UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LEONARDO SORIANO

Organogênese *in vitro* e transformação genética de variedades de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tan.)

Piracicaba
2015

LEONARDO SORIANO

Organogênese *in vitro* e transformação genética de variedades de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tan.)

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profª. Drª. Beatriz M. Januzzi Mendes

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Soriano, Leonardo
Organogênese *in vitro* e transformação genética de variedades de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tan.) / Leonardo Soriano; orientadora Beatriz Madalena Januzzi Mendes. - - Piracicaba, 2015.
96 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Citricultura 2. Cultura de tecidos de plantas 3. Embriogênese somática 4. Expressão gênica 5. Genética molecular vegetal 6. Greening (Doença de planta) 7. Protoplastos I. Título

CDU 579.254.2 : 634.322

Aos meus valorosos pais Elson e Fátima

AGRADEÇO

Ao meu primo Artur

DEDICO

Aos meus irmãos, família e amigos

OFEREÇO

I've got my own spirit level for balance.

To tell if my choice is leaning up or down.

Neil Peart

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às instituições e pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela oportunidade de realização do curso de doutorado, a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por oferecer parte da estrutura necessária para a realização do projeto, e ao Citrus Research and Education Center por oferecer toda a estrutura para a realização dos valiosos experimentos de transformação genética de suspensões celulares e protoplastos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos financeiros para o desenvolvimento do trabalho.

À Prof.ª Dr.ª Beatriz M. Januzzi Mendes pela confiança, dedicação e extrema seriedade na orientação ao longo destes sete anos de parceria acadêmica-científica; e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, por todo apoio, respaldo e essencial contribuição na orientação.

Ao Dr. Jude W. Grosser por me receber em seu laboratório e pela supervisão durante o estágio Sandwich no CREC/UFL; ao Dr. Manjul Dutt pela orientação na condução do projeto nos EUA e por todo profissionalismo científico; e ao Dr. Ahmad A. Omar pelos importantes ensinamentos biotecnológicos.

À Prof.ª Dr.ª Adriana Pinheiro Martinelli pelo excelente convívio, oportunidades oferecidas e preciosos conselhos acadêmicos; e ao Professor Paulo Hercílio Viegas Rodrigues pela oportunidade de realização do estágio PAE e principalmente pela amizade.

Ao Dr. Maurel Behling pela contribuição nas análises estatísticas.

À estimada Dr.ª Eveline Tavano pela amizade, atenção e auxílio nas análises.

Aos valiosos companheiros de APG (Sylvia “Sylveirão”, Sandra “Sandrex” e Marcelo “Bidson”) pelo companheirismo, inesgotáveis discussões filosófico-científicas e feitos memoráveis, essenciais para o bem estar espiritual.

Às preciosas amigas e técnicas de laboratório Renata Cruz e Elaine Queiroz Moreira por todo cuidado com as plantas, carinho e conselhos de cunho “materno”.

Às queridas amigas Dr.ª Fabiana Muniz pelo incentivo e confiança e Carol Rossi (estagiária irreparável) pelas notáveis conversas e conselhos ponderados.

Aos saudosos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal - CENA (Lívia, Tati, Lígia, Perla, Thaísa, Bigor, Ananda, Isa, Flávia, Gra e Jú), do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas - ESALQ (Lili, Tati, Perla, Flávia, Alê, Luzia, Lísia, Nathália, Meire, Fabiana e Filipi), do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas - CENA (Mônica, Camila, Hilo, Karina e Priscila) e do Citrus Improvement Lab - CREC/UFL (Jamunaa, Mônica, Fabi, Julie, Ana, Maurício, Gary, Aditi, Ethan, Cindy, Erick, Chandreyi, Jolisa, Grayson e Chuck) pelos inesquecíveis momentos vividos.

Aos prestativos funcionários do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ (José, David, Éder e Aparecido) por toda a ajuda e auxílio na manutenção do material nas casas-de-vegetação.

Ao estimado companheiro Antoine Gady pela amizade, ajuda e incontáveis bons momentos; e as valiosas amizades construídas nos EUA (Spana, Mark, Sami, Marcos, Bia, Pablo, Ana Clara, Peter, Laís, Max, Diva, Chris, Heather, Alex, Natalie, Hongge, Laura, Paky, Yeyin e Nadia).

Aos colegas e amigos de pós-graduação do CENA e da ESALQ e, principalmente, da comissão organizadora do V Simpósio Científico dos Pós-Graduandos no CENA.

Aos professores da Comissão de Pós-Graduação do CENA e funcionários da secretaria da PG-CENA (Neuda de Oliveira, Daiane Vieira e Fábio Oliveira).

À secretária do LBV Suzineide Manesco pela atenção e eficácia.

À bibliotecária Marília Henyei pela dedicação na revisão da tese.

À Silvana Maziero, Gabriel Mendes, João Geraldo Brancalion e Fabricio Costa da Seção Técnica de Informática do CENA.

À todos os integrantes do vitorioso Tiririca Futebol Clube, equipe que obteve a supremacia no disputado campeonato da ESALQ.

À Mariana Marquiori pela amizade e companheirismo nestes dez anos juntos.

À querida Natália Gomes pelo carinho, amizade e, sobretudo, por me proporcionar uma nova perspectiva na vida.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

M**UITO OBRIGADO!**

RESUMO

SORIANO, L. **Organogênese *in vitro* e transformação genética de variedades de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tan.)**. 2015. 96 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Atualmente, o Huanglongbing (HLB), doença associada à bactéria *Candidatus* Liberibacter spp., é a principal ameaça dos *Citrus*, não tendo sido encontrado ainda espécies resistentes e tolerantes. O melhoramento genético tradicional apresenta limitações para a obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa de citros em decorrência a fatores ligados à biologia do gênero. Na tentativa de sobrepor essas dificuldades, a transformação genética destaca-se por permitir a introdução de genes exógenos, os quais, além de reduzir o período de obtenção de material melhorado geneticamente, poderão conferir resistência a doenças em variedades de interesse agronômico. Desse modo, o objetivo desta pesquisa consistiu no estudo da organogênese *in vitro*, e na obtenção de plantas transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens* das tangerinas 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules', com o gene que codifica o peptídeo antibacteriano atacina A (*att*A), controlado pelos promotores AtSUC2 e AtPP2, visando a expressão gênica preferencial nos vasos do floema. Adicionalmente, foi avaliada a transformação genética via *A. tumefaciens* de suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', de laranja doce 'Hamlin' e de tangelo 'Page', e a transformação genética direta via PEG de protoplastos da tangerina 'W-Murcott', com os fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby*, dirigidos pelos promotores com expressão preferencial nos tecidos embrionários 6105 e DC3. A eficiência da organogênese *in vitro* foi influenciada pelo tipo de explante e concentração de BAP. Após os experimentos de transformação genética de segmentos de epicótilo e internodal das tangerinas 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules', as plantas regeneradas foram analisadas por PCR, *Southern blot* e RT-qPCR e confirmadas como transgênicas pela presença e transcrição do gene *att*A no tecido vascular. A transformação genética de suspensões celulares mostrou-se eficiente com alta produção de antocianina nos embriões somáticos regenerados de tangerina 'W-Murcott', de laranja doce 'Hamlin' e de tangelo 'Page'. A transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott' mostrou-se viável e também foi possível a obtenção de embriões somáticos transgênicos. Os fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby* se mostraram úteis para detecção visual do material transgênico.

Palavras-chave: Citricultura. Cultura de tecidos de plantas. Embriogênese somática. Expressão gênica. Genética molecular vegetal. Greening (Doença de planta). Protoplastos.

ABSTRACT

SORIANO, L. ***In vitro* organogenesis and genetic transformation of mandarin varieties (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tan.)**. 2015. 96 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Currently, Huanglongbing (HLB), associated to *Candidatus* Liberibacter spp., is the main threat to the citrus culture. The conventional plant breeding shows limitations to the obtain new varieties of rootstock and scion, due to factors related to the biology of the genus. In attempt to overcome these barriers, genetic engineering is notable for allowing the introduction of foreign genes, which, besides reducing the time to obtain genetically improved material may confer disease resistance in varieties of agronomic interest. Thus, the objective of the research was the study of *in vitro* organogenesis, and obtain transgenic plants of ‘Fremont’, ‘Thomas’ and ‘Nules’ mandarins via *Agrobacterium tumefaciens* with the gene encoding the antibacterial peptide attacin A (*att*A), controlled by the promoters AtSUC2 and AtPP2, aiming to preferential gene expression in phloem. In addition, the genetic transformation of cell suspensions, via *A. tumefaciens*, of ‘W-Murcott’ mandarin, ‘Hamlin’ sweet orange and 'Page' tangelo and the direct genetic transformation, via PEG, of ‘W-Murcott’ mandarin protoplasts were evaluated with *Vvmyb*A1 and *Ruby* transcription factors driven by 6105 and DC3 promoters, with preferential expression in embryonic tissues. The *in vitro* organogenesis of the varieties studied was influenced by the type of explant and BAP concentration. After genetic transformation experiments of epicotyl and internodal segments of 'Fremont', 'Thomas' and 'Nules mandarins, regenerated plants were analyzed by PCR, *Southern blot* and RT-qPCR and confirmed as transgenic by presence and transcription of *att*A gene. The genetic transformation of cell suspensions was efficient with high anthocyanin production in the somatic embryos regenerated of ‘W-Murcott’ mandarin, ‘Hamlin’ sweet orange and 'Page' tangelo. The direct genetic transformation of ‘W-Murcott’ mandarin protoplasts revealed to be viable and it was also possible to obtain transgenic somatic embryos. The *VvmybA1* and *Ruby* transcription factors were useful tools for visual detection of transgenic material.

Keywords: *Citrus* production. Plant tissue culture. Somatic embryogenesis. Gene expression. Plant molecular genetics. Greening (Plant disease). Protoplasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das construções gênicas, contendo o gene *att*A utilizadas nos experimentos de transformação genética de segmentos de epicótilo e internodal..... 34

Figura 2 - Esquema das construções gênicas, contendo os genes dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby*, utilizadas nos experimentos de transformação genética de suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page'..... 35

Figura 3 - Esquema das construções gênicas (pC1300-35S/*Vvmyb*A1 e pC1300-6105/*Vvmyb*A1) contendo o gene do fator de transcrição *Vvmyb*A1, utilizadas nos experimentos de transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott'..... 36

Figura 4 - Organogênese *in vitro* de tangerina..... 45

Figura 5 - Organogênese *in vitro* das variedades de tangerina 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules' a partir do cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo e internodal em função da concentração de BAP adicionada ao meio de cultura..... 48

Figura 6 - Transformação genética de segmentos de epicótilo com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A..... 50

Figura 7 - Análise de PCR de plantas de tangerina obtidas dos experimentos de transformação genética..... 55

Figura 8 - Análise de *Southern blot* em plantas de tangerina obtidas a partir dos experimentos de transformação genética..... 56

Figura 9 - Expressão do gene *att*A, em relação aos genes de referência FBOX e UBQ, em plantas transgênicas de tangerina..... 57

Figura 10 - Desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de citros, regenerados a partir de suspensões celulares após transformação genética via *A. tumefaciens*..... 62

Figura 11 - Expressão dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby* nos embriões de laranja doce 'Hamlin' cultivados no meio de cultura EME-maltose.. 63

Figura 12 - Etapas do processo de purificação e cultura de protoplastos, desenvolvimento dos embriões somáticos transgênicos e regeneração de plantas, a partir da transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott'..... 67

Figura 13 - Identificação visual dos embriões de tangerina 'W-Murcott' expressando o gene do fator de transcrição *Vvmyb*A1..... 69

Figura 14 - Embriões somáticos de tangerina 'W-Murcott' expressando o fator de transcrição *Vvmyb*A1, cultivados em meio de cultura EME-maltose, após tratamento térmico (45 ºC, 5 min - TA2)..... 71

Figura 15 - Embriões somáticos de tangerina 'W-Murcott' expressando o fator de transcrição *Vvmyb*A1, cultivados em meio de cultura EME-maltose, após transformação genética com PEG 4000 (TB3)..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Organogênese *in vitro* das variedades de tangerina 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules' a partir de segmentos de epicótilo (média de 3 experimentos, totalizando 108 explantes por tratamento)..... 46

Tabela 2 - Experimentos de transformação genética realizados com segmentos de epicótilo e internodal da variedade 'Fremont' (número total de explantes introduzidos e de plantas transgênicas obtidas)..... 51

Tabela 3 - Experimentos de transformação genética realizados com segmentos de epicótilo e internodal da variedade 'Thomas' (número total de explantes introduzidos e de plantas transgênicas obtidas)..... 52

Tabela 4 - Experimentos de transformação genética realizados com segmentos de epicótilo e internodal da variedade 'Nules'(número total de explantes introduzidos e de plantas transgênicas obtidas)..... 53

Tabela 5 - Resumo dos resultados dos experimentos de transformação genética para cada construção gênica e variedade estudadas..... 58

Tabela 6 - Experimentos de transformação genética de suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page' realizados com as construções gênicas pC6105/*Vvmyb*A1, pC6105/*Ruby*, pCDC3/*Vvmyb*A1 e pCDC3/*Ruby*..... 61

Tabela 7 - Experimentos de transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott', com tratamentos térmicos prévios, realizados com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1..... 70

Tabela 8 - Experimentos de transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott', com os quatro tratamentos com o RT/PEG, realizados com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1..... 72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18

2 REVISÃO DA LITERATURA..... 20

2.1 Aspectos gerais da citricultura no Brasil e no mundo..... 20

2.2 Huanglongbing (HLB)..... 23

2.3 Transformação genética de citros..... 25

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 32

3.1 Material vegetal..... 32

3.2 Organogênese *in vitro*..... 33

3.3 Construções gênicas..... 34

3.4 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*..... 36

3.5 Transformação genética utilizando-se segmentos de epicótilo e internodal como explantes..... 37

3.5.1 Seleção e regeneração de plantas..... 37

3.5.2 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR..... 38

3.5.3 Caracterização molecular das plantas por análise de *Southern blot*..... 38

3.5.4 Análise da expressão do transgene..... 39

3.6 Transformação genética utilizando-se suspensões celulares como explantes..... 41

3.7 Transformação genética utilizando-se protoplastos como explantes..... 42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 45

4.1 Organogênese *in vitro*..... 45

4.2 Transformação genética utilizando-se segmentos de epicótilo e internodal como explantes..... 49

4.3 Transformação genética utilizando-se suspensões celulares como explantes..... 60

4.4 Transformação genética utilizando-se protoplastos como explantes..... 65

5 CONCLUSÕES..... 75

REFERÊNCIAS..... 76

ANEXOS..... 90

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* possui ampla diversidade genética, porém, apenas um número restrito de cultivares é cultivado comercialmente. As tangerinas e seus híbridos são amplamente cultivados em pomares comerciais, sobretudo, no Leste asiático, constituindo um grupo importante na produção mundial de citros.

No Brasil, a citricultura é um importante segmento de sua estrutura sócio-econômica, sendo o país o maior produtor mundial de laranja doce e o maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado.

O Huanglongbing (HLB), doença associada a bactérias endógenas gram-negativas restritas aos vasos do floema (TEIXEIRA et al., 2008), cuja transmissão é feita pelo psilídeo *Diaphorina citri*, é hoje a principal ameaça da cultura. A doença foi encontrada nos principais pomares no mundo e ainda não foi relatada nenhuma variedade resistente ao HLB.

O melhoramento genético de plantas de interesse agronômico visa fundamentalmente obter variedades capazes de reunir características de resistência a fatores bióticos e abióticos e elevada produtividade. O melhoramento genético de citros por métodos tradicionais apresenta limitações que dificultam a obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa. Estas limitações estão relacionadas, principalmente, a características da biologia reprodutiva do gênero.

Entre as ferramentas biotecnológicas incorporadas aos programas de melhoramento de citros, destacam-se a hibridação somática, por fusão de protoplastos, e a transformação genética. Esta última permite a incorporação de genes exógenos de interesse agronômico no genoma das plantas e obtenção de novas variedades, difíceis de serem obtidas pelo melhoramento convencional.

O sistema de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* é, atualmente, o método mundialmente mais empregado para obtenção de plantas transgênicas de citros, utilizando principalmente explantes provenientes de segmentos de epicótilo e segmentos internodais. No entanto, explantes mais sensíveis como protoplastos (OMAR et al., 2008) e calos embriogênicos (DUTT; GROSSER, 2010), constituem uma alternativa viável para espécies recalcitrantes, com baixa eficiência de transformação, como o grupo das tangerinas.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a organogênese *in vitro* de segmentos de epicótilo e internodal de tangerinas ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ e em obter plantas transgênicas destas variedades, pelo cultivo destes explantes com *A. tumefaciens.* Foram utilizadas construções gênicas contendo o gene *att*A que codifica o peptídeo antibacteriano atacina A, dirigido pelos promotores com expressão preferencial no floema AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana sucrose transporter* 2) e o AtPP2 (*Arabidopsis thaliana phloem protein* 2).

Adicionalmente, na busca de alternativas à transformação genética para variedades com baixa oferta de sementes e explantes recalcitrantes a este processo, o trabalho também estudou a transformação genética de suspensões celulares provenientes de calos embriogênicos de tangerina ‘W-Murcott’, de laranja doce ‘Hamlin’ e de tangelo ‘Page’, via *A. tumefaciens*, e a transformação genética, direta via PEG, de protoplastos de tangerina ‘W-Murcott’. Foram utilizadas construções gênicas contendo os fatores de transcrição *Vvmyb*A1, de *Vitis vinifera,* e *Ruby*, de *C. sinesis*, dirigidos pelos promotores 6105 de *C. sinesis* e DC3 de *Daucus carota*, visando a identificação visual não destrutiva do material transgênico, com expressão preferencial nos tecidos embrionários.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da citricultura no Brasil e no mundo

As principais plantas cítricas utilizadas em plantios comerciais no mundo pertencem, em geral, a três gêneros: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (DAVIES; ALBRIGO, 1994). O gênero *Citrus* e outros gêneros relacionados à subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, tribo Citreae e subtribo Citrinae são nativos da região Sudeste do continente asiático (SOOST; CAMERON, 1975; SWINGLE; REECE, 1967). Devido a grande complexidade do grupo dos citros, os sistemas de classificação comumente utilizados na sistemática ainda apresentam problemas na identificação e na conceituação de espécie. Estudos filogenéticos e taxonômicos indicam que gênero *Citrus* seja composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra *(Citrus medica* L.), tangerina (*C. reticulata* Blanco) e toranja (*C. grandis* L.), sendo os outros genótipos derivados de hibridações entre estas espécies verdadeiras (SCORA, 1975; BARRETT; RHODES, 1976).

Originárias do Sudeste da Ásia, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e do leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967; DONADIO; MOURÃO-FILHO; MOREIRA; 2005), as plantas cítricas hoje se encontram distribuídas e cultivadas em diferentes regiões do mundo. Os principais pomares comerciais estão concentrados nas regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes de 20º e 40º, onde os regimes térmicos e hídricos são mais adequados para o cultivo de plantas cítricas (SENTELHAS, 2005).

Entre as espécies do gênero Citrus, o grupo das tangerinas é aquele que possui a maior diversidade genética. Outros representantes do subgênero *Citrus*, como os pomelos (*C. paradisi* Macf.), as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck), os limões (*C. limon* L. Burm, f.) e as limas (*C. aurantifolia* Christm. Swingle), apresentam menor variabilidade genética, em decorrência da alta seleção artificial e da propagação vegetativa realizada durante a história de cultivo.

Os citros são representados por plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo); com flores brancas, aromáticas e com ovário apoiado sobre disco floral (nectário); glândulas de óleo, manchas transparentes nas folhas; e frutos globosos tipo baga

com vesículas de sucos e epicarpo de coloração verde, amarela ou laranja (SWINGLE; REECE, 1967; ARAÚJO et al., 2005).

As espécies do gênero reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e polinização cruzada, e assexuadamente, principalmente por apomixia nucelar (MACHADO et al., 2005).

As frutas cítricas apresentam posição de destaque na economia mundial, tendo sido produzidas no ano de 2013, mais de 135 milhões de toneladas, sendo China, Brasil, Estados Unidos e Índia responsáveis por 64,5% da produção mundial de laranja doce e 77% da produção mundial de frutas cítricas (FAO, 2014).

A cultura dos citros no Brasil constitui um importante segmento na estrutura sócio-econômica do país, caracterizada como uma importante atividade agro-industrial, considerando a geração de empregos e divisas, a formação de capital de renda, a agregação de valor regional, a ativação do setor terciário e a interiorização do desenvolvimento (NEVES et al., 2001).

A citricultura é praticada no país há mais de cem anos, porém, a indústria dos citros tornou-se importante somente a partir da década de 1960, no momento em que a produção voltou-se para o mercado internacional com a exportação de suco concentrado de laranja doce. Atualmente, o país é o maior produtor mundial de laranja doce e o maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado (FCOJ – *Frozen Concentrated Orange Juice*), exportando principalmente para os EUA, União Européia e Japão.

