

As gemas adventícias desenvolvidas foram avaliadas pelo teste histoquímico GUS, para identificação de gemas transgênicas. Um segmento pequeno do tecido foliar desenvolvido (3 - 4 mm), foi coletado e incubado com solução X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida), à temperatura de 37 °C, durante 16 h, em ausência de luz. Após o período de reação, o material foi lavado com álcool 70% e analisado. A análise foi realizada em microscópio estereoscópico para a identificação da coloração azul.

As gemas que apresentaram reação positiva no teste GUS foram enxertadas *in vitro* em plântula de citrange 'Carrizo', germinada *in vitro,* e incubadas sob fotoperíodo de 16 h, a 27 ºC para pegamento da enxertia e desenvolvimento das plântulas. A plântula desenvolvida foi posteriormente transferida para um vaso plástico contendo substrato autoclavado Rendmax Citrus™ (Eucatex) e incubada em condições da alta umidade relativa para aclimatização. Após a aclimatização, a planta foi transferida para vaso maior e mantida em casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas.

3.5 Análise de DNA

A confirmação da transformação genética foi realizada pela análise de PCR. O DNA foi extraído de folha de plântulas microenxertadas cultivadas *in vitro*, pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). A análise de PCR foi realizada em termociclador PTC 100 (MJ Research) utilizando 'primers' específicos para a detecção do gene da capa protéica do CTV 5'- ATGGACGACGAAACAAAG – 3' e 5'- CAACGTGTGTTGAATTTCC – 3'. As reações foram realizadas utilizando-se 39 ciclos 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 ºC por 40 s, mais uma extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos da amplificação

foram separados por eletroforese, aplicando-se as amostras em gel de agorose 1%, tampão TBE (0,5 x), a uma voltagem de 65 V. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), visualizado e fotografado em luz UV.

3.6 Análise histológica associada ao teste histoquímico GUS

Segmentos internodais de limão 'Volkameriano' coletados 5 dias após a inoculação com a suspensão bacteriana, ou seja, 3 dias após sua transferência do meio de co-cultivo para o meio de seleção, foram incubados com solução X-GLUC, à temperatura de 37 °C, durante 16 h, em ausência de luz. Após o período de reação, o material foi lavado com álcool 70% para a remoção da clorofila e desidratado em série de etanol 80%, etanol 90%, etanol 95% e etanol 100%, seguido de imersão em etanol (100%):meio de infiltração (1:1) (Historesina, Leica). A infiltração foi finalizada com 100% de meio de infiltração. A emblocagem foi feita em Historesina (hidroxietilmetacrilato). A polimerização foi realizada em temperatura ambiente por 3 - 5 dias. Cortes seriados longitudinais (10 µm) foram preparados em micrótomo rotativo (Leica RM 2155), com navalha de aço, imersos em gotas de água, desidratados em chapa quente (40º) e observados em microscópio para a análise da expressão transiente do gene *uidA* (GUS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Organogênese *in vitro*

A organogênese *in vitro* foi estudada em função de diferentes concentrações de regulador vegetal, tipo de explante e condições de incubação para limão 'Volkameriano' e laranja azeda.

Inicialmente, avaliou-se a resposta morfogênica em segmento internodal de limão 'Volkameriano' introduzido horizontalmente em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de regulador vegetal e mantido diretamente sob o fotoperíodo de 16 h de luz ou em ausência de luz durante 30 dias seguido do cultivo sob o fotoperíodo de 16 h (Tabela 1).

Tabela 1 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento internodal de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), cultivado em diferentes concentrações de BAP e condições de incubação.

	nº de explantes responsivos/ total de explante (%)*			nº de gemas por explante*		
	condições de incubação			condições de incubação		
BAP (mg L^{-1})	escuro	16 h de luz	Média	escuro	16 h de luz	média
0,0	0,00/10 (0,0)	0,00/10 (0,0)	0,00/10 (0,0) B	0,00	0,00	0,00 B
0,5	0,40/10 (4,0)	0,20/10 (2,0)	0,30/10 (3,0) B	0,07	0,02	0,05 B
1,0	2,13/10 (21)	0,46/10 (4,6)	1,30/10 (13) A	0,34	0,04	0,19 A
1,5	1,73/10 (17)	0,53/10 (5,3)	1,13/10(11) A	0,27	0,05	0,16 A
média	1,00/10 (10) a	0,30/10 (3,0) b		0,17 a	0,03b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey $p < 0,05$)

*Médias obtidas a partir de 3 experimentos independentes, com 5 repetições cada, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 10 explantes, total de 50 explantes por experimento.

Pela análise dos dados apresentados na Tabela 1 foi possível notar que a incubação dos explantes em ausência de luz promoveu um maior desenvolvimento de gemas adventícias em comparação com aqueles incubados sob fotoperíodo de 16 h de

luz. Os tratamentos com 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP e incubação em ausência de luz permitiu que 17 e 21% dos explantes apresentassem o desenvolvimento de gemas adventícias (explantes responsivos), enquanto que apenas 4 e 5% dos explantes incubados diretamente sob o fotoperíodo de 16 h foram responsivos. O cultivo dos explantes em ausência de luz na presença de 1,0 - 1,5 mg L^{-1} de BAP também favoreceu o desenvolvimento de um maior número de gemas por explante.

Semelhante ao resultado obtido neste estudo, Silva et al. (2005b) também verificaram em tangerina 'Cleopatra' que a organogênese foi mais eficiente com o cultivo dos explantes em condições de escuro por 30 dias, esses resultados foram obtidos a partir do cultivo de segmentos de epicótilo em meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com 2,0 mg $L^{-1.}$ de BAP. Bordón, Guardiola e García-Luis (2000) verificaram em laranja azeda, o desenvolvimento de um maior número de gemas por explante, quando segmentos de epicótilo foram cultivados em condições de escuro em meio de cultura MS suplementado com 5,0 mg L^{-1} de BAP. Resultado divergente foi relatado em citrange 'Troyer', onde foi constatado que na presença de luz houve a formação de um maior número de gemas por explante (MOREIRA-DIAS et al., 2000).

Mediante os resultados obtidos neste primeiro experimento, realizou-se a incubação dos explantes, dos experimentos posteriores, em ausência de luz por um período de 30 dias, sendo em seguida, transferidos para fotoperíodo de 16 h de luz.

Assim, a organogênese *in vitro* foi estudada em segmento de epicótilo e segmento internodal, de limão 'Volkameriano' e laranja azeda, introduzidos horizontalmente em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP (Tabelas 2 e 3). Gemas adventícias desenvolveram-se nas extremidades desses explantes e puderam ser enxertadas *in vitro*, sendo possível a obtenção de plântulas que foram aclimatizadas e transferidas para a casa-de-vegetação (Figuras 3 - 4).

A análise dos dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 mostram que a presença da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) foi essencial para o desenvolvimento de gemas adventícias tanto em limão 'Volkameriano', quanto em laranja azeda. No entanto, as concentrações de BAP, que resultaram em um maior número de explantes com desenvolvimento de gemas adventícias foram diferentes para cada uma das espécies.

