

**MARIA LUIZA PEIXOTO DE OLIVEIRA**

**Morfogênese *in vitro* e transformação genética de laranja ‘Pêra’  
[*Citrus sinensis* (L.) Osb.], mediada por *Agrobacterium***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2004

MARIA LUIZA PEIXOTO DE OLIVEIRA

**Morfogênese *in vitro* e transformação genética de laranja ‘Pêra’  
[*Citrus sinensis* (L.) Osb.], mediada por *Agrobacterium***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**APROVADA EM: 26 de fevereiro de 2004**

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros  
(Conselheiro)

---

Prof. José Maria Moreira Dias  
(Conselheiro)

---

Prof. Eldo Antônio Monteiro da Silva

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À **Deus**, pela vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária- BIOAGRO. Seus profissionais (funcionários e professores) e estudantes (da pós-graduação e graduação).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni, pela confiança em aceitar-me como sua orientada, pelos ensinamentos transmitidos sempre com muita amizade e atenção.

Aos professores Everaldo Gonçalves de Barros, José Maria Moreira Dias, por aceitar ser meus conselheiros, pelas sugestões e pela confiança.

Ao Prof. Lúcio Antonio de Oliveira Campos, pelo apoio, pela amizade, pelos ensinamentos, e por ser um exemplo de ética e perseverança.

À Lili, pela amizade, conselhos e dicas na condução dos experimentos.

Ao Professor Márcio Gilberto Cardoso Costa pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos : Ana Paula, Andréa, Alexandra, Carmen, Elisa, Fabiana, Leandro, Letícia, Leonardo, Lourdes, Luciano, Maurecilne, Miranda, Ronelza, pela ajuda, pelo companheirismo e pela amizade.

As amigas Adriana, Flávia, Juliana, Marciane, pela inabalável amizade.

Aos amigos Sérgio e Débora pelo apoio, amizade e carinho dedicados.

Ao meu marido, Juliano, pela integridade, pelo incentivo e pelo amor.

À minha filha Isabella, motivo de alegria e continuidade da minha vida.

À minha família pela compreensão, pelo apoio incessante e pelo amor dedicado.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram e torceram pelo meu sucesso, minha sincera gratidão.

## **BIOGRAFIA**

MARIA LUIZA PEIXOTO DE OLIVEIRA, filha de Luiz Carlos Peixoto de Oliveira e Maria do Carmo Carvalho Peixoto, nasceu em Santa Cruz do Rio Pardo, SP, no dia 29 de março de 1977.

Concluiu seus estudos de nível fundamental e médio em Viçosa, MG.

Em fevereiro de 1997, ingressou na Universidade Federal de Viçosa –MG, graduando-se em Ciências Biológicas em 2002.

Bolsista do Programa Especial de Treinamento do Curso de Ciências Biológicas da UFV, desde novembro de 1997 até março de 2002.

No período de janeiro de 1998 a abril de 2002, desenvolveu trabalhos de iniciação científica no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária- BIOAGRO.

Em abril de 2002, iniciou o Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em fevereiro de 2004.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. Genética e melhoramento do gênero <i>Citrus</i> .....	4
2.2. Morfogênese em espécies cítricas.....	8
2.3. Transformação genética de plantas.....	12
2.3.1. O sistema de transferência de genes por <i>Agrobacterium</i> .....	14
2.3.2. Fatores que afetam a transformação genética via <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> .....	17
2.3.2.1. Fatores relacionados à indução dos genes <i>vir</i> .....	17
2.3.2.2. Fatores relacionados ao tipo de explante e condições de incubação pós-cultivo.....	19
2.4. Transformação genética em citros.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1. Origem, preparação do material vegetal.....	23
3.2. Estirpe de <i>Agrobacterium</i> e plasmídeo.....	24
3.3. Transformação genética com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e confirmação dos eventos de transformação.....	26

3.4. Análise estatística.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
4.1. Efeito do BAP na organogênese <i>in vitro</i> de laranja ‘Pêra’.....	28
4.2. Análise dos fatores que afetam a eficiência de transformação laranja ‘Pêra’.....	31
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## RESUMO

OLIVEIRA, Maria Luiza Peixoto de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de laranja ‘Pêra’ [*Citrus sinensis* (L.) Osb.], mediada por *Agrobacterium***. Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e José Maria Moreira Dias.

A transformação genética está se tornando, cada vez mais, uma ferramenta importante em programas de melhoramento genético de diversas espécies, sendo uma alternativa para a incorporação de gene(s) exógeno(s) no genoma da planta, modificando características de interesse. Para citros, essa ferramenta permite romper barreiras naturais dessa espécie, visto que o desenvolvimento de novas variedades pelo melhoramento convencional possui uma série de limitações impostas pela sua biologia reprodutiva. Entretanto, os protocolos de transformação genética requerem, primariamente, o estabelecimento de um eficiente sistema de morfogênese *in vitro* para que o sucesso do método de transformação seja alcançado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento das melhores condições de cultivo *in vitro* para a organogênese e a posterior adequação de uma metodologia eficiente de transformação genética para a variedade de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] ‘Pêra’. Na avaliação das melhores condições da organogênese *in vitro*, segmentos de epicótilos foram introduzidos em meio de cultura MT contendo diferentes concentrações de BAP. A concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP utilizada na fase de indução de brotações assegurou as melhores freqüências de organogênese. Foram também estudados

fatores que possam influenciar o processo de transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando epicótilos de laranja 'Pêra' como fonte de explante. Os fatores testados foram: tempo de inoculação com *Agrobacterium*, o período de co-cultivo e a presença de auxina no meio de pré-cultivo. O protocolo otimizado para a transformação genética de laranja 'Pêra' foi a imersão do explante em uma solução contendo *Agrobacterium*, por um tempo de 5 minutos, seguido de um período de co-cultivo de 2 dias em meio de cultura contendo 100  $\mu\text{M}$  de acetoseringona e transferidos para o meio de seleção, constituído do meio MT e ainda de 75  $\text{mg L}^{-1}$  de canamicina, 500  $\text{mg L}^{-1}$  de Timetin<sup>®</sup> e 1  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Maria Luiza Peixoto de, M.S., Federal University of Viçosa, february 2004.

**Morphogenesis *in vitro* and genetic transformation of 'Pêra' orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] mediated by *Agrobacterium*.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee Members: Everaldo Gonçalves de Barros and José Maria Moreira Dias.

Genetic transformation is a technique whose importance is increasing as an important tool for breeding programs of several species, being a reliable alternative for introducing characteristics of interest. For citrus, this tool helps to overcome natural reproductive barriers, the obtention of new cultivars by conventional breeding methods has several constraints, mainly linked to its reproductive biology. However, genetic transformation protocols demand, primarily, the establishment of efficient regeneration systems, in order to guarantee the success of transformation method. The objective of the present work was to establish promotive conditions for a reliable *in vitro* regeneration system from epicotyl explants, and further adequate an efficient and reproducinle transformation methodology for a sweet orange variety [*Citrus sinensis* L. (Os.) 'Pêra']. For organogenesis, epicotyl explants were cultured onto a MT medium containing different BAP concentrations. For induction phase, 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP enabled higher regeneration frequencies of adventitious shoots. Also, factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency were tested, as follows: incubation period with bacteria, co-culture period, and the presence of auxin in the pre-culture step. The following conditions generated and optimized protocol for 'Pêra'

transformation: immersion for 5 minutes of the explants in a diluted *Agrobacterium* suspension; a 2-days co-culture period in a 100  $\mu\text{M}$  acetoseryngone-supplemented medium; transfer for a selective regeneration MT-based medium, supplemented with 1.0  $\text{mg L}^{-1}$  BAP, 75  $\text{mg L}^{-1}$  kanamycin, and 500  $\text{mg L}^{-1}$  Timentin<sup>®</sup>.

## 1- INTRODUÇÃO

As plantas cítricas são originárias das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático, podendo ser cultivadas do Equador até latitudes de 44° norte ou sul (Simão, 1998). O produto mais importante e valorizado dos citros no passado era a fruta *in natura*, porém atualmente é o suco de laranja concentrado e congelado, cuja produção está crescendo gradualmente, com o Brasil e o Estado da Flórida (EUA) na liderança do mercado (FAO, 2003).

No contexto da fruticultura, os citros são de grande importância econômica para o Brasil, já que ocupa o primeiro lugar em volume de produção, seguidos pelas culturas de banana, uva e maçã. A distribuição das áreas de plantio é muito irregular ao redor do globo. Apenas dois, entre mais de cem países produtores de citros, detêm mais da metade da produção mundial, o Brasil e os Estados Unidos (FAO, 2003). Apesar do Brasil ocupar lugar de destaque no panorama mundial, houve redução na produção nas últimas safras. Os fatores relacionados a essa diminuição da produção citrícola, merecem destaque as condições climáticas que não favoreceram a produção nas safras anteriores, baixos níveis de preços, erradicação de pomares menos produtivos e os problemas fitossanitários. Dentre as doenças que mais acometem o cultivo de citros se destacam o cancro cítrico, a clorose variegada do citros (CVC), o declínio e o surgimento da morte súbita, entre outras (Prates & Pelegrini, 1995). Portanto, urge a necessidade de pesquisas e/ou medidas que visem solucioná-las ou minimizá-las.

Uma das medidas cabíveis para minimizar os problemas fitossanitários dos citros é o melhoramento genético, desenvolvendo novas variedades tolerantes

e/ou resistentes a pragas e doenças. Entretanto, os métodos tradicionais de melhoramento genético de citros enfrentam uma série de barreiras, relacionadas à biologia reprodutiva do gênero, dificultando suas aplicações, sendo dignos de menções o longo período juvenil, a poliembrionia nucelar, alta heterozigose, a auto-incompatibilidade e esterilidade sexual (Koller, 1994). Devido aos problemas para a aplicação dos métodos convencionais, apesar destes serem de extrema importância para o desenvolvimento da citricultura mundial, urge a necessidade de métodos complementares para que os avanços ocorram mais rapidamente.

Os problemas associados ao melhoramento das espécies cítricas podem ser superados com a incorporação de biotecnologias, a exemplo da cultura de células e tecidos, genética molecular, fusão de protoplastos, transformação genética, entre outras, permitindo, portanto, a obtenção e a utilização da variedade disponível (Grosser et al., 1996). Ainda, permite utilizar germoplasmas não explorados, criando novas combinações que poderão ser utilizadas em programas de melhoramento convencional, ou resultar em variedades totalmente novas. A hibridação somática e a transformação genética são as técnicas mais utilizadas. Dentre estas técnicas, a transformação genética vem mostrando ter um grande potencial, por possibilitar a introdução de genes que modificam características de interesse agrônomo, mantendo-se as características da variedade e evitando a transferência de características deletérias (Peña et al., 1995a).