Embora o cultivo de frutas cítricas no Brasil seja feito em todas as regiões, com uma área plantada estimada em 800 mil ha, a principal região produtora é o Estado de São Paulo que concentra 70% da produção nacional, dominando tanto a produção de laranja doce como a de lima ácida ‘Tahiti’ e tangerinas. A instalação de um parque industrial voltado ao mercado externo de suco e a proximidade das metrópoles nacionais de maior poder aquisitivo tornou o Estado de São Paulo o maior pólo mundial citrícola. Os demais Estados representam 30% da produção nacional de laranjas doces – com destaque para Bahia (7,6%), Sergipe (7%), Minas Gerais (4%), Rio Grande do Sul (3,5%), Paraná (2,6%) e Pará (1,5%) (BOTEON; NEVES, 2005).

Entre as espécies utilizadas comercialmente como variedades copa destacam-se as laranjas doces (*C. sinensis*), tangerinas (*C. reticulata*), limões (*C.*

limonia), limas ácidas (*C. aurantifolia*) e pomelos (*C. paradisi*) (PIO et al., 2005). Outras espécies são empregadas como porta-enxertos, tais como limão ‘Cravo’ (*C. limonia*), limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriano*), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tan.), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tan.), laranja azeda (*C. aurantium* L.), trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), bem como os híbridos citrange ‘Carrizo’, citrange ‘Troyer’ (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*) e citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) (POMPEU JUNIOR, 2005).

As laranjas doces sobressaem-se em comparação aos demais grupos de variedades copa do gênero com, aproximadamente, dois terços dos plantios e sua produção corresponde a 52,6% da produção mundial (POMPEU JUNIOR, 2001; PIO et al., 2005; FAO, 2014). Muito aquém da produção de laranja doce, a produção de tangerinas e seus híbridos somaram 28 milhões de toneladas em 2013, cerca de 20% da produção mundial de citros. A China ocupa o primeiro lugar na produção mundial de tangerinas, seguido por Espanha, Turquia e Brasil (FAO, 2014).

O diversificado grupo das tangerinas (*C. reticulata*, *C. Clementina* e *C. tangerina* hort. ex. Tan) e seus híbridos apresentam curto período de maturação e são plantas suscetíveis às injúrias decorrentes do manuseio na colheita, pós-colheita e transporte. Ainda assim, o tangor ‘Murcott’ (*C. sinensis* L. Osbeck x *C. reticulata* Blanco) e, especialmente, a tangerina ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco) são produzidos em larga escala e ocupam posição de destaque neste grupo (PIO et al., 2005). Recentemente, novas variedades de tangerina, como a ‘Thomas’ (*C. reticulata* Blanco) e o híbrido intraespecífico ‘Fremont’ (*C. clementina* hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco), têm sido avaliadas no campo com desempenho superior quanto à sua aptidão comercial e à resistência a doenças, dentre elas a mancha marrom causada pelo fungo *Alternaria alternata*.

A cultura dos *Citrus* é vulnerável a diversos problemas fitossanitários que tem surgido ao longo da sua história, os quais têm interferido consideravelmente na sua produtividade. Dentre as muitas ameaças que conferem prejuízos ao parque citrícola brasileiro, destacam-se as doenças: a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico, causados pelas bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* subsp. citri, respectivamente, a tristeza dos citros, causada pelo vírus da tristeza do citros (CTV) e a gomose, causada por patógenos do gênero *Phytophthora*.

Há 10 anos, foi constatada na região de Araraquara (SP), a presença do Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening*, doença associada às

bactérias *Candidatus* Liberibacter spp. (MATTOS JÚNIOR et al., 2005). O HLB constitui a principal ameaça à citricultura mundial devido à dificuldade de controle, tratos culturais onerosos e, sobretudo, por que ainda não foram encontradas no gênero *Citrus* espécies resistentes e tolerantes ao patógeno.

2.2 Huanglongbing (HLB)

O Huanglongbing (HLB), descrito como a doença do ramo amarelo “yellow shoot”, foi relatado pela primeira vez na China, em 1919 e disseminado, durante o século XX, para diversos países da Ásia e da África, inclusive para o continente americano, onde estão presentes os dois maiores centros produtores de laranja doce, Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida) (BOVÉ, 2006). Anteriormente à denominação oficial de HLB, a doença era conhecida também como *likubin* (Taiwan), *leaf mottling* (Fillipinas), *die back* (Índia), *vein-phloem degeneration* (Indonésia) e *greening* (África do Sul) (FEICHTENBERGER et al., 2005; BOVÉ, 2006).

Em março de 2004, a doença foi encontrada em pomares na região central do Estado de São Paulo (COLETTA FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Hoje, além de estar presente em todas as regiões do Estado de São Paulo, o HLB ameaça também pomares nos Estados do Paraná e Minas Gerais (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009). Nos Estados Unidos, a doença foi constada em 2005, no sul do Estado da Flórida (BOVÉ, 2006).

O HLB é associado a bactérias endógenas gram-negativas que pertencem ao grupo das proteobactérias e são restritas aos vasos do floema (TEIXEIRA et al., 2008). Três espécies de Liberibacter foram associadas ao HLB dos citros: *Candidatus* Liberibacter africanus (CLaf), *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas) e *Candidatus* Liberibacter americanus (CLam), sendo as duas últimas de ocorrência no Brasil (COLETTA FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), com maior incidência de CLas (LOPES et al., 2009). O prefixo *Candidatus* é uma designação temporária, pois a sua classificação taxonômica definitiva ainda não foi concluída (MURRAY; SCHLEIFER, 1994).

Foram identificadas duas espécies de psilídeos vetores associados à transmissão das espécies de *Ca*. Liberibacter, *D. citri* (Hemiptera: Psyllidae) de

ocorrência na Ásia e na América e *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae) presente na África (BOVÉ; AYRES, 2007). O *D. citri* tem preferência por brotações jovens, com ciclo biológico variando de 15 a 40 dias e cada fêmea depositando aproximadamente 800 ovos (PARRA et al., 2010). O psilídeo adquire a bactéria com maior eficiência ainda na fase ninfal, porém a aquisição também já foi constatada em adultos. Ninfas infectadas podem transmitir o patógeno mesmo após a ecdise para a fase adulta (INOUE et al., 2009).

No Brasil, o psilídeo *D. citri* é o responsável pela transmissão das duas espécies de bactérias causadoras da doença (TEIXEIRA et al., 2005) e possui, além dos citros, outros hospedeiros, a planta ornamental *Murraya paniculata* (murta) e mais três outros gêneros da família Rutaceae. No entanto, o agente causal do HLB pode também ser transmitido artificialmente, por meio da enxertia de borbulhas contaminadas (LOPES; FRARE, 2008; COLLETA FILHO et al., 2010).

O HLB afeta todas as espécies e variedades de citros, havendo diferenças de resistência e tolerância entre elas (LARANJEIRA et al., 2005). As laranjas doces, tangerinas e tangelos são altamente suscetíveis à doença, enquanto que alguns cultivares de limão e *Citrus macroptera* apresentam certa tolerância à doença (ALBRECHT; BOWMAN, 2011). Em plantas infectadas, os sintomas iniciam-se com manchas amareladas assimétricas no limbo foliar que contrasta com a cor verde normal das folhas, sintoma conhecido como mosqueado. As manchas amareladas no limbo muitas vezes intensificam-se e o mesmo fica completamente amarelado. Observa-se também limbo foliar amarelado e com aspecto coriáceo e outras vezes espessamento de nervuras. Em estágios mais avançados da doença pode ocorrer queda das folhas e morte de ponteiros. Os frutos dos ramos afetados podem ter tamanho reduzido, amadurecimento incompleto e desenvolverem-se de forma assimétrica em relação ao eixo central. A análise de cortes perpendiculares ao eixo desses frutos confirma a presença de assimetria e também de sementes abortadas (BOVÉ; GARNIER, 2002; COLETTA FILHO et al., 2004; LOPES; FRARE, 2008; BELASQUE JÚNIOR et al., 2009).

Independente da espécie de *Ca*. Liberibacter, o controle da doença consiste no manejo dos pomares pela eliminação de árvores infectadas para a redução da fonte de inóculo, utilização de mudas sadias e controle químico da população de vetores (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009). Outros métodos estão em fase de estudo, como a utilização de voláteis de goiabeira, repelente natural do psilídeo

(ZAKA et al., 2010). Tendo em vista que a murta (*M. paniculata*) é hospedeira tanto do inseto transmissor quanto da bactéria causadora do HLB, recomenda-se também a eliminação dessa planta ornamental (LARANJEIRA et al., 2005).

Mesmo com o uso de práticas culturais onerosas na tentativa de amenizar os efeitos do HLB, elevando seriamente o custo produtivo, a disseminação da doença e infestação dos pomares em todo o mundo é um problema recorrente por não haver genótipos tolerantes ou resistentes, sendo este o principal gargalo das pesquisas de melhoramento genético de *Citrus*. Assim, uma alternativa promissora no desenvolvimento de plantas resistentes e tolerantes ao HLB é a transformação genética com genes relacionados ao controle das bactérias causadoras e dos psilídeos vetores.

2.3 Transformação genética de citros

Os primeiros programas de melhoramento de citros foram iniciados no Estado da Flórida, nos EUA, no fim do século XIX. Desde então, outros programas foram desenvolvidos com diversos objetivos para o desenvolvimento de novas variedades copa e porta-enxertos (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Para variedades copa, o melhoramento concentra-se na produtividade, adaptações a condições climáticas adversas e condições de solo, bem como, na qualidade e características do fruto e na resistência a patógenos (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1978). Já no melhoramento de variedades porta-enxerto, o objetivo dos programas é a resistência a pragas e doenças, tolerância a adversidades climáticas, diminuição do porte, maior sincronismo entre copa/porta-enxerto e qualidade dos frutos (GROSSER et al., 1998).

A obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa de citros pelo melhoramento genético tradicional é dificultada por fatores biológicos característicos da espécie como, por exemplo, o longo ciclo de reprodução, a juvenilidade, a poliembrionia nucelar (apomixia), a alta heterozigose, a incompatibilidade sexual, a esterilidade gametofítica e a poliploidia (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; LING et al., 1989; MACHADO et al., 2005). A transposição destas adversidades para obtenção de novas cultivares que apresentem tolerância ou resistência aos problemas fitossanitários é imprescindível para a manutenção da liderança brasileira

na produção mundial de citros, diminuindo assim as perdas nas produções e gastos com manejo dos pomares.

Na tentativa de superar as dificuldades enfrentadas pelo melhoramento genético tradicional, o avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de novas técnicas biológicas para o desenvolvimento de novas variedades resistentes e produtivas. Assim, a biotecnologia disponibilizou ferramentas que foram gradativamente incorporadas aos programas de melhoramento de citros, como a hibridação somática por fusão de protoplastos e a transformação genética (OLLITRAUT; LURO, 1995; GROSSER et al., 1996). Esta última permite a introdução de genes exógenos de interesse agronômico e obtenção de novas variedades, principalmente visando resistência a doenças, tornando-se uma ferramenta muito atraente para o melhoramento genético (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

O primeiro relato de transformação genética de citros foi feito na década de 80, por Kobayashi e Uchimiya (1989), quando utilizaram polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce (*C. sinensis*). Entretanto, não houve regeneração das plantas. A primeira planta transgênica de laranja doce regenerada foi obtida a partir de células embriogênicas em suspensão da cultivar “Washington Navel”, co-cultivadas com *A. tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990). Vários métodos de transformação genética já foram descritos para citros, como a introdução direta de DNA em cloroplastos (GUO et al., 2005), transformação via *A. tumefaciens* (ALMEIDA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2006; BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; BARBOSA-MENDES et al., 2009), bombardeamento de partículas em células *in vivo* (YAO et al., 1996), introdução direta de DNA em calos embriogênicos (GUO; GROSSER, 2005) e células em suspensão (DUTT; GROSSER, 2010), por eletroporação de protoplastos (HIDAKA; OMURA, 1993; NIEDZ et al., 2003) ou quimicamente via PEG, também em protoplastos (VARDI et al., 1990; FLEMING et al., 2000; GUO et al., 2005).

O sistema de transformação genética via *A. tumefaciens* é, atualmente, o método mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas de citros (MENDES et al., 2002; DOMÍNGUEZ et al., 2004; ANANTHAKRISNAN et al., 2007; PAOLI et al., 2007; BARBOSA-MENDES et al., 2009; DUTT; GROSSER, 2010). O estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração é preponderante para o sucesso da transformação genética de citros, o qual deve disponibilizar informações

precisas e ajustadas para cada genótipo, como o tipo, idade e maturação do tecido do explante, estirpe de *A. tumefaciens*, tempo de incubação com a bactéria e condições de co-cultivo (BOSCARIOL et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2008; DUTT; GROSSER, 2009). Esta técnica, embora amplamente realizada com segmentos de epicótilo e internodal como fonte de explantes, enfrenta algumas dificuldades principalmente para cultivares com baixa oferta de sementes e monoembriônicas. Além disso, várias cultivares do grupo das tangerinas são pouco receptivas à inserção do transgene através desse método (KHAWALE et al., 2006; DUTT; ORBOVIC; GROSSER, 2009).

Os tipos de explantes mais comumente utilizados são tecidos juvenis provenientes de segmentos de epicótilo obtidos pela germinação *in vitro* de sementes (PEÑA et al., 2004; DOMÍNGUEZ et al., 2004; MOLINARI et al., 2004; ANANTHAKRISNAN et al., 2007) ou segmentos internodais coletados de plantas cultivadas em casa-de-vegetação (FAGOAGA et al., 2001; DOMÍNGUEZ et al., 2004), a transformação genética também tem sido realizada com explantes coletados de tecido adulto (ALMEIDA et al., 2003; CERVERA et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2008) para a produção de plantas transgênicas que não apresentem juvenilidade ou menor período juvenil. Além destes, a transformação genética de suspensões celulares obtidas de calos embriogênicos de citros representam uma alternativa interessante em relação aos demais explantes, devido à sua uniformidade, alta eficiência de transformação genética e metodologia simples (DUTT; GROSSER, 2010).

A transformação genética direta de citros, sem o emprego *A. tumefaciens* como vetor, utilizando protoplastos, pode ser realizada quimicamente via polietilenoglicol (PEG) ou fisicamente via eletroporação. Além destes, proteínas de transfecção, como AvrRpt2 e AvrB, podem substituir o papel do PEG na condução de macromoléculas, dentre elas DNA-exógeno, para o interior dos protoplastos (WU et al., 2003). A transformação genética direta é uma técnica viável aos muitos cultivares de citros e permite a introdução de construções gênicas lineares diretamente no genoma da célula vegetal, de forma imediata (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989; VARDI et al., 1990; HIDAKA; OMURA, 1993; MATHUR; KONCZ, 1998; FLEMING et al., 2000; OLIVARES-FUSTER et al., 2003; NIEDZ et al., 2003; OMAR; GROSSER, 2004; GUO et al., 2005; OMAR et al., 2006; OMAR; GROSSER,

2008; OMAR et al., 2008). Dentre as espécies de citros, o grupo das tangerinas e seus híbridos enquadram-se nas que apresentam baixa eficiência de transformação genética.

A utilização de explantes não convencionais, com grande potencial regenerativo, como segmentos cotiledonares (KHAWALE et al., 2006), calos embriogênicos (LI; SHI; DENG, 2002; ZUO et al., 2002; GUO; GROSSER, 2005) e protoplastos de citros (TAWEEKANACHOTE; TE-CHATO, 2000; OMAR et al., 2008) são atrativos para espécies recalcitrantes e com baixa eficiência de tranformação genética com tecidos adultos e juvenis a partir de segmentos de epicótilo e internodal.

É comum, nos trabalhos de transformação genética de citros, a utilização do gene de seleção *npt*II (que codifica para a enzima *neomycin phosphotransferase* II) que confere resistência ao antibiótico canamicina (AZEVEDO et al., 2006; BOSCARIOL et al., 2006; DUAN; FAN; GUO, 2010).

Os genes repórteres são comumente utilizados nas construções gênicas para facilitar a identificação visual do transgene. Os genes repórteres *uid*A (que codifica para a β-glucuronidase – GUS) (PAOLI et al., 2007) e o *gfp* (que codifica para *green fluorescent protein*) (FOLIMONOV et al., 2007) são muito conhecidos e amplamente empregados em trabalhos de transformação genética, inclusive de citros (OMAR et al., 2008; MIYATA et al., 2012). Além destes, alguns genes envolvidos na produção de pigmentos em frutos durante a fase de amadurecimento tem sido caracterizados e utilizados como genes repórteres em trabalhos de transformação genética (KOBAYASHI; GOTO-YAMAMOTO; HIROCHIKA, 2004). Os fatores de transcrição *VvmybA1* de *Vitis vinifera* e *Ruby* de *C. sinensis* estão associados ao domínio MYB, o qual é conhecido por se ligar a elementos reguladores específicos de genes envolvidos na via de fenilalanina, promovendo assim a biossíntese de antocianina (KOBAYASHI; GOTO-YAMAMOTO; HIROCHIKA, 2004; BOGS et al., 2007).

A utilização de genes de interesse agronômico na transformação genética de citros tem sido realizada, destacando: genes que conferem resistência à salinidade (CERVERA et al., 2000), resistência a doenças causadas por fungos (PEÑA; NAVARRO, 1999; GENTILE et al., 2007; KATOH et al., 2007), vírus (SCHINOR et al., 2006; FEBRES et al., 2008; ZANEK et al., 2008) ou bactérias (AZEVEDO et al., 2006; BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; BARBOSA-MENDES et al., 2009).

Algumas estratégias têm sido utilizadas pelos programas de melhoramento genético com o intuito de aumentar a resistência de plantas a doenças bacterianas. O uso de peptídeos antibacterianos tem mostrado bons resultados para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes, tendo sido descritos mais de 500 tipos de peptídeos com essas características procedentes de uma grande variedade de organismos a exemplo de bactérias, fungos, insetos, plantas e vertebrados (ZASLOFF, 2002). Na transformação genética de plantas, genes de que codificam peptídeos antibacterianos identificados em insetos têm sido utilizados com êxito para obtenção de plantas resistentes a bactérias fitopatogênicas (AZEVEDO, 2006; BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI, 2007). O sistema imune de alguns insetos, como de *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae), apresenta respostas eficientes contra infecções bacterianas, pela indução da síntese de várias proteínas e de duas classes de peptídeos antibacterianos, como as atacinas (CHRISTENSEN et al., 1988).

As atacinas atuam na membrana externa de bactérias gram-negativas alterando a permeabilidade e a síntese de proteínas (HULTMARK et al., 1983; CARLSSON et al., 1998). Este grupo de peptídeos apresenta aproximadamente 20 kDa, possui formas básicas (A, B, C e D) e ácidas (E e F), e pode ser sintetizado através do sistema imunológico de insetos (HULTMARK et al., 1983). O gene da atacina, responsável pela expressão e formação de peptídeos que apresenta atividade antibacteriana, tem sido isolado de insetos como *Hyalophora cecropia* L. - *att*E (SUN et al.,1991), *Drosophila melanogaster* – *att*A (ASLING; DUSHAY; HULTMARK, 1995) e *Trichoplusia ni* - *att*A (KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996).

Outros peptídeos utilizados na transformação genética de plantas já foram descritos, como a sarcotoxina, obtida de *Sarcophaga peregrina* (OHSHIMA et al., 1999) e as cecropinas, que são produzidas por diversos organismos como insetos, vertebrados e plantas (ZASLOFF, 2002).

Boscariol et al. (2006) relatam a transformação genética de laranja doce ‘Hamlin’ com o gene da atacina A (*att*A) visando resistência a *X. axonopodis* pv. citri e, observaram aumento da resistência destas plantas a esta bactéria.

Em vários trabalhos relacionados à transformação genética de plantas, os genes introduzidos são controlados por promotores constitutivos, como o CaMV35S (BOSCARIOL et al., 2006). A utilização de genes exógenos com expressão

constitutiva pode gerar desgaste fisiológico da planta transgênica pela expressão de forma generalizada da sequência. Entretanto, para superar essas adversidades, uma alternativa é o uso de promotores para expressão em tecidos específicos, como por exemplo, o CsPP (*Citrus Phenylalanine Ammonia-lyase*) (AZEVEDO et al., 2006) expresso no xilema, o AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana sucrose transporter* 2) e o AtPP2 (*Arabidopsis thaliana phloem protein* 2) (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012; TAVANO, 2013) expressos no floema, o DC3 isolado de *D. carota* (KIM; CHUNG; THOMAS, 1997; KIM et al., 2002) e o 6105 de *C. sinensis* expressos em tecidos embrionários, ou promotores induzidos pelo patógeno, como o *Gst*1 (gene glutationa fosfotransferase) (BARBOSA-MENDES et al., 2009).

Os promotores induzidos pelo patógeno conferem a expressão gênica somente no local e no momento da infecção do patógeno e representam uma estratégia importante para produção de plantas transgênicas (GURR; RUSHTON, 2005). Em citros, o promotor Gst1, clonado a partir do gene que codifica a proteína glutationa S-transferase de batata, promoveu a expressão do gene *uid*A (GUS) em resposta a indução por ferimento ou pelo patógeno (*X. axonopodis*) (BARBOSA-MENDES et al., 2010). Já os promotores tecido-específico tem sido utilizados para regular a expressão de genes no local de colonização do patógeno (GURR; RUSHTON, 2005).

