

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

**Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e transformação genética de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) e laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene da replicase do *Marafivirus***

**Rosely Pereira da Silva**

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

**Piracicaba  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Rosely Pereira da Silva**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e transformação genética de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) e laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene da replicase do *Marafivirus***

Orientador:  
Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO

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

**Piracicaba**  
**2008**

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

Silva, Rosely Pereira da

Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e transformação genética de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L.Osbeck) e laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene da replicase do Marafivirus / Rosely Pereira da Silva. - - Piracicaba, 2008.

102 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.  
Bibliografia.

1. Laranja 2. Limão 3. Micropropagação vegetal 4. Morte súbita 5. Organogênese  
6. Plantas transgênicas 7. Vírus de planta I. Título

CDD 634.31  
S586o

*Direi do Senhor: “Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza,  
e nele confiarei”.*

**(Salmo 91,2)**

### **Dedico**

Com muito amor:

Aos meus pais

**José Carlos e Maria da Conceição**

E aos meus irmãos

**Genilda, Paulo, Adriana e Samuel**

**Ofereço**

Ao meu noivo **Luiz Carlos**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me possibilitar mais esta conquista, por me iluminar sempre e ouvir minhas orações e os anseios do meu coração.

Aos meus amados pais por serem fontes inesgotáveis de muito amor, carinho e dedicação. Obrigada pelo apoio, incentivo e confiança em mim depositada.

Aos meus queridos irmãos e familiares pelas palavras de conforto, pelo carinho, amizade e apoio constantes, pelas orações e por torcerem sempre por mim.

Ao meu noivo Luiz Carlos Cruz Brito, pelo apoio incondicional às minhas decisões, pelo seu amor, carinho e compreensão.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Produção Vegetal e Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização deste curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela orientação e atenção durante a realização deste trabalho. Também pela oportunidade de aprendizado durante o Estágio do PAE junto à disciplina Fruticultura Tropical e Subtropical.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes, pela atenção e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo pela valiosa contribuição e sugestões durante a execução deste trabalho.

Ao querido amigo Dr. Evandro Henrique Schinor pela atenção, amizade e ensinamentos essenciais principalmente na fase inicial de desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pelos ensinamentos nas disciplinas cursadas.

À Profa. Dra. Beatriz Apezato-da-Glória e ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida pela amizade, apoio, atenção e oportunidade de aprendizado durante o Estágio do PAE junto à disciplina Morfologia Vegetal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e recursos financeiros que auxiliaram no desenvolvimento do trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da ESALQ: Alexandra Pavan, Amancio Souza, Dayse Carvalho, Eduardo Girardi, Evandro Schinor, Fernando Azevedo, Juliana Bonin, Leandro Branco, Lívia Castro, Luciana Leite, Luis Gustavo de Paoli, Monita Fiori, Natália Espósito, Pamela Fávero, Suane Cardoso e Waner Junior, pela amizade, constante apoio, colaboração, aprendizado e agradável convívio durante o curso.

Ao amigo Amancio José de Souza, também pela atenção, disponibilidade em ajudar e valiosa contribuição nos ajustes das análises moleculares.

Às amigas e colegas Alessandra Hara, Alice, Ana Paula Pinto, Andréa Koehler, Eveline Tavano, Fabiana Muniz, Jannayna Mendes, Liliane Stipp, Luciana Castelotti, Renata Cruz e Vânia Nakano, pela colaboração sempre que necessária e agradável convívio no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA.

Aos casais de amigos queridos Edmilson Silva e Jurema Queiroz, Alessandro Brito e Suane Cardoso pela calorosa acolhida em Piracicaba, pelas palavras de conforto, amizade, carinho, apoio e atenção constantes, me ajudando a superar a saudade durante o tempo que estive fora do convívio dos meus familiares. Por tudo que compartilhamos juntos, minha eterna gratidão.

À querida amiga Elaine Costa Cerqueira Pereira pelo inestimável companheirismo, amizade, carinho, constante atenção e paciência durante todo o tempo em que estivemos juntas.

À amiga Eloise Melo Viana, nossa querida guria, pela disposição em me ouvir, pelas palavras de conforto, carinho e ensinamentos nesses anos de convívio e por ter compartilhado comigo, Elaine e Suane momentos maravilhosos e inesquecíveis de muitas conversas e gargalhadas, firmando uma linda e fraterna amizade.

Aos amigos, Bruno Almeida, Carlos Batista, Fernando, Jaedson Mota, Jovan, Laércio Carvalho, Marcelo Miranda, Melissa Oda, Onildo de Jesus, Tales Miller e Taís Abreu entre outros já citados, pelas reuniões maravilhosas, amizade e agradável convívio nesta cidade.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia e outros programas pelo convívio e atenção durante as disciplinas.

Aos saudosos amigos, funcionários do Depto. de Produção Vegetal Aparecido Serrano, David Ulrich, Eder Cintra e Sr. José Volpato, pela amizade, atenção e colaboração durante a execução deste trabalho.

À técnica do Laboratório Biotecnologia Vegetal do CENA, Renata Beatriz Cruz, pela amizade, atenção e constante ajuda cedida.

Às secretárias do Depto. de Produção Vegetal, Bete e Célia, e a secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane Lopes, pela atenção, apoio e convívio.

Aos funcionários Sra. Helena, Ilze, Edleuza e Sr. Chico, pelo apoio, atenção e colaboração.

Aos professores da UFRB, em especial Weliton Antonio Bastos de Almeida, Ana Cristina Fermino Soares, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa e Clóvis Pereira Peixoto pelas oportunidades de aprendizado, amizade, confiança, apoio e incentivo.

Aos amigos de sempre, embora distantes, sempre atenciosos com palavras de conforto, incentivo e carinho que me trouxeram muita alegria: Bruno Dias, Darcilúcia Carmo, Elma Souza, Êmile Susy, Euzi Inácio, Fabíola Rebouças, Genilda Lima, Jean Capinan, Mônica Leone, Regilene Souza, Renata Santana, Rogeson Carvalho, Rosimeire de Jesus, Rossana Cerqueira, Tânia Fonseca e Tuna Velame.

À Silvia Zinsly, bibliotecária da Divisão de Biblioteca e Documentação da ESALQ/USP, pela gentileza em fazer a correção das referências.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho.

*Como são grandes tuas obras Senhor,  
e teus projetos, como são profundos!*  
(Salmo 92, 6)

**Muito Obrigada!**



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO .....   | 9  |
| ABSTRACT .....   | 10 |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 11 |
| LISTA DE TABELAS .....   | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....  | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 18 |
| 2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Citrus</i> e da citricultura .....  | 18 |
| 2.2 Tristeza dos citros .....  | 21 |
| 2.3 Morte súbita dos citros .....  | 24 |
| 2.4 Organogênese <i>in vitro</i> de citros .....   | 27 |
| 2.5 Transformação genética em citros .....   | 34 |
| 2.6 Transformação genética para resistência à doenças .....  | 38 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 42 |
| 3.1 Organogênese <i>in vitro</i> de laranja azeda .....  | 42 |
| 3.1.1 Indução e regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função de fitorreguladores .....                  | 42 |
| 3.1.2 Indução e regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo e segmentos internodais de laranja azeda em função de BAP e CIN ..... | 43 |
| 3.1.3 Indução e regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função da composição do meio de cultura .....     | 44 |
| 3.1.4 Indução e regeneração de gemas adventícias, e obtenção de plantas <i>in vitro</i> a partir de diferentes explantes de laranja azeda .....                  | 45 |
| 3.2 Transformação genética .....   | 46 |
| 3.2.1 Material vegetal .....   | 46 |
| 3.2.2 Gene e vetor de expressão .....  | 47 |
| 3.2.3 Manutenção do isolado e cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 47 |
| 3.2.4 Inoculação e co-cultivo com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....   | 48 |
| 3.2.5 Seleção e regeneração de brotações adventícias .....   | 48 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.6 Microenxertia e aclimatização das plantas .....  | 48 |
| 3.2.7 Análise das plantas regeneradas .....  | 49 |
| 3.2.7.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....   | 49 |
| 3.2.7.2 ‘Southern blot’ .....  | 50 |
| 3.2.7.3 RT-PCR .....   | 50 |
| 3.2.7.4 ‘Northern blot’ .....  | 51 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 53 |
| 4.1 Organogênese <i>in vitro</i> de laranja azeda .....  | 53 |
| 4.1.1 Indução e regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função de fitorreguladores .....                  | 53 |
| 4.1.2 Indução e regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo e segmentos internodais de laranja azeda em função de BAP e CIN ..... | 59 |
| 4.1.3 Indução e regeneração <i>in vitro</i> de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função do tipo de meio de cultura .....           | 63 |
| 4.1.4 Indução e regeneração de gemas adventícias, e obtenção de plantas <i>in vitro</i> a partir de diferentes explantes de laranja azeda.....                   | 64 |
| 4.2 Transformação genética com o gene da replicase do <i>Marafivirus</i> .....   | 70 |
| 5 CONCLUSÕES .....   | 83 |
| REFERÊNCIAS .....  | 84 |
| ANEXO .....  | 98 |

## RESUMO

### **Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e transformação genética de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) e laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene da replicase do *Marafivirus***

Embora desfrute de inegável importância econômica, os citros estão sujeitos a muitos problemas sanitários sendo alguns, limitantes para o cultivo como é o caso das doenças causadas por vírus. A morte súbita dos citros é uma doença relacionada à combinação copa/ porta-enxerto e manifesta sintomas na região da enxertia sobre porta-enxertos intolerantes. Embora sua etiologia não tenha sido determinada, há indicações que a causa da MSC esteja relacionada a uma estirpe do vírus da tristeza dos citros (CTV), a um vírus do gênero *Marafivirus*, ou a uma associação entre eles. Uma vez que a transformação genética têm sido considerada como uma ferramenta auxiliar a programas de melhoramento de citros, o objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ contendo o gene da replicase do *Marafivirus* e estudar a regeneração e obtenção de plantas *in vitro* de laranja azeda, via organogênese, visando futuros trabalhos de transformação genética. Experimentos para indução da organogênese *in vitro* foram realizados avaliando-se citocininas (BAP, TDZ e CIN), em diferentes concentrações, isoladamente ou em combinação com ANA, condições de luminosidade (fotoperíodo de 16 h e escuro por 30 dias), meios de cultivo e explantes (provenientes de plantas germinadas *in vitro* e de plantas mantidas em estufa). Além disso, avaliou-se o enraizamento dos brotos regenerados. Para a transformação genética, explantes de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ foram inoculados e co-cultivados com a estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o gene da replicase do *Marafivirus* (em seqüência sense e antisense interligadas por um íntron). A construção gênica foi elaborada a partir do plasmídeo pCAMBIA 2201, dirigidas pelo promotor 35S e terminador NOS, contendo ainda o gene de seleção *nptII*. A transformação foi confirmada por análises de PCR e ‘Southern blot’. A transcrição do gene foi avaliada por RT-PCR e ‘northern blot’. A adição de BAP, combinada ou não com ANA, e em combinações com CIN ao meio de cultivo, assegurou maior formação de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda. Entretanto, TDZ não se mostrou favorável a essa resposta, que também é afetada pela ausência de luz. Os explantes provenientes do cultivo *in vitro* mostraram-se mais favoráveis à resposta organogênica. O enraizamento das brotações de laranja azeda regeneradas foi obtido no meio MT com metade da concentração de sais, sem ou com auxinas. Foi possível obter plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e de laranja ‘Valência’ contendo o gene da replicase do *Marafivirus* utilizando-se segmentos internodais como explantes. A análise de ‘Southern blot’ confirmou a integração de um a quatro eventos de inserção do transgene no genoma das plantas. A transcrição do gene da replicase do *Marafivirus* e do gene *nptII* foi observada por RT-PCR.