A transformação genética, mediante a introdução de um único gene em determinado cultivar de *Citrus*, permite produzir rapidamente uma variedade modificada com características específicas (Bond & Roose, 1998). Para tanto, são necessários determinados requisitos para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas, tais como a existência prévia de uma metodologia eficiente de cultura de células e tecidos *in vitro* que permita a formação de plantas (Brasileiro & Dusi, 1999), bem como um sistema de transformação genética compatível, que assegure a introdução de genes com eficiência (Perez- Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1998). Em *Citrus*, existem diversos protocolos de cultura de tecidos que

levam à formação de plantas, o que torna viável a aplicação destes protocolos em engenharia genética da cultura.

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer condições de cultivo *in vitro* para organogênese e transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens*, para a variedade de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] 'Pêra'.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Genética e melhoramento do gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* e muitos gêneros relacionados à sub-família Aurantioideae, família Rutaceae são nativos da região sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do leste da Arábia às Filipinas e do sul da região do Himalaia à Indonésia ou Austrália (Koller, 1994).

Na família Rutaceae, sub-tribo Citrinae, somente três gêneros têm importância econômica: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*. Entre eles é possível a polinização com a obtenção de híbridos, alguns com valor comercial (Moreira & Pio, 1991).

As plantas cítricas geralmente são diplóides, com  $2n = 18$  cromossomos (Koller, 1994). Tetraplóides e triplóides naturais ocorrem em baixa frequência. Os tetraplóides não têm valor econômico, crescem lentamente e, em geral, surgem espontaneamente como plântulas nucelares em todos os cultivares (Cameron et al., 1968). Por outro lado, os triplóides aparecem regularmente como plântulas produzidas sexualmente. Podem ser obtidas, de forma sistemática, pelo cruzamento controlado de tetraplóides com diplóides. Apesar do baixo conteúdo, ou mesmo a completa ausência de sementes, poucos triplóides adquirem significância comercial (Amaro et al., 1991).

Os primeiros trabalhos de melhoramento de citros foram iniciados na Flórida em 1983 com Swingle e Webber. A partir de então, numerosos trabalhos foram desenvolvidos, não apenas na Flórida, mas também na Califórnia. Muitos

programas de melhoramento genético de citros são divididos em duas categorias: o melhoramento para variedades copa e para variedades porta-enxerto, pois os objetivos de cada um deles são diferentes. Entretanto, a combinação de ambos os programas pode resolver problemas de natureza mais universal, como resistência a viroses e tolerância ao frio (Simão, 1998).

No melhoramento para variedades copa, ênfases têm sido dadas à melhoria da qualidade dos frutos, seleção de cultivares que apresentam maturação precoce e tardia, produtividade, resistência a pragas e doenças, ausência ou poucas sementes e tolerância ao frio. Quanto ao melhoramento de variedades porta-enxerto, têm-se buscado tolerância à salinidade e à seca, além da resistência a pragas e doenças (Moreira & Pio, 1991).

Algumas barreiras reprodutivas do gênero *Citrus* limitam o impacto do melhoramento tradicional, por meio de cruzamentos controlados no lançamento de novas variedades. Dentre esses problemas estão relacionados a alta heterozigose dos citros, a esterilidade de pólen e óvulos, a apomixia facultativa, longa fase juvenil (Koller, 1994). A alta heterozigose dos citros pode ser resultado de polinizações cruzadas realizadas por insetos, já que a ocorrência natural de cruzamentos intervarietais e até interespecíficos é relativamente fácil em citros (Moreira & Pio, 1991).

Diversos cultivares e híbridos em citros possuem alta esterilidade do pólen e a autoincompatibilidade, assim como a incompatibilidade cruzada são bastante comuns (Soost et al., 1975); estas incompatibilidades impedem muitas hibridações potenciais.

As espécies cítricas são alógamas, altamente heterozigotas, e os cultivares têm se mantido inalterados por gerações, pois têm sido propagados vegetativamente. Estas espécies são também caracterizadas por um longo período juvenil, com período mínimo de cinco anos para o aparecimento das primeiras flores e frutos e de dez a quinze anos para que possam ser avaliadas as características de produção e qualidade de frutos, portanto, requer tempo e custo (Koller, 1994).

A apomixia facultativa via embriogenia nucelar resulta freqüentemente na ocorrência de sementes poliembriônicas. Essas sementes poliembriônicas resultam na ausência ou na produção de poucas plantas híbridas a partir de cruzamentos controlados. Apesar da embriogenia nucelar em citros ser um importante obstáculo para a hibridação, é de grande valor na produção de porta-enxertos vigorosos, uniformes e livres de vírus (Moreira & Pio, 1991).

Os problemas particulares associados ao melhoramento das espécies cítricas podem ser superados com a incorporação de biotecnologias, a exemplo da cultura de células e tecidos, genética molecular, fusão de protoplastos, transformação genética, entre outras, permitindo, portanto, a utilização da variedade disponível (Grosser et al., 1996), bem como a utilização de germoplasmas ainda não explorado, criando novas combinações que poderão ser utilizadas em programas de melhoramento convencional, ou resultar em variedades totalmente novas (Gmitter Jr. et al., 1992). A hibridação somática e a transformação genética são as técnicas mais utilizadas.

Híbridos somáticos têm sido obtidos, pela fusão de protoplastos, sendo portanto uma alternativa para a produção de híbridos de espécies e gêneros sexualmente incompatíveis (Kobayashi et al., 1991). Essa técnica tem sido extensivamente aplicada em programas de melhoramento genético de citros, tanto para o melhoramento de variedades copa, como porta-enxerto.

No caso de melhoramento de porta-enxerto, as aplicações se referem à obtenção de híbridos somáticos alotetraplóides, dando ênfase para combinações com características complementares de resistência a doenças (Mendes-da-Glória et al., 2000; Mendes et al., 2001).

Entretanto, quando o objetivo é o melhoramento de variedades copa, é pouco provável que híbridos somáticos tetraplóides sejam utilizados diretamente como novos cultivares, visto que as frutas tetraplóides geralmente apresentam características inaceitáveis aos consumidores, como casca grossa, fruta em forma irregular e textura áspera (Gmitter Jr. et al., 1992). Portanto, os híbridos somáticos obtidos de variedades copa, devem ser incorporados ao programa de melhoramento, como parental tetraplóide para cruzamento com diplóides,

resultando em plantas triplóides infertéis. Esta técnica tem sido utilizada com o objetivo da produção de variedades comerciais de copa triplóide sem sementes (Deng et al., 1992; Grosser et al., 1996).

## 2.2- Morfogênese em espécies cítricas

O processo morfogênico é resultado da divisão e diferenciação celular organizada, que depende, basicamente, da atividade e expressão de determinados genes. Segundo Ramalho & Santos (1990), a cultura de tecidos tem contribuído significativamente para o estudo da morfogênese. Entretanto, sua principal dificuldade é identificar o meio de cultura mais adequado para que ocorra a divisão e diferenciação celular, seguida da obtenção de plantas idênticas àquela de onde a célula ou conjunto de células foi retirada.

As células cultivadas *in vitro* podem manifestar sua totipotência, seguindo duas rotas alternativas: a) organogênese, onde ocorre a produção de brotações e raízes, sem formação prévia do embrião, ou seja, conduz à diferenciação de meristemas caulinares e/ou radiculares; b) embriogênese somática, que conduz a formação de embriões, a partir de células que não são produtos da fusão de gametas (Dias, 1998).

A formação de plantas cítricas *in vitro*, a partir da organogênese ou embriogênese somática tem sido reportada em alguns trabalhos. A embriogênese somática em citros, tem sido, principalmente, a partir de calos, originados do cultivo de óvulos (Kunitake et al., 1991) e nucelos (Vu et al., 1993; Oliveira et al., 1994).

Cabasson et al. (1995) caracterizaram histologicamente o processo de embriogênese somática, a partir de células em suspensão de *Citrus deliciosa*. Essa metodologia para a obtenção de calos friáveis em meio de cultura líquido incubados sob agitação contínua se mostrou uma boa alternativa para aumentar a quantidade de células embriogênicas num curto período de tempo.

A formação de plantas pela organogênese *in vitro* pode variar de acordo com o genótipo (Bordón et al., 2000), idade (Costa et al., 2004), posição do explante (García-Luis et al., 1999; Moura et al., 2001; Costa et al., 2004), época do ano, composição do meio de cultura e condição de incubação (Durán-Vila et al., 1992; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Moreira-Dias et al., 2000).

Verifica-se na literatura que diversos trabalhos foram realizados na tentativa de otimizar os protocolos de morfogênese, seja para a obtenção de

clones, seja para a utilização em protocolos de transformação genética. Neste sentido, reguladores de crescimento têm sido foco de pesquisas com o intuito de se obter balanços citocinina/auxina adequados para uma maior eficiência morfogênica.

Bhat et al. (1992) caracterizaram a morfogênese *in vitro* de lima ácida 'Kagzi', utilizando para isso, segmentos de raízes cultivados sobre papel de filtro em meio MS líquido, contendo diferentes concentrações de BAP e AIA. Embora a formação de brotações em todos os meios de cultura tenha sido baixa, a organogênese foi direta e as brotações originaram-se endogenamente, a partir de zonas meristemáticas formadas no periciclo.

Edriss & Burger (1984) estabeleceram um protocolo eficiente de organogênese para citrange 'Troyer'. Este trabalho teve como objetivo comparar diferentes fontes de explantes (segmentos de epicótilo, segmentos de raízes e ápices meristemáticos de raízes de plântulas germinadas *in vitro*), quanto à capacidade de propagação *in vitro*, utilizando, para isso, diferentes concentrações de reguladores de crescimento. A formação de brotações, por organogênese direta, foi obtida somente para os explantes provenientes de regiões do epicótilo, quando cultivados em meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Para os demais explantes, somente ocorreu a formação de calos. Posteriormente, as brotações obtidas em segmentos de epicótilos foram individualizadas e colocadas em meio MS contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, onde se obteve a formação de raízes a partir de quatro semanas. O trabalho de Moore et al. (1986) relatou que a adição de ANA no meio de cultura inibiu a organogênese em algumas espécies de citros. Outros trabalhos contradizem os resultados obtidos por Moore et al. (1986) e Edriss & Burger (1984), onde obtiveram resultados positivos com a combinação de ANA e BAP (Durán-Vila et al., 1992; Moreira-Dias et al., 2000) no processo organogênico em algumas espécies de citros.