Segundo Azevedo et al. (2006), o promotor CsPP, clonado a partir do gene que codifica a enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) de citros, demonstrou dirigir a expressão do gene *uid*A (GUS), no xilema e em células da epiderme de pecíolos em plantas transgênicas de tabaco e de laranja doce ‘Valência’. O CsPP também foi empregado na transformação genética de citros com o intuito de dirigir no xilema a expressão do gene cecropin MB39 para o controle da bactéria *X. fastidiosa* (PAOLI et al., 2007). Outros promotores, como o SUC2, clonado a partir do gene que codifica uma proteína transportadora de sacarose de *Arabidopsis thaliana*, demonstrou dirigir a expressão do gene *uid*A (GUS), em vasos do floema em morango (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004); e o PP2, clonado do gene que codifica a proteína do floema isolado de *Curcubita moschata*, também demonstrou ativar a expressão gênica no floema em plantas transgênicas de tabaco (GUO et al., 2004).

Com base nos resultados positivos obtidos em trabalhos relacionados à transformação genética para resistência a doenças, em plantas cítricas e em outras culturas, verifica-se que a transformação genética de *C. reticulata* e *C. clementina*

com genes que codifiquem peptídeos antibacterianos dirigidos por promotores específicos de floema, que representa uma alternativa promissora para a obtenção de plantas resistentes a *Ca.* Liberibacter spp. (MIYATA et al., 2012; TAVANO, 2013).

A utilização de fatores de transcrição associados à biossíntese de antocioanina, como genes repórteres, nos tecidos embrionários representa uma ferramenta promissora e prática de identificação visual do material geneticamente modificado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os experimentos de organogênese *in vitro* e transformação genética via *A. tumefaciens* foram realizados com as variedades de tangerina 'Fremont' (*C. clementina* x C. *reticulata*), 'Thomas' (*C. reticulata*) e 'Nules' (*C. clementina*). Foram utilizados como explantes segmentos de epicótilo, coletados de plântulas cultivadas *in vitro*, e segmentos internodais coletados de plantas cultivadas em casa-de-vegetação.

As plântulas para a coleta de segmentos de epicótilo foram obtidas pela germinação *in vitro* de sementes, extraídas de frutos maduros, obtidos no Banco Ativo de Germoplasma do Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira', Cordeirópolis/SP, ou na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, Bebedouro/SP. As sementes foram lavadas e tratadas com óxido de cálcio, para a retirada da mucilagem, e secas à temperatura ambiente (24 h). Em seguida, para a conservação, as sementes foram tratadas com o fungicida Orthocid® (350 mL.100 kg^{-1} de semente) e armazenadas em câmara fria (10 ºC). Para a germinação, o tegumento da semente foi retirado, sendo realizada a desinfestação, em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água (3:1; 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® (2 $g.L^{-1}$), sacarose (30 $g.L^{-1}$), e pH ajustado para 5,8. A incubação foi realizada a 27 ºC, em ausência de luz, para germinação e alongamento do epicótilo. As plântulas obtidas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h de luz, por 10 dias. O epicótilo foi dividido em segmentos de 0,8 - 1,0 cm de comprimento, conforme descrito por Mendes et al. (2002).

Os segmentos internodais foram coletados de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, no Departamento de Produção Vegetal, da ESALQ/USP, as quais foram submetidas aos tratamentos descritos abaixo:

• podas na altura do colo para renovação foliar, a cada 90 dias;

• adubação granulada: fórmula 22-4-8 (N-P-K; Osmocote®), a cada 60 dias;

• adubação líquida na água de irrigação: fórmula 20-8-8 (N-P-K; 0,8 $g.L^{-1}$; Kristalon® lilás) + nitrato de cálcio (0,8 $g.L^{-1}$) + fórmula 24-8-16 (N-P-K; 0,8 $g.L^{-1}$; Peters Pofessional Tropical Foliage®), a cada 15 dias; e

• controle fitossanitário do ácaro-branco: aplicação de solução de acaricida Vertimec® 18CE (0,8 $mL.L^{-1}$ de água) + óleo vegetal Stoller do Brasil S/A (8 $mL.L^{-1}$ de água), a cada 15 dias.

Os segmentos internodais foram coletados de brotações jovens, as quais foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água (3:1; 15 min), sob agitação constante. Após o tratamento, o material foi lavado (3x) em água destilada estéril, em condições assépticas. As gemas laterais foram retiradas e os segmentos internodais (0,8 - 1,0 cm) isolados.

As culturas de células em suspensão de tangerina 'W-Murcott' (*C. reticulata*), laranja doce 'Hamlin' (*C. sinensis*) e tangelo 'Page' (*C. tangelo* J. Ingram & H. Moore), utilizadas nos experimentos de transformação genética via *A. tumefaciens*, e culturas de protoplastos de tangerina 'W-Murcott', utilizadas nos experimentos de transformação genética química direta, foram obtidos a partir da coleção de calos embriogênicos do Citrus Research and Education Center (CREC) – University of Florida/USA. As culturas de suspensões celulares foram subcultivadas em meio de cultura EME, de acordo com o protocolo estabelecido por Grosser e Gmitter Junior (1990).

3.2 Organogênese *in vitro*

Os segmentos de epicótilo e internodal das variedades 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules' foram cultivados horizontalmente em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo meio de cultura EME (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), suplementado com benzilaminopurina (BAP; 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 $mg.L^{-1}$). A incubação foi realizada no escuro por trinta dias e após este período o material foi transferido 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. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições. Cada

repetição constituiu-se de uma placa de Petri com seis explantes, totalizando trinta e seis explantes por tratamento. Os experimentos foram repetidos três vezes. Os dados foram analisados por ANOVA. As médias das três variedades estudadas foram comparadas pelo teste de Tukey. A influência das concentrações de BAP foi avaliada por análise de regressão.

3.3 Construções gênicas

As construções gênicas pCAtSUC2/*att*A e pCAtPP2/*att*A utilizadas nos experimentos de transformação genética de segmentos de epicótilo e internodal foram desenvolvidas pela Dra. Eveline Carla da Rocha Tavano, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, contendo o gene da atacina A (*att*A), sob controle dos promotores de floema AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2*) (Figura 1A) e AtPP2 (*Arabidopsis thaliana phloem protein 2*) (Figura 1B) inseridos no plasmídeo pCAMBIA 2201 (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália) que contém as bordas esquerda e direita de região de transferência do plasmídeo de *A. tumefaciens*, e o gene de seleção *npt*II (*neomycin phosphotransferase II*), que confere resistência ao antibiótico canamicina, em plantas.

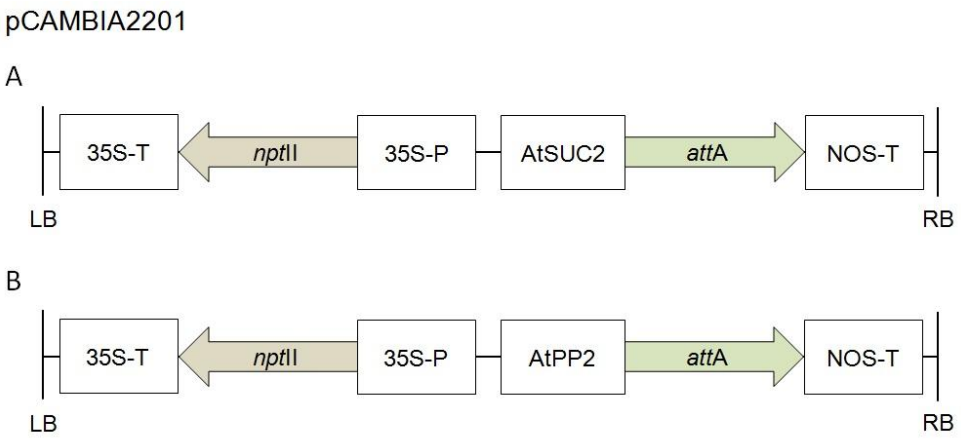

Figura 1 - Esquema das construções gênicas, contendo o gene *att*A utilizadas nos experimentos de transformação genética de segmentos de epicótilo e internodal. a) pCAtSUC2/*att*A com o promotor específico de floema AtSUC2. b) pCAtPP2/*att*A com o promotor específico de floema AtPP2. *npt*II: região codificadora do gene de resistência ao antibiótico canamicina; 35S-P: promotor constitutivo CaMV35S; 35S-T: terminador; NOS-T: Terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita.

As construções gênicas utilizadas nos experimentos de transformação genética de protoplastos e células em suspensão foram clonadas e cedidas pelo Dr. Manjul Dutt, do Citrus Research and Education Center (CREC), University of Florida/USA.

Para os experimentos de transformação genética de suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page', foram utilizadas as construções gênicas pC6105/*Vvmyb*A1 (Figura 2A), pC6105/*Ruby* (Figura 2B), pCDC3/*Vvmyb*A1 (Figura 2C) e pCDC3/*Ruby* (Figura 2D) que contém os promotores 6105 de laranja doce (*C. sinensis*) e o DC3 de cenoura (*D. carota* L.), específicos para a expressão gênica em tecidos embrionários. Nestas construções gênicas estes promotores foram fusionados com os genes dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 (*V. vinifera* L.) e *Ruby* (*C. sinensis*), associados na biossíntese de antocianina e utilizados como genes repórteres.

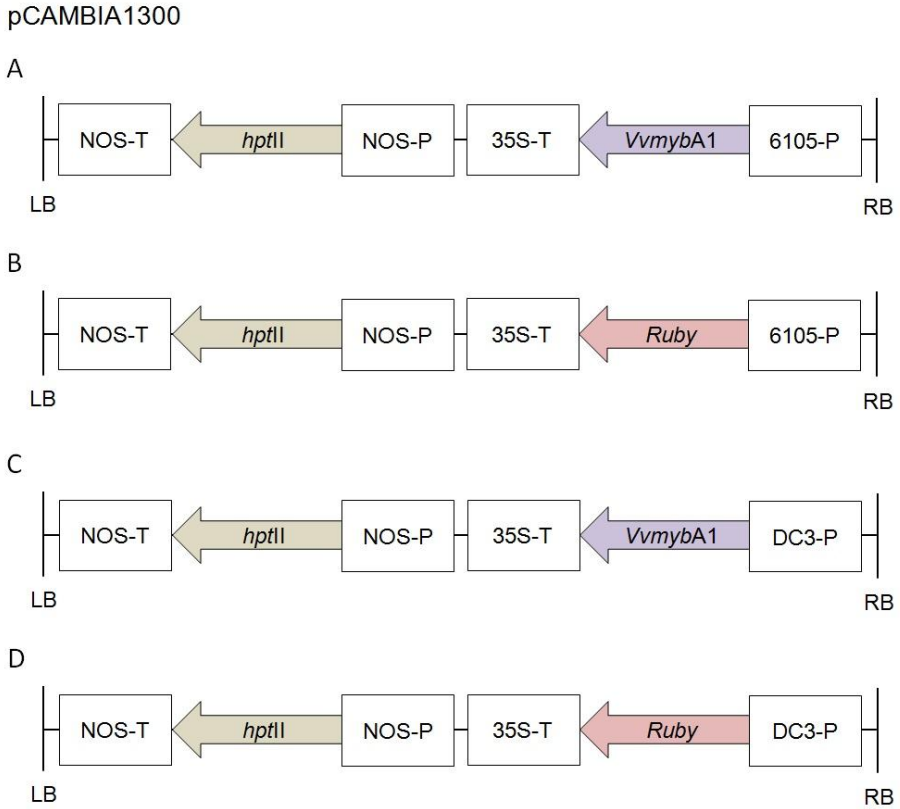

Figura 2 - Esquema das construções gênicas, contendo os genes dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby*, utilizadas nos experimentos de transformação genética de suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page'. A: pC6105/*Vvmyb*A1; B: pC6105/*Ruby;* C: pCDC3/*Vvmyb*A1; D: pCDC3/*Ruby*. *hpt*II: região codificadora do gene de resistência ao antibiótico higromicina; 35S-T: promotor constitutivo CaMV35S; 35S-T: terminador; 6105-P: promotor específico para expressão gênica em tecidos embrionários de *C. sinensis*; DC3-P: promotor específico para expressão gênica em tecidos embrionários de *D. carota*; NOS-P: promotor da nopalina sintase; NOS-T: Terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita.

Nos experimentos de transformação genética química direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott' foram utilizadas duas construções gênicas, ambas com o fator de transcrição *Vvmyb*A1. A construção gênica pC1300-35S/*Vvmyb*A1 (Figura 3A) contém o promotor constitutivo CaMV35S (*Cauliflower Mosaic Virus*), enquanto que a construção pC1300-6105/*Vvmyb*A1 (Figura 3B) possui o promotor 6105, clonado do genoma de *C. sinensis*, que confere expressão específica em tecidos embrionários.

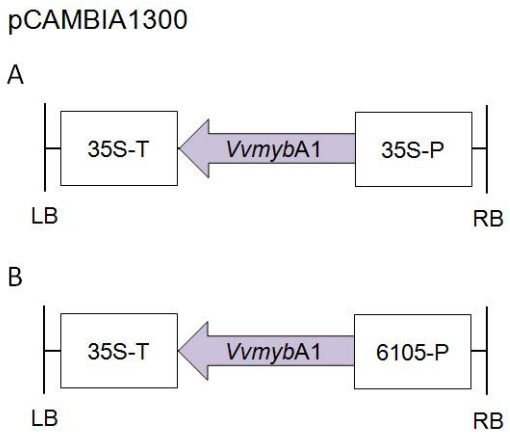

Figura 3 - Esquema das construções gênicas (pC1300-35S/*Vvmyb*A1 e pC1300-6105/*Vvmyb*A1) contendo o gene do fator de transcrição *Vvmyb*A1, utilizadas nos experimentos de transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott'. A: pC1300-35S/*Vvmyb*A1; B: pC1300-6105/*Vvmyb*A1. 35S-P: promotor constitutivo CaMV35S; 35S-T: terminador; 6105-P: promotor específico para expressão gênica em tecidos embrionários de *C. sinensis*; LB: borda esquerda; RB: borda direita.

3.4 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

Os isolados de *A. tumefaciens* EHA 105 utilizados nos experimentos de transformação genética foram conservados (-80 ºC) em solução de 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 desses isolados, foi preparado um estoque de trabalho, constituído da suspensão bacteriana cultivada em tubo de 2 mL, contendo meio de cultura YEP sólido, suplementado com os antibióticos mencionados acima e conservados a 4 ºC. A partir do estoque de trabalho, alíquotas da suspensão bacteriana foram transferidas

para placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura YEP sólido, suplementado com os mesmos antibióticos, cultivadas a 27 ºC (72 h). Para o preparo do inóculo, uma colônia isolada foi transferida para o meio de cultura YEP líquido, contendo os antibióticos, e incubado por 16 h, em agitador orbital (28 ºC; 150 rpm^{-1}). Posteriormente a suspensão bacteriana foi centrifugada (4000 rpm; 12 min; 15 ºC), e o precipitado ressuspendido em meio de cultura MS (5 x 10^8 a 10^9 $UFC.mL^{-1}$).

3.5 Transformação genética utilizando-se segmentos de epicótilo e internodal como explantes

Os segmentos de epicótilo e internodal foram inoculados com a suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* (5.10^8 x 10^9 $UFC.mL^{-1}$), em placa de Petri, durante 15 min e, em seguida, secos em papel filtro estéril para retirar o excesso de bactéria. Os explantes foram co-cultivados em meio de cultura de co-cultivo EME (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), suplementado com BAP (1,0 $mg.L^{-1}$), acetoseringona (100 $mM.L^{-1}$), sacarose (25 $g.L^{-1}$), ácido ascórbico (50 $mg.L^{-1}$), ágar (8 $g.L^{-1}$), e pH ajustado para 5,5. A incubação foi realizada à temperatura de 24 °C, por 2 dias, em ausência de luz.

3.5.1 Seleção e regeneração de plantas

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção EME, suplementado com as mesmas concentrações de BAP, acetoseringona, sacarose, ácido ascórbico e ágar utilizadas no período de co-cultivo, cefotaxima (100 $mg.L^{-1}$) e canamicina (100 $mg.L^{-1}$) e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram subcultivados para meio de cultura fresco a cada 15 dias.

As gemas adventícias desenvolvidas foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange ‘Carrizo’, obtidas de sementes germinadas *in vitro,* e foram incubadas a 27 ºC, sob o fotoperíodo de 16 h de luz.

3.5.2 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR

A identificação de plantas transgênicas foi realizada pela análise de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O DNA foi extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) de folhas de plantas enxertadas *in vitro*. O gene *att*A foi amplificado utilizando-se os *primer*s *att*-F 5’ACATGTTCACCTACAAATTGAT3' e *att*-R 5'GGTCACCTACCACTTATTACCAAAAGAC3', utilizando-se o programa: 94 ºC por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 ºC por 30 s, 52 ºC por 30 s, 72 ºC por 1 min e uma extensão final de 72 ºC por 4 min.

As plantas identificadas como PCR positivas foram transferidas para aclimatização. Durante esta fase, as plantas foram mantidas em um vaso plástico contendo substrato autoclavado e incubadas em condições da alta umidade relativa. As plantas aclimatizadas foram transferidas para casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas (ESALQ/USP).

3.5.3 Caracterização molecular das plantas por análise de *Southern blot*

A análise de *Southern blot* foi realizada em plantas PCR positivas das variedades de tangerina 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules' contendo as construções gênicas pCAtPP2/*att*A e pCAtSUC2/*att*A e plantas não transgênicas (controle negativo). O DNA total foi extraído de folhas jovens (1,4 g) pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e quantificado por fluorometria (Quanti-iT DNA Assay - Invitrogen). Após a quantificação, 20 a 60 µg de DNA foram submetidos à reação de digestão, utilizando a enzimas *Bam*HI (construção gênica pCAtSUC2/attA) ou *Hind*III (construção gênica pCAtPP2/*att*A). Estas enzimas foram escolhidas por cortar apenas uma vez a região do T-DNA, fora do gene *att*A. Para a digestão, utilizou-se 5 unidades de enzima por µg de DNA. A reação de digestão foi realizada por 16 h a 30

ºC (*Bam*HI) ou 37 ºC (*Hind*III). Após este período, os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose (1%) por eletroforese, transferidos para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N+' (GE Healthcare) e fixados em alta temperatura (80 ºC; 2 h).

A membrana foi hibridizada (16 h; 60 ºC) com 150 ng de sonda marcada com a enzima Fosfatase Alcalina (AlkPhos Direct Labelling Reagents - GE Healthcare), para a detecção do gene *att*A. A sonda foi preparada amplificando-se o gene *att*A, a partir do plasmídeo pCAtSUC2/*att*A, extraído de *E. coli* (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System: Promega). Os fragmentos amplificados foram purificados com o auxílio do kit 'QIAEX® II Gel Extration' (Qiagen) e quantificados por fluorometria.

A reação de detecção foi realizada com auxílio do kit 'CDP - StarTM Detection Reagent' (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi introduzida no cassete fotográfico (Hypercassette™ Amersham Life Science) contendo chapa fotográfica (Hyperfilm - GE Healthcare) por um período de 1 - 2 h. Após o tempo de exposição, a chapa fotográfica foi revelada, utilizando-se revelador e reforçador (Kodak GBX), por 4 min, lavada em água (1 min), em seguida transferida para fixador e reforçador (Kodak GBX), por 14 min, e lavada em água (1 min).

3.5.4 Análise da expressão do transgene

O RNA foi extraído a partir da nervura principal de folhas de plantas transgênicas confirmadas por *Southern blot*, utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen). Em seguida o RNA foi purificado (RNeasy Plant Mini Kit - Qiagen) e tratado com DNase (RNase-Free DNase Set - Qiagen), para remover qualquer contaminação por DNA. Após este procedimento, o RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop - Thermo Scientific) e a pureza foi determinada pelo razão de OD260/OD280 (1,80 - 2,00).

Para a síntese do cDNA, utilizou-se 1 µg de RNA, 1 µl de oligo dT (10 µM) e 1 µl de mix de dNTP (10 mM) e adicionou-se água para um volume final de 12 µl. A

solução foi incubada em banho-maria (65 ºC; 5 min), e depois acondicionada em gelo (3 min). Em seguida, adicionou-se 4 µl de tampão First Strand (5x), 2 µl de DDT (0,1 M) e 1 µl de RNaseOUT (Invitrogen), incubando-se a solução em banho-maria (37 ºC; 2 min). Após este período, adicionou-se 1 µl da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e a reação foi incubada a 37 ºC (50 min). Posteriormente, a reação foi mantida a 70 ºC (15 min) para inativação.

O cDNA obtido foi utilizado para a análise de RT-qPCR, no equipamento 7500 Fast™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para a amplificação foi utilizada placa de 96 poços (0,1 mL; MicroAmp - Applied Biosystems).

As reações foram realizadas adicionando-se *primers* específicos para detecção do gene *att*A-F 5'TCGTCACCAAGAACATGCCTGACT3' e *att*A-R 5'AAGAATGGAGTGTTTGCCATGCCG3'.