Palavras-chave: *Agrobacterium tumefaciens*; Citros; Gemas adventícias; Interferência de RNA; Micropropagação; Morte súbita dos citros

## ABSTRACT

*In vitro* organogenesis in sour orange (*Citrus aurantium* L.) and genetic transformation of Rangpur lime (*Citrus limonia* L. Osbeck) and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with the *Marafivirus* replicase gene

In spite of great economic importance, the citrus industry is affected by many phytopathological problems some, limiting its cultivation such as virus-caused diseases. The citrus sudden death disease is related to scion/rootstock combinations and manifests symptoms in the grafting area of intolerant rootstocks. Although its etiology has not been determined, there are indications that the cause of MSC might be related to a strain of the *Citrus tristeza virus* (CTV), to a virus of the *Marafivirus* group, or to an association of both viruses. Since the genetic transformation has been considered as an auxiliary tool to programs of citrus improvement, the objectives of this work were to obtain transgenic plants of the Rangpur lime and Valencia sweet orange containing the *Marafivirus* replicase gene and study the *in vitro* regeneration of sour orange plants through organogenesis, aiming for future work in genetic transformation. Experiments for induction of *in vitro* organogenesis were carried out evaluating cytokinins (BAP, TDZ and KIN), in different concentrations, separately or in combination with NAA, lighting conditions (photoperiod of 16 hours and darkness for 30 days), cultivation media and explants (coming from *in vitro* germinated plants and from green house cultivated plants). Besides this, rooting of the regenerated shoots was evaluated. For the genetic transformation, Rangpur lime and Valencia sweet orange explants were inoculated and co-cultivated with the EHA-105 *Agrobacterium tumefaciens* strain containing the *Marafivirus* replicase gene (in sense and antisense sequence linked by an intron). The genetic construct used derived from the pCAMBIA 2201 plasmid, driven by the 35S promoter and NOS terminator, containing the selection *nptII* gene. The genetic transformation was confirmed by PCR and Southern blot analysis. The gene transcription was evaluated by RT-PCR and northern blot. The addition of BAP to the culture medium, combined or not with NAA, and in combinations with KIN, assured a greater formation of adventitious buds in sour orange epicotyl segments. However, TDZ was not favorable to this response, that is also affected by the absence of light. Explants coming from *in vitro* cultivation were more favorable to the organogenic response. Rooting of sour orange regenerated shoots was obtained in MT medium with half the salt concentration, with or without auxin. It was possible to obtain transgenic Rangpur lime and Valencia sweet orange plants containing the *Marafivirus* replicase gene using internodal segments as explants. The Southern blot analysis confirmed the integration of one to four copies of the transgene in the plant genome. The transcription of the *Marafivirus* replicase gene and the *nptII* gene was observed by RT-PCR.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; Citrus; Adventitious buds; RNA interference; Micropropagation; Citrus sudden death disease

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |  |    |
|-----------|---|--|----|
| Figura 1  | - | Representação esquemática da seqüência gênica contendo o gene da replicase do <i>Marafivírus</i> em uma construção tipo hairpin .....  | 47 |
| Figura 2  | - | Transformação genética de citros via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 52 |
| Figura 3  | - | Indução e regeneração <i>in vitro</i> de brotações adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda após 60 dias de cultivo .....  | 55 |
| Figura 4  | - | Indução e regeneração <i>in vitro</i> de brotações adventícias em explantes de laranja azeda após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h em meio com BAP ou CIN, combinados com 0,3 mg L <sup>-1</sup> de ANA ..... | 63 |
| Figura 5  | - | Indução de organogênese e obtenção de plantas <i>in vitro</i> de laranja azeda a partir de diferentes explantes .....  | 69 |
| Figura 6  | - | Regeneração <i>in vitro</i> , microenxertia e aclimatização de plantas de limão ‘Cravo’ após transformação genética .....  | 72 |
| Figura 7  | - | Análise da PCR das plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ contendo o gene da replicase do <i>Marafivírus</i> .....  | 73 |
| Figura 8  | - | Análise de ‘Southern blot’ em plantas de limão ‘Cravo’ utilizando sonda do gene da replicase do <i>Marafivírus</i> .....   | 74 |
| Figura 9  | - | Regeneração <i>in vitro</i> de laranja ‘Valência’ após transformação genética .....  | 76 |
| Figura 10 | - | Análises da PCR da planta transgênica de laranja ‘Valência’ .....  | 10 |
| Figura 11 | - | Confirmação da transcrição do transgene em plantas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ .....   | 80 |
| Figura 12 | - | Análise de ‘northern blot’ das plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ .....  | 81 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Explantes responsivos e gemas regeneradas por explante de laranja azeda cultivados em meio MT sem e com fitorregulador, em duas condições de cultivo (fotoperíodo de 16 h e ausência de luz por 30 dias seguidos de fotoperíodo de 16 h), após 60 dias de incubação .....  | 53 |
| Tabela 2 - | Explantes responsivos e gemas regeneradas por explante de laranja azeda cultivados em função da composição do meio de cultivo, avaliados aos 35 (ausência de luz) e 70 dias de cultivo (35 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) .....   | 56 |
| Tabela 3 - | Explantes responsivos, gemas regeneradas e brotações por explante de laranja azeda cultivados em meio MT sem e com fitorregulador (BAP e/ou CIN), após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) .....  | 58 |
| Tabela 4 - | Percentual de explantes responsivos em segmentos de epicótilo (obtidos <i>in vitro</i> ) e segmentos internodais (obtidos de casa de vegetação) de laranja azeda cultivados <i>in vitro</i> em função do tipo de citocinina (BAP ou CIN) em combinação com ANA, após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) .....                      | 60 |
| Tabela 5 - | Número de gemas e/ou brotações por explante responsivo em segmentos de epicótilo (obtido <i>in vitro</i> ) e segmentos internodais (obtidos de casa de vegetação) de laranja azeda regeneradas <i>in vitro</i> , em função do tipo de citocinina (BAP ou CIN) em combinação com ANA, após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) ..... | 61 |
| Tabela 6 - | Explantes responsivos, gemas regeneradas e brotações desenvolvidas por explante (segmento de epicótilo) de laranja azeda cultivado em meio MT, MS e DBA3, após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) .....  | 64 |
| Tabela 7 - | Explantes responsivos e gemas e/ou brotações por explante responsivo de laranja azeda, cultivados em meio MT suplementado com 1,0 mg L <sup>-1</sup> de BAP, avaliados após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) .....   | 65 |
| Tabela 8 - | Enraizamento de brotos de laranja azeda obtidos a partir de diferentes explantes (Epi A, SI <i>in vitro</i> e Epi C) cultivados em meio MT sem auxina ou com a adição de IBA ou ANA, após 60 dias de cultivo sob fotoperíodo de 16 h .....   | 67 |
| Tabela 9 - | Número de explantes que desenvolveram gemas adventícias por total de explantes (segmentos internodais) de limão ‘Cravo’ introduzidos, número de gemas regeneradas por explantes, brotos PCR+ por brotos avaliados, eficiência de transformação e total   |    |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
|             | de plantas aclimatizadas contendo o gene da replicase do <i>Marafivírus</i> .....   | 71 |
| Tabela 10 - | Número de explantes que desenvolveram gemas adventícias por total de explantes de laranja 'Valência' introduzidos, número de gemas regeneradas por explantes, brotos PCR+ por brotos avaliados, eficiência de transformação e total de plantas aclimatizadas contendo o gene da replicase do <i>Marafivírus</i> ..... | 75 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- ANA – Ácido naftalenoacético
- BAP – 6-benzilaminipurina
- CaMV – Vírus do mosaico da couve-flor (*cauliflower mosaic virus*)
- CIN – Cinetina (6-Furfurilaminopurina)
- CTAB – Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide
- CTV – Vírus da tristeza dos citros
- EDTA – Ethylenediaminetetracetic Acid
- GA<sub>3</sub> – Ácido giberélico
- GUS – Enzima  $\beta$ -glucuronidase
- IBA – Ácido indolbutírico
- MSC – Morte súbita dos citros
- NOS – Terminador nopalina sintetase
- nptII* – Gene neomicina fosfotransferase II
- PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
- RT-PCR – Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase
- SDS – Sodium dodecyl sulfate
- TBE – Tampão Tris, ácido bórico, EDTA
- TDZ – Thidiazuron
- Tris – 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
- UFC – Unidades formadoras de colônia
- uidA* – Gene  $\beta$ -glucuronidase
- X-GLUC – 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida
- 2iP – Isopenteniladenina
- 2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético



## 1 INTRODUÇÃO

Considerando a média dos triênios de 1993/95 e 2003/05, a produção mundial de frutas aumentou 26%. Um dos principais fatores para esse desempenho foi o aumento da demanda por alimentos saudáveis. Com isso, a receita mundial com exportações de frutas cresceu 62% no período de 10 anos analisados (VITTI, 2007). A participação do Brasil no mercado externo de frutas tem aumentado consideravelmente, resultado da combinação de avanços tecnológicos do setor produtivo com maior acesso a novos mercados consumidores.

Entre 2000 e 2006, a balança comercial no setor de frutas cresceu significativamente de US\$ 50 milhões para quase US\$ 300 milhões. As frutas cítricas (laranja, lima, limão e tangerina) estão entre as principais categorias responsáveis por esse crescimento, juntamente com a banana, maçã, mamão, manga, melão e uva que, representaram em 2006 cerca de 95% da receita gerada com exportação de frutas no país (VITTI, 2007).

Em 2007, o Brasil produziu aproximadamente 18,3 milhões de toneladas de frutas cítricas, mantendo a posição de maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado de laranja. A principal área produtora é o Estado de São Paulo, produzindo 80,4% do total (IBGE, 2008), e supera a produção da Flórida (EUA), maior concorrente brasileiro no mercado de sucos de laranja, em quantidade de frutas e suco concentrado. O volume produzido pela Flórida na safra de laranja 2007/08 foi estimado em 168 milhões de caixas de 40,8 Kg, número abaixo do esperado pelo setor em consequência de problemas fitossanitários e dos furacões que ocorreram naquela região. No Brasil, a produção dessa safra no Estado de São Paulo foi estimada em 353,1 milhões de caixas de 40,8 Kg (VIANA; BRAGA, 2007). O destino da produção da citricultura paulista é voltado, sobretudo, ao processamento industrial. Deve-se ressaltar que o mercado interno de laranja *in natura* é relevante, mas, a disponibilidade interna para esse segmento está mais atrelada aos excedentes de produção não absorvidos pela indústria do que propriamente a oferta pré-direcionada (CITRICULTURA, 2007).

Cerca de 98% do suco é exportado, principalmente, para os Estados Unidos e União Européia, além do Japão e outros 45 países (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Em 2007, a receita com exportação de suco de laranja cresceu em média 60%. Os preços recebidos por citricultores que destinam sua fruta ao processamento através de contratos

alcançaram valores de até US\$ 7,5/cx de 40,8 Kg nesse ano, um recorde para a década (CITRICULTURA, 2007).

É notável a importância da citricultura para a economia brasileira, seja pela geração de empregos, seja pela movimentação de recursos econômico-financeiros. Em 2006, o Brasil produziu 20,4 milhões de toneladas de frutas cítricas. A segunda maior produção foi da China, 18,4 milhões de toneladas, seguida pela dos Estados Unidos e do México, com 11,5 e 6,6 milhões de toneladas, respectivamente. Esses países representam juntos mais de 50% da produção mundial de citros (FAO, 2008).

No entanto, não é o fato de a cadeia produtiva da citricultura em todo o mundo ser uma das mais dinâmicas e rentáveis atividades do agronegócio que a livra de ser também uma das que mais desafios tem enfrentado para a garantia de manutenção da produtividade. Particularmente, o crescente número de pragas e doenças que afetam os citros nas condições brasileiras, em que velhos e novos problemas surgem e ressurgem com vigor, tem levado à morte de milhões de plantas por ano (MACHADO et al., 2005).

A citricultura nacional tem se mostrado bastante vulnerável aos diversos problemas fitossanitários que têm surgido ao longo da sua história e que são responsáveis por grandes perdas para a cultura. Entre outros fatores, essa vulnerabilidade pode estar associada a pouca diversidade de cultivares copa/ porta-enxerto utilizada. Doenças como a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a morte súbita dos citros (MSC), e o *greening* (ou *huanglongbing*) exigiram e ainda exigem esforços de cooperação mútua em seu combate (TOZATTI, 2006).

A MSC é uma doença de combinação copa/ porta-enxerto que manifesta sintomas na região da enxertia em plantas sobre porta-enxertos intolerantes. Embora sua etiologia ainda não tenha sido determinada, suspeita-se que esteja relacionada a uma estirpe do *Citrus tristeza virus* (CTV), a um vírus do gênero *Marafivirus* ou a uma associação entre eles. O CTV é o agente causal da tristeza dos citros, que é considerada a virose de maior importância econômica para a citricultura mundial, uma vez que, cerca de 100 milhões de árvores foram mortas ou tornaram-se improdutivas por causa desta doença.

A obtenção de novas cultivares de citros, mais resistentes à fatores de ordem biótica ou abiótica é importante para aumentar a variabilidade genética dos pomares. Uma das perspectivas para minimizar problemas fitossanitários é o melhoramento genético, porém, este apresenta uma série de entraves que dificultam a sua aplicação na cultura dos citros.

O uso da transformação genética no melhoramento genético de citros é muito interessante. Dentre algumas vantagens da obtenção de plantas geneticamente modificadas citam-se a possibilidade de introdução de material genético em situações em que os organismos são incompatíveis e a redução do tempo de obtenção de uma variedade melhorada (BRASILEIRO; DUSI, 1999; MACHADO et al., 2005). Em citros, o sistema de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* tem se mostrado eficiente na regeneração de plantas transgênicas (MOORE et al., 1992; MENDES et al., 2002).

Existem protocolos para regeneração *in vitro* de plantas cítricas que possibilitam a obtenção de plantas transgênicas. Entretanto, observa-se constantemente que muitos precisam ser ajustados de acordo com a variedade a ser trabalhada, tipo de tecido vegetal utilizado, entre outros, para se obter alta taxa de regeneração e, conseqüentemente, um maior número de plantas transformadas.

Com a transformação genética e as estratégias desenvolvidas para a obtenção de plantas resistentes a vírus, como a resistência derivada do patógeno (RDP), pode-se obter plantas resistentes a determinado vírus através da interferência de RNA. Acredita-se que os processos envolvidos no desenvolvimento da RDP estejam relacionados ao mecanismo de silenciamento gênico ou interferência de RNA. Este mecanismo envolve a interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA, destacando-se o silenciamento gênico pós-transcricional e o silenciamento gênico transcricional.