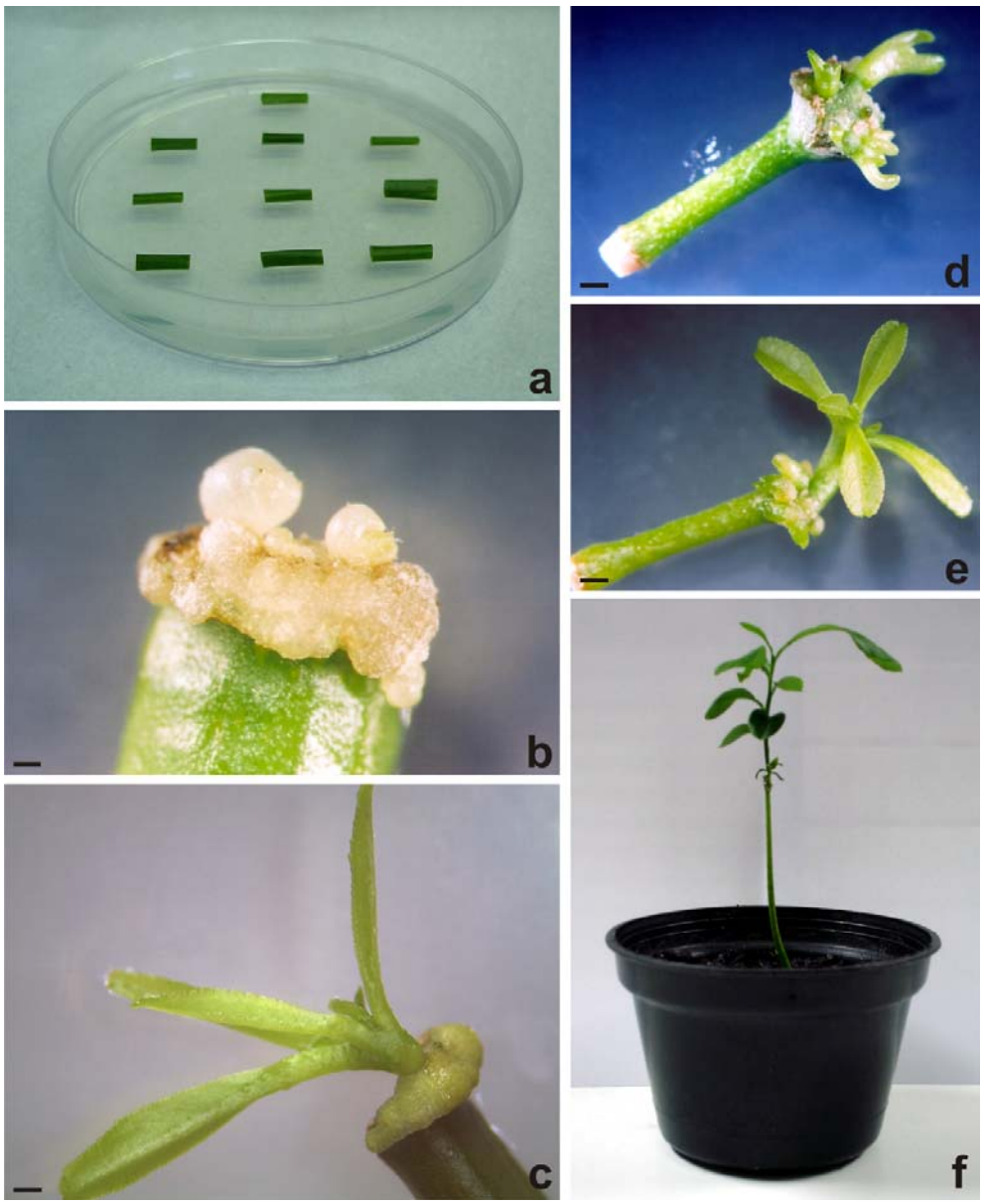

Figura 3 - Organogênese *in vitro* em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*). a) Explante inicial (segmento internodal). b) Gemas adventícias obtidas de segmento internodal, após 30 dias de cultivo em ausência de luz. c) Desenvolvimento de gemas obtidas a partir de segmento internodal, após 60 dias de cultivo. d) Gemas adventícias obtidas de segmento de epicótilo, cultivado por 30 dias no escuro seguido do cultivo durante 15 dias sob o fotoperíodo de 16 h de luz. e) Desenvolvimento de gemas adventícias obtidas a partir de segmento de epicótilo após 60 dias de cultivo. f) Desenvolvimento de plântula enxertada *in vitro* em citrange 'Carrizo'. Barras: 500 µm (c,d,e), 1000 µm (b).

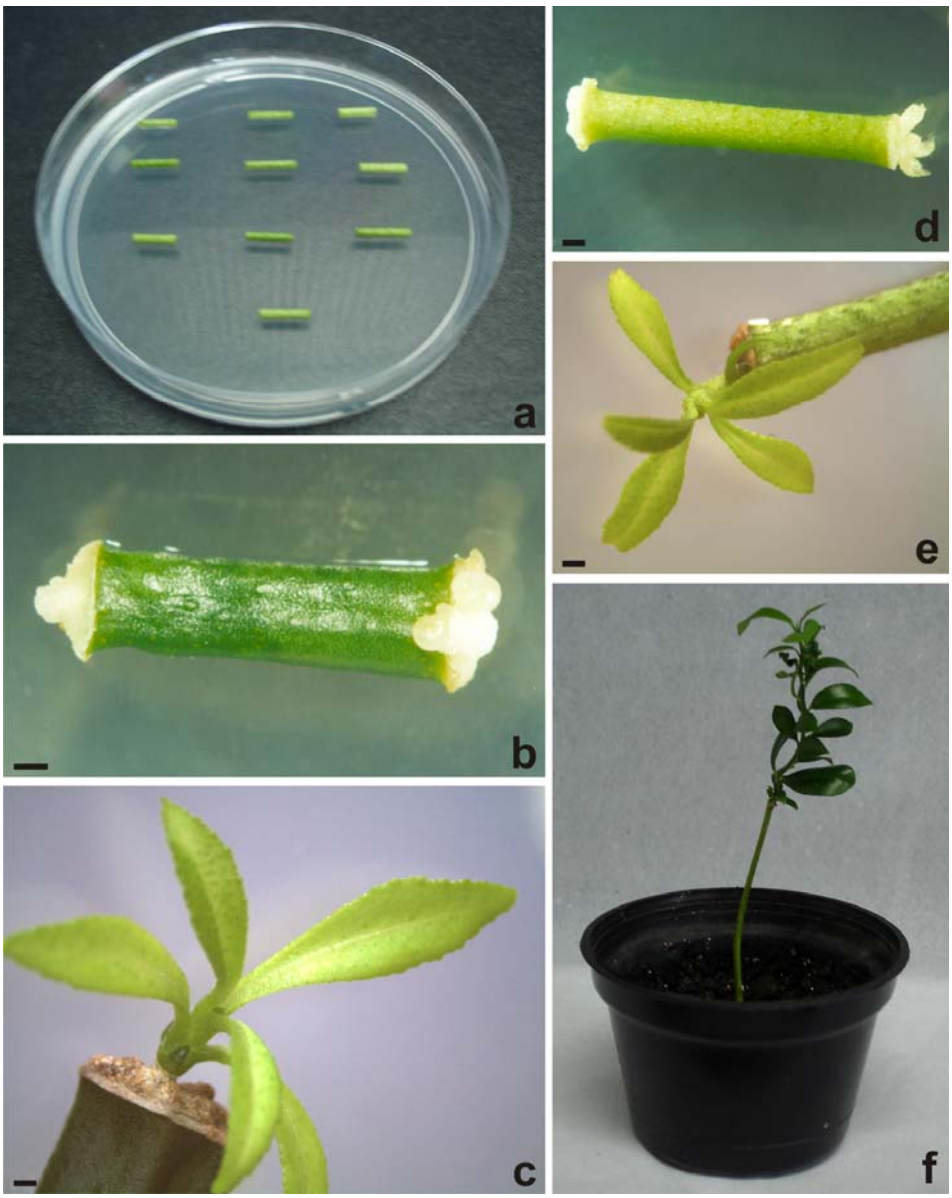

Figura 4 - Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium*). a) Explante inicial (segmento de epicótilo). b) Gemas adventícias obtidas de segmento internodal, após 30 dias de cultivo em ausência de luz. c) Desenvolvimento de gemas obtidas a partir de segmento internodal, após 60 dias de cultivo. d) Gemas adventícias obtidas de segmento de epicótilo, após 30 dias de cultivo em ausência de luz. e) Desenvolvimento de gemas obtidas a partir de segmento de epicótilo após 90 dias de cultivo. f) Desenvolvimento de plântula enxertada *in vitro* em cintrange 'Carrizo'. Barras: 500 µm (b,c,d,e).

Para limão 'Volkameriano' (Tabela 2) a suplementação do meio de cultura com 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP garantiu os melhores resultados em relação ao percentual de explante que desenvolveram gemas adventícias (33 e 34% de explantes responsivos), enquanto que para laranja azeda a melhor resposta (49 e 50% de explantes responsivos) foi obtida na presença de 0,5 e 1,0 mg L^{-1} de BAP, sendo que o uso de concentrações de BAP acima de 1,0 mg L^{-1} resultou em uma diminuição no número de explantes responsivos (Tabela 3).

Tabela 2 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento internodal e de epicótilo, de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP.

	nº de explantes responsivos/ total de explante (%)*			nº de gemas por explante*		
	tipos de explantes			tipos de explantes		
BAP (mg L^{-1})	seg. epicótilo	seg. internodal	média	seg. epicótilo	seg. internodal	média
0,0	0,60/10 (6,0)	0,06/10 (0,6)	0,33/10 (3,0) C	0,06	0,06	0,06 C
0,5	2,46/10 (24)	1,13/10 (11)	1,80/10 (18) B	0,52	0,19	0,35 B
1,0	4,20/10 (42)	2,40/10 (24)	3,30/10 (33) A	1,04	0,45	0,74 A
1,5	3,73/10 (37)	3,07/10 (30)	3,40/10 (34) A	0,92	0,43	0,67 A
média	2,75/10 (27) a	1,67/10 (16) b		0,63 a	0,28 b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey $p < 0,05$).
* Médias obtidas a partir de 3 experimentos independentes, com 5 repetições cada, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 10 explantes, total de 50 explantes por experimento.

Os resultados obtidos nestes experimentos foram divergentes daqueles já relatados, em segmentos de epicótilo de limão 'Volkameriano' e laranja azeda (SCHINOR et al., 2006), onde foi constatada uma maior freqüência de regeneração, em laranja azeda (77,3% de explantes responsivos) na ausência de BAP e não foi notada diferenças na taxa de formação de gemas em limão 'Volkameriano' tanto na presença de 1,0 mg L^{-1} de BAP (67,6% de explantes responsivos) quanto na ausência da

citocinina (69,3% de explantes responsivos). Essas diferenças nos resultados podem estar relacionadas ao material vegetal e a idade do explante.