As reações foram preparadas utilizando-se 10 µl de cDNA diluído (2,5 $ng.\mu l^{-1}$), 0,6 µl do conjunto de *primers* (5 µM), 7,5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 1,9 µl de água. Foram realizadas 2 réplicas técnicas para cada amostra. Os genes FBOX e UBQ utilizados como referência. Para a amplificação utilizou-se o programa padrão do equipamento, no modo FAST, conforme descrito a seguir: 95 ºC por 20 s, seguido de 40 ciclos de 95 ºC por 3 s e 60 ºC por 30 s. Ao final da reação foi determinado o ponto de fusão médio dos amplicons, por meio da análise de Melting, submetendo as amostras a 95 ºC, por 15 s, aquecendo-as gradativamente de 60 - 95 ºC, com taxa de aquecimento de 0,3 $ºC.s^{-1}$ e em seguida, mantendo-as a 60 ºC (15 s).

Os dados dos níveis de fluorescência foram analisados com o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), para o cálculo do ciclo de quantificação (Cq) e eficiência das curvas de amplificação. O cálculo da expressão gênica foi realizado, pelo método comparativo, utilizando-se o programa GenEx (versão 5.3.6.170).

3.6 Transformação genética utilizando-se suspensões celulares como explantes

As suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page', foram transformadas geneticamente conforme protocolo descrito por Dutt e Grosser (2010).

Suspensões celulares embriogênicas, sete dias após o terceiro cultivo, foram imersas na suspensão de *A. tumefaciens* (10 min). Em seguida, a cultura de células foi seca em discos de papel de filtro (Whatman® - 25 mm) e plaqueada em meio de cultura EME-maltose sólido (sacarose substituída por maltose - 50 $g.L^{-1}$), suplementado com acetoseringona (100 $mM.L^{-1}$) e incubado a 25 ºC, por 5 dias no escuro. O material foi transferido para o meio de cultura de seleção, EME-maltose sólido suplementado com 400 $mg.L^{-1}$ de timentin (Duchefa Biochemie B.V.) e 25 $mg.L^{-1}$ de higromicina B (Sigma-Aldrich Corp.). As células embriogênicas foram transferidas para temperatura de 28 ºC e fotoperíodo de 16 h de luz. O meio de cultura de seleção foi renovado a cada 2 semanas. Durante o segundo subcultivo, as células foram hidratadas com uma fina camada (2 mL) da mistura líquida 1:2 (v:v; 0,6 M BH3: 0,15 M EME-maltose) suplementada com de higromicina B (25 $mg.L^{-1}$) e timentin (400 $mg.L^{-1}$).

Os embriões desenvolvidos, expressando o fator de transcrição *Vvmyb*A1, identificados pela presença da coloração roxo-escuro nos tecidos embrionários iniciais, foram separados fisicamente *in vitro* dos tecidos originais e transferidos para meio de cultura EME, suplementado com sacarose (25 $g.L^{-1}$) e posteriormente para o meio de cultura de expansão 1500 (meio EME modificado pela adição de 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de malte), em placas de Petri (100 x 20 mm), sendo subcultivados a cada 15 dias. Após a germinação dos embriões, o material foi transferido para o meio de cultura B+ (meio 1500 modificado pela adição de 0,02 $mg.L^{-1}$ de ácido naftaleno acético, 14,6 $mg.L^{-1}$ de cumarina e 20 mL de água de coco), inicialmente em placas de Petri (100 x 20 mm) e depois transferidos para frasco tipo Magenta®. As plântulas desenvolvidas e alongadas foram transferidas para o meio de cultura de enraizamento RMAN, por 30 dias (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

3.7 Transformação genética utilizando-se protoplastos como explantes

O isolamento, purificação e transformação genética de protoplastos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Fleming et al. (2000).

Para o isolamento dos protoplastos, cerca de 500 mg da cultura de células em suspensão foram transferidos para placas de Petri (58 x 15 mm), contendo meio de cultura BH3 (2 mL; 0,7 M) e solução enzimática (2 mL) composta por:

- 1% de Cellulase Onozuka R.S. (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.);
- 1% de Macerase R10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltda.); e
- 0,2% de Pectoliase Y-23 (Seishin).

A purificação dos protoplastos foi iniciada após 14 - 16 h de incubação (25 ºC), sob agitação constante (40 rpm), verificando-se em microscópio óptico invertido a ocorrência de digestão da parede celular. A suspensão de isolamento foi filtrada em peneira de nylon (45 µm) e, em seguida, recolhida em tubo de centrífuga (15 mL). Após a centrifugação (100g; 5 min), o sobrenadante foi retirado e descartado. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL da solução CPW 25 M (FREASON; POWER; COCKING, 1973), sobre o qual foi adicionado, delicadamente, 3 mL da solução CPW 13 M (FREASON; POWER; COCKING, 1973), gerando um gradiente de densidade entre os meios. Após centrifugação (100 g; 8 min), a banda formada por protoplastos na interface dos meios foi coletada com o auxílio da pipeta de Pasteur e transferida para um novo tubo, contendo meio de cultura BH3 (5 mL; 0,7 M). Após nova centrifugação (100 g; 5 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi diluído em meio de cultura BH3 (0,7 M).

Para transformação genética 20 µg da suspensão de DNA plasmidial contendo as construções gênicas, presente em tampão TE (pH 7,5), foram misturadas a 0,5 mL da suspensão de protoplastos, seguido da adição de 0,5 mL da solução de PEG 1500 (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Após a incubação (20 min), foram adicionadas duas gotas da solução de eluição, formada por 2 mL da solução de lavagem “A”, para cada quatro gotas da solução de lavagem “B” (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010), incubando-se por 20 min. Em seguida, foi realizada a tríplice lavagem (10 min) dos protoplastos com 15 a 20 gotas do meio de cultura. Os protoplastos foram então plaqueados em 4

placas de Petri (90 x 15 mm) com meio de cultura BH3 (0,7 M) líquido e incubados no escuro, a 27 ºC.

A cultura dos protoplastos, multiplicação das microcolônias e microcalos e indução da embriogênese somática foram executadas conforme metodologia proposta por Grosser e Gmitter Junior (2010).

Aos 20 dias de cultivo, foi iniciada a redução da pressão osmótica do meio de cultura pela adição de 10 a 12 gotas da mistura 1:1:1 de BH3 0,7 M: EME 0,6 M: EME 0,146 M (v:v:v). Nos cultivos posteriores, o mesmo volume foi adicionado, no entanto, empregou-se a mistura 1:2 de BH3 0,7 M: EME 0,146 M (v:v) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

Os microcalos desenvolvidos foram transferidos para placas de Petri (100 x 15 mm), contendo meio EME, modificado pela substituição da sacarose por 13 $g.L^{-1}$ (37 mM) de maltose. O material foi incubado sob fotoperíodo de 16 horas de luz, a 27 ºC.

Os embriões desenvolvidos no meio EME-maltose foram transferidos para meio de cultura EME suplementado com sacarose (25 $g.L^{-1}$) e posteriormente para o meio de expansão 1500 (meio EME modificado pela adição de 1,0 $g.L^{-1}$ de extrato de malte) em placas de Petri (100 x 20 mm), sendo subcultivados a cada 15 dias.

Para avaliar a eficiência da introdução do DNA-exógeno no genoma dos protoplastos, a eficiência da expressão do gene do fator de transcrição *Vvmyb*A1 e o desempenho do promotor tecido-específico 6105 em relação ao promotor constitutivo CaMV35S, foram realizados dois experimentos testando diferentes temperaturas, pesos moleculares de PEG e a ação do reagente de transfecção.

No primeiro experimento (A), as suspensões plasmidiais com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1 em contato com a suspensão de protoplastos foram submetidas, antes da adição do PEG, a 3 tratamentos térmicos de 5 min:

- Tratamento 1 (TA1): 25 ºC (controle);
- Tratamento 2 (TA2): 45 ºC;
- Tratamento 3 (TA3): 45 ºC seguido de 0 ºC; e
- Tratamento 4 (TA4): 0 ºC.

No segundo experimento (B), utilizando as mesmas suspensões plasmidiais com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1,

foram utilizados três diferentes pesos moleculares de PEG e o reagente de transfecção:

- Tratamento (TB1): 30 µL do reagente de transfecção (ViaFect™ Transfection Reagent Promega), em substituição ao PEG;
- Tratamento (TB2): 0,5 mL da solução de PEG 1500 daltons (controle);
- Tratamento (TB3): 0,5 mL da solução do PEG 4000; e
- Tratamento (TB4): 0,5 mL da solução do PEG 6000.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Organogênese *in vitro*

Os explantes introduzidos no meio de cultura EME, suplementado com BAP foram avaliados após 45 dias de incubação. O desenvolvimento de gemas adventícias foi detectado nos segmentos de epicótilo (Figura 4A-C) e internodal (Figura 4D-F) após seis semanas de cultivo *in vitro*.

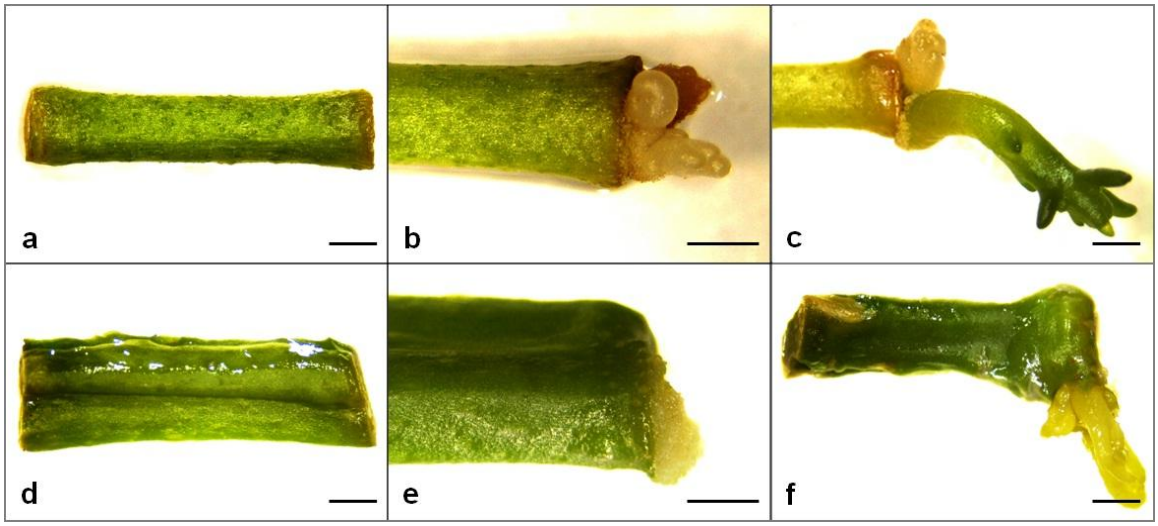

Figura 4 - Organogênese *in vitro* de tangerina. Explantes cultivados em meio de cultura EME suplementado com BAP (1 $mg.L^{-1}$): segmento de epicótilo (A-C) e segmento internodal (D-F). Explante inicial em fase de estabelecimento (A e D). Detalhe das gemas adventícias desenvolvidas após 30 dias de incubação no escuro (B e E). Desenvolvimento das gemas adventícias após transferência para condições de fotoperíodo de 16 h de luz (C e F). Barra = 1 mm.

Os segmentos de epicótilo das variedades ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ apresentaram médias de porcentagem de explantes responsivos e número de gemas por explantes significativamente similares entre si (Tabela 1). Assim, um padrão semelhante de regeneração *in vitro* foi observado para segmentos de epicótilo das três variedades de tangerina. Para os explantes de segmentos internodais foi verificado maior porcentagem de explantes responsivos para as variedades ‘Nules’ e ‘Fremont’ em comparação com a variedade ‘Thomas’. A variedade ‘Nules’ apresentou maior número de gemas por explante em comparação

com as variedades ‘Fremont’ e ‘Thomas’ (Tabela 1). Estes valores foram diferentes aos relatados para espécies de citros consideradas mais responsivas, como a laranja-doce. Pérez-Molphe-Balch e Ochoa-Alejo (1997) observaram uma capacidade de resposta de 96% para *C. aurantifolia*, enquanto que Soriano et al. (2012) relataram valor médio de 81,49% de explantes responsivos para limão ‘Cravo’.

Tabela 1 - Organogênese *in vitro* das variedades de tangerina ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ a partir de segmentos de epicótilo (média de três experimentos, totalizando 108 explantes por tratamento).

explantes responsivos (%)						
	variedades					
BAP (mg.L^{-1})	‘Fremont’		‘Thomas’		‘Nules’	
	SE	SI	SE	SI	SE	SI
0,0	36,11	9,26	34,26	7,41	30,56	16,67
0,5	56,48	23,15	65,74	13,89	54,63	24,07
1,0	78,70	50,93	73,15	40,74	82,41	54,63
1,5	57,41	15,74	55,56	12,04	54,63	18,52
2,0	32,41	7,41	36,11	5,56	31,48	12,96
Média*	52,22 A	21,30 a	52,96 A	15,93 b	50,74 A	25,37 a

número de gemas por explante						
	variedades					
BAP (mg.L^{-1})	‘Fremont'		‘Thomas’		‘Nules’	
	SE	SI	SE	SI	SE	SI
0,0	3,06	1,11	3,28	1,39	3,22	2,06
0,5	4,61	2,17	5,67	1,56	5,00	2,50
1,0	6,11	4,00	5,89	3,89	6,56	5,17
1,5	4,56	1,78	4,67	1,44	4,67	2,11
2,0	2,89	0,83	3,39	0,72	3,17	1,83
Média*	4,24 A	1,98 b	4,58 A	1,80 b	4,52 A	2,73 a

SE: segmento de epicótilo; SI: segmento internodal.
*Médias com letras maiúsculas para segmento de epicótilo e minúsculas para segmento internodal.
*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey’s (5%).
*Coeficiente de variação dos explantes responsivos = 40%.
*Coeficiente de variação do número de gemas por explante = 38%.

De acordo com Duran-Vila et al. (1992) a capacidade de resposta para laranja doce é ao redor de 70%. Ainda assim, algumas espécies são menos eficientes no desenvolvimento de gemas adventícias. Bordón et al. (2000) observou 40% de explantes responsivos para *C. aurantium* e Tavano et al. (2009) relatou 42% para *C. volkameriano*.

Independente do tipo de explante ou variedade a maior eficiência na organogênese *in vitro* nas variedades de tangerina estudadas foi obtida com a concentração de 1,0 $mg.L^{-1}$ (Figura 5), demonstrando a importância da citocinina em estimular o desenvolvimento de gemas adventícias no cultivo *in vitro* de tangerinas. Este valor é semelhante aos encontrados para laranjas doces (MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SCHINOR et al., 2006). Entretanto, outras espécies de *Citrus* necessitam maiores concentrações de BAP. Limão 'Cravo' (MOURA et al., 2001), citrange 'Troyer' (GARCÍA-LUIS et al., 1999; MOREIRA-DIAS et al., 2001) e *C. aurantifolia* (PERES-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997) apresentaram melhores resultados em meios de cultura suplementado com concentrações equivalentes ou superiores a 2,0 $mg.L^{-1}$ de BAP.

Diferente de Lombardo et al. (2011) e Tavano et al. (2009) a suplementação dos meios de cultura com BAP não foi considerada necessária para a regeneração *in vitro*. O desenvolvimento de gemas adventícias ocorreu nos tratamentos sem a citocinina, com valores muito próximos aos tratamentos com a concentração de 2,0 $mg.L^{-1}$ de BAP (Tabela 1). Schinor et al. (2011) quando avaliaram a organogênese de tangerinas, relataram que a presença de citocinina também não foi essencial para o desenvolvimento de gemas adventícias. Assim, a necessidade de suplementação de meios de cultura BAP para regeneração *in vitro* de citros pode variar de acordo com as doses endógenas de auxina/citocinina presente em cada genótipo.

Há décadas o emprego de reguladores de crescimento na composição de meios de cultura tornou-se uma prática comum no estudo da morfogênese *in vitro*. Dentre os fitorreguladores, as citocininas promovem a divisão celular e estimulam a multiplicação de brotações (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998), sendo o 6-benzilaminopurina (BAP) a citocinina mais amplamente usada em protocolos de regeneração *in vitro* de citros, sendo responsável pela indução e desenvolvimento de gemas adventícias em diversas espécies.

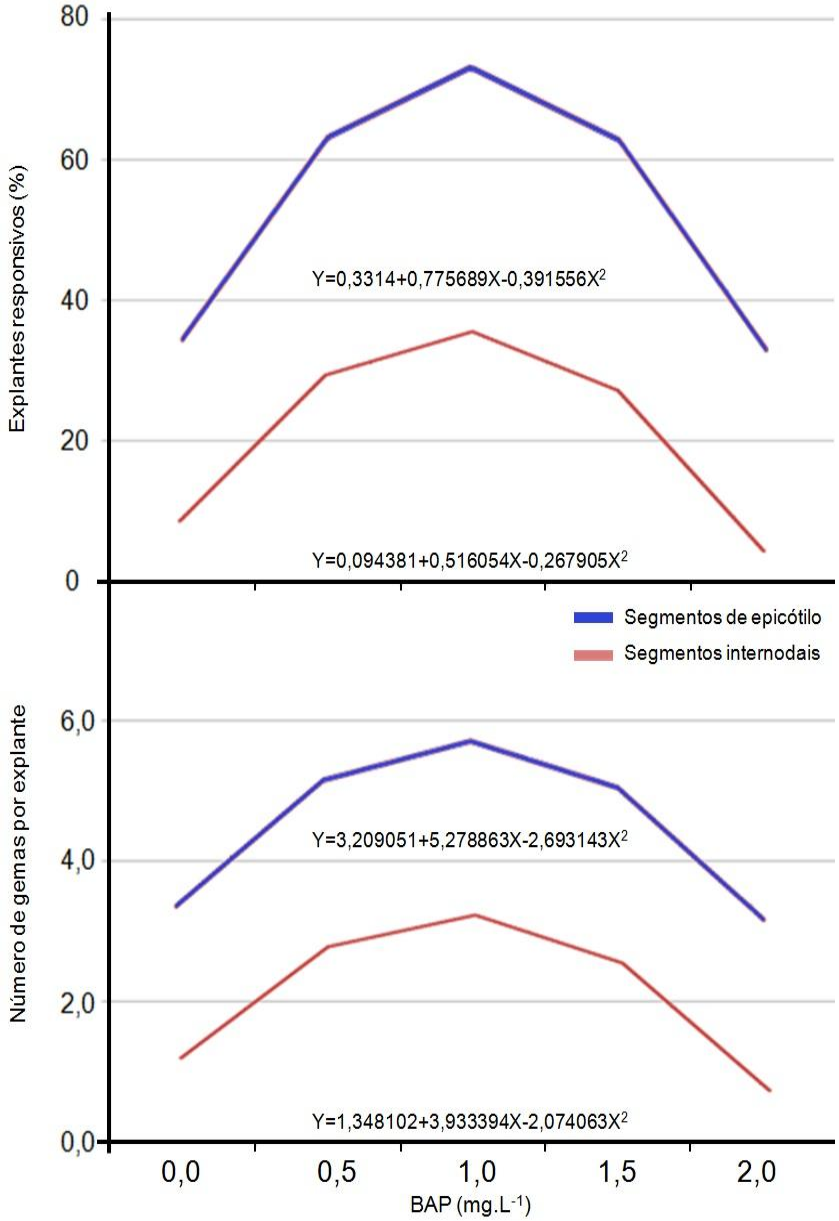

Figura 5 - Organogênese *in vitro* das variedades de tangerina 'Fremont', 'Thomas' e 'Nules' a partir do cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo e internodal em função da concentração de BAP adicionada ao meio de cultura.

No presente estudo, foi possível verificar que altas doses de BAP não promoveram um efeito sinérgico junto aos níveis endógenos de citocinina, comprometendo o processo de regeneração *in vitro*. O efeito inibidor com concentrações elevadas de BAP foi também relatado em outros genótipos de citros (MOLINA et al., 2007; CERVERA et al., 2008).

O percentual de explantes responsivos para segmentos de epicótilo foi muito maior em comparação aos valores obtidos para os segmentos internodais. Embora os segmentos de epicótilo seja o tipo explante mais frequentemente utilizado em

protocolos de regeneração *in vitro*, os segmentos internodais têm sido também descritos como explantes responsivos em *Citrus* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997; SCHINOR et al., 2011).

Quanto ao número de gemas por explante, os melhores resultados também foram obtidos para os segmentos de epicótilo, com valores superiores aos obtidos para os segmentos internodais (Tabela 1). Soriano et al. (2012) obtiveram uma resposta quase três vezes superior para o segmentos de epicótilo do que para o segmentos de hipocótilo de *C. limonia* utilizando o mesmo regulador de crescimento.

4.2 Transformação genética utilizando-se segmentos de epicótilo e internodal como explantes

Neste trabalho, segmentos de epicótilo e internodal das tangerinas ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ foram inoculados com suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* contendo as construções pCAtPP2/*att*A e pCAtSUC2/*att*A, com o gene que codifica o peptídeo antibacteriano atacina A (*att*A), controlado pelos promotores específicos de floema AtPP2 e AtSUC2, respectivamente.