Assim, este trabalho apresenta os seguintes objetivos: 1) Avaliar os fatores relacionados a organogênese *in vitro* em laranja azeda visando futuros trabalhos de transformação genética; e 2) Produzir plantas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’ geneticamente modificadas pela introdução do gene da replicase do *Marafivírus*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais do gênero *Citrus* e da citricultura

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae e é originado da região sudeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967; SOOST; CAMERON, 1975). Os citros apresentam uma grande diversidade espécies, variedades e clones. No entanto, um número relativamente pequeno é utilizado nos atuais plantios comerciais. Como espécies de propagação comercial exclusivamente vegetativa, os citros tiveram na seleção massal a via mais rápida de melhoramento, principalmente, por apresentarem elevadas taxas de mutações somáticas, promovendo, com frequência, o surgimento de novas seleções que se tornaram variedades comerciais (MACHADO et al., 2005).

Os representantes desse gênero apresentam um conjunto básico cromossômico  $x = 9$ , sendo relatados poucos indivíduos triploides e tetraploides (ARAÚJO; ROQUE, 2005). A condição mais frequente do gênero é a diploidia ( $2n = 2x = 18$ ) (MOREIRA; PIO, 1991).

Um dos sistemas de classificação mais utilizado, proposto por Swingle (1943), reconheceu 16 espécies para *Citrus* (ARAÚJO; ROQUE, 2005) e, dentre elas, estão as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex Tan., *C. tangerina* hort. ex Tan.) e limões (*C. limon* L. Burm. f.) (SWINGLE; REECE, 1967).

As frutas cítricas são cultivadas na maioria dos Estados brasileiros. Entretanto, o Estado de São Paulo domina tanto a produção de laranja quanto a de lima ácida 'Tahiti' e de tangerinas. Bahia, Sergipe, Minas Gerais e Paraná destacam-se entre os demais Estados produtores que representam cerca de 21% da produção brasileira (BOTEON; NEVES, 2005).

A produção do suco concentrado congelado, e as repetidas geadas ocorridas no Estado da Flórida (EUA) na década de 1980 fizeram com que o Brasil ganhasse importância perante a citricultura mundial, tornando-se líder na produção de citros e de suco concentrado (TOZATTI, 2006). O país detém cerca de 40% da produção mundial de laranja e 60% da de suco de laranja. Em 2006, o Brasil exportou US\$ 1,47 bilhão em suco de laranja, o que corresponde a 82% do mercado mundial, cujo consumo cresce a uma taxa de 2 a 4% ao ano. Dois terços das exportações vão para a União Européia e 17% para os Estados Unidos, que voltaram a importar volumes expressivos depois dos últimos furacões (NEVES et al., 2007).

A instalação de um parque industrial voltado para o mercado externo de suco e a proximidade das metrópoles nacionais de maior poder aquisitivo tornaram São Paulo o maior pólo mundial citrícola (BOTEON; NEVES, 2005). O Estado se beneficia com 400 mil postos de trabalho (diretos e indiretos), impostos, investimentos e consumo, contribuindo para que as cidades apresentem índices de desenvolvimento superiores à média do Brasil (NEVES et al., 2007). Os pólos produtores do Estado são: a região central (São Carlos - Araraquara), a norte (Bebedouro - São José do Rio Preto), a sudeste (Araras - Mogi Guaçu) e o novo pólo centro - sul (Bauru - Itapetininga) (BOTEON; NEVES, 2005). Vale ressaltar que a produção da citricultura paulista é voltada, sobretudo, ao processamento industrial e os pólos situados nas regiões norte e central se especializaram para essa atividade.

A ocorrência de doenças como a clorose variegada dos citros e a morte súbita dos citros, além da concorrência pelas terras da região para cultivo de cana-de-açúcar, tem provocado a migração da citricultura paulista para o sul do Estado de São Paulo, onde o clima é mais ameno, ocasionando mudanças nos pólos de produção (BOTEON; NEVES, 2005; TOZATTI, 2006).

Nos últimos anos, houve uma redução de pomares de citros tanto em São Paulo quanto na Flórida. No Estado de São Paulo, reduziram de 720 mil ha em 1996 para 576 mil ha em 2006. Na Flórida, nesse mesmo período, reduziram de 349 mil para 254 mil ha. Desde 1995, mais da metade dos citricultores brasileiros abandonou a atividade, sobretudo em São Paulo e no Triângulo mineiro. O número de produtores que era de 23 mil caiu para cerca de 10 mil. Porém, a redução da produção não foi proporcional, neste período, ela caiu no máximo 15%. Os citricultores remanescentes são os maiores proprietários e também os que empregam mais tecnologia (MENDES, 2006).

Além disso, os recentes acontecimentos no Estado da Flórida (EUA) (furacões, reaparecimento do cancro cítrico e constatação do greening), que levaram a uma queda na sua produção, influenciarão no mercado mundial por um longo tempo. Essa queda de produção tem sustentado os altos preços do suco de laranja na Bolsa de Nova York (NYBOT) (MENDES, 2006, NEVES et al., 2007), favorecendo assim a citricultura paulista.

As variedades cítricas foram cultivadas por quase dois mil anos de pé franco no Médio Oriente e na Bacia do Mediterrâneo. No século XIX, uma podridão de raízes epidêmica, causada por *Phytophthora* sp., destruiu as árvores de laranja doce e levou à utilização de laranja azeda como porta-enxerto, uma vez que era tolerante ao patógeno (MÜLLER, et al, 2005).

Posteriormente, o uso deste porta-enxerto trouxe danos consideráveis para a citricultura brasileira por sua intolerância ao vírus da tristeza dos citros, provocando a morte de milhões de plantas. O uso dos porta-enxertos permitiu superar fatores bióticos e abióticos e obter ganhos de produtividade ao longo da história da citricultura, mas foi também responsável por grandes adversidades que marcaram época nessa história como a gomose, a tristeza, o declínio e atualmente, a morte súbita dos citros (POMPEU JUNIOR, 2005).

Dentre as principais doenças que afetam a cultura dos citros, estão aquelas que são causadas por fungos como a pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), a verrugose (*Elsinoe* spp.), a melanose (*Diaporthe citri* Wolf), a rubelose (*Erythricium salmonicolor* Berk. & Br. Burdsall) e a podridão floral (*Colletotrichum acutatum* Simmonds), a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), que até recentemente era considerada uma doença fúngica, as doenças causadas por vírus, como a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*), as doenças causadas por bactérias como a clorose variegada dos citros (CVC) (*Xylella fastidiosa*), o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), e mais recentemente o huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.), também conhecido como greening, e as doenças de etiologia ainda desconhecida, como é o caso da morte súbita dos citros (MSC) e do declínio dos citros (FEICHTENBERGER et al., 2005; FUNDECITRUS, 2008).

O Brasil tem posição destacada na pesquisa com citros e, desde meados do século anterior, têm contribuído de forma significativa, notadamente em relação à tristeza dos citros, cancro cítrico, leprose, declínio, gomose e clorose variegada dos citros (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Muitas pesquisas de melhoramento genético de variedades têm sido desenvolvidas (TOZATTI, 2006) e a maioria delas busca a tolerância a pragas e doenças. Fatores como esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, poliembrionia, embrionia nucelar, alta heterozigosidade e longo período de juvenilidade tem limitado a produção de novos cultivares através do melhoramento genético convencional (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; ASTUA-MONGE; FREITAS-ASTUA; MACHADO, 2004).

A necessidade de se aumentar as bases genéticas atuais dos citros, assim como a potencialização do germoplasma já existente impõem a necessidade de desenvolver programas de melhoramento e a biotecnologia pode contribuir efetivamente no ganho ou potencialização de características desejáveis (MACHADO et al., 2005), com a implementação de técnicas como a hibridação somática, a variação somaclonal, a manipulação de ploidia e a transformação genética

(ASTUA-MONGE; FREITAS-ASTUA; MACHADO, 2004). Esta última técnica tem se mostrado essencialmente interessante por tornar possível a introdução de genes que modificam características de interesse agrônomo, incluindo genes de tolerância a doenças, mantendo-se as características originais do cultivar e evitando-se a transferência de características deletérias (PEÑA et al., 1997; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; FEBRES et al., 2003).

## 2.2 Tristeza dos citros

A tristeza é considerada uma das mais importantes doenças que atingiram a cultura dos citros. Provavelmente originária da Ásia, foi registrada pela primeira vez na África do Sul, no início do século XX, e tem sido disseminada para todos os países citrícolas. Na época, foi observado que variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), quando enxertadas em laranja azeda (*C. aurantium* L.) não cresciam. Inúmeras tentativas de se usar a laranja azeda como porta-enxerto foram feitas sem sucesso. Deste modo, apesar das vantagens de seu uso, como adaptação a muitos solos, tolerância a *Phytophthora* e a outros patógenos transmissíveis por enxertia, e também por ser compatível com muitas variedades copa, seu uso como porta-enxerto de laranja doce foi reduzido nas áreas de ocorrência da tristeza. (ROCHA-PEÑA et al., 1995; FEICHTENBERGER et al., 2005).

Estima-se que cerca de cem milhões de árvores foram mortas ou tornaram-se improdutivas pela tristeza no mundo. No Brasil, foi observada pela primeira vez em 1937 em pomares do Vale do Paraíba, SP, introduzida por material de citros trazido diretamente da África do Sul ou da Argentina, onde a sua ocorrência é conhecida desde 1930. Doze anos após a introdução da tristeza no Brasil, das 11 milhões de plantas cítricas existentes, 9 milhões sobre porta-enxerto de laranja azeda foram perdidas (FUNDECITRUS, 2008). A movimentação do pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida*) da América do Sul para América Central e Estados Unidos tem ameaçado e eliminado as plantas sobre porta-enxerto laranja azeda dessas regiões (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A tristeza dos citros é causada por um vírus do gênero *Closterovirus*, denominado *Citrus Tristeza Virus* (CTV). Suas partículas são filamentosas e flexuosas, de aproximadamente 2000 nm de comprimento por 10-12 nm de diâmetro e contém RNA de fita simples (ssRNA) não segmentado, com peso molecular aproximado de 20 Kb. Uma série de estirpes do CTV já foi

descrita e algumas tiveram seu genoma seqüenciado. Elas variam nos sintomas que induzem nos hospedeiros e na seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial (GARNSEY; LEE, 1989; BARBOSA et al., 2001).

O CTV é limitado ao floema e pode ser facilmente transmitido por enxertia, experimentalmente por *Cuscuta* e, mecanicamente, por ferimentos no floema (GARNSEY; GONSALVES; PURCIFULL, 1977; FEICHTENBERGER et al., 2005). Na natureza, o CTV é transmitido de uma maneira semi-persistente por diferentes espécies de afídeos. Dentre esses, o *Toxoptera citricida* é considerado o vetor mais eficiente em nossas condições (MÜLLER, et al., 2005).

Praticamente todas as espécies, variedades, híbridos e muitos afins de citros são hospedeiras do CTV. A manifestação da doença depende da virulência da estirpe do CTV, de condições ambientais e, principalmente, de fatores inerentes à própria planta, como a idade, capacidade de permitir a multiplicação do vírus e tolerância dos tecidos à degeneração, principalmente do floema. As laranjas doces (*Citrus sinensis*), as tangerinas (*C. reticulata*, *C. sunki*, *C. reshini*), certos pomelos (*C. paradisi*), alguns tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*), e limão ‘Galego’ (*C. aurantifolia*) são considerados suscetíveis, pois, permitem a multiplicação do vírus em altas concentrações, enquanto *Poncirus trifoliata*, alguns citrumelos (*P. trifoliata* x *C. paradisi*), a laranja azeda e alguns limões verdadeiros (*C. limon*) são consideradas como resistentes, pois, não permitem o incremento do vírus, ou o permitem muito pouco. As laranjas doces, exceto a variedade ‘Pêra’, as tangerinas, alguns tangelos, *P. trifoliata*, alguns citrumelos, citranges ‘Troyer’ e ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), limão ‘Cravo’ (*C. limonia*), limão ‘Rugoso’ (*C. jambhiri*) e limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana*) são considerados tolerantes, enquanto a laranja azeda, alguns limões verdadeiros, o limão ‘Galego’, certos pomelos e a laranja ‘Pêra’ são intolerantes à presença do vírus (FUNDECITRUS, 2008).

Em pé franco, os sintomas da tristeza só se manifestam quando ele é suscetível e intolerante. Em plantas enxertadas, os sintomas são expressos quando o porta-enxerto for intolerante e a copa suscetível ou quando a copa for suscetível e intolerante. (FUNDECITRUS, 2008). Nas combinações de laranja doce sobre laranja azeda, os sintomas são expressos em 2 a 4 meses, enquanto que em lima da ‘Pérsia’ (*C. latifolia*), em 10 anos (FEICHTENBERGER et al., 2005).