Em relação ao número de gemas adventícias desenvolvidas por explante, observou-se, para limão 'Volkameriano', que os melhores resultados foram alcançados com o cultivo dos explantes em meio de cultura suplementado com 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP, na presença dessas concentrações de regulador verificou-se que o número de gemas desenvolvidas pelo total de explante foi de 0,74 e 0,67, respectivamente. Já em laranja azeda, constatou-se que as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP favoreceram os melhores resultados, tendo sido obtido 0,86; 0,79 e 0,63 gemas pelo total de explante, respectivamente.

Tabela 3 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento internodal e de epicótilo de laranja azeda (*Citrus aurantium*), cultivados em diferentes concentrações de BAP.

	nº de explantes responsivos/ total de explante (%)*			nº de gemas por explante*		
	tipos de explantes			tipos de explantes		
BAP (mg L^{-1})	seg. epicótilo	seg. internodal	média	seg. epicótilo	seg. internodal	média
0,0	2,33/10 (23)	0,00/10 (0,0)	1,16/10 (11) C	0,26	0,00	0,13 C
0,5	5,93/10 (59)	3,93/10 (39)	4,93/10 (49) A	1,07	0,67	0,86 A
1,0	5,13/10 (51)	4,86/10 (48)	5,00/10 (50) A	0,80	0,78	0,79 A
1,5	3,79/10 (37)	3,53/10 (35)	3,66/10 (36) B	0,58	0,68	0,63 AB
2,0	3,60/10 (36)	2,20/10 (22)	2,90/10 (29) B	0,59	0,40	0,49 B
média	4,16/10 (41) a	2,90/10 (29) b		0,66 a	0,50 b	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey $p < 0,05$).
*Médias obtidas a partir de 3 experimentos independentes com 5 repetições cada, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 10 explantes, total de 50 explantes por experimento

Semelhante ao resultado obtido neste trabalho, Schinor et al. (2006) também verificaram em limão 'Volkameriano' que a concentração de 1,0 mg L^{-1} de BAP proporcionou a formação de um maior número de gemas por explante (1,5 gemas por explante), no entanto, em laranja azeda, esses mesmos pesquisadores não notaram

diferenças significativas no número de gemas por explante tanto na ausência (1,3 gemas por explante) quanto na presença de 1,0 mg L^{-1} de BAP (1,4 gemas por explante). Bordón, Guardiola e García-Luis (2000) estudando a organogênese *in vitro* de diversos porta-enxertos, verificaram em laranja azeda, que a suplementação do meio de cultura com 1,0 mg L^{-1} de BAP e 0,1 mg L^{-1} de NAA promoveu o desenvolvimento de 1,6 gemas por explante, esse resultado foi obtido na extremidade apical de segmentos de epicótilo introduzidos horizontalmente em meio de cultura MS e cultivados na presença de luz.

Embora a organogênese normalmente seja estimulada com o uso de reguladores vegetais, altas concentrações de BAP tem mostrado um efeito inibitório sobre o desenvolvimento de gemas, isto pode ser observado neste estudo, em laranja azeda, onde verificou-se que na presença de 2,0 mg L^{-1} de BAP, houve uma redução tanto no número de explantes responsivos quanto no número de gemas por explante, sendo que esse efeito foi mais pronunciado em segmento internodal (Tabela 3). Silva et al. (2005b) também notaram uma redução na resposta morfogênica em segmentos de epicótilo de tangerina 'Cleópatra', quando concentrações acima de 2,0 mg L^{-1} de BAP foram adicionadas ao meio de cultura.

Pela análise dos dados referentes ao tipo de explante (Tabelas 2 e 3) pode-se verificar que o maior desenvolvimento de gemas adventícias foi obtido com segmento de epicótilo tanto para limão 'Volkameriano' (27% explantes responsivos) quanto para laranja azeda (41% explantes responsivos) em comparação com segmento internodal, onde as porcentagens de explante responsivos foram de 16% para limão 'Volkameriano' e 29% para laranja azeda. Em segmento de epicótilo também foi observado o desenvolvimento de um maior número de gemas por explante para ambas as espécies.

Em razão da baixa taxa de desenvolvimento de gemas adventícias a partir do cultivo de segmento internodal e segmento de epicótilo e principalmente da dificuldade em se obter gemas transgênicas a partir do uso dos respectivos segmentos, buscou–se o emprego de um explante alternativo proveniente de tecidos menos diferenciados, na tentativa de promover uma maior taxa de regeneração. Assim, segmentos de cotilédone associados ao hipocótilo (Figura 5a), obtidos de sementes de limão 'Volkameriano' e

laranja azeda introduzidas *in vitro* foram cultivados na presença de diferentes concentrações de BAP a fim de analisar sua resposta morfogênica (Tabelas 4 e 5).

Os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5 mostram que semelhante aos explantes, segmento internodal e de epicótilo, a presença de citocinina (BAP) também foi essencial para o desenvolvimento de gemas adventícias a partir do segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, no entanto, não houveram diferenças significativas no número de explantes responsivos, quando diferentes concentrações de BAP foram testadas, nas duas espécies em estudo. Embora não tenha sido constatada diferenças significativas no número de explantes responsivos, verificou-se uma tendência de maior desenvolvimento de gemas adventícias na presença de 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP para limão 'Volkameriano e de 0,5 e 1,0 mg L^{-1} de BAP para laranja azeda, esse resultado foi semelhante ao observado nas respectivas espécies, a partir do cultivo de segmento de epicótilo e internodal.

Tabela 4 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP.

BAP (mg L^{-1})	nº de explantes responsivos/ total de explante (%)	nº gemas por explante
0,0	0,62/6 (10,4) b	0,20 c
0,5	3,62/6 (60,45) a	2,94 b
1,0	4,62/6 (77,0) a	4,56 a
1,5	4,50/6 (75,0) a	4,45 ab
média	3,34/6 (55,7)	2,3

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey $p < 0,05$).
*Médias obtidas a partir de 2 experimentos independentes com 4 repetições cada, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 6 explantes, total de 24 explantes em cada experimento.

Nos experimentos realizados com segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, verificou-se que a porcentagem de explantes reponsivos, na presença de BAP, foi de aproximadamente 60 a 75% em limão 'Volkameriano', já em laranja azeda constatou-se que cerca de 52 a 75% dos explante desenvolveram gemas adventícias. Mesmo não tendo sido realizada análise estatística para comparar os resultados obtidos

com os três tipos de explantes, visto que os experimentos realizados com segmento de cotilédone associado ao hipocótilo foram feitos em épocas diferentes daqueles utilizando segmento internodal e de epicótilo, verificou-se que a taxa de regeneração do explante, segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, foi maior do que aquela obtida a partir de segmento internodal (11 a 30% para limão 'Volkameriano' e 22 a 39% para laranja azeda) e segmento de epicótilo (24 a 42% para limão 'Volkameriano' e 36 a 59% para laranja azeda), na presença da citocinina BAP.

Tabela 5 - Organogênese *in vitro* a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo de laranja azeda (*Citrus aurantium*), cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de BAP

BAP (mg L^{-1})	nº de explantes responsivos/ total de explante (%)	nº gemas por explante
0,0	0/8 (0,0) b	0 c
0,5	6/8 (75,0) a	3,7 a
1,0	5,4/8 (67,5) a	2,8 ab
1,5	4,2/8 (52,5) a	1,5 b
média	3,9/8 (48,7)	2

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não apresentam diferenças significativas (Tukey $p < 0,05$).
*Médias obtidas a partir de 1 experimento com 5 repetições cada, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri, contendo 8 explantes, total de 40 explante no experimento.

Quanto ao número de gemas adventícias desenvolvidas por explante constatou-se que as melhores resposta foram obtidas para limão 'Volkameriano' com o fornecimento de 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP, onde verificou-se o desenvolvimento de 4,56 e 4,45 gemas por explante, respectivamente, enquanto em laranja azeda, as concentrações 0,5 e 1,0 mg L^{-1} de BAP proporcionaram a formação de 3,7 e 2,8 gemas por explante, respectivamente.

A organogênese *in vitro* a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo foi estudada em *Curcubita pepo* (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2006). Semelhante ao resultado alcançado neste trabalho, a organogênese em *C. pepo* também foi obtida na presença de citocinina (BAP). No

entanto, diferente do ocorrido em laranja azeda e limão 'Volkameriano', onde verificou-se o desenvolvimento de gemas adventícicas apenas no hipocótilo (Figura 5b-d), em *C pepo*, as gemas adventícias formaram-se na área de junção do cotilédone com o hipocótilo (ANANTHAKRISHNAN et al., 2003).