Após o período de co-cultivo, foi possível observar o desenvolvimento de gemas adventícias nos explantes das três variedades, em meio de cultura de seleção, entre 30 a 90 dias de incubação após os experimentos de transformação genética (Figura 6A-B). Em seguida, as brotações vigorosas das tangerinas ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ regeneradas enraizaram no meio de cultura EME (Figura 6C) ou foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange ‘Carrizo’ (Figura 6D). A fixação entre copa e porta-enxerto foi satisfatória para as três variedades de tangerina (Figura 6E), resultando no bom pegamento da enxertia *in vitro* e regenerando plantas que foram aclimatizadas para as posteriores avaliações moleculares (Figura 6F).

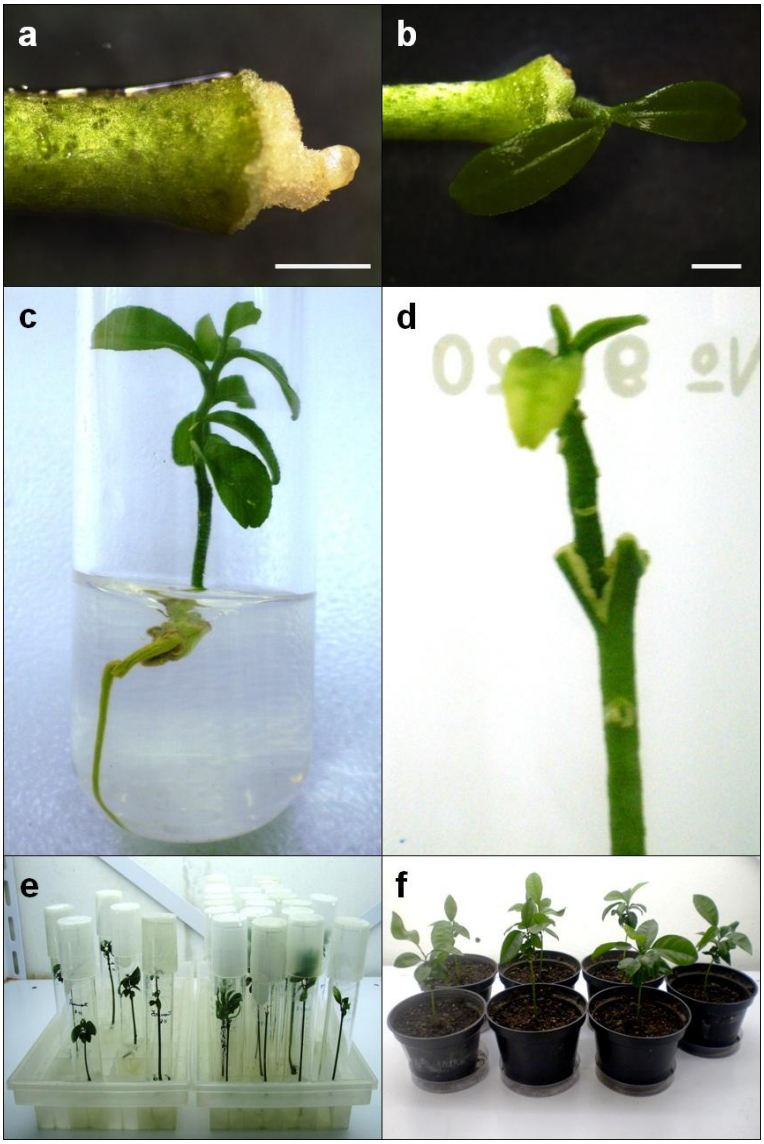

Figura 6 - Transformação genética de segmentos de epicótilo com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A. Desenvolvimento de gema adventícia após 30 dias (a) e 90 dias (b) de incubação. Enraizamento *in vitro* em meio de cultura EME (c). Enxertia *in vitro* de brotação em citrange 'Carrizo' (d). Desenvolvimento do material após enxertia *in vitro* (e). Aclimatização das plantas regeneradas (f). Barra = 0,2 cm.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 são apresentados os dados dos experimentos de transformação genética realizados com as três variedades em estudo e com as construções gênicas pCAtPP2/*att*A e pCAtSUC2/*att*A, utilizando segmentos de epicótilo e internodal como fonte de explantes.

Tabela 2 - Experimentos de transformação genética realizados com segmentos de epicótilo e internodal da variedade ‘Fremont’ (número total de explantes introduzidos e de plantas transgênicas obtidas).

tipo de explante	construções gênicas	experimentos	número de explantes introduzidos	número de plantas PCR+
segmentos de epicótilo	pCAtPP2/*att*A	1	61	0
		2	72	0
		3	102	0
		4	127	0
		5	71	0
		6	197	0
		7	162	1
		8	162	1
		9	124	0
		10	162	0
		11	138	1
		total	1378	3
	pCAtSUC2/*att*A	1	41	0
		2	141	0
		3	197	1
		4	87	0
		5	101	0
		6	42	0
		7	81	1
		8	176	1
		9	204	1
		10	177	0
		11	163	2
		12	169	1
		13	161	1
		14	134	0
		total	1874	8
segmentos internodais	pCAtPP2/*att*A	1	59	0
		2	62	0
		3	74	0
		total	195	0
	pCAtSUC2/*att*A	1	81	0
		2	69	0
		3	87	0
		4	61	0
		total	298	0

Tabela 3 - Experimentos de transformação genética realizados com segmentos de epicótilo e internodal da variedade 'Thomas' (número total de explantes introduzidos e de plantas transgênicas obtidas).

tipo de explante	construções gênicas	experimentos	número de explantes introduzidos	número de plantas PCR+
segmentos de epicótilo	pCAtPP2/*att*A	1	127	0
		2	82	0
		3	77	0
		4	62	0
		5	98	0
		6	78	0
		7	176	0
		8	161	2
		9	203	1
		10	191	1
		11	165	2
		12	176	2
		13	147	2
		total	1743	10
	pCAtSUC2/*att*A	1	113	0
		2	70	0
		3	74	0
		4	164	0
		5	191	0
		6	173	1
		7	187	0
		8	127	0
		9	198	11
		total	1297	12
segmentos internodais	pCAtPP2/*att*A	1	69	0
		2	70	0
		3	72	0
		total	211	0
	pCAtSUC2/*att*A	1	84	0
		2	51	0
		3	68	0
		total	203	0

Tabela 4 - Experimentos de transformação genética realizados com segmentos de epicótilo e internodal da variedade 'Nules' (número total de explantes introduzidos e de plantas transgênicas obtidas).

tipo de explante	construções gênicas	experimentos	número de explantes introduzidos	número de plantas PCR+
segmentos de epicótilo	pCAtPP2/*att*A	1	39	0
		2	98	0
		3	96	0
		4	97	0
		5	82	0
		6	187	0
		7	177	2
		8	187	1
		total	963	3
	pCAtSUC2/*att*A	1	98	0
		2	65	0
		3	142	0
		4	82	0
		5	86	0
		6	162	2
		7	74	0
		total	709	2
segmentos internodais	pCAtPP2/*att*A	1	72	0
		2	71	0
		3	89	0
		4	82	0
		total	314	0
	pCAtSUC2/*att*A	1	75	0
		2	80	0
		3	103	0
		total	258	0

Dos experimentos de transformação genética com segmentos de epicótilo da variedade ‘Fremont’, foram obtidas três plantas transgênicas com a construção gênica pCAtPP2/*att*A e oito com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A (Tabela 2).

Para a variedade ‘Thomas’, utilizando-se a construção gênica pCAtPP2/*att*A, foram identificadas dez plantas PCR positivas e doze para a construção gênica pCAtSUC2/*att*A (Tabela 3). Por sua vez, foram identificadas três plantas PCR positivas da variedade ‘Nules’ com a construção gênica pCAtPP2/*att*A e duas com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A (Tabela 4).

Os experimentos de transformação genética com segmentos internodais apresentaram baixa capacidade de resposta e não produziram brotações vigorosas para a enxertia *in vitro*.

As plantas desenvolvidas após o pegamento da enxertia, contendo 3-5 folhas, foram analisadas por PCR para a confirmação da inserção do transgene no genoma das plantas (Figura 7). Foram identificadas plantas transgênicas das três variedades com as duas construções gênicas utilizadas, as quais foram aclimatizadas em casa-de-vegetação certificada.

As plantas PCR positivas aclimatizadas em casa-de-vegetação foram selecionadas para a análise de *Southern blot* para confirmar a integração do gene *att*A e verificar o número de eventos de inserções do transgene no genoma. Foram analisadas plantas das três variedades obtidas a partir dos experimentos com as construções gênicas pCAtPP2/*att*A e pCAtSUC2/*att*A. As plantas analisadas foram escolhidas em função do tamanho adequado para a retirada de folhas utilizadas para a extração de DNA. No total, foram avaliadas onze plantas de tangerina ‘Fremont’, das quais três foram obtidas com a construção gênica pCAtPP2/*att*A e oito com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A; dezenove plantas de tangerina ‘Thomas’, das quais sete foram obtidas com a construção gênica pCAtPP2/*att*A e doze com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A; e três plantas de clementina ‘Nules’, das quais somente uma foi obtida com a construção gênica pCAtPP2/*att*A e duas com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A (Figura 8).

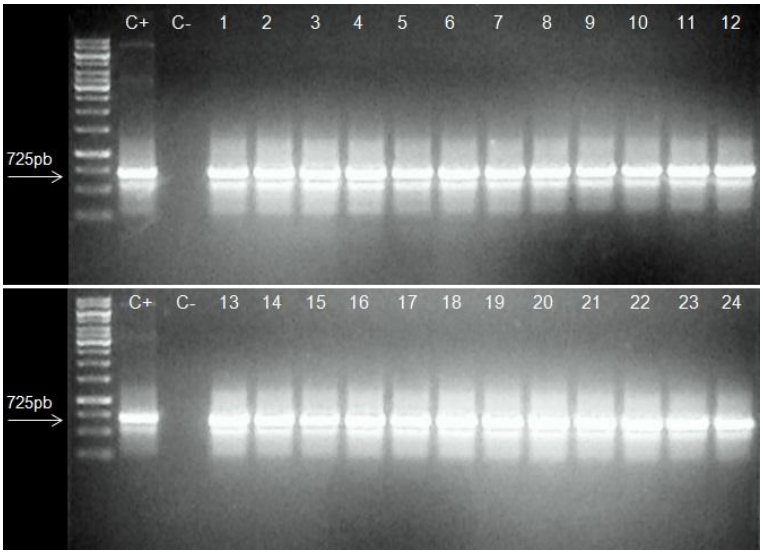

Figura 7 - Análise de PCR de plantas de tangerina obtidas dos experimentos de transformação genética. Colunas 1-3: plantas transgênicas da variedade 'Fremont' com a construção gênica pCAtPP2/*att*A; colunas 4-10: plantas transgênicas da variedade 'Thomas' com a construção gênica pCAtPP2/*att*A; colunas 11-12: plantas transgênicas da variedade 'Nules' com a construção gênica pCAtPP2/*att*A; colunas 13-15: plantas transgênicas da variedade 'Fremont' com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A; colunas 16-22: plantas transgênicas da variedade 'Thomas' com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A; colunas 23-24: plantas transgênicas da variedade 'Nules' com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A. C+: controle positivo (plasmídeo pGEM®-T contendo o gene *att*A); C-: controle negativo (planta não transgênica). O fragmento amplificado (725pb) corresponde ao gene *att*A. Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

Para a análise de RT-qPCR, foram utilizados os genes endógenos FBOX e UBQ como referência para normalizar o nível de expressão do gene *att*A e uma planta não transgênica de citros (*C. sinenses*) como controle negativo. A calibração foi feita com a planta transgênica com menor nível de expressão. A Figura 9 mostra a análise de RT-qPCR que permite avaliar a expressão do gene *att*A, em relação aos genes de referência FBOX e UBQ em duas plantas transgênicas da variedade 'Fremont' com a construção pCAtPP2/*att*A, três plantas transgênicas da variedade 'Thomas' com a construção pCAtPP2/*att*A, uma planta transgênica da variedade com a construção 'Nules' com a construção pCAtPP2/*att*A, duas plantas transgênicas da variedade 'Fremont' com a construção pCAtSUC2/*att*A, três plantas transgênicas da variedade 'Thomas' com a construção pCAtSUC2/*att*A e uma planta transgênica da variedade 'Nules' com a construção pCAtSUC2/*att*A.

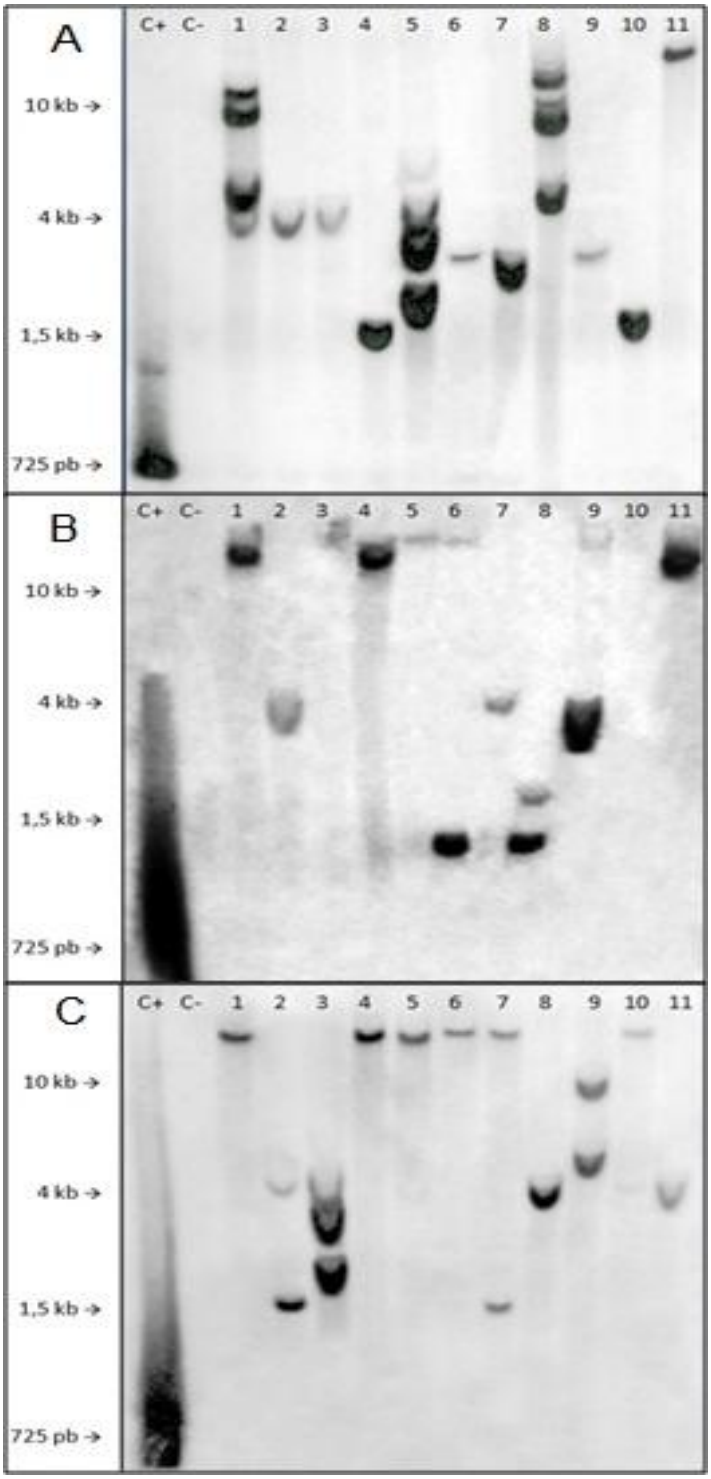

Figura 8 - Análise de *Southern blot* em plantas de tangerina obtidas a partir dos experimentos de transformação genética. A) DNA de plantas PCR+ obtidas após transformação genética com a construção gênica pCAtPP2/*att*A digerido com a enzima *Hind*III; B e C) DNA de plantas PCR+ obtidas após transformação genética com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A digerido com a enzima *Bam*HI. Colunas 1-3A e 1-6B: plantas transgênicas da variedade 'Fremont'; colunas 4-10A, 9B e 1-11C: plantas transgênicas da variedade 'Thomas'; colunas 11A e 10-11B: plantas transgênicas da variedade 'Nules'. C+: Controle positivo - fragmento amplificado do gene *att*A (725 pb). C-: Controle negativo - DNA de planta de tangerina 'Fremont' não transgênica, digerido com a enzima de restrição *Hind*III.

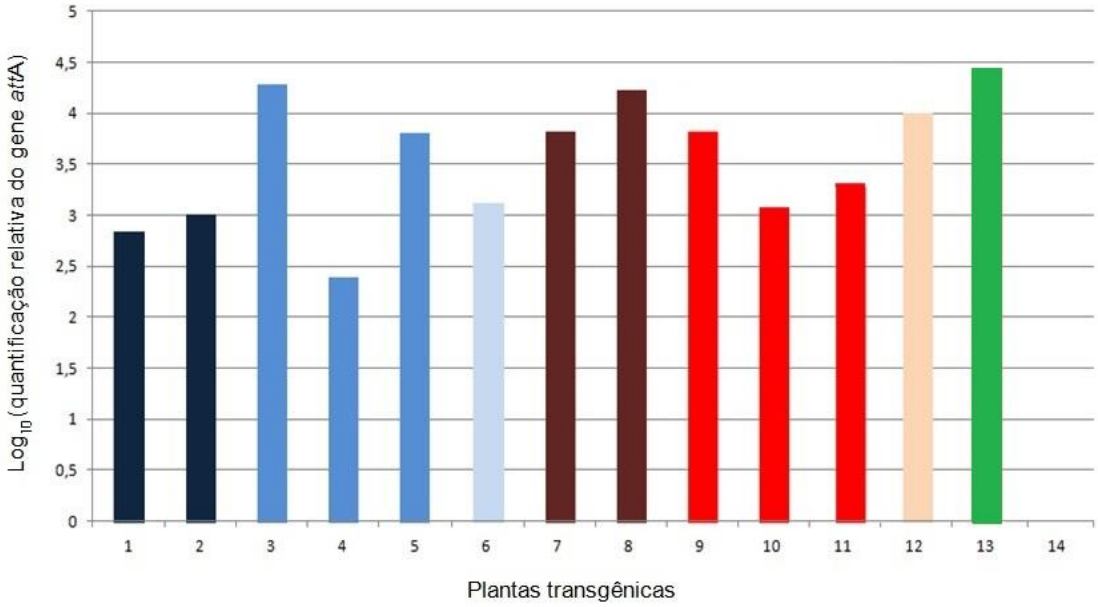

Figura 9 - Expressão do gene *att*A, em relação aos genes de referência FBOX e UBQ, em plantas transgênicas de tangerina. Coluna 1-2: plantas transgênicas da variedade 'Fremont' com a construção pCAtPP2/*att*A; colunas 3-5: plantas transgênicas da variedade 'Thomas' com a construção pCAtPP2/*att*A; coluna 6: planta transgênica da variedade com a construção 'Nules' com a construção pCAtPP2/*att*A; colunas 7-8: plantas transgênicas da variedade 'Fremont' com a construção pCAtSUC2/*att*A; colunas 9-11: plantas transgênicas da variedade 'Thomas' com a construção pCAtSUC2/*att*A; coluna 12: planta transgênica da variedade 'Nules' com a construção pCAtSUC2/*att*A; coluna 13: planta contendo o gene *att*A sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S; coluna 14: planta de laranja doce não transgênica utilizada como controle negativo.

A Tabela 5 mostra o resumo dos resultados dos experimentos de transformação genética das três variedades de tangerina, com segmentos de epicótilo como fonte de explantes, apresentando a eficiência de tranformação e o número de plantas transgênicas confirmadas via PCR e *Southern blot*.

Com base no número total de plantas transgênicas obtidas, foi possível destacar a variedade 'Thomas' em relação às variedades 'Fremont' e 'Nules', caracterizando esse genótipo como o mais receptivo à transformação genética utilizando-se segmentos de epicótilo como explante.

Tabela 5 - Resumo dos resultados dos experimentos de transformação genética para cada construção gênica e variedade estudadas.

variedade	construção gênica	eficiência de transformação genética (%)[a]	número de plantas PCR +	número de plantas *Southern blot* +[b]
'Fremont'	pCAtPP2/*att*A	0,22	3	3/3
	pCAtSUC2/*att*A	0,43	8	8/8
'Thomas'	pCAtPP2/*att*A	0,57	10	7/7
	pCAtSUC2/*att*A	0,93	12	12/12
'Nules'	pCAtPP2/*att*A	0,31	3	1/1
	pCAtSUC2/*att*A	0,28	2	1/2
	Total		38	32

[a] Número de plantas PCR+ (x100) / número total de explantes introduzidos.
[b] Plantas confirmadas por Southern blot/plantas PCR+ analisadas.

Com base da Tabela 5, foi possível verificar que a eficiência de transformação genética com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A foi superior comparada com a construção gênica pCAtPP2/*att*A nas variedades 'Fremont' e 'Thomas', porém, para a variedade 'Nules', a eficiência de transformação genética com a construção pCAtPP2/*att*A foi ligeiramente superior. Os valores de eficiência de transformação genética (de 0,22% a 0,93%) obtidos neste trabalho foram muito aquém dos observados em outras espécies de citros. Estes resultados denotam a dificuldade de inserção do T-DNA no genótipo das três variedades de tangerina.