Os sintomas da doença, na sua concepção clássica, ou seja, aqueles induzidos em combinações de citros tendo como porta-enxerto a laranja azeda, são caracterizados por profundas mudanças anatômicas na região da enxertia como: formação de células cromáticas, colapso e necrose dos tubos crivados, super produção e degradação de células do floema, acúmulo de floema não funcional e invasão do córtex pelo floema não funcional. Como consequência do bloqueio do transporte de fotoassimilados para as raízes, ocorre a podridão e morte das radículas e, por fim, o declínio da planta caracterizado por sintomas não específicos: folhas ligeiramente bronzeadas de aspecto coriáceo e quebradiças; em alguns casos, amarelecimento da nervura principal, amarelecimento total das folhas velhas e seca gradativa dos galhos a partir das extremidades. Algumas vezes, pode ser observada uma linha marrom na região da enxertia, quando a casca é retirada (MÜLLER, et al., 2005; FEICHTENBERGER et al., 2005). Danos consideráveis são ocasionados pelo vírus (caneluras) que afetam algumas variedades como a laranja 'Pêra', limas ácidas 'Galego' e 'Tahiti' e pomelos, mesmo quando propagados em porta-enxertos tolerantes (AGUILAR-VILDOSO et al., 2003; MÜLLER, et al., 2005).

Na região sudeste de Estado de São Paulo, ocorre uma forma de tristeza extremamente forte denominada variante Capão Bonito, constatada no final de 1965 por Muller et al. (1968), que afeta praticamente todas as variedades comerciais de laranja doce e limão 'Cravo', provocando sintomas como redução de crescimento, brotação axilar anormal e curta nos galhos, redução de tamanho da folha e cloroses e produção de frutos miúdos.

A diagnose da tristeza é feita pela observação dos sintomas e pela indexação biológica com o uso da planta indicadora limão 'Galego', utilizando-se o teste de dupla enxertia (enxertia de gema inóculo e gema indicadora). Caso a fonte a testar esteja infectada pela tristeza, ocorrerão sintomas de palidez das nervuras mais ou menos intensas, dependendo da severidade da estirpe, seguidos de sintoma de canelura no lenho (MÜLLER, et al., 2005; FEICHTENBERGER et al., 2005).

Os meios de controle devem ser de natureza preventiva ou indireta e a sua escolha depende das condições particulares de cada caso (MULLER; COSTA, 1991). A recuperação da citricultura nacional foi possível com a utilização de porta-enxertos considerados tolerantes (infectados, mas não afetados pelo patógeno) ou resistentes. A subenxertia, ou seja, troca do

porta-enxerto da planta por outro resistente também foi utilizada com relativo sucesso em pequena escala em plantas com até 5 ou 6 anos.

O CTV ocorre em todas as áreas citrícolas do país e a presença do patógeno sempre terá que ser levada em conta na planificação dos pomares de citros. Tanto isso é verdade, que o primeiro teste no qual um porta-enxerto em potencial tem que ser aprovado é o da tolerância ao CTV. Para as variedades copa que são afetadas pelos isolados fortes do vírus, mesmo em porta-enxertos tolerantes, o controle baseia-se na pre-imunização, que consiste em promover a infecção de uma planta, no caso citros, com uma estirpe fraca do CTV que venha oferecer proteção contra a forte, levando, desta maneira, a um controle das manifestações fortes da doença (FEICHTENBERGER et al., 2005; FUNDECITRUS, 2008). A pré-imunização constitui-se numa técnica inovadora que pode ser considerada precursora da biotecnologia no controle de doenças em citros (ASTUA-MONGE; FREITAS-ASTUA; MACHADO, 2004).

### **2.3 Morte súbita dos citros**

A morte súbita dos citros (MSC) é uma doença de combinação copa/porta-enxerto (FUNDECITRUS, 2008), sendo assim denominada devido à rapidez com que as plantas sucumbem (FUNDECITRUS, 2003). É considerada uma das mais importantes doenças que tem causado danos a citricultura brasileira no início deste século (MÜLLER et al., 2005). Foi descrita pela primeira vez em 2001 (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001), sendo observada no município de Comendador Gomes, MG, desde 1999 (MULLER et al., 2002; JESUS JUNIOR; BASSANEZI; BERGAMIN FILHO, 2004), num talhão de laranja ‘Valência’ sobre limão ‘Cravo’, com 12 anos de idade (MULLER et al., 2002). Inicialmente, a doença era restrita a região norte do Estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro, mas, já tem sido detectada em outros municípios mais ao sul do Estado de São Paulo (MÜLLER et al., 2005).

Em 2001, quando a MSC foi relatada, nada se sabia sobre o problema por se tratar de uma nova doença de ocorrência exclusiva no Brasil. Em setembro de 2002, a MSC tinha causado a morte econômica de mais de 325 mil árvores na região de ocorrência. Sua capacidade de disseminação e destruição, aliada ao fato de afetar o principal porta-enxerto utilizado na citricultura, o limão ‘Cravo’ (PESQUISA, 2007) tornou a MSC uma séria ameaça à citricultura paulista e nacional. Embora existam perguntas essenciais como qual é o vetor e qual é o agente

causal, consideráveis avanços têm sido obtidos, principalmente no tocante às estratégias para o manejo da doença (JESUS JUNIOR; BASSANEZI; BERGAMIN FILHO, 2004; PESQUISA, 2007).

Até janeiro de 2004, foram estimadas cerca de 2 milhões de plantas com sintomas da MSC, sendo mais de 1,5 milhão em 12 municípios do sul do triângulo mineiro e 436 mil em 19 municípios do norte, noroeste e centro de São Paulo (JESUS JUNIOR; BASSANEZI; BERGAMIN FILHO, 2004). No último levantamento amostral realizado pelo Fundecitrus em 2006, não foram encontrados focos da doença em novos municípios. Mas, embora a MSC permaneça restrita à região original de ocorrência, seu efeito é bastante destrutivo nas propriedades onde ocorre. Em 2006, o número de plantas com sintomas quase triplicou nos 40 talhões sem subenxertia que são acompanhados pelo Fundecitrus. Pesquisadores especulam que a disseminação da doença é mais lenta do que o imaginado anteriormente, o arranquio de muitos talhões de citros na região, inclusive com morte súbita, fez com que a doença progredisse mais lentamente, e o clima da região é fundamental para a expressão dos sintomas da MSC (estresse hídrico anual maior que 80 mm e alta temperatura) (MSC, 2006).

A MSC afeta todas as variedades comerciais de laranja doce, as tangerinas ‘Cravo’ e ‘Ponkan’ (FUNDECITRUS, 2008), a lima ácida ‘Tahiti’ e as limas ‘Pérsia’ e ‘Verde’ (MSC, 2007), enxertadas sobre os limoeiros ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’. Combinações sobre os porta-enxertos de tangerinas ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’, citrumelo ‘Swingle’ e *Poncirus trifoliata* próximas a pomares doentes não apresentam sintomas, e são considerados tolerantes (JESUS JUNIOR; BASSANEZI; BERGAMIN FILHO, 2004; FEICHTENBERGER et al., 2005). O surgimento da MSC acelerou a diversificação da porta-enxerto nos pomares.

Plantas de limão ‘Cravo’ provenientes de sementes ou brotações do porta-enxerto, próximas ou em pomares afetados pela doença, também mostram sintomas, o que indica que o agente causal da MSC também se multiplica na copa desta variedade. No campo, plantas com mais de cinco anos foram as que freqüentemente mostraram sintomas da doença, mas, também foram encontrados sintomas em plantas com mais de 14 meses. Em mudas enxertadas com borbulhas de plantas infectadas, os primeiros sintomas foram observados após 14 meses da inoculação (FEICHTENBERGER et al., 2005).

As árvores afetadas apresentam inicialmente perda de brilho e descoloração generalizada das folhas, seguida de desfolha, redução do número e tamanho das brotações, ausência de

brotações internas e morte apical de ramos. Em plantas jovens, é comum observar o amarelecimento das nervuras das folhas. Em estágio mais avançado da doença, ocorre desfolha total e morte da planta. Quando o sintoma se manifesta em plantas submetidas a grande demanda de água e nutrientes, com grande carga de frutos próximos a maturação, pode ocorrer o colapso súbito da planta, permanecendo os frutos aderidos à árvore (JESUS JUNIOR; BASSANEZI; BERGAMIN FILHO, 2004; FUNDECITRUS, 2008). O sistema radicular das plantas doentes apresenta perda acentuada de radículas e intensa podridão de raízes (MÜLLER et al., 2002). Todo este quadro sintomático está associado à redução do floema funcional do porta-enxerto abaixo da região da enxertia, acúmulo de floema não funcional e hipertrofia e hiperplasia dos raios medulares (FEICHTENBERGER et al., 2005). O amarelecimento que aparece nos tecidos internos da casca do porta-enxerto abaixo da região da enxertia é o sintoma característico da MSC, que tem permitido o seu diagnóstico. O tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a morte da planta é bastante variável (de poucas semanas a vários meses ou alguns anos) em função da idade da planta, da época do ano, e da condição de carga de frutos (MACHADO et al., 2004; FUNDECITRUS, 2008).

A perda de produção devido à MSC nos estágios iniciais e severos varia entre 30 e 60% no peso total de frutos colhidos. Com a constatação das primeiras plantas com sintomas, a doença pode atingir 30 a aproximadamente 100% das plantas do talhão em menos de dois anos (MÜLLER, et al., 2005; FUNDECITRUS, 2008).

A região afetada pela MSC concentra cerca de 25% de toda a produção do parque citrícola do Estado de São Paulo. Estima-se em 4 milhões o número de plantas erradicadas desde o primeiro levantamento da MSC, em 2002 (MSC, 2007). Doenças como a MSC e a CVC tem provocado a migração da citricultura para a região sudeste do Estado de São Paulo (NEVES et al., 2007).

No tocante à etiologia, dois tipos de partículas virais têm sido encontrados em todas as plantas com sintomas de MSC: aquelas características do CTV e outras isoméricas que têm sido denominadas de Citrus Sudden Death associated Virus (CSDaV) (MACCHERONI, et al., 2005). Tanto o CTV como o CSDaV foram detectados em afídeos provenientes de plantas com sintomas de MSC (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Estudos sobre o comportamento da MSC no tempo e no espaço permitiram fazer inferências sobre o seu período de incubação, a velocidade e os mecanismos de disseminação e o

possível agente causal (BASSANEZI et al., 2003). A elevada variação observada nas populações de CTV em plantas com MSC, comum em quase todas as plantas afetadas por esse vírus, não tem permitido obter evidências concretas de que o agente causal da MSC seja um novo variante do CTV (MACHADO et al., 2004). Entretanto, muitos fatores como o comportamento da doença, sintomas externos tanto aéreos como radiculares, entre outros, fazem com que a MSC seja considerada uma doença semelhante à tristeza dos citros (MÜLLER, et al., 2005).

O SCDaV recebeu essa denominação pelos autores por ter sido descrito primeiramente em citros em associação com sintomas de MSC. O vírus, pertencente à família Tymoviridae, gênero *Marafivirus*, foi encontrado por análise de RT-PCR numa alta frequência (99,7%) nas plantas afetadas pela doença e é considerado um forte candidato como agente causal da MSC. Os autores também cogitaram a hipótese de um variante do *citrus tristeza virus* e o vírus do gênero *Marafivirus* atuarem em conjunto na expressão dos sintomas da MSC (MACCHERONI, et al., 2005). Embora evidências apontem possíveis agentes causadores da MSC, para que seja definitivamente comprovado qual é o seu agente causal, é necessário que sejam completados os postulados de Koch (FEICHTENBERGER et al., 2005).

As recomendações para controle da MSC são baseadas no que foi observado e pesquisado até o momento, desde o aparecimento da doença. São elas: não transportar mudas, borbulhas e porta-enxertos das regiões contaminadas para aquelas onde a doença ainda não foi constatada, fazer subenxertia com porta-enxertos tolerantes como tangerinas ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’, citrumelo ‘Swingle’ e *Poncirus trifoliata* nas áreas afetadas e produzir e plantar mudas em diferentes porta-enxertos tolerantes, respeitando suas limitações (MÜLLER, et al., 2005; FUNDECITRUS, 2008).

## **2.4 Organogênese *in vitro* de citros**

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos tem sido estudada devido a suas aplicações práticas e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de Fisiologia, Bioquímica e Genética de plantas. A totipotência celular, princípio básico da cultura de tecidos vegetais, considera que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (KERBAUY, 1999).

Os primeiros relatos de trabalhos envolvendo cultura de tecidos em citros foram feitos na década de 50 (SCHROEDER; SPECTRO, 1957; GAUTHERET, 1959), e, após o desenvolvimento de meios nutritivos (MURASHIGE; SKOOG, 1962; MURASHIGE; TUCKER, 1969), avanços consideráveis foram constatados nesta área.

Em espécies cítricas, o desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos tem sido bastante estudado, de modo que, têm proporcionado a regeneração de plantas *in vitro* para todos os sistemas de cultivo como a cultura de calos (KOCHBA et al., 1982), cultura de células em suspensão (CABASSON et al., 1995), indução da embriogênese somática (KUNITAKE et al., 1995; BENEDITO et al., 2000; RICCI et al., 2002), indução da organogênese (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997; MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a; SCHINOR et al., 2006) e o isolamento e cultivo de protoplastos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; BENEDITO et al., 2000; GLÓRIA et al., 2000).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer via organogênese ou via embriogênese somática. A organogênese pode ser definida como o processo em que as células e os tecidos são induzidos a sofrerem mudanças que levam à formação de uma estrutura unipolar, podendo ser um primórdio caulinar ou radicular, cujo sistema vascular se encontra freqüentemente conectado ao explante original, diferentemente da embriogênese somática que leva à produção de uma estrutura bipolar, contendo ápice caulinar e radicular, com um sistema vascular independente (THORPE, 1994).