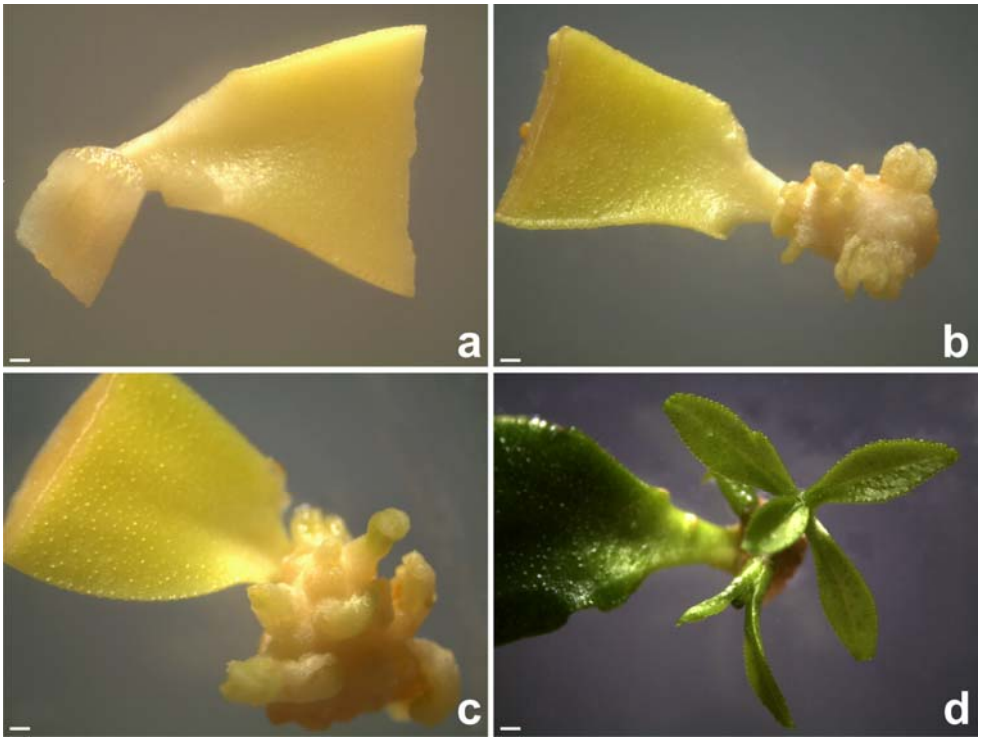

Figura 5 - Organogênese *in vitro* em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo como explante. a) Explante inicial. b) c) Desenvolvimento de gemas adventícias na região do hipocótilo, em laranja azeda (b) e limão 'Volkameriano' (c) após 20 dias de cultivo em ausência de luz. d) Brotos de laranja azeda desenvolvidos após 45 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com 0,5 mg L^{-1} de BAP. Barras: 500 µm (a,b,c,d).

4.2 Análise histológica da morfogênese

A análise histológica da morfogênese foi realizada com as duas espécies em estudo, por meio de cortes histológicos longitudinais e transversais em segmentos internodais, segmentos de epicótilo e segmentos de cotilédone associado ao hipocótilo cultivados em meio de cultura para a indução da organogênese.

Inicialmente, realizou-se a análise histológica com segmento internodal e segmento de epicótilo de obtidos de limão 'Volkameriano' e laranja azeda. Por meio de cortes histológicos transversais e longitudinais feitos nos explantes utilizados para iniciar o cultivo *in vitro*, observou-se que sua estrutura é formada por uma epiderme unisseriada, por um córtex constituído por células de diversas formas e tamanhos, por um cilindro vascular composto externamente pelas células constituintes do floema, seguido do câmbio vascular constituído por células meristemáticas e internamente pelas células que compõe o xilema, e uma região central formada por células parenquimáticas (Figura 6a-c; Figura 7a-d). Após aproximadamente 10 dias de cultivo *in vitro* desses explantes em meio de cultura suplementado com a citocinina BAP, notou-se o início do desenvolvimento de calos nas extremidades desses segmentos. Conforme foi demonstrado por meio de cortes histológicos longitudinais, a formação desses calos foi causada por divisões, principalmente no plano periclinal, das células meristemáticas do câmbio vascular próximas a extremidade do explante (Figura 6d-e; Figura 7e-f). Nos calos desenvolvidos, observou-se a presença de áreas meristemáticas, as quais foram responsáveis pela formação das gemas adventícias que foram observadas após aproximadamente 20 dias de cultivo *in vitro* (Figura 6g-h; Figura 7g-h). Dessa forma, verificou-se que o processo de desenvolvimento de gemas adventícias a partir desses explantes ocorreu por meio de organogenese indireta.

De maneira semelhante ao observado neste trabalho, em estudos relacionados com a caracterização anatômica da morfogênese realizados com laranja 'Valência' utilizando segmento internodal (ALMEIDA et al., 2003) e segmento de epicótilo (ALMEIDA et al., 2006), e com citrange 'Troyer' utilizando segmento de epicótilo (GARCÍA-LUIS et al., 1999), demonstrou-se que o processo de desenvolvimento de gemas adventícias tem início com a divisão celular na região da câmbio vascular, porém nesses estudos relatou-se que a organogênese pode ocorrer de maneira direta

ou indireta, dependendo da polaridade, orientação (GARCÍA-LUIS et al., 1999) e condição de cultivo dos explantes (ALMEIDA et al., 2003).

Com relação ao processo de morfogênese ocorrido a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, nas duas espécies em estudo, verificou-se que após o início do cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo citocinina (BAP), alterações estruturais foram visíveis apenas na região do hipocótilo. Cortes histológicos longitudinais feitos nos explantes utilizados para iniciar o cultivo *in vitro* (Figura 8a) e comparados com cortes histológicos realizados em explantes coletados após 13 dias de cultivo *in vitro*, confirmaram que essas modificações estruturais foram restritas a região do hipocótilo. Por meio dos cortes histológicos realizados com os explantes nessa fase de desenvolvimento (Figura 8b-c) e após 20 dias de cultivo *in vitro* (Figura 8d) foi possível observar a formação de calos e o desenvolvimento de gemas adventícias. Semelhante ao observado com segmento internodal e segmento de epicótilo, os calos foram desenvolvidos a partir de divisões celulares na região do câmbio vascular e a formação de gemas adventícias ocorreu por meio de organogênese indireta (Figura 8c).

Pela análise histológica, do processo de morfogênese, realizado com os três tipos de explantes utilizados para a indução de organogênese *in vitro* e obtidos tanto de limão 'Volkameriano' quanto de laranja azeda, constatou-se que as gemas adventícias tiveram origem endógena, sendo formadas a partir de calos. As gemas desenvolvidas apresentaram primódios foliares, meristema apical e conexão vascular com o tecido do explante (Figura 7g; Figura 8d).

Esses resultados referentes a origem das gemas adventícias são de grande importância quando pretende-se estabelecer protocolos de organogênese *in vitro* que estejam associados a transformação genética, visto que para a obtenção de gemas transgênicas é necessário o contato da *Agrobacterium tumefaciens* com as células que irão se diferenciar em gemas adventícias.