No entanto, estes resultados não são exclusivos para *C. reticulata*, mas também outras espécies demonstraram ser recalcitrantes ao processo de transformação genética, como *C. limonia* e *C. aurantium*, que apresentam valores menores que 2,5% de eficiência de transformação genética (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; AZEVEDO et al., 2006). Em citros, os valores de eficiência de transformação genética são muito singulares e atrelados ao genótipo e às condições de inoculação/incubação. As laranjas doces apresentam um espectro de valores de eficiência de transformação genética muito amplo, variando de 0,5% para a variedade 'Pêra' (AZEVEDO et al., 2006) à 18,6% para a variedade 'Hamlin' (MENDES et al., 2010).

Para citranges, estes valores podem variar de 0,52% a 55,2% (MOORE et al., 1992; KANEYOSHI et al., 1994; DUTT; GROSSER, 2009). Miyata et al. (2012), observaram uma eficiência de transformação genética de 6-8% em citrange 'Carrizo', com construção contendo o promotor tecido-específico de floema AtSUC2.

Espécies de citros com baixa eficiência de transformação genética, com reduzida oferta de explantes juvenis e adultos (CERVERA et al., 2008), com sementes recalcitrantes e tecidos sensíveis ao processo de transformação genética, como o caso das tangerinas, ainda requerem mais estudos de regeneração *in vitro* e controle das condições de transformação genética.

Os segmentos internodais utilzados nos experimentos de transformação genética com as três variedades não responderam ao processo de regeneração após a inoculação com *A. tumefaciens* e, desse modo, não foi possível a obtenção de plantas transgênicas com esse tipo de explante. Diferente do observado em trabalhos de organogênese *in vitro* com segmentos internodais com diferentes espécies de citros (GHORBEL et al., 1998; MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SCHINOR et al., 2006; SILVA et al., 2010), nos quais foram obtidos resultados satisfatórios de regeneração *in vitro*, entretanto neste estudo, é possível afirmar que os segmentos internodais das três espécies estudadas sejam recalcitrantes ao processo de transformação genética nas condições descritas na metodologia.

O resultado da análise de *Southern blot* mostrou sinais de hibridização que indicam os eventos de inserção do T-DNA no genoma das plantas das três variedades analisadas. As trinta e duas plantas confirmadas por análise de *Southern blot* apresentaram ao menos uma inserção do T-DNA no genoma, dentre estas, nove apresentaram mais de uma cópia do gene (Figura 8: A-C) (SCHUBERT et al., 2004; LOPÉZ et al., 2010). Múltiplas inserções (de duas a quatro) do transgene foram também relatadas em trabalhos de transformação genética com citros por análises de *Southern blot* (AZEVEDO et al., 2006; BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; BARBOSA-MENDES et al., 2009; REYES et al., 2011; DUTT et al., 2012).

Contudo, a ocorrência de uma planta de clementina ‘Nules’ (Figura 8: B - coluna 10), com a construção pCAtSUC2/*att*A, negativa para a análise de *Southern blot*, pode ser atribuída a não integração do T-DNA no genoma da planta ou a alguma falha durante a análise.

Os resultados obtidos pela análise de RT-qPCR demonstram que o nível de transcrição variou sensivelmente em função da construção gênica e do genótipo (Figura 9). O maior nível de transcrição ocorreu em uma planta da variedade ‘Thomas’ com a construção gênica pCAtPP2/*att*A (Figura 9 - coluna 3), seguida por

uma planta da variedade ‘Fremont’ com a construção gênica pCAtSUC2/*att*A, ambas com níveis de transcrição comparáveis ao obtido pela planta contendo o gene *att*A sob o controle do promotor CaMV35S. Este resultado é contrastante aos encontrados por Dutt et al. (2012) e Attílio et al. (2013), nos quais os promotores de expressão preferencial de floema apresentaram níveis de expressão do transgene bem inferiores a expressão do gene dirigido pelo promotor constitutivo CaMV35S.

As plantas de tangerina ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ tiveram a sua transgenia confirmada através das análises de PCR e *Southern blot*, que comprovaram a inserção do gene *att*A no gemona das três variedades, e a expressão preferencial do gene da atacina A nos tecidos floemáticos, região alvo de colonização da bactéria *Ca*. Liberibacter (CLas), causadora do HLB, dirigida pelos promotores tecido-específicos AtPP2 e AtSUC2, foi confirmada por análise RT-qPCR. A expressão específica destes promotores nos tecidos do floema foi avaliada com sucesso em laranjas doces (MIYATA et al., 2012; ATTÍLIO et al., 2013; TAVANO, 2013).

Como ainda não foram registradas espécies ou variedades de citros resistentes ao HLB, as plantas produzidas neste trabalho serão multiplicadas vegetativamente, pela enxertia de borbulhas no porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*C. limonia*) e as mudas produzidas serão desafiadas com o patógeno através da inoculação da bactéria CLas, buscando avaliar se o nível de expressão do transgene é eficaz no controle da doença.

4.3 Transformação genética utilizando-se suspensões celulares como explantes

Foram realizados experimentos de transformação genética com suspensões celulares de tangerina ‘W-Murcott’, laranja doce ‘Hamlin’ e tangelo ‘Page’ com as construções gênicas pC6105/*Vvmyb*A1, pC6105/*Ruby*, pCDC3/*Vvmyb*A1 e pCDC3/*Ruby*. Os fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby* foram avaliados como potenciais genes repórteres através da expressão específica de antocioanina nos tecidos embrionários, dirigida pelos promotores 6105 e DC3.

A Tabela 6 apresenta os experimentos de transformação genética de suspensões celulares realizados com as três espécies e as quatro construções gênicas estudadas.

Tabela 6 - Experimentos de transformação genética de suspensões celulares de tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page' realizados com as construções gênicas pC6105/*Vvmyb*A1, pC6105/*Ruby*, pCDC3/*Vvmyb*A1 e pCDC3/*Ruby*.

espécie	construção gênica	embriões transgênicos
tangerina 'W-Murcott'	pC6105/*Vvmyb*A1	+
	pC6105/*Ruby*	+
	pCDC3/*Vvmyb*A1	+
	pCDC3/*Ruby*	+
laranja doce 'Hamlin'	pC6105/*Vvmyb*A1	+
	pC6105/*Ruby*	+
	pCDC3/*Vvmyb*A1	+
	pCDC3/*Ruby*	+
tangelo 'Page'	pC6105/*Vvmyb*A1	+
	pC6105/*Ruby*	+
	pCDC3/*Vvmyb*A1	+
	pCDC3/*Ruby*	-

Com os resultados apresentados na Tabela 6 verifica-se que a técnica de transformação genética de suspensões celulares para as espécies avaliadas foi eficiente para as três variedades de citros. A tangerina 'W-Murcott' e a laranja doce 'Hamlin' produziram plantas transgênicas com as quatro construções gênicas. Por sua vez, somente para o tangelo 'Page', não foram obtidas plantas transgênicas com a construção pCDC3/*Ruby*. O desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos transformados da tangerina 'W-Murcott', da laranja doce 'Hamlin' e do tangelo 'Page', regenerados a partir de suspensões celulares após transformação genética via *A. tumefaciens* são ilustrados na Figura 10.

De forma geral, todo o material transformado foi regenerado com sucesso, dentro dos padrões e períodos previstos no protocolo. Da mesma forma, a qualidade e padronização das suspensões celulares foi importante para a formação de plantas *in vitro*, devido o fornecimento de calos friáveis em excelentes condições para a transformação genética via *A. tumefaciens*, cultivo em meio de cultura de seleção, multiplicação, embriogênese somática e regeneração *in vitro*. A Figura 10 ilustra o desenvolvimento da tangerina 'W-Murcott', laranja doce 'Hamlin' e tangelo 'Page'

desde o embrião somático transgênico até a planta *in vitro*, completamente regenerada.

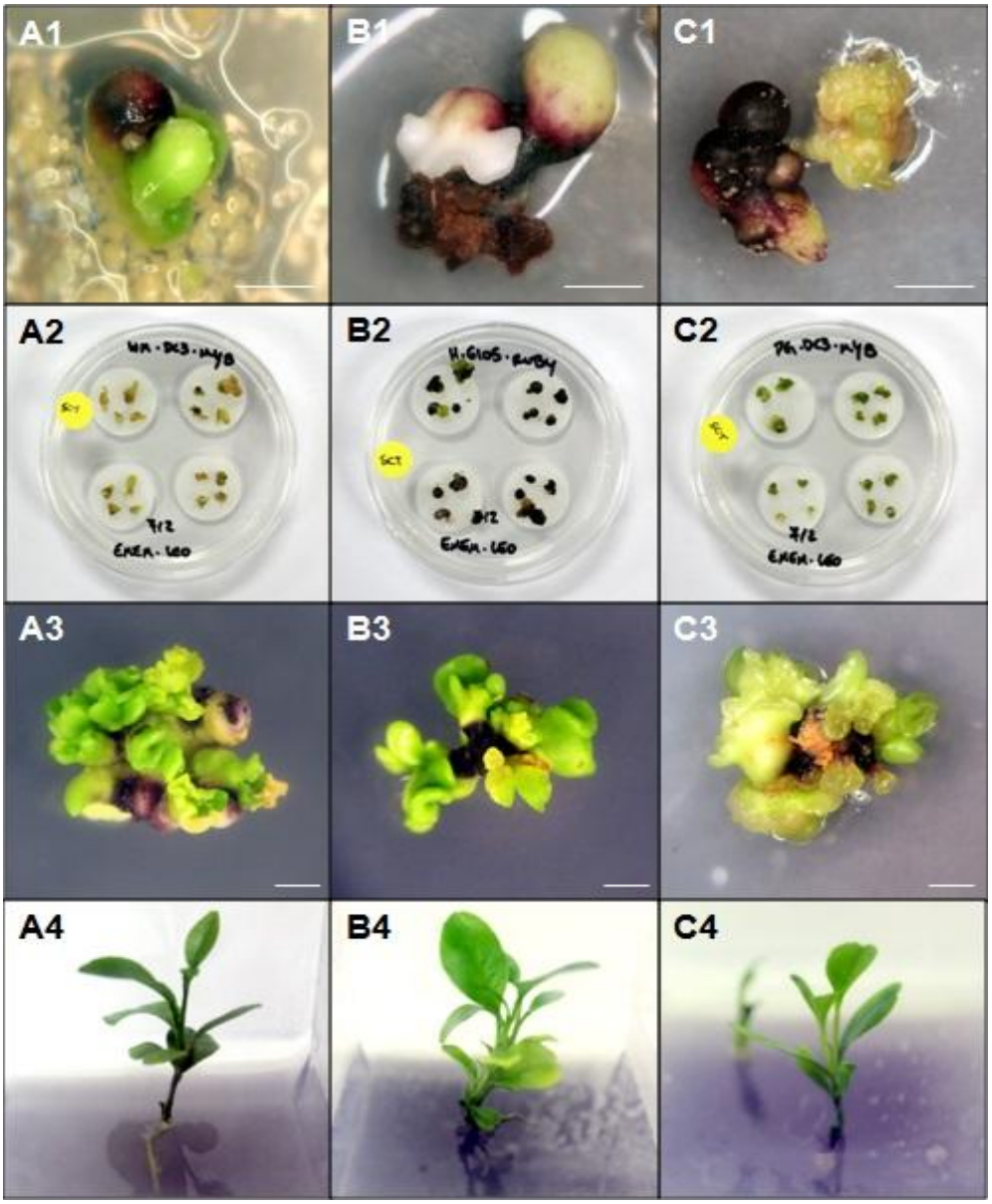

Figura 10 - Desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de citros, regenerados a partir de suspensões celulares após transformação genética via *A. tumefaciens.* A) Tangerina 'W-Murcott' transformada com a construção gênica pCDC3/*Vvmyb*A1. B) Laranja doce 'Hamlin' transformada com a construção gênica pC6105/*Ruby*. C) Tangelo 'Page' transformado com a construção gênica pCDC3/*Vvmyb*A1. 1) Embriões somáticos transgênicos desenvolvidos em meio de cultura EME-maltose (barras: 0,25 cm). 2) Embriões somáticos individualizados em papel de filtro (0,22 µm x 25 mm) sobre meio de cultura EME-maltose. 3) Embriogênese *in vitro* em meio de cultura B+ (barras: 0,25 cm). 4) Plantas regeneradas *in vitro* em meio de cultura RMAN.

A laranja doce apresentou maior vigor celular quanto à multiplicação e proliferação dos calos. Por outro lado, a tangerina 'W-Murcott' foi a espécie com maior potencial embriogênico superando, principalmente, o tangelo 'Page'.

No tocante ao desempenho dos promotores específicos para expressão gênica em tecidos embrionários dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby* na identificação visual dos embriões transformados, o promotor 6105, proveniente de *C. sinenses*, apresentou expressão mais intensa que o promotor DC3, principalmente com a expressão de *Ruby*. A expressão específica da construção pC6105/*Ruby* (Figura 11-2) nos tecidos embrionários mostrou-se muito superior que as observadas nas construções gênicas pC6105/*Vvmyb*A1 (Figura 11-1), pCDC3/*Vvmyb*A1 (Figura 11-3) e pCDC3/*Ruby* (Figura 11-4). Esses resultados foram observados nas três espécies avaliadas no meio de indução EME-maltose. A antocianina, como produto da expressão dos fatores de transcrição, foi decrescendo com evolução do desenvolvimento embrionário.

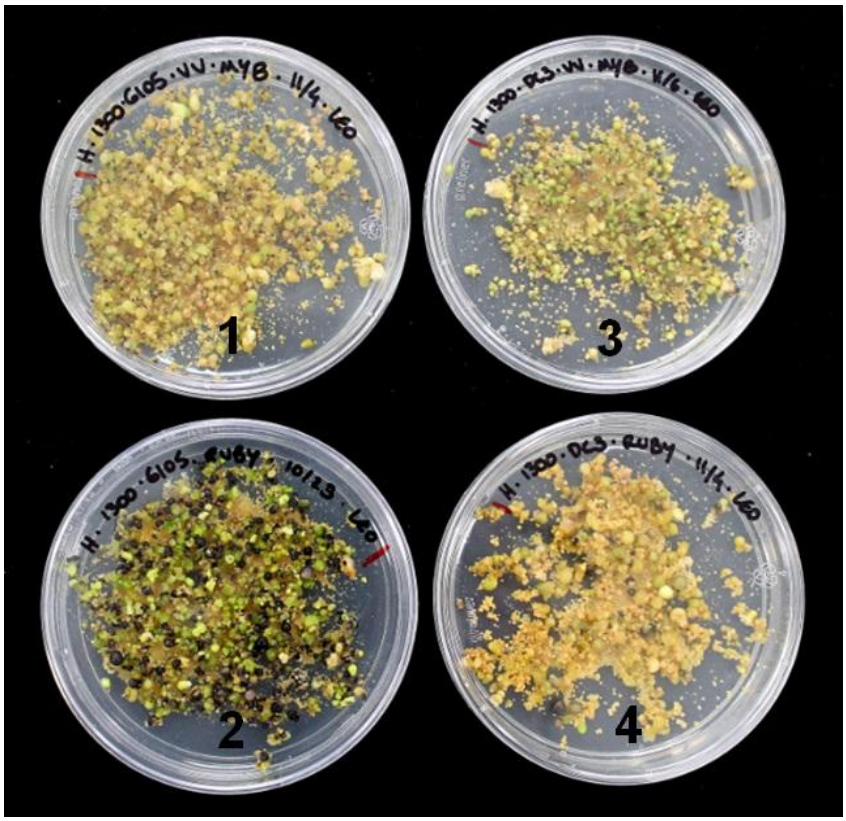

Figura 11 - Expressão dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby* nos embriões de laranja doce 'Hamlin' cultivados no meio de cultura EME-maltose. Construções gênicas: 1) pC6105/*Vvmyb*A1; 2) pC6105/*Ruby*; 3) pCDC3/*Vvmyb*A1; 4) pCDC3/*Ruby*.

A utilização de calos embriogênicos e suspensões celulares a partir de óvulos não fertilizados (LI et al., 2002) constituem uma alternativa para a transformação genética, ideal para espécies com tecidos recalcitrantes e com baixa eficiência de transformação genética, uma vez que todas as cultivares podem ser introduzidas *in*

vitro como células embriogênicas. Outro fator é a obtenção de culturas de células estabelecidas *in vitro*, em contraste com a disponibilidade sazonal de sementes obtidas de frutas frescas, limitada em determinadas épocas do ano (DUTT; GROSSER, 2010).

Neste trabalho, o sistema de transformação genética de suspensões celulares derivadas de células embriogênicas, mediado por *A. tumefaciens* foi eficiente para as três espécies de citros estudadas. Plantas transgênicas das quatro construções gênicas que expressaram os fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby*, durante o estágio embrionário, foram regeneradas *in vitro*.

A adição de 2 mL da mistura líquida dos meios de cultura 1:2 suplementado com os antibióticos higromicina B e timentin, durante o segundo subcultivo, mantendo as células hidratadas, favoreceu o desenvolvimento dos embriões somáticos. Este procedimento foi sugerido por Cabasson et al. (1997) para elevar a regeneração *in vitro* de calos embriogênicos, multiplicação celular e embriogênese somática.

A utilização dos promotores tecido-específico de embrião 6105 de *C. sinensis* e DC3 de *D. carota*, presentes nas construções gênicas utilizadas, conferiu maior especificidade de expressão e reduziu o tempo de determinação do material transgênico por identificação visual da antocianina, expressa pelos genes dos fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby* nos tecidos dos embriões somáticos regenerados. Na medida em que se iniciou o desenvolvimento da parte aérea, a expressão da antocianina foi gradativamente reduzida. Além disso, ao contrário do gene repórter *uid*A, amplamente empregado em trabalhos de transformação genética para a identificação da transformação genética (GUO et al., 2004; ZHAO; LIU; DAVIS, 2004), a eficiente expressão dos fatores de transcrição associados à síntese de antocianina apresenta a vantagem por não ser destrutivo e não necessita de qualquer equipamento de microscopia para a sua visualização.

O sistema de transformação genética de suspensões celulares mostrou-se bastante eficiente, permitindo a obtenção de plantas transgênicas das três espécies num período relativamente curto, o que torna este sistema interessante ao melhoramento genético de espécies recalcitrantes à transformação genética com tecidos maduros e juvenis e também às espécies sem sementes, pois células embriogênicas de qualquer espécie ou variedade podem ser introduzidas *in vitro* (DUTT; GROSSER, 2010). Desse modo, espera-se que essa tecnologia seja

extendida e adaptada para importantes cultivares comerciais de *Citrus* que enfrentam obstáculos na transformação genética via *A. tumefaciens*.

4.4 Transformação genética utilizando-se protoplastos como explantes

Neste trabalho, visando avaliar a transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott' e comparar o nível de expressão do promotor tecido-específico de embrião 6105 com o promotor constitutivo CaMV35S, foram realizados experimentos de transformação genética química direta de protoplastos com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1 que expressam o gene do fator de transcrição VvmybA1, utilizado como gene repórter.

A técnica de isolamento de protoplastos utilizada foi satisfatória para calos embriogênicos da tangerina 'W-Murcott' e, após a digestão enzimática, a suspensão foi purificada por filtração e centrifugação com o intuito de separar os protoplastos de restos celulares e da solução enzimática. Após a purificação, a disponibilidade de protoplastos foi evidenciada pela formação de bandas espessas na interface dos meios de cultura CPW 25 M e CPW13 M (FREASON; POWER; COCKING, 1973) e, dessa forma, a concentração da suspensão pôde ser ajustada para 2×10^5 protoplastos.mL^{-1} (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010).

Após a transformação genética direta com 20 µg da suspensão de DNA plasmidial, os protoplastos foram cultivados em meio de cultura líquido em placas de Petri (58 x 15 mm) e ao redor de dez dias de cultivo *in vitro*, já era possível observar o início das divisões celulares. A formação de microcolônias e microcalos foi verificada 20-40 dias após os experimentos de transformação genética direta de protoplastos.

Para indução da embriogênese somática, após 60 dias de cultivo, os microcalos originados foram transferidos para o meio de cultura EME-Maltose sólido, o qual proporcionou a proliferação das células e, cerca de 25 dias neste meio de cultura, os calos desenvolvidos responderam ao estresse nutricional gerado pela dificuldade de assimilação de maltose em relação à sacarose, ocorrendo a formação de embriões somáticos. Neste estágio foi possível identificar e selecionar o material

transgênico através da coloração roxo escuro nos tecidos dos embrionários, resultante da expressão gênica do fator de transcrição *Vvmyb*A1.

Os embriões foram transferidos para o meio de cultura EME-sacarose na medida em que se diferenciavam nos calos, por volta de 25 dias de cultivo. Para o desenvolvimento e expansão celular, os embriões foram transferidos para o meio de cultura 1500. Para germinação dos embriões, alongamento dos brotos e emissão das primeiras folhas, após 15 dias de cultivo no meio 1500, os embriões foram transferidos para o meio de cultura B+. As plantas desenvolvidas no meio de cultura B+ foram transferidas para meio de cultura RMAN (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2010), específico para enraizamento.