Os eventos organogênicos geralmente ocorrem mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular. A retomada da atividade meristemática do tecido vegetal caracteriza a organogênese em duas formas: direta e indireta. A organogênese é caracterizada pela formação de gemas adventícias, que são assim denominadas por terem origem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. É direta quando a regeneração de gemas ocorre sem a formação de calo, a partir de tecidos não meristemáticos, como o câmbio vascular, a base do pecíolo em dicotiledôneas, a base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmento de raízes, e é indireta, quando o processo de regeneração é precedido pela formação de calo (massa de células totalmente indiferenciadas), surgindo gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novos órgãos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O processo de organogênese *in vitro* é considerado complexo, tendo em vista a atuação de múltiplos fatores, internos e externos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores ambientais. Kerbauy (1999) destaca que durante o desenvolvimento de um organismo, o processo de diferenciação celular reflete o efeito de pelo menos três grupos de fatores. O primeiro é o fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que pode ser expresso durante o desenvolvimento; o segundo é representado pelas características originadas durante a ontogênese; e o terceiro, as características cuja expressão depende apenas do ambiente.

Vários trabalhos têm relatado a organogênese *in vitro* para as diversas espécies e cultivares de citros, e têm também destacado que o sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, como o genótipo, o tipo, a idade e o tamanho dos explantes, os meios de cultura, as condições de cultivo e os tipos e dosagens de reguladores vegetais, os quais, tem-se destacado como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (THORPE, 1994; MOREIRA-DIAS et al., 2001; SILVA et al., 2005a). A utilização de fitorreguladores tem se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas necessárias à formação de meristemas caulinares e/ ou radiculares em tecidos cultivados *in vitro* (KERBAUY, 1999).

Uma preocupação no início dos estudos em organogênese foi obter uma concentração ideal para manter o balanço citocinina/ auxina (EDRISS; BURGER, 1984; DURÁN-VILA et al., 1992; MOREIRA-DIAS et al., 2000), de modo a garantir maior eficiência na regeneração *in vitro*. Entre os reguladores vegetais, as citocininas promovem a divisão celular e estimulam a iniciação e o crescimento de gemas adventícias em diversas espécies. A 6-benzilaminopurina (BAP) parece ser a citocinina mais adequada para a indução de gemas adventícias (BEYL, 2000) e multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PALDYAL; IIAQ, 2000; AL-BAHRANY, 2002). A razão da maior eficiência do BAP, seguida em ordem decrescente por cinetina (CIN) e isopenteniladenina (2ip) pode estar na capacidade dos tecidos vegetais metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que os fitorreguladores sintéticos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Estudos realizados para estabelecer protocolos de regeneração *in vitro* de genótipos de citros têm demonstrado que a adição da citocinina BAP é essencial para a regeneração de brotos, enquanto que a contribuição das auxinas parece ter um efeito marginal (GARCÍA-LUIS et al., 1999; BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000;

MOREIRA-DIAS et al., 2000; SHINOR et al., 2006). Também há relatos de que o ANA inibe organogênese em algumas espécies de *Citrus* (EDRISS; BURGER, 1984).

A regeneração *in vitro* de plantas cítricas por organogênese tem sido descrita a partir de diferentes explantes como segmento de raiz (BHAT; CHITRALEKHA; CHANDAL, 1992; GOH et al. 1995), discos de folha (CHATUVERDI; MITRA, 1974; VANECK; KITTO, 1992; ALMEIDA et al., 2003a), segmento internodal (DURÁN-VILA; NAVARRO, 1989; PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997; ALMEIDA et al., 2003a; SILVA, et al., 2006), segmento de hipocótilo (MAGGON; SINGH, 1995) e segmento de epicótilo (EDRISS; BURGER, 1984; BESPALHOK FILHO et al., 2001a; MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a, 2005b; GARCÍA-LUIS et al., 2006; SHINOR et al., 2006). Variações consideráveis na resposta dos citros ao cultivo *in vitro* chamam a atenção para a necessidade de obtenção de uma metodologia eficiente de regeneração através da organogênese para o estabelecimento de protocolos de transformação genética para estas espécies (MOREIRA-DIAS et al., 2000).

A máxima proliferação de gemas em segmentos de caule de calamondin (*Citrus madurensis* L.) foi obtida utilizando o meio de cultura MS com a adição de 10 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 500 mg L<sup>-1</sup> de extrato de malte. O meio MS com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 500 mg L<sup>-1</sup> de extrato de malte ou meio MS na ausência de regulador vegetal levou ao enraizamento de brotações (GRINBLAT, 1972). Esse foi um dos primeiros protocolos para regeneração de plantas por organogênese *in vitro*, com o objetivo de obter plantas livres de vírus. Com esse mesmo objetivo, Sauton et al. (1982) regeneraram brotos via organogênese direta e indireta de limão 'Eureka' (*Citrus limon* L.), *Poncirus trifoliata* e citrange 'Troyer' (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* Raf.) a partir de segmentos de raízes, inicialmente cultivados em meio MS líquido com as concentrações dos componentes vitamínicos variados e, posteriormente, transferidos para meio MS sólido com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Ao estudar diferentes tipos de explantes (segmentos de epicótilo, segmentos de raízes e meristemas de raízes de plântulas germinadas *in vitro*) de citrange 'Troyer', foram obtidas brotações apenas em segmentos de epicótilo, quando cultivados em meio MS acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. O enraizamento das brotações foi verificado em meio MS com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA (EDRISS; BURGER, 1984).



A formação de gemas adventícias em segmentos de epicótilo e de raízes de plântulas de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) germinadas *in vitro*, foi verificada em meio de cultura MT com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Foi observado também um gradiente no potencial de formação de gemas em que os segmentos mais próximos do nó cotiledonar apresentaram maior número de gemas (BURGER; HACKETT, 1986).

Avaliando o efeito de BAP e ANA, regeneraram-se plantas *in vitro* de pomelo (*Citrus paradisi*), laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e *Citrus macrophylla* Wester, partindo de segmentos internodais de plantas juvenis mantidas em casa-de-vegetação (GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998). Também avaliando BAP e ANA, Bordón; Guardiola e García-Luis (2000) regeneraram plantas via organogênese em segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* para os porta-enxertos laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), laranja ‘Comuna’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus resh* Hort. Ex Tan.), *Citrus macrophylla* Wester e citrange ‘Troyer’. Além dos reguladores vegetais observou-se a influência da luz e da orientação do explante no cultivo *in vitro* das diferentes variedades. Diferentes respostas foram obtidas para organogênese, concluindo-se que as condições de regeneração devem ser otimizadas para cada genótipo.

A otimização de um protocolo para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina ‘Cleópatra’ também foi estudada. A máxima proliferação de gemas foi obtida em condições de cultivo na ausência de luz por 30 dias seguidos de fotoperíodo de 16 h, utilizando-se 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP do meio de cultivo. Contudo, foi a utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na fase de indução de brotações combinada com o meio MT contendo metade da concentração de sais, e sem regulador na fase de enraizamento, que assegurou a máxima regeneração de plantas, com índices de 85% de brotos enraizados e aclimação satisfatória (SILVA et al., 2005b).

A influência do BAP na organogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de laranja ‘Pêra’ e em segmentos internodais de plantas germinadas *in vitro* de limão ‘Cravo’ foram avaliados por Moura et al. (2001). As concentrações 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> adicionadas ao meio de cultura MT foram as que mais favoreceram a formação de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja ‘Pêra’. Para o limão ‘Cravo’, a melhor resposta foi obtida quando se utilizou 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultivo. As brotações obtidas de laranja e limão tiveram índice de enraizamento de 75 e 80%, respectivamente.

Com o objetivo de estabelecer um sistema de regeneração *in vitro* para os cultivares de laranja 'Pêra', 'Valência' e 'Folha Murcha' (*Citrus sinensis*), Besspalhok Filho et al. (2001a) testaram diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$ ). Obtiveram melhores resultados na formação de brotos adventícios de laranja 'Pêra' quando utilizaram concentrações de 2,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP, e de laranja 'Valência' e 'Folha Murcha' quando utilizaram 1,0 e 2,0  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,0  $\mu\text{M}$  de BAP, respectivamente. Entretanto, o maior número de brotos alongados foi obtido em meio de cultura suplementado com 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP. Foi relatado ainda que o enraizamento ocorreu em meio MS com a metade da concentração de sais. A regeneração de plantas *in vitro* de laranja 'Pêra' também foi estudada por Silva et al. (2005a). Estes autores concluíram que a combinação 3,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP com segmentos de epicótilo de 0,25 cm de comprimento foi eficiente na resposta organogênica e o máximo enraizamento de brotações foi obtido em meio MT na ausência de auxina ou MT com metade da concentração de sais suplementado com 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de IBA.

O efeito de BAP, CIN e ANA na multiplicação de brotos em explantes nodais de *Citrus aurantifolia* cultivados no meio MS foi estudado por Al-Bahrany (2002). Verificou-se que o maior número de brotos foi produzido no meio suplementado com 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de CIN e 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA.

O sistema que assegurou a máxima regeneração de plantas *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo para as laranjas 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' (*Citrus sinensis*) e limão 'Cravo' (*Citrus limonia*) foi obtido em meio MT com a combinação de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP utilizada na fase de indução de brotações e 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de IBA utilizada na fase de enraizamento para os três cultivares de laranjas doces e 0,5 -2,5  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP na indução de brotações com 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de IBA na indução de enraizamento para o limão 'Cravo' (ALMEIDA et al., 2002).

Mendes et al. (2002), estudando o desenvolvimento e otimização de protocolos de transformação genética de laranja 'Hamlin', observaram que a regeneração de plantas a partir de segmentos de epicótilo ocorreu em alta frequência por organogênese direta. Schinor et al. (2006), avaliando a organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo das variedades azeda, 'Volkameriano', 'Natal', 'Carrizo' e 'Pêra', evidenciaram que, independente da região do epicótilo e da presença ou ausência de BAP, a organogênese em citros é influenciada pelo genótipo. O estudo anatômico da organogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de laranja 'Valência' foi feito por Almeida et al. (2006). Demonstrou-se que áreas meristemáticas

responsáveis pela formação de gemas adventícias originam-se endogenamente na zona cambial do tecido vegetal.

Nos estudos de organogênese tem sido utilizado preferencialmente tecido juvenil, por suas características que permitem fácil regeneração, como seu alto potencial morfogenético. Em plantas arbóreas, a juvenilidade é um fator restritivo, tendo em vista que vários anos de pesquisa são necessários até que um cultivar possa ter suas características avaliadas. A redução ou perda da capacidade morfogenética é considerada um dos principais fatores que tem limitado a utilização de explantes provenientes de plantas adultas (BONGA, 1982).

Um eficiente protocolo de regeneração de plantas *in vitro* a partir de tecido adulto para aplicação em programas de transferência de genes seria de grande contribuição em programas de melhoramento de citros, pois, as plantas regeneradas perderiam características de juvenilidade. Como consequência, obter-se-ia precocidade na produção de flores e frutos, permitindo rápida avaliação agrônômica (ALMEIDA et al., 2003a; KOBAYASHI et al., 2003).

Há poucos relatos sobre a indução da organogênese a partir tecido adulto em que foram utilizados segmentos internodais e/ou discos foliares de plantas mantidas em casa-de-vegetação. Cervera et al. (1998) induziram organogênese e regeneraram plantas a partir de tecido adulto de laranja 'Pineapple', de modo que, o florescimento das plantas regeneradas foi verificado aos 14 meses. Almeida et al. (2003a) conseguiram a indução de gemas adventícias em segmentos internodais coletados de plantas adultas mantidas em casa-de-vegetação para as laranjas 'Pêra', 'Valência', 'Natal' e 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L.), bem como, em discos de folhas desta última variedade. Silva et al. (2006) também avaliaram a indução de gemas adventícias em tecido adulto de laranja 'Bahia' e concluíram que concentrações de 1, 2 ou 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinada com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA são adequadas para induzir organogênese em segmentos internodais.

Vários outros trabalhos têm sido descritos para diferentes espécies ou cultivares, avaliando a resposta morfogenética em função das condições de incubação dos explantes e, principalmente, da adição de reguladores vegetais no meio de cultivo. As variações encontradas na referida resposta permitem observar que trabalhos de otimização de sistemas de regeneração de plantas *in vitro* são de grande importância para as plantas cítricas, principalmente, em se tratando de transformação genética nestas plantas.

## 2.5 Transformação genética em citros

A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de genes representa uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em uma determinada planta. Um gene responsável por uma determinada característica, uma vez identificado, pode ser isolado, clonado, seqüenciado e utilizado em programas de melhoramento genético de plantas, por meio da transformação genética (BRASILEIRO; DUSI, 1999). De acordo com Astua-Monge; Freitas-Astua e Machado (2004), dentre as contribuições da biotecnologia no controle de doenças, a transformação genética talvez seja uma das mais importantes alternativas, não só para acelerar o processo de melhoramento genético tradicional, mas também, para maximizar a utilização das informações genômicas geradas pelos programas de sequenciamento.