Maggon & Singh (1995) demonstraram que a adição de ABA ao meio de cultura em combinação com BAP promovia bons resultados na formação de brotações em laranja 'Mousambi' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) em segmentos de epicótilo e hipocótilo oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. A combinação de

2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ABA apresentou 85% e 100% de explantes responsivos em segmentos de epicótilo e hipocótilo, respectivamente. Apesar da taxa de morfogênica ter sido alta, as brotações não se desenvolviam quando transferidas para o meio básico, MS. Os autores acreditam que a presença de ABA tenha atuado promovendo a dormência nas gemas.

Moura et al. (2001) estudaram organogênese *in vitro* de limão 'Cravo' e laranja 'Pêra' em função de diferentes concentrações de BAP. Para limão 'Cravo', foram utilizados como explantes, segmentos internodais de plântulas germinadas e cultivadas *in vitro*, em meio MT e variando as concentrações de BAP em 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10 mg L<sup>-1</sup>. Na laranja 'Pêra' os explantes foram segmentos do epicótilo de plântula também germinadas e cultivadas *in vitro*, em meio MT variando a concentração de BAP em 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. O melhor resultado para o número de brotações adventícias foi obtido na concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP para limão 'Cravo', e nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP para laranja 'Pêra'. Porém, o uso de altas concentrações de citocininas pode inibir a formação de gemas.

Um protocolo para a propagação *in vitro* de *Citrus mitis* Blanco foi desenvolvido por Sim et al. (1989). O objetivo do trabalho foi estudar o potencial organogênico de diferentes explantes oriundos de plântulas germinados *in vitro* e plantas adultas, em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de BAP. Todos os explantes foram cultivados em meio MS variando as concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10 mg L<sup>-1</sup>). Os melhores resultados para a indução da organogênese, quando se utilizou epicótilo e folhas de plântulas germinadas *in vitro* foi a utilização de 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente. Porém, não ocorreu o efeito do gradiente para essas fontes de explantes descritos acima. Com relação aos explantes de plantas adultas somente aqueles com base em gemas apicais e segmentos nodais formaram brotações. Estes mesmos explantes quando procedentes de plântulas juvenis, também induziram a organogênese. Posteriormente, todas as brotações foram enraizadas em MS líquido contendo com 0,1 - 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Muitas diferenças no comportamento dos citros podem estar relacionadas à posição do explante no meio de cultura e à composição genotípica.

García-Luis et al. (1999) mostraram que segmentos de citrange 'Troyer' inseridos verticalmente no meio respondem de forma diferente daqueles explantes cultivados horizontalmente, sendo esta última a melhor posição para regeneração de gemas. Resultados similares foram obtidos com segmentos seccionados longitudinalmente e incubados com a região do corte em contato com o meio de cultura (Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Ghorbel et al., 1998; Moreira-Dias et al., 2001 ; Almeida et al., 2002).

Bordón et al. (2000) estudaram diferentes repostas organogênicas, quando se utiliza diferentes espécies de citros como fonte de explantes. Essas diferenças estão relacionadas a diferentes concentrações de BAP no meio para a melhor indução de gemas e ANA para a o meio de enraizamento (Durán-Vila et al., 1989) e diferenças no porcentual de brotações por explante, em segmentos de epicótilo de diferentes porta enxertos de citros, quando submetidos às mesmas condições do meio de cultura (Bordón et al., 2000)

Durán-Vila et al. (1992) estudaram o efeito da temperatura e da radiação fotossintética na morfogênese *in vitro* de explantes de laranja 'Pineapple'. Para isso, foram utilizados segmentos internodais de plantas juvenis cultivados em meio MS contendo 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Os explantes foram submetidos à diferentes condições de incubação, com faixa de temperatura variando de 15 a 30 °C. A faixa ótima de temperatura para a formação de brotos foi de 21 a 30 °C.

Existem também diferenças na resposta com relação ao grau de maturidade do tecido, onde o tecido maduro responde melhor com concentrações mais baixas de BAP, conforme encontrado em segmentos internodais de citrange 'Carrizo' por Barlass & Skene (1982). No entanto, nos trabalhos utilizando tecidos adultos, a frequência da organogênese mostrou-se muito baixa (Sim et al., 1989; Bhat et al., 1992; Almeida et al., 2002), enquanto naqueles utilizando-se tecidos juvenis ocorre um aumento considerável na frequência organogênica (Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1997; Ghorbel et al., 1998; Moreira-Dias, 2001).

Todos os diferentes fatores que promovem essas variações morfogênicas no cultivo *in vitro* de citros, demonstram a necessidade do desenvolvimento de um protocolo eficiente de organogênese, específico para cada espécie ou cultivar a ser estudada, visto que suas características genéticas determinam respostas distintas, quando submetidas às mesmas condições de cultivo, seja com a finalidade de propagação, seja com a de utilização em processos de transformação genética.

### **2.3- Transformação genética de plantas**

A técnica de transformação genética apresenta-se como importante ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de novas variedades. Esta técnica está se tornando uma rotina para um grande número de espécies cultivadas, através da qual é possível a obtenção de plantas contendo genes exógenos, derivados de espécies de plantas relacionadas ou não, mesmo de outros reinos (bactérias, fungos, animais) podendo ser introduzidos no genoma das plantas, através de técnicas de transformação de plantas (De Block, 1993).

Várias são as razões para o desenvolvimento de plantas transgênicas, sendo as mais expressivas: a) introdução de gene(s) que pode(m) permitir a melhoria do valor agrônomico de plantas cultivadas; b) plantas transgênicas podem atuar como biorreatores vivos para a produção de proteínas e metabólicos de importância econômica; c) transformação genética de plantas é um poderoso

processo para estudar a ação dos genes durante o desenvolvimento e outros processos biotecnológicos (Dale, 1995).

O primeiro trabalho a relatar a capacidade de introduzir e expressar genes exógenos em plantas, foi realizado com tabaco na década de 80. A partir desta década, ocorreu uma importante ampliação dos trabalhos, envolvendo mais de 120 espécies, de grande valor vegetal, incluindo uma gama de culturas de imensurável importância agrônômica (Borém, 2001). A transformação genética está emergindo de um período dominado pelas pesquisas e entrando na era da aplicação desses métodos como uma ferramenta central da biologia vegetal e um instrumento prático para o melhoramento das culturas (Birch, 1997).

As características que podem ser melhoradas por essa técnica são aquelas controladas geneticamente por genes simples ou pequenos grupos de genes, tais como, os de resistência a insetos, proteção contra infecção de microrganismos, resistência a herbicidas, retardamento da senescência, tolerância a estresse ambiental, pigmentação de flores, melhoria da qualidade nutricional de proteínas da semente e auto-incompatibilidade (Perani et al., 1990).

Existem diversas técnicas de transformação genética de plantas, agrupadas em duas categorias: transferência indireta e direta dos genes. A transferência indireta é aquela em que, para intermediar a transformação, utiliza-se um vetor, como *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* (Brasileiro & Dusi, 1999).

A transferência direta de DNA é baseada em métodos físicos ou químicos, geralmente adaptados de outros já estabelecidos para transformação de células animais (Brasileiro & Dusi, 1999). Dentre estes, destacam-se a transformação com polietilenoglicol (PEG), eletroporação de protoplastos e biobalística (Aragão et al., 1992). No entanto, esses métodos têm sido muito utilizados para estudos de promotores e expressão de genes (Brasileiro & Dusi, 1999). Vale salientar, que para certas espécies de plantas, não é fácil estabelecer um sistema de transformação eficiente a ser utilizado rotineiramente em laboratórios, especificamente para plantas lenhosas (Cervera et al., 1998a).

A transformação via *Agrobacterium tumefaciens* tem sido o método mais utilizado em plantas, principalmente dicotiledôneas. Entretanto, muitas espécies, em particular as monocotiledôneas, são pouco susceptíveis à infecção por *Agrobacterium* apresentando recalcitrância a este tipo de transferência de DNA (Brasileiro & Dusi, 1999).

Dentre os métodos de transformação genética existentes, a introdução direta de DNA em protoplastos e a transformação mediada por *Agrobacterium* têm sido os mais utilizados na obtenção de plantas de citros transgênicas (Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a; Peña et al., 1995b; Gutiérrez-E. et al., 1997; Peña et al., 1997; Bond e Roose, 1998; Cervera et al., 1998b; Pérez-Molphe-Balch e Ochoa-Alejo, 1998).

### **2.3.1- O sistema de transferência de genes por *Agrobacterium***

*Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria do solo, pertencente à família Rhizobiaceae, caracteriza-se por ser um patógeno vegetal que induz a formação de tumor nos tecidos da planta por ela infectada, causando uma doença conhecida com “galha em coroa”. A infecção inicia-se pela penetração da bactéria no tecido vegetal e uma posterior indução para a formação do tumor. A indução do tumor é provocada pela presença de um grande plasmídeo denominado de Ti (tumour-inducing), o qual é encontrado em linhagens virulentas de *A. tumefaciens* (Stachel et al., 1985).

O plasmídeo Ti possui uma região específica, denominada de T-DNA que durante a infecção se integra no genoma da planta infectada. Os genes presentes no T-DNA, são denominados de oncogenes, por codificarem enzimas envolvidas na via biossintética de reguladores de crescimento (citocininas e auxinas), havendo dois genes responsáveis pela produção de auxina (*iaaM* e *iaaH*) e um pela de citocinina (*ipt*). Como consequência desse desbalanço hormonal, as células infectadas proliferam desordenadamente, levando à formação do tumor. Além disso, o T-DNA contém genes para a síntese de açúcares e aminoácidos

não usuais, denominados genericamente de opinas (Sheng et al., 1996; Van Sluys, 1999). As opinas produzidas são distintas de acordo com a linhagem de *Agrobacterium*, podendo ser nopalinas, octopina, leucinopina e succimanopina. As opinas produzidas são utilizadas como fonte de energia, carbono e nitrogênio, sendo, portanto, imprescindíveis para o crescimento da bactéria (Herrera-Estrela et al., 1983; Brasileiro & Dusi, 1999).