As etapas de isolamento e purificação de protoplastos, bem como o início da divisão celular em meio líquido pós-transformação genética direta com o plasmídeo contendo o gene do fator de transcrição *Vvmyb*A1, desenvolvimento dos microcalos, a indução da embriogênese somática em meio sólido e a regeneração *in vitro*, podem ser visualizadas na Figura 12.

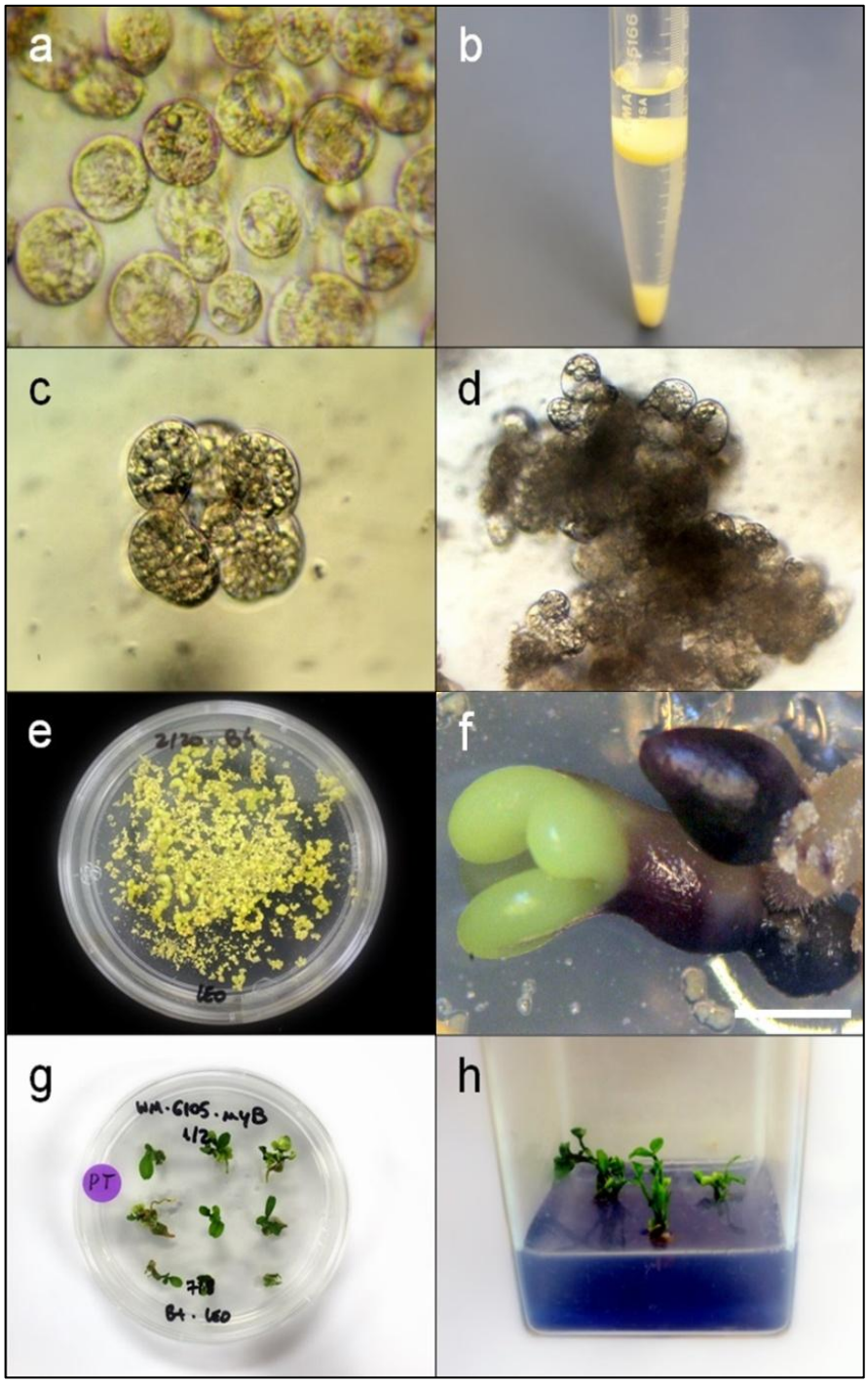

Figura 12 - Etapas do processo de purificação e cultura dos protoplastos, desenvolvimento de embriões somáticos transgênicos e regeneração de plantas, a partir da transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott'. a) Protoplastos isolados de suspensões celulares após digestão completa da parede celular (40x). b) Gradiente sacarose/manitol com a presença de banda intermediária contendo os protoplastos. c) Cultura de protoplastos após transformação genética direta com a construção pC1300-6105/*Vvmyb*A1 com o início da divisão celular em meio de cultura 1:1 BH3 0,6M: EME 0,6M (v:v) (35x). d) Microcalos em meio de cultura 1:2 BH3 0,6M: EME 0,146M (v:v) (20x). e) Indução da embriogênese somática no meio de cultura EME-maltose. f) Detalhe de embrião somático transgênico desenvolvido a partir de calos cultivados em meio de cultura EME-maltose (barra: 0,5cm). g) Embriões somáticos transferidos para meio de cultura B+. h) Plantas regeneradas em enraizamento no meio RMAN.

Diversos fatores podem afetar a eficiência de regeneração de plantas em experimentos de transformação genética de protoplastos, como a condição da cultura de protoplastos ou o estado das culturas em suspensão de células utilizadas para o isolamento de protoplastos (OMAR et al., 2007). Contudo, devido à qualidade e padronização das suspensões celulares doadoras de protoplastos viáveis, todas as células apresentaram bom potencial mitótico e germinativo; e desenvolveram-se nos estágios sequenciais (microcolônias, microcalos, calos, embriões e brotações) de acordo com os períodos de incubação e transferência previstos no protocolo de regeneração.

O sistema de transformação genética direta de protoplastos utilizado mostrou-se viável para tangerina 'W-Murcott'. Após 65 dias de cultivo, os protoplastos atingiram o estágio de desenvolvimento embrionário, no qual foi possível identificar a expressão do fator de transcrição *Vvmyb*A1. Embriões com coloração roxo-escuro nos tecidos embrionários iniciais foram observados nos dois experimentos (Figura 13) comprovando a viabilidade da transformação genética direta de protoplastos. Os embriões identificados visualmente como transgênicos foram individualizados e transferidos para meio de cultura EME-sacarose sólido e posteriormente para o meio de cultura de expansão 1500, para germinação e alongamento. Aos 80 dias de cultivo, o material foi transferido para o meio de cultura B+. As plântulas desenvolvidas e alongadas foram transferidas para o meio de cultura de enraizamento RMAN.

O promotor de citros 6105 é específico para tecidos desenvolvidos no início do estágio embrionário. Desse modo, a sua expressão é acentuada nas fases globular e cordiforme e, na medida em que transcorre o desenvolvimento para as etapas torpedo e cotiledonar, a expressão decresce gradativamente, até desaparecer por completo quando ocorre o alongamento dos tecidos (Figura 12F-H).

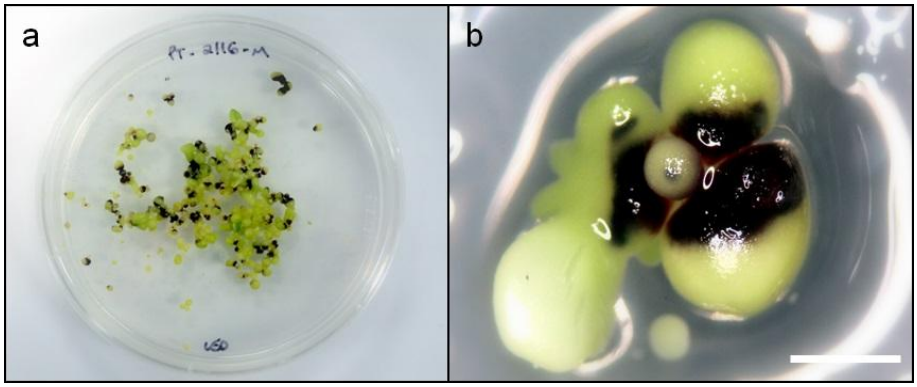

Figura 13 - Identificação visual dos embriões de tangerina 'W-Murcott' expressando o gene do fator de transcrição *Vvmyb*A1. a) Indução da embriogênese somática em meio de cultura EME-maltose. b) Detalhe dos tecidos transgênicos com a coloração roxo-escuro na base do embrião (barra: 0,25cm).

O mecanismo de identificação visual do transgênico é promissor, pois, a expressão do gene do fator de transcrição facilita a seleção do material transformado. Adicionalmente, o uso de promotores tecido-específicos temporários, como o 6105 para embriões, é uma alternativa atraente para o desenvolvimento de construções gênicas com genes repórteres fusionados com genes de seleção, como o *npt*II e o *hpt*II. Assim, a expressão dos genes de seleção seria interrompida no início do processo de desenvolvimento do material transgênico, previamente selecionado visualmente, evitando a expressão constante dos genes de seleção.

Por se tratar de uma técnica usual em trabalhos de transformação genética e na tentativa de aumentar a eficiência do método de transformação genética direta de tangerina 'W-Murcott', com a introdução do DNA-exógeno no genoma dos protoplastos, foram realizados diferentes tratamentos térmicos nos 2 plasmídeos que contêm as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1, antes do contato com a suspensão de protoplastos.

A Tabela 7 apresenta os resultados da transformação genética química direta de protoplastos de 'W-Murcott' com os 4 tratamentos térmicos prévios. Em todos os tratamentos foram obtidos embriões transgênicos, exceto o tratamento TA3 (45 ºC) com a construção gênica contendo o promotor constitutivo CaMV35S. A Tabela 8 também fornece o número de placas por tratamento de EME-maltose, meio de cultura sólido de indução de embriogênese, no qual foi possível a identificação visual do embrião transgênico expressando a coloração roxo-escuro e o número de embriões individualizados em meio EME-sacarose.

Tabela 7 - Experimentos de transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott', com tratamentos térmicos prévios, realizados com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1.

construção gênica	tratamento	embriões transgênicos	número de placas em EME-maltose	número de embriões somáticos transgênicos em EME-sacarose
pC1300-35S/*Vvmyb*A1	TA1 (controle)	+	9	32
	TA2 (45ºC)	+	12	37
	TA3 (45ºC - 0ºC)	-	10	0
	TA4 (0ºC)	+	9	17
pC1300-6105/*Vvmyb*A1	TA1 (controle)	+	9	36
	TA2 (45ºC)	+	8	33
	TA3 (45ºC - 0ºC)	+	11	19
	TA4 (0ºC)	+	8	21

De forma geral, após o processo de transformação genética, em relação ao tratamento controle, não houve diferença no desenvolvimento dos protoplastos durante a cultura nas fases iniciais de multiplicação celular em meio líquido, assim como na indução da embriogênese no meio EME-maltose sólido, nas etapas subsequentes de desenvolvimento e crescimento embrionário.

Considerando somente os tratamentos com embriões somáticos transgênicos, não houve diferença entre as transformações realizadas com as duas construções gênicas, com valores próximos quanto ao número de placas EME-maltose, durante a indução da embriogênese, e número de embriões individualizados em EME-sacarose (Figura 14A). Entretanto, o promotor constitutivo CaMV35S apresentou maior expressão de *Vvmyb*A1 e a consequente produção de antocianina mais elevada do que o promotor 6105, sobretudo nos embriões no estágio globular (Figura 14B).

Ainda de acordo com a Tabela 7, nos dois promotores, os tratamentos TA1 e TA2 foram os que apresentaram maior número de embriões somáticos individualizados. Contudo, foi observada uma diminuição do número de embriões nos tratamentos envolvendo baixas temperaturas (TA3 e TA4).

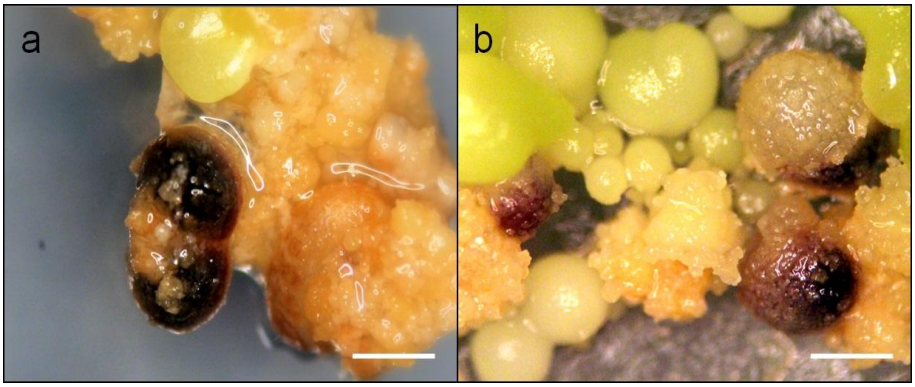

Figura 14 - Embriões somáticos de tangerina 'W-Murcott' expressando o fator de transcrição *Vvmyb*A1, cultivados em meio de cultura EME-maltose, após tratamento térmico (45 ºC, 5 min - TA2). a) Detalhe de embriões com expressão dirigida pelo promotor CaMV35S. b) Detalhe de embriões com expressão dirigida pelo promotor 6105 (barras: 0,25cm).

Com base nos resultados, considerando os valores do tratamento controle, foi possível concluir que os tratamentos térmicos não elevaram a eficiência do processo de transformação genética direta de protoplastos via PEG de tangerina 'W-Murcott'.

Utilizando o mesmo desenho experimental das avaliações com tratamentos térmicos, o segundo experimento (B) comparou a ação do PEG com três massas molares diferentes (TB-2: PEG 1500 daltons - controle; TB-3: PEG 4000 daltons e TB-4: PEG 6000 daltons) e do reagente de transfecção (TB-1 - RT) (ViaFect™ Transfection Reagent Promega), na condução do plasmídeo para o genoma do protoplasto (célula receptora). No tratamento (TB-1), o RT substituiu o PEG na metodologia, utilizando o volume de 30 µL por experimento de transformação genética realizado. A Tabela 8 apresenta os resultados da transformação genética com os quatro tratamentos do experimento B empregados.

Tabela 8 - Experimentos de transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott', com os quatro tratamentos com o RT/PEG, realizados com as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1.

construção gênica	tratamento	embriões transgênicos	número de placas em EME-maltose	número de embriões somáticos transgênicos em EME-sacarose
pC1300-35S/*Vvmyb*A1	TB1 (RT)	-	12	0
	TB2 (PEG 1500)	+	9	25
	TB3 (PEG 4000)	+	11	16
	TB4 (PEG 6000)	-	6	0
pC1300-6105/*Vvmyb*A1	TB1 (RT)	-	10	0
	TB2 (PEG 1500)	+	10	28
	TB3 (PEG 4000)	+	13	21
	TB4 (PEG 6000)	+	7	13

Porém, nesta avaliação, os tratamentos com o RT (TB1) não produziram embriões somáticos transgênicos nas duas construções gênicas, assim como o tratamento com PEG 6000 (TB4), na construção gênica com o promotor CaMV35S. Nos demais, foram detectados visualmente embriões transgênicos expressando o fator de transcrição *Vvmyb*A1.

Além da ineficácia do RT na condução do plasmídeo na transformação genética direta de tangerina 'W-Murcott', o aumento da concentração de PEG reduziu o número de embriões transgênicos tanto para os tratamentos com o promotor CaMV35S quanto para o promotor 6105. É provável que soluções de PEG com alto peso molecular (4000 e 6000 daltons), sob o mesmo tempo de exposição da metodologia original, desestabilize demasiadamente a membrana plasmática dos protoplastos e comprometa a integridade do conteúdo celular, afetando assim o processo de absorção e transformação. No entanto, os tratamentos com PEG 4000 e 6000 que apresentaram protoplastos com atividade mitótica e multiplicação dos calos normais, demonstraram comportamento similar na regeneração em relação ao tratamento controle (TB2 - PEG 1500).

Embora não tão evidente quanto foi observado no experimento A, o promotor constitutivo CaMV35S desta vez apresentou uma expressão de *Vvmyb*A1 sensivelmente mais acentuada de antocianina em comparação ao promotor tecido-

específico 6105, com poucos embriões no estágio globular completamente pigmentados com a tonalidade roxo-escuro (Figura 15).

Desse modo, não foi verificada a hipótese do reagente de transfecção na substituição da ação do PEG na condução do plasmídeo para o interior dos protoplastos de tangerina 'W-Murcott', realizando assim a transformação genética direta. Além disso, o uso de polietilenoglicol com concentrações de massas molares superiores a 1500, não contribuiu para o aumento da transformação genética direta de protoplastos de tangerina 'W-Murcott'.

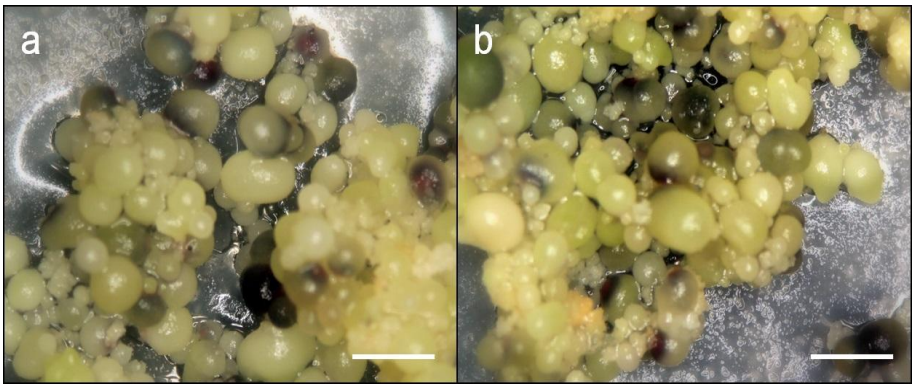

Figura 15 - Embriões somáticos de tangerina 'W-Murcott' expressando o fator de transcrição *Vvmyb*A1, cultivados em meio de cultura EME-maltose, após transformação genética com PEG 4000 (TB3). a) Detalhe de embriões com expressão dirigida pelo promotor CaMV35S. b) Detalhe de embriões com expressão dirigida pelo promotor 6105 (barras: 0,5 cm).

Os experimentos de transformação direta de protoplastos realizados neste trabalho foram bem sucedidos na sua proposta inicial, ou seja, na verificação da alta eficiência do sistema de transformação genética utilizado e na comparação dos níveis de expressão entre os promotores constitutivo (CaMV35S) e tecido-específico (6105), bem como na avaliação de tratamentos envolvendo diferentes temperaturas e agentes químicos transformantes (PEG e RT).

Uma vez que muitas cultivares importantes de citros, incluindo alguns clones comerciais de laranja doce, não ofertam sementes suficientes (zero a cinco sementes por fruto), pode ser difícil ou impossível à obtenção de explantes juvenis para a transformação genética mediada por *A. tumefaciens*. Outra limitação consiste na dificuldade de regeneração de plantas via indução de gemas adventícias para determinadas cultivares de citros comercialmente importantes, particularmente o grupo das tangerinas (FLEMING et al., 2000).

Embora o método de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* seja considerado o melhor, a absorção direta de DNA em protoplastos de plantas facilita uma rápida análise da expressão de genes, bem como a geração de plantas transgênicas transformadas de forma estável (GROSSER et al., 1998).

O progresso das técnicas de manipulação de protoplastos isolados tornou possível não só a produção de novas variedades de híbridos somáticos, mas também a transferência de DNA exógeno diretamente em protoplastos de plantas (DAVEY et al, 1980; KRENS et al., 1982).

Neste sistema, assim como na transformação genética de suspensões celulares, a planta é regenerada a partir de protoplastos via embriogénese somática com baixa variação somaclonal e, principalmente, não requer o uso de antibióticos para a seleção ou inibição bacteriana (VARDI et al., 1990; FLEMING et al., 2000). Além disso, a utilização de antibióticos, tanto na seleção quanto no co-cultivo, também pode influenciar na redução da capacidade de regeneração *in vitro* (MOORE et al., 1992).

É importante ressaltar a obtenção de um grande número de plantas transgênicas com eventos independentes sem a utilização de qualquer gene de resistência a antibiótico, o que de fato significa uma vantagem importante sobre a metodologia de transformação *Citrus* via *A. tumefaciens*. Dessa maneira, o desenvolvimento de um sistema de transformação genética de *Citrus* livre de genes de resistência a antibióticos poderia contribuir na liberação de produtos transgênicos, aumentando a aceitação dos mercados consumidores (GHORBEL et al., 1999).

5 CONCLUSÕES

A eficiência da organogênese *in vitro* das variedades de tangerina ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ é influenciada pelo tipo de explante e a concentração da citocinina. A concentração de 1 $mg.L^{-1}$ de BAP foi responsável pela maior porcentagem de explantes responsivos e número de gemas adventícias desenvolvidas.

Foi possível obter plantas transgênicas das variedades de tangerina ‘Fremont’, ‘Thomas’ e ‘Nules’ via *A. tumefaciens* contendo o gene da atacina A (*att*A), dirigido por promotores específicos para expressão gênica no floema.

A transformação genética via *A. tumefaciens* de suspensões celulares de tangerina ‘W-Murcott’, laranja doce ‘Hamlin’ e tangelo ‘Page’ mostrou-se eficiente com as construções gênicas contendo os fatores de transcrição *Vvmyb*A1 e *Ruby*, dirigidos pelos promotores específicos para expressão gênica em tecidos embrionários 6105 e DC3.