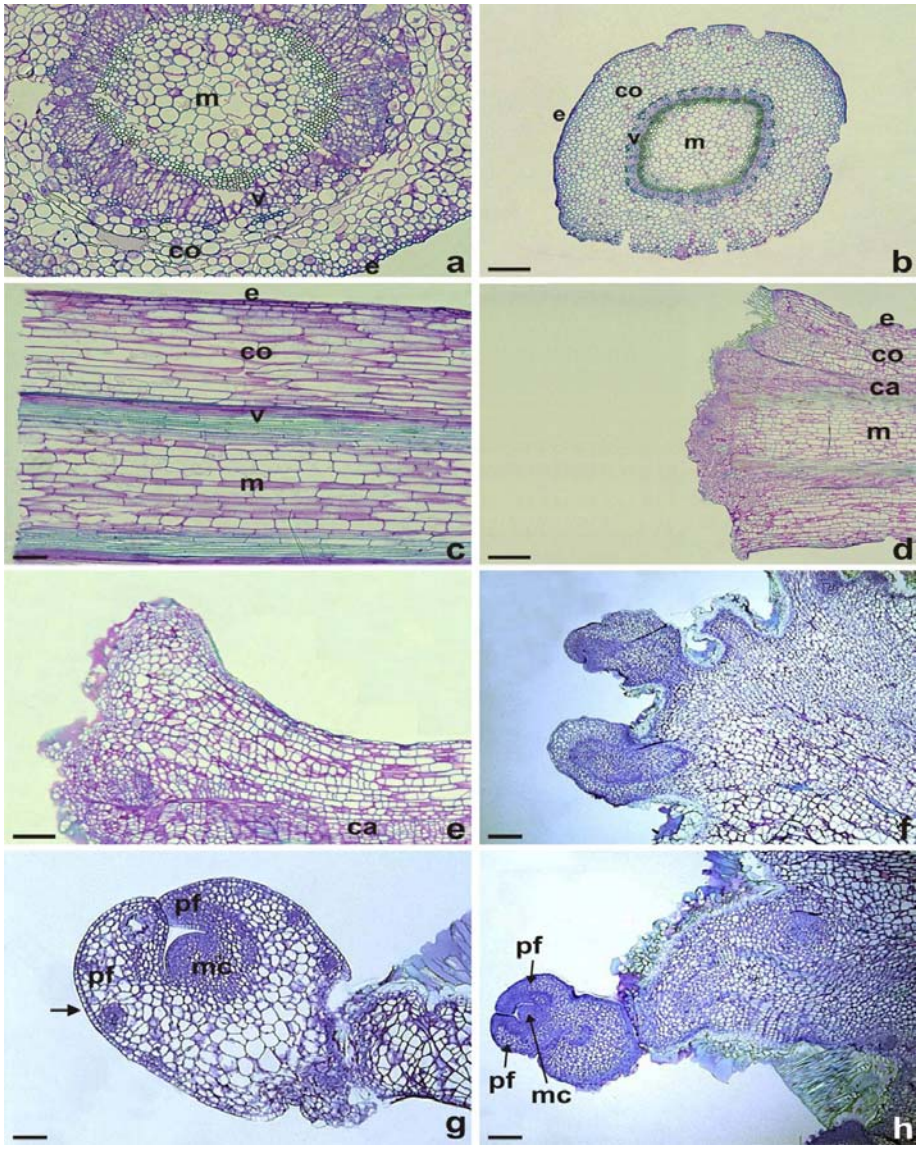

Figura 6 - Análise histológica do processo organogênico em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) a partir de segmento de epicótilo. a-b) Cortes transversais do explante inicial de limão 'Volkameriano' (a) e laranja azeda (b), apresentando epiderme (e), córtex (co), sistema vascular (v) e medula (m). c) características anatômicas gerais do explante inicial visualizadas em corte longitudinal de laranja azeda. d-e). Corte longitudinal de laranja azeda após 10 dias de cultivo *in vitro* (d) e limão 'Volkameriano' após 13 dias de cultivo *in vitro* (e), mostrando espessamento da extremidade do explante devido a divisões celulares na região do câmbio vascular. f) Corte histológico de laranja azeda, evidenciando o início de formação de gema adventícia. g-h). Cortes histológicos de limão 'Volkameriano' (g) e de laranja azeda (h) com gemas adventícias, após 20 e 24 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente, com presença de meristema caulinar (mc), primórdios foliares (pf) e epiderme bem definida (seta). Barras: 50 µm (g), 100 µm (a, c, f, h), 200 µm (b, d, e).

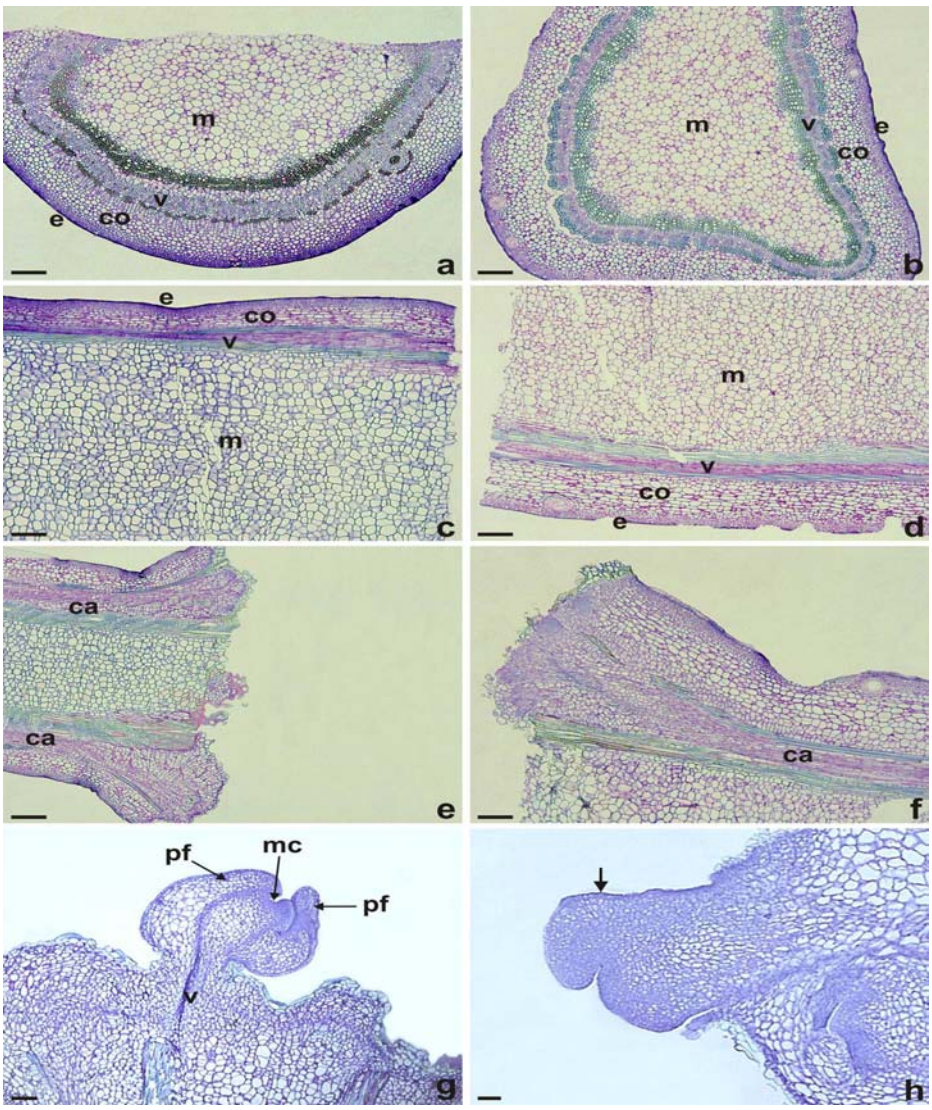

Figura 7 - Análise histológica do processo organogênico em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) a partir de segmento internodal. a-d) Cortes transversais de limão 'Volkameriano' (a) e laranja azeda (b) e cortes longitudinais de limão 'Volkameriano' (c) e laranja azeda (d) do segmento internodal utilizado como explante, com a presença de epiderme (e), córtex, (co), sistema vascular (v) e medula (m). e-f) Cortes longitudinais de laranja azeda após 10 dias de cultivo *in vitro* (e) e de limão 'Volkameriano' após 13 dias de cultivo *in vitro* (f), apresentando divisões celulares na região do câmbio vascular (ca), com conseqüente espessamento da extremidade do explante. g) Corte histológico de limão 'Volkameriano', após 20 dias de cultivo *in vitro*, com gema adventícia, exibindo meristema caulinar (mc), primórdios foliares (pf) e sistema vascular (v). h) Corte histológico de laranja azeda, após 24 dias de cultivo *in vitro*, com gema adventícia em desenvolvimento, apresentando epiderme definida (seta) e com áreas meristemáticas. Barras: 50 µm (h), 100 µm (g), 200 µm (a,b,c,d,ef).

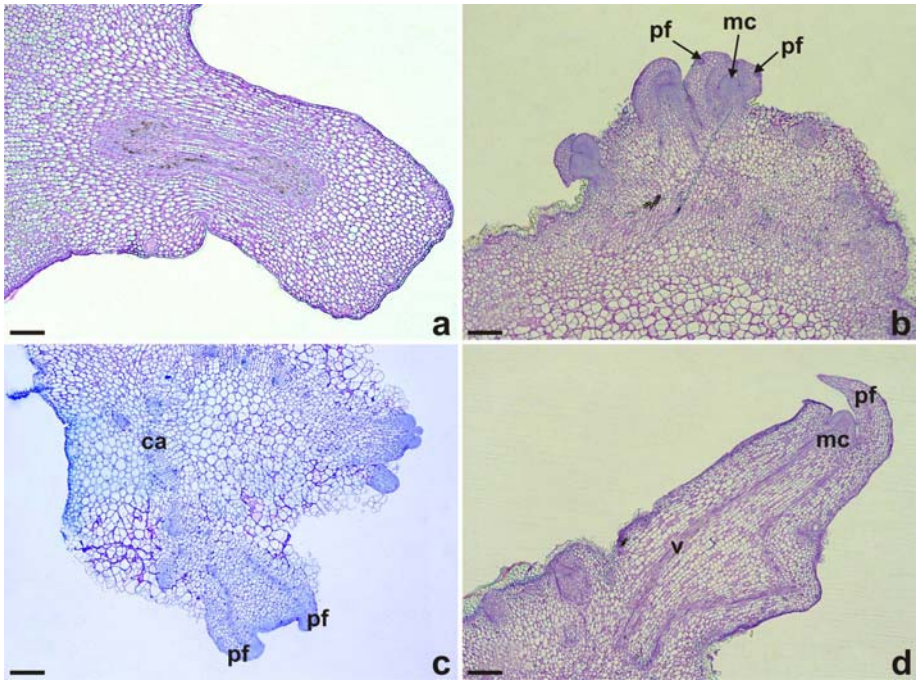

Figura 8 - Análise histológica do processo organogênico em limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*) a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo. a) Corte histológico do explante inicial, apresentando caracterísiticas anatômicas gerais. b) Desenvolvimento de gemas adventícias em laranja azeda, após 13 dias de cultivo *in vitro*. c-d) Cortes histológicos mostrando divisões celulares na região do câmbio vascular (ca) e formação de gemas adventícias a partir dessa região em limão 'Volkameriano' (c) e em laranja azeda (d), com meristema caulinar (mc), primórdios foliares (pf), sistema vascular (v) e epiderme (seta), após 20 dias de cultivo *in vitro*. Barras: 200 μm (a, b, c, d).