Para a transferência do T-DNA e a posterior integração do mesmo no genoma da planta, algumas seqüências gênicas são necessárias para esse processo: a) duas seqüências presentes nas extremidades do T-DNA de 25 pares de bases (pb) constituem as bordas direita e esquerda; b) produtos “trans-acting” dos genes de virulência os quais estão localizados na região de virulência (região *vir*) do plasmídeo Ti, e outros genes cromossomais (*chv*), os quais estão envolvidos na quimiotaxia da bactéria até o local da lesão na planta e na ligação desta com a parede celular (Wang et al., 1984; Sheng & Citovsky, 1996).

Os genes de virulência são induzidos quando o tecido injuriado da planta libera compostos fenólicos, como a acetoseringona, que atraem a bactéria por quimiotaxia, iniciando o processo de infecção e posterior transferência do T-DNA para a planta. A região de virulência está organizada em sete operons. O locus *vir* A é expresso constitutivamente e o seu produto (VirA), localizado na membrana interna das células de *Agrobacterium*, funciona como um quimiorreceptor que percebe a presença da acetoseringona no ambiente. Ao se ligar à acetoseringona, a proteína Vir A “ativada” modifica a proteína Vir G (que também é expressa constitutivamente, porém em menor escala) a partir da fosforilação da mesma. A proteína Vir G fosforilada se liga às seqüências operadoras dos genes *vir*, resultando na ativação dos mesmos. No processo de transferência do T-DNA, inicialmente este é clivado na fita inferior entre a terceira e a quarta base em ambas repetições de 25 pb presentes na borda direita e esquerda. Um T-DNA de fita simples é liberado a partir do plasmídeo Ti e outro é ressintetizado na direção 5'- 3', iniciando pela borda direita. O operon *vir*D codifica uma endonuclease que cliva seqüências na borda do T-DNA. A proteína VirD2 se liga à extremidade 3' do

T-DNA, protegendo contra a ação de exonucleases (Sheng & Citovsky, 1996; Tinland, 1996).

A proteína VirE2 complexa o T-DNA liberado e promove a exportação deste para o núcleo da célula vegetal. Canais conectando os citoplasmas da *Agrobacterium* e da célula vegetal, por onde o T-DNA passa, entrando na célula vegetal, provavelmente é formado por proteínas VirB (Sheng & Citovsky, 1996; Tinland, 1996).

A habilidade de *Agrobacterium* em transferir um segmento de DNA para o genoma vegetal levou à elaboração de técnicas que viabilizam a transformação de várias espécies de plantas. Há duas estratégias para a transferência de genes via *Agrobacterium*: o sistema de vetor cointegrado e o sistema do vetor binário, que é o mais utilizado atualmente. Neste último sistema, a agrobactéria deve possuir um pTi com região *vir* intacta e um segundo plasmídeo, denominado de vetor binário, que contém o gene de interesse e o marcador clonados entre sequências idênticas às da borda da região T. A transmissão do segmento de DNA dar-se-á através da atuação em *trans* dos produtos de expressão dos genes *vir* sobre as bordas da região-T simulada no vetor binário. Como os genes de biossíntese de auxinas e citocininas interferem negativamente na morfogênese das células transformadas, é comum a utilização de cepas desarmadas, das quais carregam deleções parciais ou totais na região-T do plasmídeo Ti, ou seja, não possuem os genes de biossíntese hormonal (Walden & Wingender, 1995).

A descoberta deste meio de transferência de DNA possibilitou não só o desenvolvimento de técnicas de produção de plantas transgênicas, mas também de outros métodos que permitem a integração de genes exógenos no genoma das plantas, métodos estes, amplamente utilizados na atualidade.

### **2.3.2- Fatores que afetam a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens***

Para a aplicação das técnicas de transformação genética é necessário que as células ou tecidos transformados formem plantas que expressem o gene introduzido (Brasileiro & Dusi, 1999). Além desse pré-requisito, alguns outros fatores podem afetar a eficiência da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, dentre eles estão: o cultivo, a estirpe de *Agrobacterium*, o tipo de explante, o genótipo, e as condições de incubação nas etapas de co-cultivo e de pós-cultivo.

#### **2.3.2.1- Fatores relacionados à indução dos genes *vir***

Acetoseringona e outros compostos fenólicos estão diretamente ligados ao processo de ativação dos genes da região *vir*, responsáveis pela transferência do T-DNA para a célula vegetal (Stachel et al., 1985).

Acetoseringona tem promovido um aumento nos níveis de transformação genética em várias espécies (Mathews et al., 1990; Goodwin et al., 1991; Jacq et al., 1993; Confalonieri et al., 1995). Em citros, a acetoseringona já vem sendo utilizada em protocolos de transformação de laranja doce (Bond & Rose, 1998; Costa et al., 2002), citrange 'Carrizo' (Cervera et al., 1998a), grapefruit 'Foster' (Costa et al., 2002). Kaneyoshi et al. (1994) utilizaram acetoseringona na suspensão bacteriana e no meio de co-cultivo em *Poncirus trifoliata*, obtendo uma eficiência de transformação de 55,4%.

Sabe-se que a acetoseringona ativa os genes *vir* a pH baixo (5,0-5,8) e assim dá início ao processo de transferência do T-DNA (Stackel et al., 1985). A importância do pH na presença de um agente indutor de virulência tem sido relatada em diversos trabalhos. Goodwin et al., (1991) obtiveram um incremento na frequência de transformação de *Antirrhinum majus*, quando o pH foi abaixado, porém isto ocorreu na presença de acetoseringona. O mesmo ocorre com algumas espécies de orquídeas (Belarmino & Mii, 2000) e em *Brassica campestris* L. (Zhang et al., 2000), onde foi utilizado pH 5,4 e 5,2 com a adição de

acetoseringona ao meio de cultura para o co-cultivo. Em citros, o efeito do pH ainda não foi testado.

Porém, nem sempre a adição de acetoseringona proporciona incrementos nas eficiências de formação de gemas transformadas. Em cenoura (Pawlicki et al., 1992), tabaco e tomate (Fillati et al., 1987), esse aumento não foi significativo, indicando que estas espécies possuem quantidades suficientes de compostos fenólicos para ativar os genes de virulência, não havendo a necessidade de adicionar compostos sintéticos.

Além de compostos fenólicos, outro fator relacionado a transferência do T-DNA, é a temperatura de incubação durante o período de co-cultivo, sugerindo fortemente que a termo-sensibilidade no desenvolvimento da 'galha da coroa' reflete dependência da temperatura para transferência do T-DNA (Dillen et al., 1997).

O efeito da temperatura no co-cultivo foi estudado em *Nicotiana tabacum* e *Phaseolus acutifolius*, onde as melhores temperaturas ficaram entre 19 e 22 OC. Estes resultados vão de acordo àqueles encontrados por Riker (1926), onde a formação de tumor em plantas foi obtido à temperatura de 22 OC. Em temperaturas entre 22 - 28 OC ocorre uma supressão dos genes de virulência, havendo portanto, uma relação entre a temperatura e a transferência do T-DNA pela maquinaria celular da Agrobactéria (Fullner & Nester, 1996)

Trabalhos em que se adicionam auxinas no meio de cultura na etapa de co-cultivo, têm sido utilizados com sucesso em sistemas de transformação genética em citros (Peña et al., 1997; Cervera et al., 1998a; Domínguez et al., 2000). Cervera et al. (1998a) mencionaram a importância das auxinas na indução de células competentes para transformação em citrange 'Carrizo', possivelmente devido ao aumento da taxa de desdiferenciação e conseqüente indução de divisão celular.

### **2.3.2.2- Fatores relacionados ao tipo de explante e condições de incubação pós-cultivo**

Em experimentos de transformação genética de citros, a incubação dos explantes no escuro, após o co-cultivo, tem proporcionado um aumento na eficiência de transformação. Peña et al. (1995a) obtiveram aumento na eficiência de transformação de citrange 'Carrizo' e laranja doce, quando utilizaram um período de 8 semanas de incubação no escuro, antes de transferir para fotoperíodo de 16-h. Porém, longos períodos de exposição ao escuro produziram gemas estioladas que mostraram abscisão, embranquecimento e morte, mais recentemente este tempo de incubação foi reduzido e adaptado de acordo com o genótipo (Peña et al. 1997). Durán-Vila et al. (1992) também obtiveram resultados semelhantes com laranja doce. Porém, existem trabalhos resultando em aumento na frequência de obtenção de plantas de citros transformadas, quando os segmentos foram transferidos diretamente para a luz, após o co-cultivo (Kaneyoshi et al., 1994; Costa et al., 2002).

Explantes expostos a fotoperíodo de 16-h formaram maior percentagem de gemas, mas também apresentam maior número de escapes, com pouca ou nenhuma formação de calos. O cultivo dos explantes no escuro favorece a formação de calos e desta forma aumentam o número de gemas transformadas que são GUS<sup>+</sup>, e ao mesmo tempo evitando a formação de escapes que poderiam ser estimulados pela exposição dos explantes diretamente na luz (Cervera et al., 1998a).

Um outro fator que afeta a frequência de transformação é o tipo de explante. Trabalhos de García-Luis et al. (1999), estudando a morfogênese em segmentos de epicótilo de citrange 'Troyer', mostraram uma maior frequência de transformação nos explantes cultivados na posição horizontal apresentando proliferação de calos a partir do câmbio, sendo indireta a origem das gemas. Porém, Almeida et al. (2002), trabalhando com laranja doce, cuja organogênese foi direta, obtiveram uma redução na eficiência de transformação. Segundo Mukhopadhyay et al. (1992), a origem endógena das gemas pode reduzir a eficiência de transformação genética, devido à dificuldade de contato entre a

bactéria e as células meristemáticas de células transformadas em variedades de laranja doce.

Outras tentativas foram realizadas buscando o tipo e posição de cultivo do explante para citros: segmentos internodais ou de epicótilos foram cultivados na posição vertical, com apenas uma gota de suspensão sobre a superfície do corte (Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a), mas explantes não seccionados cultivados na posição horizontal mostraram melhores resultados (Kaneyoshi et al., 1994; Peña et al., 1995b; Bond & Roose, 1998; Cervera et al., 1998a; Luth & Moore, 1999).

#### **2.4- Transformação genética em citros**

O estabelecimento de uma metodologia eficiente de transformação genética é o pré-requisito para o sucesso dessa técnica. Apesar da disponibilidade de protocolos de transformação genética para diversas espécies de citros, o desenvolvimento de plantas transgênicas tem sido relativamente lento (Peña et al., 1995a).