A transformação genética pode ser definida como a introdução controlada de ácidos nucléicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação. As técnicas de transformação genética de plantas são agrupadas em duas categorias: transferência direta e indireta de genes. A direta é baseada em processos físicos ou químicos e a indireta é aquela em que o DNA exógeno é inserido no genoma pela ação de um vetor biológico. A transformação indireta baseia-se principalmente no sistema mediado por bactérias do gênero *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*) e a transformação via *A. tumefaciens* tem sido o método mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Essas técnicas de transformação ampliam os limites de disponibilidade de genes impostos pela incompatibilidade sexual no melhoramento convencional de plantas. Isto porque se pode transferir para plantas, genes isolados de outras plantas, ou mesmo microrganismos e animais (PERIANI et al., 1986).

*Agrobacterium tumefaciens* é o agente causal da doença conhecida como galha-da-coroa, que é caracterizada pela proliferação descontrolada das células situadas próximo à região do colo da planta (BENEDDRA et al., 1996). Foi o estudo dessa doença que abriu novas perspectivas para as pesquisas de transferência de genes em plantas. A galha-da-coroa se manifesta em um grande número de dicotiledôneas pelo aparecimento de um tumor ou galha sobre o tecido vegetal ferido e infectado (BRASILEIRO; DUSI, 1999). A demonstração de que a causa da proliferação celular do tumor é a transferência da informação genética da bactéria para a célula vegetal (CHILTON et al., 1977) foi o ponto de partida para pesquisas sobre as possibilidades da

utilização desse sistema natural para a transformação genética de plantas. A agrobactéria transfere naturalmente parte de seu genoma às células vegetais no momento da infecção e seu DNA pode também ser manipulado por engenharia genética, de maneira a portar genes de interesse. No processo de infecção de células vegetais a agrobactéria levará à integração do DNA no genoma vegetal e, a multiplicação das células que contém esse DNA exógeno levará a regeneração de plantas transgênicas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). O sucesso na obtenção de plantas transgênicas envolve dois processos independentes, a integração estável do DNA exógeno dentro do genoma hospedeiro e a subsequente regeneração de plantas a partir das células transformadas. Competência para regeneração de plantas é a primeira limitação do processo, sendo que a frequência de regeneração pode ser baixa ou nula em muitas espécies recalcitrantes (PEÑA et al., 2004).

A formação da galha ou tumor por *Agrobacterium tumefaciens* está diretamente associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (120 a 250 kb) em seu genoma, denominado plasmídeo Ti (“tumor inducing”), e parte desse plasmídeo se integra ao genoma das células de plantas infectadas (LEE et al., 1995). O fragmento de DNA bacteriano que é transferido para a célula vegetal, integrado ao genoma nuclear e aí expresso de maneira estável é denominado T-DNA (“transferred DNA”) (VAN SLUYS; HASHIMOTO; SCORTECCI, 1992; ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003). A região do T-DNA é delimitada por seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda, e definem a porção do plasmídeo que será transferida (WANG et al., 1984). Esta região contém genes que estão envolvidos na síntese de auxinas e citocininas (oncogenes) e que são responsáveis pelo aparecimento da galha. O processo de indução e transferência do T-DNA é controlado pela expressão coordenada da região de virulência (*vir*) presente no plasmídeo Ti. A região *vir* é ativada pela liberação de compostos fenólicos pelos tecidos vegetais lesionados, iniciando o processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (STACHEL et al., 1985; SHENG; CITOVSKY, 1996). Na transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, os vetores utilizados são denominados “desarmados”, pois, não são mais capazes de induzir tumores em plantas devido à remoção dos oncogenes e genes da síntese de opinas. Assim, qualquer outra nova seqüência de DNA inserida entre as extremidades direita e esquerda do T-DNA pode ser transferida e integrada no genoma vegetal, sem afetar a regeneração da célula transformada e,

desde que seja conservada a região *vir* do plasmídeo (KLEE; HORSCH; ROGGERS, 1987; BRASILEIRO; DUSI, 1999).

A utilização da transformação genética em citros é particularmente interessante devido às características genéticas da cultura como poliembrião, alta heterozigose e longo período juvenil, que dificultam os programas tradicionais de melhoramento. A obtenção de plantas cítricas geneticamente modificadas oferece vantagens sobre os métodos convencionais de melhoramento, tais como, possibilidade de introdução de material genético em situações em que os organismos são incompatíveis, redução do tempo de obtenção de uma variedade melhorada e restrição à adição de genes indesejáveis em programas de melhoramento, eliminando os efeitos da heterozigotidade dos cruzamentos sexuais, entre outros (MACHADO et al., 2005).

A transformação genética em citros foi relatada pela primeira vez no final da década de 1980 por Kobayashi e Uchimiya (1989), quando utilizaram polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja 'Trovia' (*Citrus sinensis*). Entretanto, não foi obtido sucesso na regeneração das plantas. A primeira laranja transgênica regenerada foi obtida pela regeneração de plantas a partir de células embriogênicas em suspensão da variedade 'Washington Navel' co-cultivadas com *Agrobacterium tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990). A partir daí, vários trabalhos de transformação genética de citros foram descritos pelo tratamento com PEG em protoplastos de limão 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990) e laranjas 'Itaboraí' (*C. sinensis*) (FLEMING et al., 2000), 'Valência' (*C. sinensis*) (GUO et al., 2005) e 'Hamlin' (OMAR; SONG; GROSSER, 2007), por eletroporação de protoplastos de tangerina 'Ponkan' (*C. reticulata* Blanco cv. Ohta) (HIDAKA; OMURA, 1993) e de laranja 'Hamlin' (NIEDZ et al., 2003), por bombardeamento de partículas em células embriogênicas de tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macf.) (YAO et al., 1996) e pelo co-cultivo de segmentos de epicótilo e segmentos internodais de citros com *Agrobacterium tumefaciens* (MOORE et al., 1992; KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1995a, 1995b, 1997, 2004; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; BOND; ROOSE, 1998; CERVERA et al., 1998a, 1998b; LUTH; MOORE, 1999; GHORBEL et al., 2000; YANG et al., 2000; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003a, 2003b; MOLINARI et al., 2004; BOSCARIOL et al., 2006) e com *Agrobacterium rhizogenes* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1998; CHÁVEZ-VELA; CHÁVEZ-ORTIZ; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, 2003).

A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido a mais frequentemente utilizada por não requerer uso de calos embriogênicos ou de um sistema complexo de regeneração de plantas a partir de protoplastos (FLEMING et al., 2000). Entretanto, a eficiência de transformação muitas vezes tem sido baixa e afetada por diversos fatores, além de os protocolos demonstrarem especificidade para a variedade ou espécie (PEÑA et al., 1995a, 1995b; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; BOND; ROOSE, 1998). Além disso, algumas variedades importantes como a laranja azeda (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997) e a laranja 'Pêra' tem se mostrado recalcitrantes ao processo de transferência gênica, restringindo o número de plantas obtidas. Dentre os fatores que afetam a regeneração de plantas transgênicas, são relatados o cultivo (CERVERA et al., 1998; PEÑA et al., 1997), a estirpe de *Agrobacterium* (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; BOND; ROOSE, 1998), o tipo de explante (MOORE et al., 1992; FLEMING et al., 2000; MENDES et al., 2002), o genótipo utilizado (ALMEIDA et al., 2003), e as condições de incubação no co-cultivo (MENDES et al., 2002).

Os explantes provenientes de tecidos juvenis são os mais utilizados nos experimentos de transformação genética. Porém, tem sido relatada a importância de se obter plantas transformadas geneticamente a partir de tecido adulto (ALMEIDA et al., 2003a; KOBAYASHI et al., 2003). As estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* mais utilizadas no processo de transferência gênica são EHA 101 e EHA 105 pelos bons resultados demonstrados (PEÑA et al., 1995b; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; MENDES et al., 2002). Entretanto, foram verificadas também melhores respostas utilizando a estirpe C58C1 (BOND; ROOSE, 1998).

Para a seleção de plantas transgênicas, é comum a utilização do gene *nptII*, que confere resistência à canamicina (BOND; ROOSE, 1998; ALMEIDA et al., 2003a, 2003b; BOSCARIOL et al., 2006). Entretanto, tem sido observada a regeneração de elevado número de escapes (PEÑA et al., 1997; DOMINGUEZ et al., 2004). A utilização de outros genes como *manA* (BOSCARIOL et al., 2003) tem sido relatados como métodos alternativos para seleção de plantas transgênicas de citros. A transformação pode ser confirmada com o emprego de genes repórteres como o GUS (DOMINGUEZ et al., 2000; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003b) e o GFP (FLEMING, et al., 2000; OMAR; SONG; GROSSER, 2007).

Em citros, já foram introduzidos genes de interesse agrônômico como o gene *HAL2* em citrange 'Carrizo', para tolerância à salinidade (CERVERA et al., 2000), o gene *gna*, que confere resistência contra afídeos, em pomelo 'Rio Red' (YANG et al., 2000), os genes *lfy* e *ap1* de

*Arabidopsis* em citrange ‘Carrizo’, que tiveram o período de juvenilidade diminuído, com plantas florescendo já no primeiro ano de cultivo (PEÑA et al., 2001) e outros genes visando resistência a doenças.

## 2.6 Transformação genética para resistência a doenças

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento é a obtenção de variedades resistentes a doenças. Em citros, a maior parte dos progressos obtidos na transformação genética buscando resistência a doenças baseia-se na resistência derivada do patógeno, a qual consiste na expressão de partes do seu genoma (SANFORD; JOHNSTON, 1985).

Com o propósito de obter resistência ao vírus homólogo, foram obtidas plantas transgênicas de citros contendo gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (CTV). Esse gene pode promover resistência ao CTV e já foi introduzido em citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) e laranja ‘Pineapple’ (*C. sinensis*) (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997), em laranja azeda (*C. aurantium*) (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; DOMÍNGUEZ et al., 2000; GHORBEL et al., 2000; CHÁVEZ-VELA; CHÁVEZ-ORTIZ; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, 2003), em lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*) (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; DOMÍNGUEZ et al., 2000;) e em pomelo (*C. paradisi* cv Duncan) (FEBRES et al., 2003) e em laranja ‘Hamlin’ e limão ‘Cravo’ (SCHINOR, 2006).

O primeiro trabalho de transformação genética com o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros foi realizado com laranja azeda (*C. aurantium*), lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*), citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) e laranja ‘Pineapple’ (*C. sinensis*). Foram utilizadas duas estirpes de *A. tumefaciens*, EHA 101 e A518. Antes da inoculação, ferimentos foram feitos nos explantes (segmento internodal de 3-4 meses de idade) por bombardeamento de partículas (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997).

Outros genes relacionados com resistência a doenças também já foram introduzidos em citros. O gene *PR-5*, de uma proteína relacionada com patogênese, acarretou uma redução significativa no desenvolvimento de lesões causadas por *Phytophthora citrophthora* em laranja ‘Pineapple’ (FAGOAGA et al., 2001). O gene *p12*, que codifica uma proteína RP, foi introduzido em plantas de citrange ‘Carrizo’ visando resistência ao declínio. Esta proteína é encontrada em plantas com sintomas de declínio e ausente em plantas sadias (KAYIM, 2004). O gene *bO*,



introduzido em limão ‘Cravo’, resultou na diminuição dos sintomas causados por *Phytophthora* (AZEVEDO et al., 2006). Plantas de laranja ‘Hamlin’ foram transformadas com o gene *Xa21* e apresentaram 35 a 58% de redução na severidade do cancro cítrico (CARDOSO et al., 2006). Resultados preliminares demonstraram redução nos sintomas de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo o gene *hrpN* (BARBOSA-MENDES, 2007).

A produção de peptídeos antibacterianos está entre as estratégias que tem sido destacadas visando aumentar a resistência de plantas a doenças. Plantas transgênicas de laranja ‘Pêra’ contendo o gene da sarcotoxina (peptídeo antibacteriano isolado de larvas de *Sarcophaga peregrina*, pertencente ao grupo das cecropinas) foram obtidas. Os resultados da avaliação de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. mostraram que as plantas com maiores quantidades de sarcotoxina foram mais resistentes à bactéria (BESPALHOK FILHO et al., 2001b). Com a introdução do gene *attA*, houve redução na severidade do cancro cítrico em laranja ‘Hamlin’ (BOSCARIOL et al., 2006). Paoli et al. (2007) obtiveram plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene *cecropin* MB39 dirigido pelo promotor do gene da fenilalanina amônia-liase, que confere expressão gênica nos vasos do xilema. Essas plantas serão avaliadas para a resistência a *Xylella fastidiosa*.

Plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com seqüências do genoma do CTV foram inoculadas com borbulhas infectadas para avaliação da resistência ao referido vírus. Embora os resultados ainda não sejam conclusivos, avaliações preliminares mostraram diferenças em relação à resistência a translocação do vírus nas plantas com diferentes construções e entre clones destas construções. Foram registradas 12 plantas transgênicas candidatas a apresentarem algum grau de resistência à translocação do CTV (SOUZA et al., 2007).