4.3 Transformação genética

A transformação genética foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com uma seqüência do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros numa construção gênica tipo 'hairpin' (dsCP-CTV). Os experimentos foram realizados com as espécies, limão 'Volkameriano' (39 experimentos) e laranja azeda (28 experimentos), tendo sido utilizado os seguintes explantes, segmento internodal, segmento de epicótilo e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo. Esses explantes foram mantidos em meio de co-cultivo e seleção, suplementado com concentração de BAP estabelecida durante os experimentos de organogênese (1,0 mg L^{-1} de BAP para limão 'Volkameriano' e 0,5 mg L^{-1} de BAP para laranja azeda).

Nos experimentos de transformação genética realizados a partir de segmentos internodais, obtido de plantas de limão 'Volkameriano' cultivadas em casa-de-vegetação (28 experimentos), verificou-se o desenvolvimento de gemas adventícias em 248 explantes (explantes responsivos) de um total de 4978 explantes inoculados com a suspensão bacteriana (Tabela 6). Para a identificação das gemas transgênicas, realizou-se o teste histoquímico GUS em 94 gemas adventícias, sendo que 2 mostram reação positiva (Figura 9b). A eficiência de transformação foi de 0,58%, esse valor foi obtido calculando-se o número de gemas GUS positivas pelo número total de explantes utilizados nos experimentos onde essas gemas foram regeneradas.

Nos experimentos de transformação genética realizados com laranja azeda, utilizando segmento internodal (10 experimentos), verificou-se que de um total de 1659 explantes inoculados com a *Agrobacterium tumefaciens*, apenas 7 explantes formaram gemas adventícias, 2 gemas foram avaliadas pelo teste histoquímico GUS, porém essas gemas apresentaram reação negativa.

Já nos experimentos realizados com laranja azeda utilizando segmento de epicótilo (14 experimentos), observou-se que 39 explantes desenvolveram gemas adventícias de um total de 2622 explantes inoculados com a suspensão bacteriana. Realizou-se o teste histoquímico GUS em 21 gemas, sendo que 2 mostraram reação positiva (0,54% de eficiência de transformação) (Tabela 7). Essas gemas foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo', no entanto, devido ao seu pequeno tamanho elas não se desenvolveram.

Em vários experimentos realizados com segmento de epicótilo obtido de plântulas de laranja azeda, notou-se necrose nas extremidades dos explantes, ou seja, verificou-se que esses explantes tornaram-se escuros e não desenvolveram gemas adventícias. Esta resposta também foi observada em segmentos de epicótilo obtidos de plântulas de limão 'Volkameriano', no entanto, nessa espécie, esta resposta foi constatada em todos os explantes utilizados nos 4 experimentos realizados (total de 687 explantes). Ghorbel et al. (2000) também observaram necrose nas extremidades dos explantes e ausência no desenvolvimento de gemas adventícias, quando segmentos de epicótilo de laranja azeda foram utilizados como explante em experimentos de transformação genética.

Tabela 6 - Transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), utilizando segmento internodal.

experimentos	explantes responsivos / total de explantes	gemas GUS $^{+}$/ gemas avaliadas	eficiência de transformação (%)	plantas aclimatizadas
1[a]	24/131	1/24	0,76	1
2 [b]	3/143	0/3	0	0
3 [b]	0/134	0/0	0	0
4 [b]	8/185	0/5	0	0
5 [b]	33/189	0/9	0	0
6 [b]	1/179	0/0	0	0
7 [b]	0/92	0/0	0	0
8 [b,c]	0/77	0/0	0	0
9 [b]	0/103	0/0	0	0
10 [b,c]	0/60	0/0	0	0
11 [b]	5/352	0/1	0	0
12 [b]	18/434	0/0	0	0
13 [b]	34/240	1/27	0,41	1
14 [b]	4/171	0/1	0	0
15 [b]	5/118	0/1	0	0
16 [b]	3/242	0/0	0	0
17 [a]	5/150	0/3	0	0
18 [a]	0/122	0/0	0	0
19 [a]	0/64	0/0	0	0
20 [a]	0/85	0/0	0	0
21 [a]	4/116	0/0	0	0
22 [a]	2/167	0/0	0	0
23 [a]	14/209	0/8	0	0
24 [a]	10/426	0/2	0	0
25 [a]	2/153	0/1	0	0
26 [a,d]	3/191	0/0	0	0
27 [a,d]	13/170	0/0	0	0
28 [a,d]	57/275	0/9	0	0
Total	248/4978	2/94	0,58	2

a Experimentos mantidos em meio de seleção suplementado com o antibiótico cefotaxima (500 mg L^{-1}).
b Experimentos mantidos em meio de seleção suplementado com o antibiótico timentin (400 mg L^{-1}).
c Explantes inoculados com a suspensão bacteriana e tratados em ultrassom por 30 s .
d Explantes cultivados em meio de co-cultivo EME suplementado com 2,4 D (2,0 mg L^{-1}), NAA (1,0 mg L^{-1}) e 2-ip (1,0 mg L^{-1}).

Tabela 7 - Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de epicótilo.

experimentos	explantes responsivos / total de explantes	gemas GUS $^{+}$/ gemas avaliadas	eficiência de transformação (%)	plantas aclimatizadas
1 [a]	1/375	0/1	0	0
2 [b]	20/352	1/15	0,28	0
3 [b]	0/256	0/0	0	0
4 [b]	0/100	0/0	0	0
5 [b,c]	0/108	0/0	0	0
6 [b]	0/107	0/0	0	0
7 [b,c]	0/88	0/0	0	0
8 [b]	1/402	0/0	0	0
9 [a,d]	4/124	1/2	0,8	0
10 [a]	11/114	0/1	0	0
11 [a,d]	2/217	0/2	0	0
12 [a,d]	0/80	0/0	0	0
13 [a,d]	0/162	0/0	0	0
14 [a ,d]	0/137	0/0	0	0
Total	39/2622	2/21	0,54	0

a Explantes cultivados em meio de seleção suplementado com o antibiótico cefotaxima (500 mg L^{-1})
b Explantes cultivados em meio de seleção suplementado com o antibiótico timentin (400 mg L^{-1})
c Explantes inoculados com a suspensão bacteriana e tratados em ultrassom por 30 s
d Experimentos realizados com a variedade laranja azeda 'Beja'

Embora os resultados obtidos nos experimentos de organogênese *in vitro* realizados com limão 'Volkameriano' e laranja azeda (Tabelas 2 e 3), mostrarem uma maior capacidade morfogênica em segmento de epicótilo, nos experimentos de transformação genética, realizados principalmente com limão 'Volkameriano', os segmentos internodais foram mais eficientes para a obtenção de gemas transgênicas em comparação com segmentos de epicótilo, os quais, mostram-se mais sensíveis ao contato com a *Agrobacterium tumefaciens*, dificultando o desenvolvimento de gemas transgênicas.

Nos experimentos de transformação genética realizados com limão 'Volkameriano' utilizando segmento internodal, e com laranja azeda utilizando os segmentos internodal e de epicótilo, verificou-se que diversos explantes apresentaram apenas o início de desenvolvimento das gemas adventícias, no entanto, mesmo após sua transferência para meio de cultura com concentração reduzida de BAP e canamicina, seu crescimento foi paralisado, impossibilitando a coleta de tecido para a realização do teste histoquímico GUS. Esse início de desenvolvimento de gemas adventícias também foi observado em experimentos de transformação genética realizados com tangerina 'Clementina', utilizando segmento internodal como explante (CERVERA et al., 2008), porém, esses pesquisadores observaram um maior desenvolvimento dessas gemas, quando os explantes foram mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) em substituição ao meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Nos experimentos realizados com limão 'Volkameriano' utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo (5 experimentos), verificou-se o desenvolvimento de gemas adventícias em 42 explantes de um total de 248 explantes inoculados com a *Agrobacterium tumefaciens*. Para a identificação das gemas transgênicas realizou-se o teste histoquímico GUS, em 63 gemas e verificou-se que 4 mostraram-se positiva (3% de eficiência de transformação) (Tabela 8).

Já nos experimentos realizados com laranja azeda utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo (Tabela 9), verificou-se o desenvolvimento de gemas adventícias em 38 explantes, de um total de 146 explantes inoculados com a suspensão bacteriana. Em cada explante, observou-se o desenvolvimento de muitas gemas adventícias, sendo que 137 gemas foram avaliadas pelo teste histoquímico GUS e apenas uma mostrou-se positiva. A eficiência de transformação foi de 3,22%, esse valor foi semelhante aquele obtido por Ghorbel et al. (2000) em experimentos de transformação genética realizados com segmento internodal de laranja azeda (3,6% de eficiência de transformação), e foi superior a eficiência de transformação genética de laranja azeda, alcançada por Gutiérrez, Luth e Moore (1997) cujos valores foram de 1,2% e 2,4%.