Os principais problemas têm sido as baixas eficiências de transformação (Peña et al., 1995b), o baixo número de plantas formadas (Vardi et al., 1990; Yao et al., 1996), a dificuldade de enraizamento e o elevado número de escapes (Moore et al., 1992).

Um outro problema que tem limitado o potencial do uso de transformação genética no melhoramento de citros é o seu longo período de juvenilidade. Transformação e formação dessas plantas são usualmente limitadas a tecidos juvenis derivados de sementes ou órgãos de plântulas, tais como embriões zigóticos, hipocótilos, epicótilos e cotilédones (Hidaka et al., 1990; Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a; Peña et al., 1995b; Peña et al., 1997; Gutiérrez-E. et al., 1997; Bond e Roose, 1998; Cervera et al., 1998b; Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1998). Plantas formadas a partir dessas fontes de explantes apresentam características de juvenilidade e são necessários muitos anos para que as características de interesse introduzidas nas plantas transgênicas sejam

avaliadas. Somente Cervera et al. (1998b) e Almeida et al. (2003) relataram o desenvolvimento de um sistema de transformação de citros via *Agrobacterium*, utilizando explantes derivados de tecidos adultos. Embora a frequência de respostas organogênicas dos explantes derivados de tecidos adultos foi menor do que os explantes derivados de tecidos juvenis, os resultados indicaram uma eficiência de transformação satisfatória. As plantas transgênicas obtidas nesse estudo floresceram e frutificaram 14 meses após transferência para casa-de-vegetação, período de tempo necessário para as plantas maduras atingirem vigor e tamanho adequados para o florescimento e frutificação. Peña et al. (2001), utilizando os genes LFY e AP1, conseguiram florescimento de plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' em 16 a 13 meses, respectivamente.

A dificuldade de enraizamento de plantas transgênicas tem sido superada com a realização de enxertias *in vitro* de seus ápices meristemáticos em plântulas de porta-enxerto germinadas *in vitro* (Peña et al., 1995a). Apesar de superar o problema do enraizamento, essa técnica tem dificultado o trabalho em virtude da introdução de mais uma etapa no protocolo (Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo, 1998).

Além das dificuldades de enraizamento, do elevado número de escapes e do período de juvenilidade na produção de plantas transgênicas, também tem sido relatada a influência da variedade (Moore et al., 1992; Gutiérrez-E. et al., 1997; Bond & Roose, 1998) e da estirpe de *Agrobacterium* utilizada (Gutiérrez-E. et al., 1997; Bond & Roose, 1998). Das variedades testadas até o momento, verifica-se que aquelas de laranja-doce (*C. sinensis*), de grande interesse comercial, são as mais recalcitrantes ao processo de transformação, dificultando a obtenção de plantas transgênicas, principalmente plantas enraizadas (Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a; Gutiérrez-E. et al., 1997; Bond & Roose, 1998). *Poncirus trifoliata* e os híbridos de *Poncirus* com *C. sinensis* respondem melhor aos protocolos de transformação, obtendo-se um maior número de plantas transformadas (Moore et al., 1992; Kaneyoshi et al., 1994; Peña et al., 1995b; Gutiérrez-E. et al., 1997; Bond & Roose, 1998; Cervera et al., 1998b). Variedades de *C. aurantifolia* (Moore et al., 1992; Peña et al., 1997; Pérez-Molphe-Balch &

Ochoa-Alejo, 1998), *C. aurantium* (Gutiérrez-E. et al., 1997) e *C. reticulata* x *C. paradisi* (Yao et al., 1996) também foram testadas. Das estirpes de *Agrobacterium* testadas, os melhores resultados têm sido obtidos com C58 C1, EHA-101 e EHA-105 (Peña et al., 1995a; Peña et al., 1995b; Gutiérrez-E. et al., 1997; Peña et al., 1997; Bond & Roose, 1998), enquanto que a estirpe LBA4404 não permitiu a obtenção de plantas transgênicas de laranja-doce e citrange 'Carrizo' (Bond & Roose, 1998).

Os genes *gus* e *nptII*, como agente repórter e de seleção, respectivamente, têm sido os mais utilizados em trabalhos de transformação genética de citros (Moore, 1986; 1992; Peña et al., 1995a; 1995b; 1997; Bond & Roose, 1998; Costa et al., 2002).

Apesar da baixa eficiência de formação de plantas no sistema mediado por *Agrobacterium*, alguns genes de importância agrônômica estão sendo introduzidos em citros com sucesso, como tolerância ou resistência ao vírus da tristeza dos citros pela introdução do gene da capa protéica do vírus da tristeza em laranja azeda (*C. aurantium* L.), lima (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing) (Gutiérrez-E. et al., 1997) e em lima Mexicana (Domínguez et al., 2000), tolerância à salinidade do gene HAL2 em citrange 'Carrizo' (Cervera et al., 1998a) e em grapefruit (*C. paradisi* Macf.) o gene GNA (oriundo de *Galanthus nivalis*) que confere resistência contra afídeos (Yang et al., 2000).

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Origem, preparação e regeneração do material vegetal

Para alcançar os objetivos propostos, utilizou-se sementes de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] 'Pêra' extraídas de frutos maduros, tratadas com cal extinta para eliminar a mucilagem. Posteriormente, foram postas a secar durante 3-5 dias à sombra. Após a secagem, as sementes foram selecionadas e embaladas em bolsas de plástico transparentes e armazenadas a uma temperatura de  $\pm 7$  °C, até o momento da utilização.

As sementes foram desinfestadas em álcool a 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) mais Tween-20 a 0,1% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e esterilizada (três vezes) e incubadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura para germinação, contendo metade da concentração dos minerais nutrientes do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck, Alemanha). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , com o uso de NaOH (0,1 N), antes da adição do ágar, e a adição desta foi realizada em autoclave a 121 °C, 1,5 Kgf cm<sup>-2</sup> de pressão, durante 20 minutos.

Como o objetivo era conseguir plântulas estioladas com o maior comprimento possível do epicótilo, a incubação se deu no escuro e a uma temperatura de  $27 \pm 2$  °C, em ausência de luz, por um período de 30 dias, tempo adequado para obter plântulas estioladas vigorosas. Para assegurar a

uniformidade genética do material vegetal, se deve escolher plântulas de origem nucelar. Uma maneira de selecionar o material é escolher somente uma plântula de cada semente, a mais vigorosa (Webber, 1932).

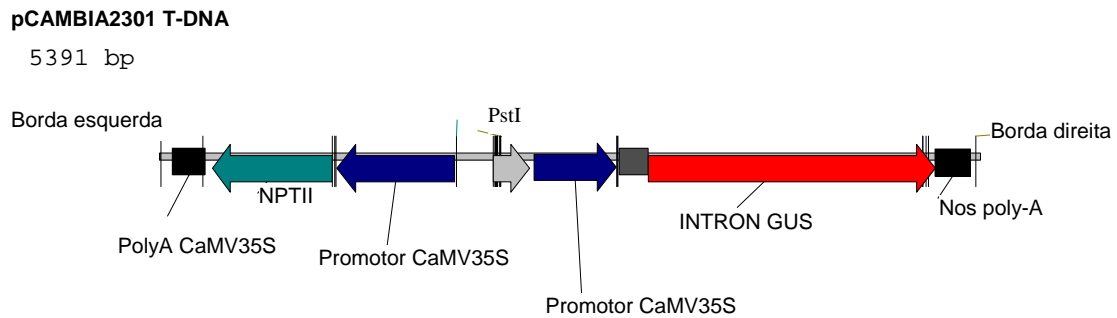
Para a indução de brotações adventícias, segmentos de epicótilos, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram cultivados em meio de cultura constituído pelos minerais nutrientes MT (Murashige & Tucker, 1969), com adição de 1,0 g L<sup>-1</sup> de tiamina clorídrica, 1,0 g L<sup>-1</sup> de piridoxina clorídrica, 0,5 g L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,2 g L<sup>-1</sup> de glicina, 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck, Alemanha) e diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP): 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 ou 4,0 mg L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, com o uso de NaOH (0,1 N), antes da adição do ágar. O meio, assim constituído, foi esterilizado em autoclave a 121 °C, 1,5 Kg<sup>f</sup> cm<sup>-2</sup> de pressão, durante 20 minutos. Em seguida, alíquotas de 25 mL deste meio foram distribuídas em placas de Petri estéreis de poliestireno cristal (90 x 15 mm; J. Prolab, Brasil). Sob condições de câmara de fluxo laminar Os explantes foram inoculados horizontalmente no meio de cultivo e incubados à 27 °C, sob irradiância de 24 a 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 16 horas de fotoperíodo (duas lâmpadas fluorescentes, 20 W), por um período de oito semanas.

As brotações obtidas foram transferidas para o meio de cultura MT, semelhante ao meio de indução de gemas e brotos, porém com ausência de BAP e com presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), para promover o alongamento das referidas brotações, as quais permaneceram incubadas, durante mais oito semanas, nas mesmas condições ambientais acima descritas.

### **3.2- Estirpe de *Agrobacterium* e plasmídios**

Todos os experimentos de transformação genética foram executados, utilizando-se a estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105, contendo os plasmídios pCAMBIA 2301 (Cambia, Austrália). Esses vetores foram construídos por Costa et al. (2002) onde estão inseridos os genes da neomicina

fosfotransferase II (*nptII*), sob controle do promotor nopalina sintase (*nos*), e da  $\beta$ -glucuronidase (*gus*), sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Figura 1).



**Figura 1.** Vetor utilizado na transformação de laranja 'Pêra'. Vetor: Pcambia2301; borda esquerda; polyA CAMV35S: sinais de terminação do gene CaMV; NPTII: neomicina fosfotransferase II; promotor CaMV35S : promotor do RNA 35S do CAMV; *Pst1*: sítio de restrição para a enzima *Pst1*; INTRON GUS: gene da  $\beta$ -glucuronidase; Nos polyA: sinais de terminação do gene *nos*; borda direita.

A bactéria foi mantida em solução 50% glicerol, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota da bactéria estocada foi cultivada em meio YEP ( $10\text{ g L}^{-1}$  de peptona,  $10\text{ g L}^{-1}$  de extrato de malte,  $5\text{ g L}^{-1}$  de cloreto de sódio e  $10\text{ g L}^{-1}$  de ágar Merck, Alemanha), contendo canamicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ), por 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este período, uma colônia isolada foi transferida para um frasco Erlenmeyer (50 mL), contendo 30 mL de meio de cultura YEP líquido, com presença do antibiótico canamicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ). O frasco contendo a bactéria foi incubado sob agitação a 200 rpm,  $28^{\circ}\text{C}$ , por 16 horas, no escuro. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3500 rpm, à

temperatura ambiente, por 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em meio de cultura MS líquido (Murashige & Skoog, 1962).