Buscando resistência ao CTV em linhagens transgênicas de lima ácida ‘Galego’ expressando o transgene p23 do CTV, observou-se que, clones de uma mesma linhagem, apresentaram diferentes respostas à inoculação com o vírus. Essas respostas indicaram tanto susceptibilidade, quanto imunidade ao vírus (FAGOAGA et al., 2006). Na avaliação da resistência ao CTV em plantas transgênicas de pomelo (*Citrus paradisi*), verificou-se que a linhagem mais resistente não mostrou acumulação de RNAm do transgene e demonstrou metilação das citosinas na região do promotor, indicando metilação do DNA dirigida pelo RNA e silenciamento gênico transcricional (FEBRES; LEE; MOORE, 2008).

A capacidade de manipular técnicas de silenciamento gênico tem produzido plantas transgênicas capazes de suprimir a expressão de genes endógenos e ácidos nucléicos invasores, uma ferramenta biotecnológica que pode incrementar com sucesso programas de melhoramento genético de plantas (SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007).

Vários termos têm sido encontrados para descrever o silenciamento gênico: co-supressão, RNA de interferência (RNAi) e “quelling” (interrupção da seqüência gênica). A co-supressão seria o termo aplicado ao silenciamento de um gene endógeno pela ação do RNA do transgene, onde ambos os genes, exógeno e endógeno, são coordenadamente suprimidos. “Quelling” é um termo de co-supressão utilizado em *Neurospora crassa*, e RNAi é aplicado ao silenciamento gênico em animais, ocorrendo pela ação de uma fita dupla de RNA, causando a não transcrição e tradução de determinado gene (BAULCOMBE, 2002). A formação de RNA fita dupla (dsRNA), uma forma de RNA que não ocorre nas células, está relacionada com o silenciamento de genes homólogos ao dsRNA (FIRE et al, 1998).

Acredita-se que a maioria dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência derivada do patógeno esteja relacionada ao silenciamento gênico. Este mecanismo corresponde a uma interação entre seqüências homólogas de DNA ou RNA. Sabe-se que o RNA está envolvido em dois tipos de silenciamento gênico dependente de homologia, o silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT), em que a degradação de RNAs homólogos no citoplasma levaria a não tradução, e o silenciamento gênico transcricional (SGT), relacionado com o bloqueio na transcrição induzido por um RNA antisense derivado do próprio DNA, que promoveria uma metilação na região promotora, no núcleo, e a homologia para a metilação dirigida ocorreria nas regiões transcritas (FAGARD; VAUCHERET, 2000; WASSENEGGER, 2000; VAUCHERET; BÉCLIN; FAGARD, 2001).

A presença de um RNA aberrante (abRNA) de, aproximadamente, 25 nt em senso e antisense, com homologia ao RNA alvo, tem sido observado em plantas que apresentam co-supressão e resistência a vírus, mas que não são encontradas em plantas usadas como testemunha (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999). A resistência a vírus seria explicada, então, pelo fato destes abRNA serem o molde para que as RNA polimerases dependentes de RNA do hospedeiro vegetal, possam sintetizar pequenas moléculas de RNA antisense (MATZKE et al., 2001; MLOTSHWA et al., 2002). Esses pequenos RNA antisense levariam à formação de RNA fita dupla (dsRNA). Um complexo de RNAses específicas para esses dsRNAs, conhecidas como

Complexo DICER ou RNases tipo III, levariam à degradação dessas moléculas híbridas e, em consequência, tornariam a planta resistente ao vírus (CERUTTI, 2003).

O silenciamento de transgenes em cópias múltiplas e invertidas também tem sido explicado pela formação de um RNA em alça (alRNA), que, posteriormente, se transformaria em dsRNA pela ação de RNA nucleases causando o efeito do silenciamento conforme descrito acima (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001). De modo similar, o dsRNA poderia também ser usado como molde para algumas RNAs polimerases que transcreveriam moléculas de RNA antisense, homólogos aos mRNAs, formando os dsRNA e continuando o rotas silenciamento (FAGARD; VAUCHERET, 2000).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Organogênese *in vitro* de laranja azeda

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), pertencente à Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

##### 3.1.1 Indução e regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função de fitorreguladores

Os explantes provenientes de segmentos de epicótilo foram obtidos a partir de sementes extraídas de frutos maduros de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. As sementes foram lavadas para retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente por cerca de 24 horas. Posteriormente, essas sementes tiveram seus tegumentos retirados e foram submetidas a desinfestação em solução 3:1 de água e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), durante 20 minutos, sob agitação. Após este período, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas, e incubadas *in vitro*, em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup> e 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e pH ajustado para 5,8.

Para obtenção do epicótilo alongado, a incubação foi realizada em ausência de luz durante 30 dias, a 27 °C. Posteriormente, as plântulas germinadas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas por 10 a 15 dias, quando foram utilizadas como fonte de explantes, que se constituíram de segmentos de epicótilo de 0,8-1,0 cm de comprimento.

Para a avaliação da indução e regeneração de gemas adventícias, no primeiro experimento, segmentos de epicótilo (0,8-1,0 cm de comprimento) de plântulas germinadas *in vitro* foram introduzidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura MT sem fitorregulador e suplementado com TDZ (thidiazuron) (0,01 e 0,02 mg L<sup>-1</sup>), BAP (6-benzilaminopurina) (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) ou CIN (cinetina) (1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>). As placas contendo os explantes foram incubadas a 27 °C, por 30 dias em ausência de luz, seguidos de 30 dias em

fotoperíodo de 16 h ou diretamente em fotoperíodo de 16 h por 60 dias, constituindo-se assim, em duas condições de cultivo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 2 (meios de cultivo e condição de luminosidade), com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 20 explantes. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados o percentual de explantes responsivos (explantes que desenvolveram gemas) e o número de gemas por explantes responsivos.

No segundo experimento, segmentos de epicótilo foram cultivados em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura MT sem regulador e suplementado com BAP (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) ou CIN (1,0; 2,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>), em concentrações combinadas ou não com ANA (ácido naftalenoacético) (0,3 mg L<sup>-1</sup>) para a avaliação da indução de brotações adventícias. As placas contendo os explantes foram incubadas a 27 °C durante 35 dias em ausência de luz, quando foi realizada a primeira avaliação, seguidos de 35 dias em fotoperíodo de 16 h, época da avaliação final, quando foram observados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas por explantes responsivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 20 explantes.

No terceiro experimento, segmentos de epicótilo foram cultivados em meio de cultura MT sem regulador e suplementado com concentrações de BAP (1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>), CIN (1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>), BAP + CIN (1,0 + 1,0 mg L<sup>-1</sup>), BAP + CIN (1,0 + 2,0 mg L<sup>-1</sup>) e BAP + CIN (2,0 + 1,0 mg L<sup>-1</sup>). As placas contendo os explantes foram incubadas a 27 °C em ausência de luz por 30 dias, e em seguida submetidas a fotoperíodo de 16 h. Após 60 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas e/ou brotações por explantes responsivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 20 segmentos (explantes).

### **3.1.2 Indução e regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo e segmentos internodais de laranja azeda em função de BAP e CIN**

Os segmentos de epicótilo foram obtidos conforme descrição no item anterior (3.1.1). Os segmentos internodais foram obtidos de ramos de plantas juvenis (cerca de dois anos de idade) de laranja azeda cultivadas em sacolas plásticas (35 cm x 20 cm) contendo substrato Rendmax Citrus<sup>TM</sup>, sobre bancadas de concreto de 30 cm de altura, em estufa (temperatura máxima em

torno de 37 °C e mínima de 18 °C e umidade em torno de 60%). Essas plantas foram constantemente podadas, preservando-se a haste principal, para a formação de novos ramos laterais que foram coletados como fonte de explantes com cerca de 2 a 3 semanas de idade. A assepsia dos segmentos foi realizada em solução de água e hipoclorito (2,5% de cloro ativo) na proporção 2:1, durante 20 minutos. Em seguida, foram lavados três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas. Utilizaram-se segmentos internodais de 0,8-1,0 cm de comprimento como explantes, descartando-se as gemas laterais dos ramos.

Os explantes (segmentos de epicótilo e segmentos internodais) foram introduzidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura MT suplementado com BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,3 mg L<sup>-1</sup>) ou CIN (1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,3 mg L<sup>-1</sup>). A incubação foi realizada a 27 °C, em ausência de luz durante 30 dias, seguidos de 30 dias de fotoperíodo de 16 horas. Posteriormente, foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas e/ou brotações por explantes responsivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (tipo de explante e tipo de citocinina), com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 20 explantes.

### **3.1.3 Indução e regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função da composição do meio de cultura**

Segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* foram introduzidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e DBA3 (DENG; GROSSER; GMITER, 1992) com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,3 mg L<sup>-1</sup> de ANA. A incubação foi realizada a 27 °C, em ausência de luz durante 30 dias e em seguida submetida a fotoperíodo de 16 horas por mais 30 dias, quando foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas e/ou brotações por explantes responsivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 20 segmentos de epicótilo.

### 3.1.4 Indução e regeneração de gemas adventícias, e obtenção de plantas *in vitro* a partir de diferentes explantes de laranja azeda

A região do epicótilo alongado de plântulas germinadas *in vitro* (alongado pela germinação e cultivo no escuro seguido de luminosidade), Epi A; epicótilo curto de plantas germinadas *in vitro* (curto, pela germinação em fotoperíodo de 16 horas), Epi C; segmentos internodais de plantas germinadas *in vitro*, excluindo a região do epicótilo, SI *in vitro*; e segmentos de ramos de plantas juvenis cultivadas em casa de vegetação, SI cv, foram utilizados como fonte de explantes. O epicótilo alongado (Epi A) e os segmentos internodais de plantas de casa de vegetação (SI cv) foram obtidos conforme descrição em itens anteriores. Para obtenção dos segmentos internodais das plantas germinadas *in vitro* (SI *in vitro*) e epicótilo curto (Epi C), as sementes de laranja azeda foram germinadas sob fotoperíodo de 16 horas. Após 45 a 60 dias, as plantas obtidas foram utilizadas como fonte de explantes, que se constituíram de segmentos de 0,8-1,0 cm de comprimento.

Para a indução e desenvolvimento de gemas adventícias, os explantes foram cultivados em meio MT suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. A incubação foi realizada a  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias em ausência de luz, e em seguida, sob fotoperíodo de 16 h por 30 dias. Após esse período, foram avaliados o percentual de explantes responsivos e o número de gemas e/ou brotações por explantes responsivos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo 20 explantes. Posteriormente, as brotações regeneradas foram submetidas a condições de enraizamento.

Para o enraizamento, brotações com cerca de 1,0 cm de comprimento foram transferidas para meio de cultivo MT com metade da concentração de sais e acrescido de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, na ausência de auxina, suplementado com IBA ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou com ANA ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Este experimento foi realizado com brotações provenientes dos explantes Epi A, Epi C e SI *in vitro*. A incubação foi feita a  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$  sob fotoperíodo de 16 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $3 \times 3$  (origem do explante e meio de cultivo), com seis repetições, sendo cada repetição constituída de uma caixa Magenta <sup>TM</sup> contendo 5 brotos. Após 60 dias de cultivo foi avaliado o percentual de brotos que emitiram raízes.

### 3.2 Transformação genética

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

#### 3.2.1 Material vegetal

Segmentos internodais de ramos de plantas juvenis de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia*) e laranja ‘Valência’ (*C. sinensis*), foram utilizadas como fonte de explantes. As plantas com cerca de dois anos de idade, foram cultivadas em sacolas plásticas (35 cm x 20 cm) contendo substrato Rendmax Citrus™, sobre bancadas de concreto de 30 cm de altura, em casa de vegetação. Essas plantas foram constantemente podadas, preservando-se a haste principal, para a formação de novos ramos laterais que foram coletados como fonte de explantes com cerca de 2 a 3 semanas de idade. A assepsia dos segmentos foi realizada em solução de água e hipoclorito (2,5% de cloro ativo) na proporção 2:1, durante 20 minutos. Em seguida, foram lavados três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas. Utilizaram-se segmentos internodais de 0,8-1,0 cm de comprimento como explantes, descartando-se as gemas laterais dos ramos.

Outra fonte de explante utilizada foi segmentos de epicótilo de laranja ‘Valência’, obtidos *in vitro*. Para tal, sementes extraídas de frutos maduros foram lavadas para retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente por cerca de 24 horas. Posteriormente, essas sementes tiveram seus tegumentos retirados e foram submetidas a desinfestação em solução 3:1 de água e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), durante 20 minutos, sob agitação. Após este período, foram lavadas três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas, e incubadas *in vitro*, em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™ e 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e pH ajustado para 5,8. A incubação foi realizada em ausência de luz durante 30 dias, a 27 °C. Posteriormente, as plântulas germinadas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas por 10 a 15 dias, quando foram utilizadas como fonte de explantes, que se constituíram de segmentos de epicótilo de 0,8-1,0 cm de comprimento.



### 3.2.2 Gene e vetor de expressão

A construção gênica utilizada nos experimentos de transformação genética foi gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo. Essa construção foi elaborada com base no plasmídeo pCAMBIA 2201 e introduzida na estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*. Contém o gene de interesse (replicase do *Marafivírus*), dirigido pelo promotor 35S e o terminador NOS, e o gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina (Figura 1).