Tabela 8 - Transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*), utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo.

experimentos	explantes responsivos / total de explantes	gemas GUS $^{+}$/ gemas avaliadas	eficiência de transformação (%)	plantas aclimatizadas
1	13/67	3/28	4,47	2
2	8/62	0/13	0	0
3 [a]	17/59	1/22	1,69	0
4 [b]	1/25	0	0	0
5	3/35	0	0	0
Total	42/248	4/63	3,08	2

a Explantes cultivados em meio de co-cultivo EME suplementado com 2,4 D (2,0 mg L^{-1}), NAA (1,0 mg L^{-1}) e 2-ip (1,0 mg L^{-1}).
b Explantes tratados em ultrassom por 30 s, antes da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*

Em todos os experimentos onde foi constatado o desenvolvimento de gemas adventícias, verificou-se que muitas gemas regeneradas não eram transformadas (escapes) (Figura 9a). A regeneração de gemas adventícias não transformadas, em meio de cultura contendo agente de seleção (canamicina) foi atribuída a proteção das células não transformadas, ao agente de seleção, pelas células transformadas adjacentes e também a persistência da *Agrobacterium tumefaciens* no tecido inoculado (DOMINGUEZ et al., 2004).

Tabela 9 - Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo.

experimentos	explantes responsivos/ total de explantes	gemas GUS $^{+}$/ gemas avaliadas	eficiência de transformação (%)	plantas aclimatizadas
1[a]	1/14	0/0	0	0
2	20/64	0/58	0	0
3[a]	15/31	1/79	3,22	0
4[a,b]	2/37	0/0	0	0
Total	38/146	1/137	3,22	0

a Experimentos realizados com a variedade laranja azeda 'Beja'
b Explantes cultivados em meio de co-cultivo EME suplementado com 2,4 D (2,0 mg L^{-1}), NAA (1,0 mg L^{-1}) e 2-ip (1,0 mg L^{-1}).

Em razão do baixo número de gemas transgênicas obtidas nas duas espécies em estudo, buscou-se localizar a expressão transiente do gene *uidA* (GUS) no tecido do explante após a inoculação com a *Agobacterium*, a fim de verificar se as células competentes para a transformação genética e regeneração tem a mesma origem. Assim, segmentos internodais de limão 'Volkameriano' coletados 2 dias após período de co-cultivo (5 dias após a inoculação com a suspensão bacteriana) foram incubados em solução X-GLUC para a realização cortes histológicos. Pela análise dos cortes foi possível observar a expressão transiente do gene *uidA* (GUS) na região do câmbio vascular (Figura 9c), indicando que as células capazes de serem transformadas genéticamente tem a mesma origem das células envolvidas no processo de desenvolvimento de gemas adventícias.

Em alguns experimentos, o protocolo normalmente utilizado para a transformação genética de citros foi modificado, com a introdução de parâmetros alternativos como a sonicação dos explantes, antes ou durante sua inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*, a utilização do antibiótico timentin (400 mg L^{-1}) ou cefotaxima (500 mg L^{-1}), para o controle do crescimento da *Agrobacterium*, e a introdução dos explantes em meio de co-cultivo contendo os reguladores vegetais 2,4 D (2,0 mg L^{-1}), NAA (1,0 mg L^{-1}), 2-ip (1,0 mg L^{-1}).

A sonicação foi realizada antes da inoculação com a suspensão bacteriana, quando utilizou-se os segmentos de epicótilo e segmentos de cotilédone associado ao hipocótilo de limão 'Volkameriano' (Tabela 8) e segmentos internodais de laranja azeda ou durante a inoculação com a suspensão bacteriana, neste caso, utilizou-se segmentos internodais de limão 'Volkameriano' (Tabela 6) e segmentos de epicótilo de laranja azeda (Tabela 7). No entanto, verificou-se que com esses tratamentos não ocorreu o desenvolvimento de gemas adventícias.

Em aproximadamente metade dos experimentos de transformação genética realizados, nas duas espécies em estudos, com os explantes, segmentos internodal e de epicótilo, utilizou-se meio de seleção contendo o antibiótico cefotaxima e a outra metade dos experimentos foi realizada com o antibiótico timentin. No entanto, verificou-se que esses antibióticos não influenciaram a transformação genética em limão 'Volkameriano' e laranja azeda. Em razão deste resultado, nos experimentos realizados

com segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, utilizou-se o apenas o antibiótico cefotaxima no meio de seleção.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de transformação genética, em alguns experimentos realizados com limão 'Volkameriano' e laranja azeda, utilizando segmento internodal e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, o meio de co-cultivo normalmente utilizado foi substituido por um meio de cultura suplementado com auxinas e citocinina (2,4 D, NAA e 2-ip). Essa alteração foi realizada, uma vez que há relatos na literatura mostrando que os reguladores vegetais, principalmente as auxinas, presentes no meio de co-cultivo exercem influência na transformação genética de citros (PEÑA et al., 2004a). A presença de auxina durante a fase de co-cultivo induz o desenvolvimento de calos derivados das células do câmbio vascular, os quais podem conter as áreas meristemáticas responsáveis pela formação de gemas adventícias (PEÑA et al., 2004a).

Em limão 'Volkameriano', quando o meio de co-cultivo suplementado com auxinas e citocinina foi utilizado, identificou-se 1 gema transgênica obtida a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, porém a eficiência de transformação foi menor do que aquela alcançada no outro experimento em que foram identificadas gemas transgênicas, cujo o meio de co-cultivo foi suplementado com 1,0 mg L^{-1} de BAP (Tabela 8). Esse resultado foi divergente daquele obtido com segmento de epicótilo de citrange 'Carrizo', onde constatou-se uma maior eficiência de transformação genética, quando os explantes foram mantidos em meio de co-cultivo, suplementado com auxinas e citocinina (2,0 mg L^{-1} de 2,4 D; 2,0 mg L^{-1} de AIA e 1,0 mg L^{-1} de 2-ip) em comparação com aqueles mantidos em meio de co-cultivo suplementado apenas com citocinina (1,0 mg L^{-1} de BAP) ou sem reguladores vegetais (PEÑA et al., 2004a).

Em laranja azeda não se notou o desenvolvimento de gemas transgênicas quando os explantes foram mantidos no meio de co-cultivo suplementado com auxinas e citocinina, essa ausência no desenvolvimento de gemas transgênicas provavelmente esta relacionada ao fato de desta espécie ser mais recalcitrante para a transformação genética.

A análise geral dos resultados obtidos nos experimentos de transformação genética mostra que foi possível obter 6 gemas transgênicas de limão 'Volkameriano',

sendo que 2 foram obtidas a partir de segmento internodal e 4 foram obtidas a partir de segmento de cotilédone associado ao hipocótilo. Enquanto que com laranja azeda foram obtidas 3 gemas transgênicas, sendo 2 utilizando segmento de epicótilo e 1 utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo. A eficiência de transformação foi maior quando os experimentos foram realizados com segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, nas duas espécies em estudo (3% em limão 'Volkameriano' e 3,22% em laranja azeda), em comparação com segmento internodal (0,58% em limão 'Volkameriano') e segmento de epicótilo (0,54% em laranja azeda).

As gemas transgênicas foram enxertadas *in vitro* em plântula de citrange 'Carrizo', porém verificou-se apenas 4 gemas transgênicas de limão 'Volkameriano' e 1 de laranja azeda se desenvolveram após a enxertia *in vitro.* Após o desenvolvimento das plântulas de limão 'Volkameriano', realizou-se a análise de PCR, para confirmar a inserção do gene dsCP-CTV em seu genoma. Conforme mostra a Figura 9d, foi possível observar um fragmento de 671 pb, correspondente a parte do gene amplificada. As plântulas PCR positiva foram aclimatizadas e estão sendo mantidas em casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas e até o momento apresentam desenvolvimento normal. Após seu crescimento, essas plantas serão analisadas por Southern blot para confirmar a integração e o número de eventos de inserções do gene dsCP-CTV em seu genoma.