### **3.3- Transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens* e confirmação dos eventos de transformação genética**

Segmentos de epicótilo com aproximadamente 1 cm de comprimento e procedentes de tecidos juvenis foram mantidos, por 5 minutos, dentro de uma suspensão bacteriana a uma concentração de  $10^8 - 5 \times 10^8$  cfu/mL. Após este tempo, os explantes foram colocados em papel-filtro estéril para a retirada do excesso de *Agrobacterium* e, em seguida, transferidos para o meio de co-cultivo, composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), 100  $\mu$ M de acetoseringona (Sigma Aldrich, EUA), 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck, Alemanha), este adicionado ao meio de cultura, após ajustar o pH para  $5,7 \pm 1$  °C. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada conforme o item 3.1. Em seguida, alíquotas de 15 mL foram distribuídas em placas de Petri estéreis de poliestireno cristal (60 x 15 mm; J. Prolab, Brasil). Após dois dias de co-cultivo a 27 °C, mantidos no escuro, os explantes foram transferidos para meio seletivo de indução de gemas e brotos, contendo 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, 75 mg L<sup>-1</sup> de canamicina e 500 mg L<sup>-1</sup> de Timentin<sup>®</sup> e foram recultivadas a cada duas semanas. A avaliação final foi efetuada após oito semanas.

Após a fase de indução (60 dias), as brotações GUS<sup>+</sup> foram transferidas para placas de petri estéreis de poliestireno cristal (90 x 15 mm; J Prolab, Brasil) contendo 25 mL de meio MT (Murashige & Toker, 1969), e, ainda, 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), 75 mg L<sup>-1</sup> de canamicina e 500 mg L<sup>-1</sup> de Timentin<sup>®</sup> para alongamento. Após 60 dias, os ápices caulinares das brotações alongadas foram microenxertados em porta-enxertos de laranja 'Pêra' cultivados *in vitro*.

Com o objetivo de avaliar diferentes fatores que influenciam a eficiência de transformação genética, diferentes tratamentos foram desenvolvidos: a) tempo de

inoculação com a bactéria de 5, 10, 15 e 20 minutos; b) o período de co-cultivo 2 e 3 dias; c) presença de auxina (2,4-D) no meio de pré-cultivo.

O teste histoquímico de GUS foi efetuado nas plantas descendentes para a confirmação dos eventos de transformação genética. Seções transversais (1-2 mm), provenientes da base das brotações formadas, foram transferidas para placa de ELISA contendo 30  $\mu$ L de solução X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- glucuronídeo) e incubadas por 4-6 horas a 37 °C, em ausência de luz, de forma a permitir análise histoloquímica da expressão do gene *gus* (Brasileiro & Dusi, 1999).

### **3.4- Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado para a indução de brotações adventícias foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo quatorze segmentos de epicótilo. As variáveis analisadas foram: porcentual de explantes com brotações e número de brotações por explantes. Os dados de todos esses experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida análise de regressão, efetuado pelo Programa Genes (Cruz, 2001), sendo o nível de significância utilizado de 5% de probabilidade.

Para os experimentos de transformação genética os explantes foram distribuídos em placas de Petri contendo quatorze explantes. Cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes. Para a avaliação da eficiência de transformação, brotações isoladas a partir de um único explante foram consideradas como sendo resultantes de eventos de transformação independentes. A eficiência de transformação foi determinada pela relação entre número de brotações transformadas GUS<sup>+</sup> e número total de explantes inoculados em meio de cultura. Os explantes contaminados não foram avaliados.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Efeito do BAP na organogênese *in vitro* de laranja 'Pêra'

A indução de gemas adventícias ocorreu com eficiência nos meios com ausência de BAP ou com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  desta citocinina, proporcionando o percentual de 95 e 87,5 % de explantes responsivos, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 1 ). A concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  também proporcionou um bom percentual (60%) de indução de gemas, apesar de diferir estatisticamente dos melhores tratamentos. Observa-se na Figura 1 um decréscimo acentuado no percentual de explantes com brotações, conforme aumentava a concentração de BAP. Concentrações superiores a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  exerceram efeito antagônico sobre o percentual de explantes com brotações. Provavelmente, estes níveis exógenos de BAP, interagindo com níveis endógenos de citocininas, tenham ocasionado efeito fitotóxico, inibindo as brotações, visto que muitas gemas não se desenvolveram, levando a uma diminuição da freqüência de formação de brotos. Isto também foi verificado por Sim et al. (1989), Goh et al. (1995), Maggon & Sing (1995), Pérez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997), Ghorbel et al. (1998) e Moreira-Dias et al. (2000).

Essas altas concentrações de BAP produziram forte calejamento nas extremidades seccionadas. A partir de células desse calo, desenvolveram-se gemas adventícias, originando-se brotações. Portanto, as brotações são típicas de uma organogênese do tipo indireta (Figura 1a). O mesmo não pode-se observar nas concentrações inferiores ou igual a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  onde ocorreu formação

de gemas e brotações de forma direta (Figura 2b). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Sim et al. (1989), Goh et al. (1995), Maggon & Sing (1995) e Costa et al. (2004).

**Tabela 1.** Percentual de explantes responsivos e número médio de brotações por explante de laranja 'Pêra' em função da concentração de BAP.

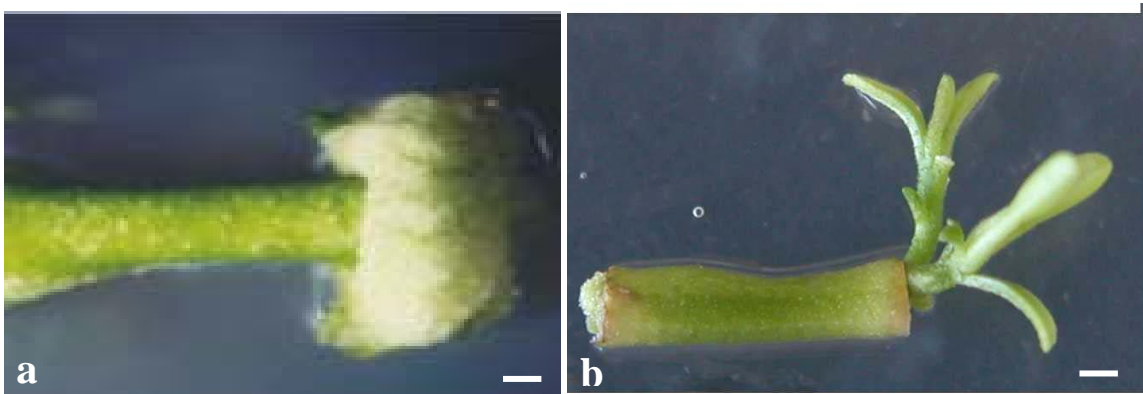
<b>BAP (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Explantes com gemas (%)</b>	<b>Brotações por explante (n°)</b>
0,0	95,00a	1,13ab
1,0	87,50a	1,66a
2,0	60,00b	1,70a
3,0	27,50c	1,15ab
4,0	10,00c	0,83b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente (Tukey 0,05).

Com relação ao número de brotações por explante, a utilização de 1 e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou a melhor resposta com média de 1,66 e 1,70 brotações por explante responsivo, respectivamente, diferindo significativamente de todas as outras concentrações (Tabela 1). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Pasqual & Ando (1989) e Moura et al. (2001), demonstrando em seus experimentos o decréscimo do número de brotações/explante em meios contendo altas concentrações de BAP, sendo 1 mg L<sup>-1</sup> a concentração ótima de BAP.

Esses experimentos demonstraram a importância e a eficiência dessa citocinina na organogênese *in vitro*, tanto na indução de gemas adventícias, quanto no número de brotações por explante. De todas as citocininas utilizadas

para a indução de brotações, a citocinina BAP tem mostrado melhores resultados em organogênese direta e indireta em espécies cítricas, e vem sendo utilizada em concentrações variando entre 0,5 – 1,0 mg L<sup>-1</sup> para as variedades de laranja doce (Moura et al., 2001; Almeida et al., 2002; Costa et al., 2004), 2,5 mg L<sup>-1</sup> para limão 'Cravo' (Moura et al., 2001) e de 2,0 mg L<sup>-1</sup> em *Poncirus trifoliata* (Pasqual & Ando, 1989).



**Figura 1-** Padrões de organogênese em segmentos de epicótilos de laranja 'Pêra': a) organogênese indireta em explantes cultivados por 60 dias em meio MT contendo 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP; b) organogênese direta em explantes cultivados por 60 dias em meio MT contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP. [Barras = 10 mm]

#### **4.2- Análise dos fatores que afetam a eficiência de transformação em laranja 'Pêra'**

O sucesso da obtenção de plantas geneticamente modificadas depende não só de um eficiente protocolo de formação de plantas, mas também de uma metodologia adequada de transformação, específica para a variedade testada. Vários trabalhos de transformação de *Citrus* relatam uma baixa eficiência de transformação, sendo as laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) citadas como as mais recalcitrantes ao processo de transformação genética (Moore et al., 1992). Para isso, vários fatores devem ser testados, visando uma bem sucedida transferência do DNA de interesse para a planta alvo.

##### ***Período de co-cultivo***

O período de co-cultivo tem sido considerado um importante fator na eficiência de transformação genética mediada por *Agrobacterium*. Neste trabalho, foram testados os tempos de 2 e 3 dias de co-cultivo. Somente o tratamento com 2 dias de co-cultivo formaram brotações GUS<sup>+</sup> (Tabela 2). Não foi realizado estudo comparativo com tempo de co-cultivo de 1 dia nem superiores a 3 dias, visto que períodos de 2 e 3 dias são rotineiramente utilizados em protocolos de transformação em citros. Longos períodos de co-cultivos freqüentemente têm resultado em uma proliferação excessiva da *Agrobacterium* (Moore et al., 1992; Peña et al., 1995a; 1995b; 1997; Cervera et al., 1998b; Yang et al., 2000). Cervera et al. (1998a), trabalhando com citrange 'Carrizo', obtiveram o maior número de brotações transformadas no período de 5 dias de co-cultivo, mas esse longo período resultou em um abundante proliferação da bactéria e subsequente redução da freqüência de formação de brotações transformadas. Os mesmos autores observaram uma redução acentuada na formação de brotações, quando os explantes co-cultivados por 1 dia eram transferidos para o meio seletivo. Todavia, períodos prolongados de co-cultivo foram utilizados com sucesso para

algumas plantas (Dong et al., 1991; Mourgues et al., 1996). Costa et al. (2002) também obtiveram resultados semelhantes com pomelo 'Duncan', utilizando 2 dias de co-cultivo.