A transformação genética direta de protoplastos de tangerina ‘W-Murcott’ via PEG mostrou-se viável para as construções gênicas pC1300-6105/*Vvmyb*A1 e pC1300-35S/*Vvmyb*A1.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the trifoliate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulate* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **Hortscience**, Saint Joseph, v. 46, n. 1, p. 16–22, 2011.

ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.35-40, 2002.

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

ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag; 2005. 926 p.

ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; HULTMARK. D. Identification of early genes in the Drosophila immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 511-518, 1995.

ATTÍLIO, L.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; HARAKAVA, R.; SILVA, T.L.; MIYATA, L.Y.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of sweet oranges with the *D4E1* gene driven by the AtPP2 promoter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 7, p.741-747, 2013.

AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.M.J.; HARAKAVA, R.; GABRIEL, D.W.; LEE, R.F. *GUS* gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valência' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 11, p. 1623-628, 2006b.

BARBOSA-MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO; F.A.A.; BERGAMIN FILHO; A.; HARAKAVA, R.; BEER; S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrp*N gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p. 109-115, 2009.

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.

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, A.S.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, *Greening*) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BOGS, J.; JAFFÉ, F.W.; TAKOS, A.M.; WALKER, A.R.; ROBINSON, S.P. The grapevine transcription factor *VvMYBP*A1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 143, p. 1347–1361, 2007.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, Oxford, v.86, n.1, p.159-166, 2000.

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,** Geneva, 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.

BOVÉ, J.; GARNIER, M. Ploem-and xylem-restried plant pathogenic bacteria. **Plant Science,** Amisterdam, v. 164, p. 423-438, 2002.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destrutive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citus in São Paulo state: sudden death, variegated chlorosis and Huanglongbing. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, London, v. 59, p. 346-354, 2007.

BUTELLI, E.; LICCIARDELLO, C.; ZHANG, Y.; LIU, J.; MACKAY, S.; BAILEY, P.; REFORGIATO-RECUPERO, G.; MARTINA, C. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, n. 3, p. 1242–1255, 2012.

CARLSSON, A.; NYSTROM, T.; COCK, H.; BENNICH, H. Attacin - an insect immune protein - binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 2179-2188, 1998.

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 and Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 1, p. 26-30, 2000.

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.

CHRISTENSEN, B.; FINK, J.; MERRIFIELD, R.B.; MAUZERALL, D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Boston, v. 85, p. 5072-5076, 1988.

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F.; ALVES, K.C.S.; PEREIRA, M.A.R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; DE SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 1, p. 53–60, 2010.

COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.L.P.; CARLOS, E.F.; MACHADO, M.A.A bacteria '*Candidatus* Liberibacter' em plantas com Huanglongbing (ex-greening) no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, p. 367-374, 2004.

DAVEY, M.R.; COCKING, E.C.; FREEMAN, J.; PEARCE, N.; TUDOR, I. Transformation of Petunia protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. **Plant Science Letters**, Davis, v. 18, p. 307-313, 1980.

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

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

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

DUAN, Y. X.; FAN, J.; GUO, W. W. Regeneration and characterization of transgenic kumquat plants containing the *Arabidopsis APETALA1* gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p.273-281, 2010.

DUTT, M.; ANANTHAKRISHNAN, G.; JAROMIN, M.K.; BRLANSKY, R.H.; GROSSER, J.W. Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants.**Tree Physiology**, Victoria, v. 32, n. 1, p. 83-93, 2012.

DUTT, M.; GROSSER, J. W. An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p.1251-1260, 2010.

DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 331–340, 2009.

DUTT, M.; ORBOVIC, V.; GROSSER, J.W. Cultivar dependent gene transfer into citrus using *Agrobacterium*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Lake Alfred, v. 122, p. 85-89, 2009.

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.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division. Produção mundial de citros. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 19 nov. 2014.

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

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. v. 2, p. 239-269.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; DEL-BOSCO, S.F.; GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet organce. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant**, Oxon, v. 36, n. 6, p. 450-455, 2000.

FOLIMONOV, A.S.; FOLIMONOVA, S.Y.; BAR-JOSEPH, M.; DAWSON, W.O. A stable RNA virus-based vector for citrus trees. **Virology**, Spencers Wood, v. 368, p.205-216, 2007.

FREASON, E.M.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, New York, v.33, p.130-137, 1973.

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**, Oxford, v.84, n.6, p.715-723, 1999.

GENTILE, A.; DENG, Z.; LA MALFA, S.; DISTÉFAN, G. O.; DOMINA, F.; VITALE, A.; POLIZZI, G.; LORITO, M.; TRIBULATO, E. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 26(2), p.146-151, 2007.

GHORBEL, R.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Warwick, v. 99, p. 350-358, 1999.

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

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

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.1., p.1-15, 2010.

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

GROSSER, J.W.; JIANG, J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: I. Scion improvement. **HortScience**, St. Joseph, v.33, n.6, p.1057-1059, 1998.

GUO, H.; CHEN, X.; ZHANG, H.; FANG, R.; YUAN, Z.; ZHANG, Z.; TIAN, Y. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin *PP2* gene promoter. **Transgenic Research**, London, v. 13, p. 559-566, 2004.

GUO, W.W.; GROSSER, J.W. Somatic hybrid vigor in Citrus: direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the *GFP* gene. **Plant Science,** Amsterdam, v. 168, p. 1541-1545, 2005.

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**, New York, v. 24, n. 8, p. 482-486, 2005.

GURR, S.J.; RUSHTON, P.J. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? **Trends in Biotechnology**, London, v. 23, n. 6, p. 275-282, 2005.

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

HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; ANDERSSON, K.; STEINER, H.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Insect immunity attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. **The EMBO Journal**, London, v. 2, n. 4, p. 571-576, 1983.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASKIHARA, W. Enhancel prolifation and efficient transmission of *Candidatus* Liberibacter asiaticus by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in nymphal stage. **Annals of Applied Biology,** Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.

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**, New York, v. 13, n. 10, p. 541-545, 1994.

KANG, D.; LUNDSTROM, A.; STEINER, H. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. **Gene**, Amsterdam, v. 174, p. 245-249, 1996.

KATOH, A.; SHOJI, T,; HASHIMOTO, T. Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 48, p.550-554, 2007.

KHAWALE, R.N. ;SINGH, S.K.; GARG, G.; BARANWAL, V.K.; ALIZADEH, S.A. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Current Science**, New York, v. 91, n. 12, p. 1700-1705, 2006.

KIM, S.Y.; CHUNG, H.J.; THOMAS, T.L. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. **The Plant Journal**, Malden, v.11, n. 6, p. 1237-1251, 1997.

KIM, S.Y.; MA, J.; PERRET, P.; LI, Z.; THOMAS, T. Arabidopsis ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 130, p. 688-697, 2002.

KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science**, Washington, v. 304, p. 982–982, 2004.

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.

KRENS, F.A.; MOLENDIJK, L.; WULLEMS, G.J.; SCHILPEROORT, R.A. *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. **Nature**, London, v. 296, p. 72-74, 1982.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 18, p. 509-566.

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

LING, J-T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.39, p. 325-333, 1989.

LOMBARDO, G.; ALESSANDRO, R.; SCIALABBA, A.; SCIANDRA, M.; PASQUALE, F. Direct organogenesis from cotyledons in cultivars of *Citrus Clementina* Hort. ex Tan. **American Journal of Plant Sciences**, Wuhan, v. 2, p. 237-244, 2011.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca.* L. americanus' is heat sensitive*.* **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n.3, p. 257-262, 2009.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus* Liberibacter americanus'. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p.21-24, 2008.

LÓPEZ, C.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant Pathology**, Saint Paul, v. 11, n. 1, p. 33–41, 2010.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 9, p. 221-277.

MATHUR, J.; KONCZ, C. PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. **Methods in Molecular Biology***,* Clifton, v.82, p.267-276, 1998.

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

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

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, Amsterdam, v. 59, p. 68-75, 2010.

MIYATA, L.M.; HARAKAVA, R.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MOURÃO FILHO, F.A.A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. **Plant Cell Reports**. New York, v. 31, n. 11, p. 2005-2013, 2012.

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.

MOLINA, R.V.; CASTELLÓ, S.; GARCÍA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J.L. Light-cytokinin interactions in shoot formation in epicotyl cuttings of Troyer citrange cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n.2, v.89, p.131-140, 2007.

MOORE, G.A.; JACANO, C.C.; NEIDIGH, J.L. *Agrobacterium*–mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports,** New York, v. 11, n. 5-6, p. 238-242, 1992.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Day length 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.

MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. *Citrus in vitro* organogenesis related to BAP concentrations and explant section. **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.

MURRAY, R.G.E.; SCHLEIFER, K.H. Taxonomic notes: A proposal for recording the properties of putative taxa of Procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 1, p. 174-176, 1994.

NEVES, E.M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S.; NEVES, M.F. Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros, 1996-2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 432-436, 2001.

NIEDZ, R.P.; MCKENDREE, W.L.; SHATTERS, R.G.J. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and regeneration of transformed plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 39, p.586-594, 2003.

OHSHIMA, M.; MITSUHARA, I.; OKAMOTO, M.; SAWANO, S.; NISHIYAMA, K.; KAKU, H.; NATORI, S.; OHASHI, Y. Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. **The Japanese Biochemical Society**, Tokyo, v.125, p.431-435, 1999.

OLIVARES-FUSTER, O.; FLEMING, G.H.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O.; GROSSER, J.W. Citrus Tristeza Virus (CTV) Resistance in Transgenic Citrus Based on Virus Challenge of Protoplasts. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.39, n.6, p.567-572, 2003.

OLLITRAULT, P.; LURO, F. Amélioration des agrumes biotecnologie. **Fruits**, Cambridge, v. 50, p. 267-279, 1995.

OMAR, A.A.; GROSSER, J.W. Transfer of cDNA of the Xa21 *Xanthomonas resistance gene* from rice into 'Hamlin' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using a protoplast/*GFP* transformation system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, Columbia, v.40, p.65, 2004.

OMAR, A.A.; SONG, W. Y.; GRAHAM, J. H.; GROSSER, J. W. Comparison between protoplast transformation and co-transformation in 'Hamlin' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) osbeck]. **Hortscience**, Alexandria, v. 41, p.972-973, 2006.

OMAR, A. A.; GROSSER, J. W. Protoplast/*GFP* transformation system: Comparison between endoplasmic reticulum targeting and non-targeting *GFP* in transgenic citrus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, Columbia, v.43, p.25, 2007.

OMAR, A.A.; CALOVIC, M.; EL-SHAMY, H.A.; AN, H.J.; GROSSER, J.W. Transformation and regeneration of transgenic 'W. Murcott' (Nadorcott) mandarin using a protoplast-*GFP* transformation system. **Hortscience**, Alexandria, v.43, p.1155, 2008.

OMAR, A.A.; GROSSER, J.W. Comparison of endoplasmic reticulum targeted and non-targeted cytoplasmic *GFP* as a selectable marker in citrus protoplast transformation. **Plant Science**, Amsterdam, v. 174, n. 2, p. 131–139, 2008.

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

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *Huanglongbing* **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.37-51, 2010.

PEÑA L.; NAVARRO, L. Transgenic citrus. In: **Bajaj YPS**, ed. Biotechnology in agriculture and forestry: transgenic trees. Berlin: Springer Verlag, p.39-53, 1999.

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, 2004.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and Mandarim by direct organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.5, p.931-934, 1997.

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

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

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo. In: INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001. Ribeirão Preto. **Proceedings**... Ribeirão Preto: [s.n.], 2001. p.75-82.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v.13, p. 62–66, 2003.

REYES, C.A.; ZANEK, M.C.; VELAZQUES, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GARCIA, M. L. Generation of Sweet Orange Transgenic Lines and Evaluation of *Citrus psorosis virus*-derived Resistance against Psorosis A and Psorosis B. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 159, n. 7/8 p. 531-537, 2011.

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, p.463-466, 2006.

SCHINOR, E.H.; AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis in some citrus species. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.2, p.526-531, 2011.

SCHUBERT, D.; LECHTENBERG, B.; FORSBACH, A.; GILS, M.; BAHADU, S.; SCHMIDT, R. Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: The predominant role

of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, n. 10, p. 2561-2572, 2004.

SCORA, R.W. On the history and origin of *Citrus*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lancaster, v. 102, n. 6, p. 369-375, 1975.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos Citros. In: MATTOS JUNIOR., D. et al. **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, p.319-344, 2005.

SILVA, R.P.; SOUZA, A.J.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Sour orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explant type. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.1, p.1-8, 2010.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SORIANO, L.; TAVANO, E.C.R.; BEHLING, A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of rangpur lime. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 349-355, 2012.

SUN, S.C.; LINDSTROM, I.; LEE, J.Y.; FAYE, I. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia.* **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 196, p. 247-254, 1991.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.B.(Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. p.190-430.

TAVANO, E.C.R.; STIPP, L.C.L.; MUNIZ, F.R.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium.* **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 53, n. 2, p. 395-399, 2009.

TAVANO, E.C.R. Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus* Liberibacter spp. 2013. 86p. **Tese** (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

TAWEEKANACHOTE, S.; TE-CHATO, S. Factors affecting isolation of protoplasts of neck orange (*Citrus reticulata* Blanco) and gene transformation by *Agrobacterium*. **Journal of Science and Technology**, Knust Kumasi, v.22, p.15-23, 2000.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET,J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. '*Candidatus* Liberibacter americanus', associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857–1862, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD,S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus Huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 9, p. 977-984, 2008.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; FIGUEIREDO, J. O.; BARBIN, D. Melhoramento de clones de laranjeira 'Pêra' no Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2., 1978, Salvador,. Anais... Salvador: SBF, p.111-116. 1978.

WU, Y.; WOOD, M.D.; TAO, Y.; KATAGIRI, F. Direct delivery of bacterial avirulence proteins into resistant *Arabidopsis* protoplasts leads to hypersensitive cell death. **The Plant Journal**, Malden, v. 33, p. 131-137, 2003.

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**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 175-183, 1996.

ZAKA, S.M.; XIN-NIAN, Z.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G.A.C. Repellent effect of guava leaf volatiles on settlement of adults of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama, on citrus. **Insect Science**, Beijing, v. 17, n. 1, p. 39-45, 2010.

ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELASQUE , K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PEÑA, L;.GARCIA, M.L. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 57-66, 2008.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, p. 389-395, 2002.

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

ZUO, S.; LI, D.; DENG, X.; YI, H. The Transformation of *gfp* in cleopatra (*Citrus reticulata*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.2, p.109-112, 2002.

ANEXOS

Composição das soluções e meios de cultura para protoplastos, calos, embriões e plântulas de citros

1. EME Regular (0,146M)	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	1,65
KNO_3	1,90
$MgSo_4.7H_2O$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose*	50,00
Extrato de malte	0,50
Ágar	8,00
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

- Para cultura de calos e células em suspensão, autoclavar por 20 minutos a 15 psi.
* Para cultura de protoplastos, adicionar a sacarose nas seguintes proporções:
  para EME 0,6M = usar 205,38 $g.L^{-1}$
  para EME 0,7M = usar 239,61 $g.L^{-1}$
  para EME 0,8M = usar 273,84 $g.L^{-1}$, e esterilizar em filtro de 0,2 μm.

2. H+H	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	0,825
KNO_3	0,95
$MgSo_4.7H_2O$	0,185
KH_2PO_4 (monobásico)	0,075
K_2HPO_4 (dibásico)	0,01
$MgSO_4$	0,185
KH_2PO_4 (monobásico)	0,075
K_2HPO_4 (dibásico)	0,01
KCl	0,75
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43

Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose*	50,00
Extrato de malte	0,50
Glutamina	1,55
Ágar	8,00
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

3. BH_3	**$g.L^{-1}$**
$MgSO_4$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
KCl	1,50
Pantotenato de cálcio	0,05
Ácido ascórbico	0,10
Cloreto de colina	0,05
Ácido p-aminobenzóico	0,001
Ácido fólico	0,02
Riboflavina	0,01
Biotina	0,001
Retinol (vitamina A)	0,00001
Colecalciferol (vitamina D_3)	0,00002
Vitamina B_{12}	0,00004
KI	0,00075
Piruvato de sódio	0,02
Ácido cítrico	0,04
Ácido málico	0,04
Ácido fumárico	0,04
Frutose	0,25
Ribose	0,25
Xilose	0,25
Manose	0,25
Ramose	0,25
Celobiose	0,25
Galactose	0,25
Manitol	0,25
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Extrato de malte	1,00
Sacarose*	-
Manitol	81,99
Glutamina	3,10
Caseína hidrolisada	0,25
Adicionar 20 mL de água de côco	
Ajustar o pH para 5.7 com KOH	

* Adicionar a sacarose nas seguintes proporções:
para BH_3 0,6M = usar 51,35 $g.L^{-1}$
para BH_3 0,7M = usar 85,56 $g.L^{-1}$
para BH_3 0,8M = usar 119,77 $g.L^{-1}$, e esterilizar em filtro de 0,2 μm.

4. 1500	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	1,65
KNO_3	1,90
$MgSo_4.7H_2O$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose	50,00
Extrato de malte	1,50
Ágar	8,00
Ajustar o pH para 5.8 com KOH	
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi	

5. B+	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	1,65
KNO_3	1,90
$MgSo_4.7H_2O$	0,37
KH_2PO_4 (monobásico)	0,15
K_2HPO_4 (dibásico)	0,02
H_3BO_3	0,0062
$MnSO_4.H_2O$	0,0168
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086
KI	0,00083
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025
$CuSO_4.5H_2O$	0,000025
$CoCl_2.6H_2O$	0,000025
Mio-inositol	0,10
Tiamina-HCl	0,01
Piridoxina-HCl	0,01
Ácido nicotínico	0,005
Glicina	0,002
$CaCl_2.2H_2O$	0,43
Na_2EDTA	0,03724
$FeSO_4.7H_2O$	0,02744
Sacarose*	25,00
Extrato de malte	1,50
Cumarina	14,60
Ácido naftaleno acético	0,02
Ágar	8,00

Adicionar 20 mL de água de côco
Ajustar o pH para 5.8 com KOH
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

6. RMAN	**$g.L^{-1}$**
NH_4NO_3	0,825
KNO_3	0,95
$MgSo_4.7H_2O$	0,185
KH_2PO_4 (monobásico)	0,075
K_2HPO_4 (dibásico)	0,01
H_3BO_3	0,0031
$MnSO_4.H_2O$	0,0084
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0043
KI	0,000415
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,000125
$CuSO_4.5H_2O$	0,0000125
$CoCl_2.6H_2O$	0,0000125
Mio-inositol	0,05
Tiamina-HCl	0,005
Piridoxina-HCl	0,005
Ácido nicotínico	0,0025
Glicina	0,001
$CaCl_2.2H_2O$	0,215
Na_2EDTA	0,01862
$FeSO_4.7H_2O$	0,01372
Sacarose	25,00
Ácido naftaleno acético	2,01
Carvão ativado	0,50
Ágar	8,00

Ajustar o pH para 5.8 com KOH
Autoclavar por 20 minutos, a 15 psi

7. CPW	**$g.L^{-1}$**
KH_2PO_4	0,0272
KNO_3	0,10
$MgSO_4$	0,25
KI	0,00016
$CuSO_4$	0,0000025
$CaCl_2.2H_2O$	0,15

- Para CPW 13M, adicionar 13 $g.100\ mL^{-1}$ de manitol
- Para CPW 25M, adicionar 25 $g.100mL^{1}$ de sacarose

Ajustar o pH para 5.8 com KOH
Esterilizar em filtro de 0,2 μm

8. Solução Enzimática	**$g.L^{-1}$**
Manitol (0,7M)	128,00
$CaCl_2$ (24,5mM)	3,60
NaH_2PO_4 (0,92mM)	0,11
MES (6,15mM)	1,20
Celulase a 1% (Onozuka RS)	10,00
Macerase a 1%(R 10)	10,00
Pectolyase Y-23 a 0,2%	2,00

Ajustar o pH para 5.6 com KOH
Esterilizar em filtro de 0,2 μm

9. Solução de PEG	**$g.L^{-1}$**
Polietilenoglicol (PM = 1500)	400,00
$CaCl_2.2H_2O$	9,70
Glicose	54,10
Ajustar o pH para 6.0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

10. Solução de lavagem "A"	**$g.L^{-1}$**
Glicose	72,00
$CaCl_2.2H_2O$	9,70
Adicionar 100 mL de DMSO	
Ajustar o pH para 6.0 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

11. Solução de lavagem "B"	**$g.L^{-1}$**
Glicina	22,50
Ajustar o pH para 10.5 com KOH	
Esterilizar em filtro de 0,2 μm	

12. 1:1:1
1 parte de BH_3 0,6M
1 parte de EME 0,6M
1 parte de EME regular (0,146M)
Ajustar o pH para 5.7
Esterilizar em filtro de 0,2 μm

13. 1:2
1 parte de BH_3 0,6M
2 partes de EME Regular (0,146M)
Ajustar o pH para 5.7
Esterilizar em filtro de 0,2 μm