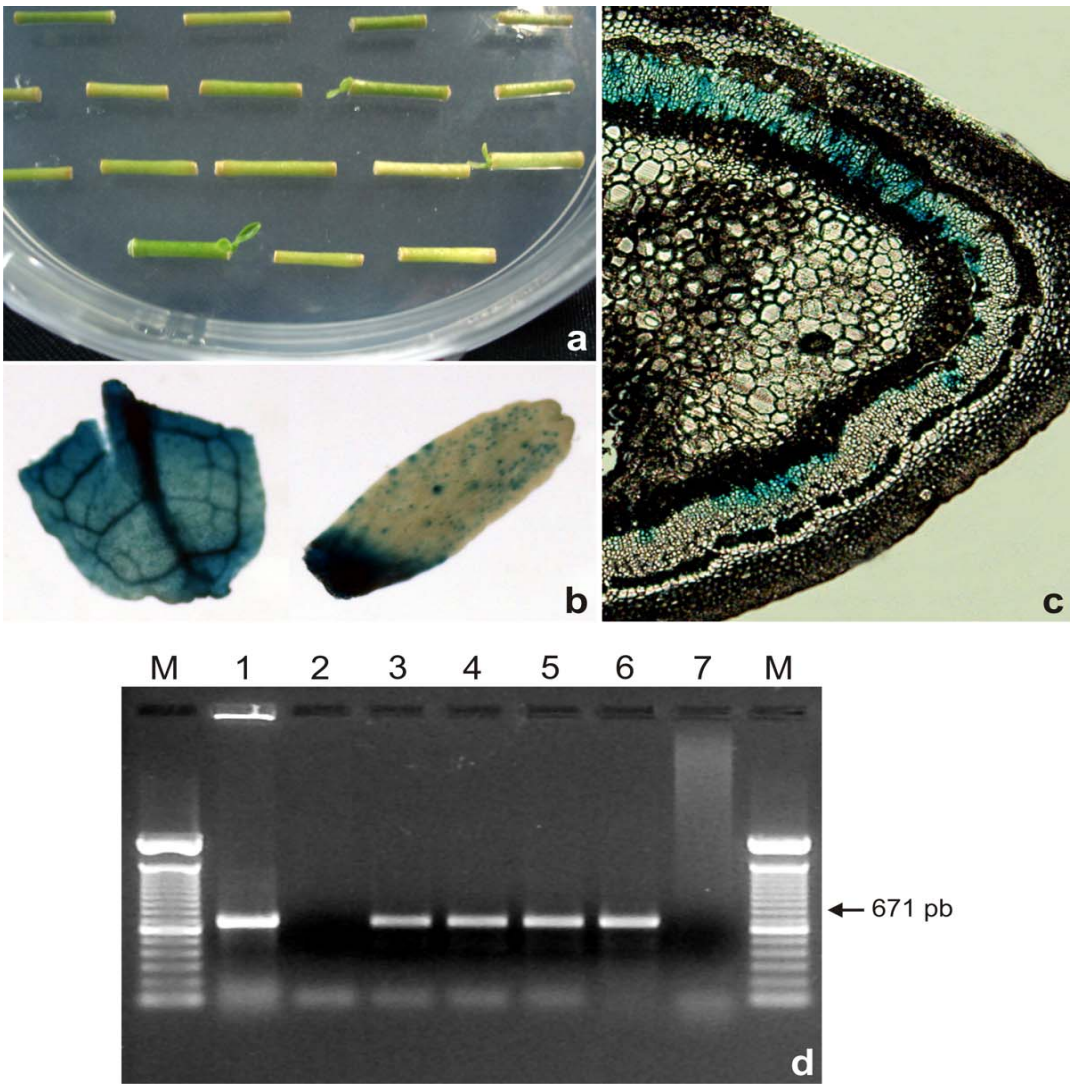

Figura 9 - Transformação genética em citros via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com uma seqüência do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros numa construção gênica tipo 'hairpin'. a) Regeneração dos explantes, segmento de epicótilo de laranja azeda, em meio de seleção. b) Folhas expressando o gene *uidA* após o teste histoquímico GUS. c) Corte transversal de segmento internodal de limão 'Volkameriano' após a incubação com solução X-GLUC, mostrando a expressão transiente do gene *uidA.* d) Análise de PCR das plantas de limão 'Volkameriano' GUS positiva: M = marcador de 100 pb (Invitrogen); 1= controle positivo (DNA de *Agrobacterium)*; 2 = controle negativo (DNA de planta de limão 'Volkameriano' não transformada); 3 a 6 = planta transgênica; 7= água. O fragmento de 671 pb corresponde ao seqüência amplificada do gene da capa protéica do CTV.

5 CONCLUSÕES

A organogênese *in vitro* em limão 'Volkameriano' e laranja azeda ocorreu a partir de segmento de epicótilo, segmento internodal e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, sendo que o segmento de cotilédone associado ao hipocótilo mostrou-se mais eficiente.

As concentrações de 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de BAP, para limão 'Volkameriano' e 0,5 e 1,0 mg L^{-1} de BAP para laranja azeda proporcionaram as melhores resposta na indução da gemas adventícias *in vitro*.

O desenvolvimento de gemas adventícias nos 3 tipos de explantes testados ocorreu por meio da organogênese indireta.

Foram obtidas gemas transgênicas de limão 'Volkameriano' utilizando segmento internodal (2 gemas) e segmento de cotilédone associado ao hipocótilo (2 gemas) e de laranja azeda utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo (1 gema).

REFERÊNCIAS

ABECITRUS. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em: 09 mar. 2008.

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**, Dordrecht, v. 50, n. 3, p. 321-325, 2006.

ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerik, v. 164, n. 2, p. 203-211, 2003.

ANANTHAKRISHNAN, G.; ORBOVIC, V.; PASQUALI, G.; CALOVIC, M.; GROSSER, J.W. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. ***In vitro*** **Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 43, n. 6, p. 593-601, 2007.

ANANTHAKRISHNAN, G.; XIA, X.; ELMAN, C.; SINGER, S.; PARIS, H.S.; GAL-ON, A.; GABA, V. Shoot production in squash (*Curcubita pepo*) by *in vitro* organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 8, p. 739-746, 2003.

AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (*b*O), cecropina e *gus***. 2005. 76 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *hrpN* (harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri)**. 2007. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 1, n. 2, p. 105-136, 1976.

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, n. 4, p. 502-512, 2003.

BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B. M.J. Calogênese, embriogênese somática e isoloamento de protoplasto em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 33-38, 2000.

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, n. 1, p. 159-166, 2000.

BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21***. 2004. 87 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BOSCARIOL, R.L.; ALMEIDA, W.A.B.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A. MENDES, B.M.J. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 2, p. 122-128, 2003.

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

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 Agronômico; Fundag, 2005. cap. 2, p. 21-34.

BURGER, D.W.; HACKETT, W.P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of citrus. **Plant Science***,* Limerick, v. 43, n. 3, p. 229 -232, 1986.

CERVERA, M.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA L. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, n., 1 p. 55-66, 2008.

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

CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 3-4, p. 271-278, 1998b.

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

COSTA, M.G.C.; OTONI, W.C.; MOORE, G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports,** Berlin, v. 21, n. 4, p. 365-373, 2002.

COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G.; MOSQUIM, P.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Dordrecht, v. 100, n. 1/4, p. 63-74, 2004.

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

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

DOMÍNGUEZ, A.; MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.)Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, n. 1/2, p. 1-10, 2002.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMEO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated

transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 171-183, 2004.

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

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

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

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

FAO. Disponível em: < http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: 16 mar. 2008.

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

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual:** anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo. 2007. 504 p.

FUNDECITRUS. Disponível em: < http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 20 mar. 2008.

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, n. 6, p. 715-723, 1999.

GARCÍA-LUIS A.; MOLINA, R.V.; VARONA, V.; CASTELLÓ, S.; GAURDIOLA 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.

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

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, n. 1, p. 27-36, 2001.

GRINBLAT, U. Differentiation of *Citrus* stem *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 97, p. 599-603, 1972.

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

GUO, W.W.; GROSSER, J.W. Transfer of a potential canker resistance gene into *Citrus* protoplasts using GFP as the selectable marker. **Acta Horticulturae**, Berlin, n. 632, p. 255-258, 2004.

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

GUTIÉRREZ-E, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.)

plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports,** Berlin, v. 16, n. 11, p. 745–753, 1997.

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

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

KATHIRAVAN, K.; VENGEDESAN, G.; SINGER, S.; STEINITZ, B.; PARIS, H.S.; GABA, V. Adventitious regeneration *in vitro* occurs across a wide spectrum of squash (*Curcubita pepo*) genotypes. **Pant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n. 3, p. 285-295, 2006.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômico Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 1, p. 99-102, 2003.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 64, n. 2, p. 91-97, 1989.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1980.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F. ZACHARIAS, P.R.A.; JOSEPH, M.B.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPÇÃO, L.C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E.C.; FERRARI, F.; FRANCO, S.F.; GIACHETTO, P.F.; GIRASOL, A.; JORDÃO JUNIOR.; SILVA, V.H.A.; SOUZA, L.C.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.A.; ZANCA, A.S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J.P.; REINACH,

F.C.; FERRO, J.A; SILVA, AC.R. Identification and genomic characterization of a new virus (*Tymoviridae* Family) associated with citrus sudden death disease. **Journal of Virology**, Atlanta, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, 2005.

MAGGON, R.; SINGH, B.D. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyls explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 123-128, 1995.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. 929 p.

MOLINARI, H.B.C.; BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf*.* × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 3/4, p. 379–385, 2004.

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, n. 4, 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, n. 1, p. 103-110, 2000.

MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de C*itrus* 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 bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473– 497, 1962.

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

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 8, p. 1155-1166, 2000.

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

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

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUAREZ, 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, n. 11, 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, n. 3, p. 263-267, 2001.

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

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

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

POWELL-ABEL, P; NELSON, R.S; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.; BEACHY, R.N. Delayed disease development in transgenic tobacco that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. **Science**, Washington, v. 232, p. 738-743, 1986.

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.

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

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

SCORA, R.W. On the history and origin of *Citrus.* **Bulletin of the Torrey Botanical. Club,** New York, v. 102, n. 6, p. 369, 1975.

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 'Ceópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 484-487, 2005b.

SOUZA, A.J.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 6, p. 645-656, 2007.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily. In: WEBER, H.J.; BATCHELLOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry** Berkeley: University of California, 1943. p. 129-474.

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

TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. **Studia Citrogia,** v. 14, p. 1-6, 1977.

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

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, Limerick, v. 69, n. 2, p. 199-206, 1990.

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

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

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

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