### ***Período de incubação com Agrobacterium***

Outro fator importante na transformação genética via *Agrobacterium* é o tempo de imersão do explante na solução contendo esta bactéria. No presente trabalho, foram avaliados os tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos de imersão. Somente nos tempos de 5 e 20 minutos foram obtidas brotações transgênicas. O tempo de 5 minutos foi o mais eficiente, originando duas brotações GUS<sup>+</sup> (Tabela 2). Nos tempos superiores a 5 minutos de inoculação observou-se uma proliferação excessiva de bactéria, sugerindo que o antibiótico utilizado, Timentin<sup>®</sup>, possivelmente não tenha sido hábil em reter o crescimento bacteriano, mesmo quando utilizado em alta concentração (500 mg L<sup>-1</sup>). Esse crescimento exagerado da bactéria parece ter provocado redução acentuada na diferenciação de gemas. Muitas das que se formaram não alongaram, reduzindo conseqüentemente o número de brotações, o que afetou consideravelmente a freqüência de transformação. Porém, é importante ressaltar a eficiência do tempo de 20 minutos de inoculação, uma vez que mesmo com os problemas ocorridos, com a proliferação excessiva da bactéria, no decorrer dos experimentos, observou-se a formação de uma brotação GUS<sup>+</sup> (Tabela 2). Os dados obtidos neste experimento contradizem os resultados obtidos nos trabalhos de transformação envolvendo plantas cítricas, onde verifica-se a utilização de 15 a 30 minutos como tempo de inoculação (Kaneyoshi et al., 1994; Peña et al., 1997; Bond and Roose, 1998; Cervera et al., 1998a; 1998b; Luth & Moore, 1999; Ghorbel et al., 2000; Yang et al., 2000; Costa et al., 2002). Somente Costa et al. (2002) compararam diferentes tempos de inoculação, obtendo o maior número de brotações transformadas no tempo de 20 minutos. Todavia, Bond & Roose (1998) observaram que tempos superiores a 10 minutos diminuía a eficiência de

transformação em epicótilos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), devido ao grande número de plantas escape.

### ***Presença de auxina no meio de co-cultivo***

Os resultados obtidos neste trabalho não mostraram aumento na eficiência de transformação no tratamento utilizando 0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, portanto a concentração endógena desse regulador a indução de células competentes à transformação. Com a adição de 2,4-D, mesmo em baixa concentração, pode-se observar a formação de calos nas extremidade seccionadas de alguns explantes, e uma posterior formação de gemas adventícias na superfície dos referidos calos (organogênese indireta). Algumas gemas não alongaram com o decorrer do tempo. Neste tratamento, portanto, pode-se observar tanto organogênese direta quanto indireta. No tratamento, cujo meio de co-cultivo não continha auxina, foram obtidas 3 brotações GUS<sup>+</sup> (Tabela 2). Todavia, Costa et al. (2002) observaram incremento na frequência de transformação em grapefruit 'Duncan', apenas quando foi utilizado 0,2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D no meio de co-cultivo. Outros trabalhos foram realizados, obtendo sucesso em sistemas de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em citros (Peña et al., 1997; Cervera et al., 1998; Ghorbel et al., 1999; Domínguez et al., 2000). Cervera et al. (1998) mencionaram a importância das auxinas na indução de células competentes para transformação em citrange 'Carrizo'. Yu et al. (2002) obtiveram aumento na frequência de transformantes em segmentos de epicótilo de laranja doce e citrange quando pré-tratados com 2,4-D por 3 horas, antes da imersão na bactéria. Todavia, o pré-tratamento "overnight" diminuiu a frequência de transformação. Esse aumento na frequência de transformação, atribuído ao pré tratamento por 3 horas, foi proporcionado pelo aumento de brotações GUS<sup>+</sup> e não ao incremento na frequência de organogênese.

**Tabela 2.** Efeito do tempo de co-cultivo, tempo de imersão em *Agrobacterium* e meio de co-cultivo sobre a eficiência de transformação em laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

Fator avaliado	Tratamento	Nº expl. com gemas/ total de expl. (%)	GUS <sup>+</sup> / brotos avaliados (%)
Tempo de co-cultivo <sup>a</sup>	2 dias	06/87(6,89)	01/ 03(1,15)
	3 dias	03/78(3,85)	00/01(0,0)
Tempo de imersão em <i>Agrobacterium</i> <sup>b</sup>	5 minutos	04/96(4,16)	02/04(2,08)
	10 minutos	02/76(2,63)	00/01(0,0)
	15 minutos	03/81(3,70)	00/03(0,00)
	20 minutos	02/89(2,24)	1/2(1,12)
Meio de co-cultivo <sup>c</sup>	0,2 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D	13/97(13,14)	00/05(0,0)
	Sem 2,4-D	08/99(8,08)	03/06(3,03)

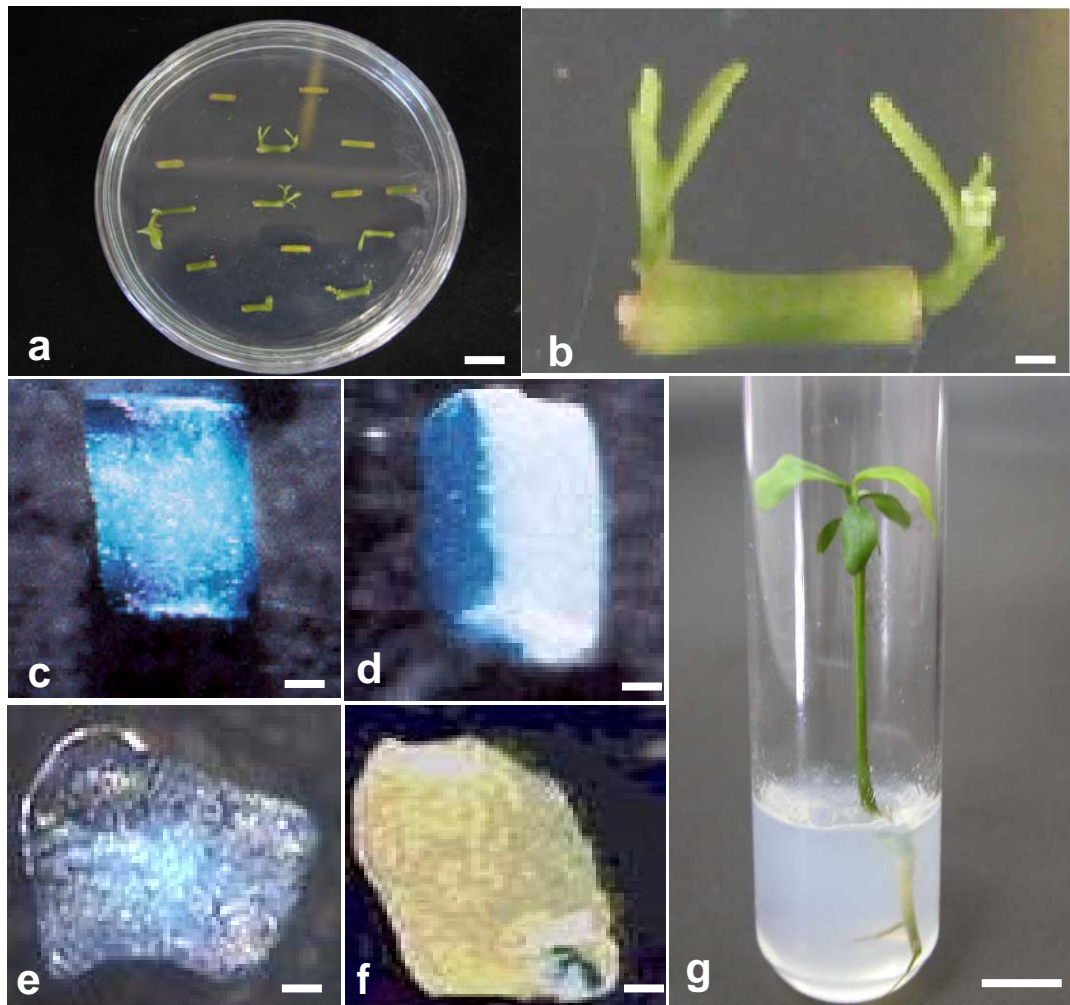
a. Tempo de imersão = 15 minutos, meio de co-cultivo = sem 2,4-D e temperatura = 27 °C

b. Período de co-cultivo = 2 dias, meio de co-cultivo = sem 2,4-D e temperatura = 27 °C

c. Tempo de inoculação = 5 minutos, período de co-cultivo = 2 dias e temperatura = 27 °C

O teste histoquímico de GUS foi efetuado nas plantas obtidas para a confirmação dos eventos de transformação genética. Este teste é baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- glucuronídeo cicloexil amina (X-gluc) pela enzima  $\beta$ -glucoronidase. O produto dessa reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel de cor azul (Brasileiro & Dusi, 1999). Algumas reações positivas do teste histoquímico de GUS podem ser observadas nas figuras 5c-f. Neste trabalho, uma planta quimérica foi formada (Figura 2f ). A obtenção de plantas quiméricas pode estar relacionada ao fato das gemas possuírem origem multicelular (áreas meristemáticas na zona cambial) e, provavelmente, algumas destas células não receberam a transferência gênica, resultando em uma planta quimérica. Este tipo

de evento também foi obtido nos trabalhos de Gutiérrez-E. et al. (1997), Peña et al. (1997) e Cervera et al. (1998b).



**Figura 2-** Transformação genética a partir de segmentos de epicótilo de laranja 'Pêra'. a) explantes após co-cultivo com *Agrobacterium*; b) brotações formadas em meio seletivo contendo  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ ; c-e) porções dos segmentos de epicótilo evidenciando expressão do gene *gus* após teste histoquímico; f) porções de segmentos de epicótilo evidenciando provável quimera após teste histoquímico GUS; g) brotação  $\text{GUS}^+$  microenxertada em porta- enxerto de laranja 'Pêra'.

A baixa eficiência em transformação de *Citrus* está aliada ao desenvolvimento de gemas não transformadas e à dificuldade de enraizamento de brotações transgênicas (Peña et al., 1995a; Gutiérrez-E. et al., 1997; Yang et al., 2000). O problema de enraizamento das brotações formadas foi solucionado realizando-se a microenxertia de ápices extraídos destas brotações em porta-enxertos juvenis provenientes da germinação *in vitro* de sementes de laranjeira 'Pêra' (Figura 2g).

Neste trabalho, a eficiência de transformação se mostrou baixa ocasionada, principalmente, pelo super crescimento da *Agrobacterium*, diminuindo muito a frequência de organogênese. Como a frequência de transformação é definida pela relação entre o número de gemas GUS<sup>+</sup> produzidas e o número de explantes inoculados, esses baixos valores do porcentual de brotações afetaram consideravelmente a frequência de transformação.

Vários trabalhos descritos na literatura relatam uma baixa frequência de plantas transformadas provenientes de sistemas baseados em *Agrobacterium tumefaciens*. A eficiência de transformação obtida em segmentos internodais de citrange 'Carrizo' foi de 2% (Moore et al., 1992), em laranja doce 7,9% (Peña et al., 1995a) e em lima mexicana de 6,7% (Peña et al., 1997).

Portanto, não se pode descartar a importância dessa metodologia otimizada neste trabalho, pois nenhum outro trabalho descrito na literatura relatou a transformação com esse cultivar. A baixa frequência de transformação obtida (3,03%) está em concordância com as baixas frequências relatadas na literatura.

## 5- CONCLUSÕES

A concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP utilizada na fase de indução de brotações foi a mais eficiente tanto na indução de gemas adventícias quanto no número de brotações formadas por explante.

O protocolo otimizado para a transformação genética de laranja 'Pêra' foi a imersão do explante em solução contendo *Agrobacterium* por 5 minutos, com o período de co-cultivo de 2 dias em meio de cultura contendo  $100 \text{ }\mu\text{M}$  de acetoseringona e transferidos, posteriormente, para o meio de seleção, constituído por  $75 \text{ mg L}^{-1}$  de canamicina,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de Timetin<sup>®</sup>, e ainda,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v.59, p.35-40, 2002.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, v.164, p.203-211, 2003.
- AMARO, A.A.; ARAÚJO, C.M.; PORTO, M.; DORNELLES, C.M.M.; CUNHA SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, S. Panorama da citricultura brasileira. In: RODRIGUEZ, Z.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. (Ed.). **Citricultura brasileira**, v.1, São Paulo: Fundação Cargill, p.22-59, 1991.
- ARAGÃO, F.J.L.; SÁ, M.F.G.; ALMEIDA, E.R.; GANDER, E.S.; RECH, E.L. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Molecular Biology**, v.20, p.357-359, 1992.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. *In vitro* plantlet formation from citrus species and hybrids. **Scientia Horticulturae**, v.17, p.333-341, 1982.

- BERLAMINO, M.M.; MII, M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. **Plant Cell Reports**, v.19, p.435-442, 2000.
- BHAT, S.R.; CHITRALEKHA, P.; CHANDEL, K.P.S. Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.19-25, 1992.
- BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.297-326, 1997.
- BOND, J.E.; ROOSE, M.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 3-4, p. 229-234, 1998.
- BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response in vitro of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, v.86, p.159-166, 2000.
- BORÉM, A. **Escape gênico e transgênico**. Viçosa: Editora UFV, 206p, 2001.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.(Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v.1, Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, v.2, p.679-735, 1999.
- CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F.X.; FERRIERE, N.M.; DAMBIER, D.; DALNIC, R.; TEISSON, C. Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.464-470, 1995.

- CAMERON, J.W.; BURNETT, R.H. Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid *Citrus* hybrids. **HortScience**, v.13, p.167-169, 1968.
- CERVERA, M.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, v.18, p.271-278, 1998a.
- CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, v.7, p.51-59, 1998b.
- CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A.; BISOFFI, S.; CELLA, R. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* transformation in several black poplar clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.43, p.215-222, 1995.
- COSTA, M.G.C.; OTONI, W.C.; MOORE, G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and the production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 365-373, 2002.
- COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G.; MOSQUIM, P.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, v.100, p.63-74, 2004.
- DALE, P.J.R. Regulation and field trailing of transgenic crops. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.398-403, 1995.
- DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and implications for plant breeding. **Euphytica**, v.71, p.1-14, 1993.

- DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, v.49, p.55-62, 1992.
- DILLEN, W.; De CLERCQ, J.; KAPILA, J.; ZAMBRE, M.; VAN MONTAGU, M.; ANGENON, G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. **The Plant Journal**, v.12, p.1459-1463, 1997.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. **Plant Cell Reports**, v.19, p.427-433, 2000.
- DONG, J.Z.; YANG, M.Z.; JIA, S.R., CHUA, N.H. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. **Biotechnology**, v.9, p.858-863, 1991.
- DURÁN-VILA, N.; GOGOCENA, Y.; ORTEGA, V.; ORTIZ, J.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck): Effect of temperature and photosynthetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.11-18, 1992.
- EDRISS, M.H.; BURGER, D.W. In vitro propagation of 'Troyer' citrange from epicotyl segments. **Scientia Horticulturae**, v.23, p.159-162, 1984.
- FAO. FAOSTAT database results. <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>, 2003.
- FILLATI, J.J.; KISER, J.; ROSE, R.; COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Biotechnology**, v.5, p.726-730, 1987.

FULLNER, K.J.; NESTER, E.W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.1498-1504, 1996.

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**, v.84, p.715-723, 1999.

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

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

GOODWUIN, I.; TODD, G.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY, H.J. The effects of acetosyringone and pH in *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. **Plant Cell Reports**, v.9, p.671-675, 1991.

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

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**, v.16, p.745-753, 1997.

- HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.  
Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, v.303, p.209-213, 1983.
- 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**, v.40, p.199-207, 1990.
- JACQ, B.; LESOBRE, O.; SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. **Plant Cell Reports**, v.12, p.621-624, 1993.
- KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A. simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Plant Cell Reports**, v.13, p.541-545, 1994.
- KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of Rutaceae. **HortScience**, v.26, p.207-210, 1991.
- KOLLER, O.C. **Citricultura**: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Iligel, cap.5, p.49-62, 1994.
- KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Scientia Horticulturae**, v.47, p.27-33, 1991.
- LUTH, D.; MOORE, G.A. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.57, p.219-222, 1999.

- MAGGON, R.; SINGH, B.D. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, v.63, p.123-128, 1995.
- MATHEWS, H.; BHARATHAN, N.; LITZ, R.E.; NARAYANAN, K.R.; RAO, P.S.; BATHIA, C.R. The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Antropa belladonna* L. by acetosyringone. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.404-409, 1990.
- MENDES, B.M.J.; MOURÃO-FILHO, A.A.; FARIAS, P.C.M.; BENEDITO, V.A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.37, p.490-495, 2001.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CAMARGO, L.E.A.; MENDES, B.M.J. Caipira sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.661-665, 2000.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO A.S. (Eds.) **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, p.116-152, 1991.
- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and their response to light. **Annals of Botany**, v.85, p.103-110, 2000.

- MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, .A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.
- MOORE, G.A. In vitro propagation of *Citrus* rootstocks. **HortScience**, v.21, p.300-301, 1986.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.11, p.238-242, 1992.
- MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO-FILHO, F.A.; Organogênese in vitro de *Citrus* em função da concentração de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.240-245, 2001.
- MOURGUES, F.; CHEVREAU, E.; LAMBERT, C.; DE BONDT, A. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports**, v.16, p.245-249, 1996.
- MUKHOPADHYAY, A.; ARUMUGA, N.; NANDAKUMAR, P.B.A.; PRADHAN, A.K.; GUPTA, V.; PENTAL, D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. **Plant Cell Reports**, v.11, p.506-513, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

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

OLIVEIRA, R.P.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. Obtenção e cultura de calos nucleares de limão Cravo, tangerina Cleópatra e *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, p.115-119, 1994.

PASQUAL, M.; ANDO, A.; Micropagação de 'Trifoliata' através de cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p.217-220, 1989.

PAWLICKI, N.; SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.31, p.129-139, 1992.

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v.104, p.183-191, 1995b.

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

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, M. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA 1 genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, v.19, p.263-267, 2001.

- PERANI, A.M.S.; RADKE, S.; WILK-DOUGLAS, M.; BOSSERT, M. Gene transfer methods for crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, v.68, p.125-134, 1990.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 8, p. 591-596, 1998.
- PRATES, H.S.; PELEGRINI, J.R. **Controle sanitário e cultural- legislação e relação de defensivos para citros**. Campinas: Fundação Cargill, 40p, 1995.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 359p, 1990.
- SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v.8, p.1699-1710, 1996.
- SIM, G.E.; GOH, C.J.; LOH, C.S. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco: multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. **Plant Science**, v.59, p.203-210, 1989.
- SIMÃO, S. Citrus. In: SIMÃO, S. (Ed.) **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, p.419-472, 1998.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plants cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, v.318, p.624-629, 1985.

- TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v.1, p.178-184, 1996.
- VAN SLUYS, M.A. *Agrobacterium*: um vetor natural para transformação em plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; CNPH, p.737-759, 1999.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, v.69, p.199-206, 1990.
- VU, J.C.V.; NIEDZ, R.P.; YELENOSKY, G. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of 'Hamlin' sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.75-80, 1993.
- YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, v.19, p.1203-1211, 2000.
- YAO, J.L.; WU, J.H.; GLEAVE, A.P.; MORRIS, B.A.M. Transformation of *Citrus* embryonic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, v.113, p.175-183, 1996.
- YU, C.; HUANG, S.; CHEN, C.; DENG, Z.; LING, P.; GMITTER-JUNIOR, F.G. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.147-155, 2002.

WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **Transgenics**, v.13, p.324-331, 1995.

WANG, K.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSK, P. Right 25 bp terminus of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. **Cell**, v.38, p.455-462, 1984.

WEBBER, J.J. Variation in Citrus seedlings and their relation to rootstock selection. **Hilgardia**, v.7, p.1-79, 1932.

ZHANG, F.L.; TAKAHATA, Y.; WATANABE, M.; XU, J.B. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*). **Plant Cell Reports**, v.19, p.569-575, 2000.