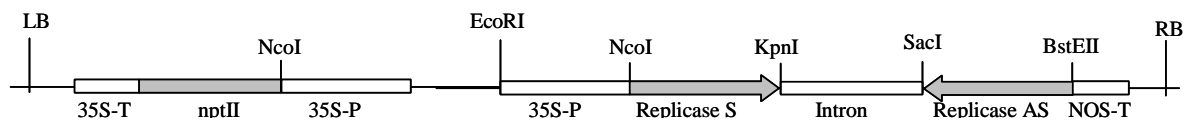


Figura 1 – Representação esquemática da sequência gênica contendo o gene da replicase do *Marafivírus* em uma construção tipo hairpin.

Para obtenção da sequência do *Marafivírus*, foi amplificada uma região da replicase do mesmo, entre os nucleotídeos 4903 a 5535 do genoma viral, através de RT-PCR. Posteriormente, esta região foi clonada nos sentidos senso e antisenso, separadas por um íntron obtido do gene da quitinase dos citros (construção tipo hairpin), entre um promotor CaMV35S e o terminador NOS, no plasmídeo pCAMBIA 2201. A sequência foi amplificada a partir de uma amostra de planta cítrica com sintomas de MSC, coletada no município de Comendador Gomes, MG.

### 3.2.3 Manutenção do isolado e cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

O isolado de *A. tumefaciens* foi mantido em solução de glicerol (50%) e conservado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , e um estoque de trabalho em tubos contendo 1,0 mL de meio de cultura YEP sólido foi mantido em geladeira ( $4^{\circ}\text{C}$ ). A partir desse estoque trabalho, o isolado foi cultivado em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura YEP sólido, suplementado com os antibióticos canamicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ), por 48 horas a  $27^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, para os experimentos de transformação genética (Figura 2), uma colônia isolada foi transferida para 50 mL de meio de cultura YEP líquido suplementado com os antibióticos

canamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), incubando-se por 16 horas em agitador orbital (180 rpm), a  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após este período, a suspensão bacteriana foi quantificada em espectrofotômetro (600 nm), centrifugada a 4800 rpm, a  $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. O precipitado obtido foi ressuspensionado em meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) líquido, para concentração de  $5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ .

### **3.2.4 Inoculação e co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***

Os explantes foram imersos na suspensão bacteriana ( $5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) em placa de Petri, por 20 minutos. Após esse período de inoculação, os explantes foram secos a temperatura ambiente, em papel filtro estéril. Posteriormente, segmentos de epicótilo foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura MT sólido suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (6-benzilaminopurina) e segmentos internodais para meio MT com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

### **3.2.5 Seleção e regeneração de brotações adventícias**

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para o mesmo meio de cultura utilizado no co-cultivo, suplementado com os antibióticos canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), para a seleção de brotos transformados, e cefotaxima ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou timentin ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), para inibição do crescimento de *A. tumefaciens*. As placas com os explantes foram incubadas em ausência de luz, a  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o início do desenvolvimento das gemas adventícias, quando foram então transferidos para fotoperíodo de 16 horas. Os explantes foram mantidos no meio de cultura com sub-cultivos a cada 15 dias, até que as gemas desenvolvessem os primeiros pares de folhas.

### **3.2.6 Microenxertia e aclimatização das plantas**

As brotações desenvolvidas foram microenxertadas em plântulas de citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) ou laranja ‘Hamlin’ (*C. sinensis*), ambas germinadas *in vitro*, para crescimento e posterior aclimatização. Para a microenxertia, foram removidos os cotilédones e o ápice caulinar dos porta-enxertos, e as brotações provenientes da transformação

genética foram microenxertadas na região terminal do porta-enxerto, após esta ter recebido um pequeno corte em T invertido. As plantas microenxertadas foram mantidas *in vitro* e incubadas sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C. Diariamente, foi observada a sobrevivência da enxertia e surgimento de brotações do porta-enxerto, que foram removidas para garantir o melhor desenvolvimento do broto microenxertado.

Após o desenvolvimento dos brotos microenxertados (cerca de 45 a 60 dias), as plantas foram transferidas para vasos plásticos pequenos (0,5 L) contendo substrato (Plantmax™) autoclavado e incubadas em condições de alta umidade, sendo esta posteriormente reduzida aos poucos, até a completa aclimatização para condições ambiente. As plantas aclimatizadas foram analisadas e, as identificadas como transgênicas, foram transplantadas para vasos maiores (5 L) e mantidas em estufa certificada para o cultivo de plantas transgênicas.

### **3.2.7 Análise das plantas regeneradas**

#### **3.2.7.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para detecção do transgene nas plantas regeneradas, utilizando-se “primers” específicos para detecção do gene. Para isto, o DNA foi extraído pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com a maceração de fragmentos de folhas com nitrogênio líquido e analisado por PCR. A amplificação foi realizada utilizando-se 1,0 µL de DNA (50-100 ng), 0,2 µL dNTPs (10 mM), 0,8 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,0 µL de tampão (10x), 0,3 µL Taq polimerase (5 U/µL) e 0,3 µL dos primers (10µM), em uma reação final de 20µL. Para detecção do gene da replicase do *Marafivirus* foram utilizados os “primers”: MSC11 (5’-GGTGACCCTGATTGGCGGT-3’) e MSC14 (5’-GAGCTCGACCCCTTTCTT - 3’) e as reações foram submetidas ao termociclador (PTC-100™, MJ Research, Inc.) com o programa: 94 °C/4min; 39 ciclos de 94 °C/30s, 58 °C/30s e 72 °C/45s; e 72 °C/4min, amplificando um fragmento de 630 pb.

O produto da reação de amplificação obtido foi separado por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>), utilizando-se tampão TBE (0,5 x), a uma voltagem de 60 V. O gel foi visualizado e fotografado em luz UV.

### 3.2.7.2 'Southern blot'

A análise de 'Southern blot' foi realizada para confirmar a integração do transgene no genoma da planta. Para tal, o DNA das plantas positivas para a PCR e plantas não transgênicas (controle negativo), cultivadas em estufa, foi extraído de folhas jovens. Utilizou-se o método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), acrescentando-se uma lavagem com fenol e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para uma melhor purificação do ácido nucléico. Aproximadamente 60 µg do DNA de cada planta obtida foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, separados por eletroforese em gel de agarose (1%) e transferidos para membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences).

A sonda foi preparada por PCR e o fragmento amplificado, 630 pb, foi purificado utilizando-se o kit "QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction" (Qiagen) e posteriormente, submetidos à marcação com o kit "AlkPhos Direct Labelling Reagents" (Amersham Biosciences). A hibridação foi realizada a 60 °C em forno de hibridização (Amersham Biosciences) por cerca de 16 horas e a reação de detecção foi feita com "CDP-Star<sup>™</sup> Detection Reagent" (Amersham Biosciences).

### 3.2.7.3 RT-PCR

Esta análise foi realizada a fim de confirmar a transcrição dos transgenes nas plantas. A extração de RNA total das plantas analisadas foi feita com cerca de 60 mg de tecido foliar com o auxílio do produto comercial TRIzol (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para cada amostra de planta, cerca de 5,0 µg de RNA foi tratado com DNase (Promega) em uma reação final de 10,0 µL contendo 1,0 µ de buffer (10x) e 2,5 µL de DNase (1u/µL). O cDNA foi obtido utilizando-se a enzima SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Inicialmente preparou-se uma reação 1, num volume final de 12 µL, contendo 1,0 µL de oligo (dT), 1,0 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µg de RNA e água, que foi incubada a 65°C em termociclador durante 5 min, em seguida resfriada no gelo por 1 min e, finalmente, foi adicionada a esta reação, uma reação 2 preparada com 4,0 µL de First-Strand Buffer (5x), 1,0 µL de DTT (0,1 M) e 0,5 µL da enzima SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase. Essa solução final foi incubada a 42°C durante 1 h. Em seguida, para inativar a reação, a solução foi aquecida a 70°C por 15 min. O cDNA

obtido foi submetido a uma reação de PCR, como descrito no item 3.3.6.2. Como controle negativo da reação foi utilizado o RNA total de uma planta não transformada.

#### **3.2.7.4 'Northern blot'**

Assim como a RT-PCR, análises de 'northern blot' foram realizadas com o objetivo de confirmar a transcrição dos genes nas plantas transgênicas. O RNA total dessas plantas mantidas em estufa, bem como, de uma planta não transformada (controle negativo), foi extraído usando-se o protocolo do TRIzol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A eletroforese em gel desnaturante com agarose (1%) foi realizada com 30 µg de RNA de cada planta avaliada. O RNA separado em gel foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences) e hibridizado com a mesma sonda utilizada nas análises de 'Southern blot'. A sonda do gene *nptII* (gene da canamicina) foi preparada da mesma forma como preparou-se a sonda do gene da replicase do *Marafivirus*. As hibridações foram realizadas a 60 °C e a detecção foi realizada com "CDP-Star<sup>TM</sup> Detection Reagent" (Amersham Biosciences).



Figura 2 – Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*. **a.** Seleção de colônia bacteriana para crescimento em meio YEP líquido; **b, c.** Meio líquido com colônia de bactéria para crescimento por 16 horas sob agitação; **d.** Plântula germinada *in vitro* em ausência de luz para estiolamento do epicótilo (esquerda), e plântula, após 15 dias sob fotoperíodo de 16 h (direita); **e.** Segmentos de epicótilo utilizados como explantes; **f.** Segmentos internodais utilizados como explantes; **g.** Meio YEP com bactéria após período de crescimento; **h.** Meio YEP descartado após centrifugação para ressuspensão do pelet com meio MT líquido; **i, j.** Inoculação dos explantes; **k.** Secagem dos segmentos internodais antes do plaqueamento; **l.** Plaqueamento dos explantes para co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*; **m.** Explante com crescimento de bactéria após 3 dias de co-cultivo

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Organogênese *in vitro* de laranja azeda

#### 4.1.1 Indução e regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função de fitorreguladores

Observou-se o efeito de TDZ, BAP e CIN no meio de cultivo na indução de brotações adventícias em duas condições de luminosidade. Ocorreu interação entre meio de cultivo x condições de luminosidade. O cultivo dos explantes diretamente em fotoperíodo de 16 h promoveu melhor resposta, tanto para o percentual de explantes responsivos, quanto para o número de gemas regeneradas por explante em todos os meios de cultivos utilizados, ou seja, independente da ausência ou presença de fitorregulador, nas suas concentrações (Tabela 1).

Tabela 1 – Explantes responsivos e gemas regeneradas por explante de laranja azeda cultivados em meio MT sem e com fitorregulador, em duas condições de cultivo (fotoperíodo de 16 h e ausência de luz por 30 dias seguidos de fotoperíodo de 16 h), após 60 dias de incubação

| Meio de cultura sem e com<br>fitorregulador (mg L <sup>-1</sup> ) | Condição de cultivo             |                             |
|---|---------------------------------|-----------------------------|
|   | Fotoperíodo de 16 h             | Ausência de luz por 30 dias |
|   | Explantes responsivos*          |                             |
|   | ----- (%) -----                 |                             |
| MT  | 51,0 A c                        | 23,0 B ab                   |
| MT + 0,01 TDZ   | 58,8 A bc                       | 2,5 B c                     |
| MT + 0,02 TDZ   | 56,7 A c                        | 1,7 B c                     |
| MT + 0,5 BAP  | 80,0 A ab                       | 25,0 B a                    |
| MT + 1,0 BAP  | 82,5 A a                        | 21,3 B ab                   |
| MT + 1,0 CIN  | 65,0 A abc                      | 24,0 B a                    |
| MT + 2,0 CIN  | 83,0 A a                        | 26,0 B a                    |
|   | Gemas regeneradas por explante* |                             |
|   | ----- (número) -----            |                             |
| MT  | 1,2 A <sup>ns</sup>             | 1,1 B a                     |
| MT + 0,01 TDZ   | 1,4 A <sup>ns</sup>             | 0,5 B bc                    |
| MT + 0,02 TDZ   | 1,4 A <sup>ns</sup>             | 0,3 B c                     |
| MT + 0,5 BAP  | 1,3 A <sup>ns</sup>             | 1,0 B ab                    |
| MT + 1,0 BAP  | 1,3 A <sup>ns</sup>             | 1,1 B a                     |
| MT + 1,0 CIN  | 1,3 A <sup>ns</sup>             | 1,2 B a                     |
| MT + 2,0 CIN  | 1,2 A <sup>ns</sup>             | 1,0 B ab                    |

\* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula (na linha) e minúscula (na coluna), em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); <sup>ns</sup> não significativo ( $P < 0,05$ ).

A análise conjunta dos resultados indicou que o cultivo dos explantes diretamente em fotoperíodo de 16 h e a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP ou 2,0 mg L<sup>-1</sup> de CIN (Figura 3) constituíram-se na condição mais favorável à regeneração de gemas adventícias, de modo que, partindo-se de 100 explantes, pode-se obter respectivamente, cerca de 104, 107 e 100 gemas. O TDZ demonstrou ser o menos indicado à indução de resposta morfo genética em segmentos de epicótilo de laranja azeda.

Melhores respostas na indução e regeneração de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de citrange ‘Troyer’ (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) e laranja ‘Pêra’ (*C. sinensis*) foram observadas por Moreira-Dias et al. (2000) e Silva et al. (2005a), respectivamente em seus estudos, quando cultivaram os explantes sob fotoperíodo de 16 h. Entretanto, em outro trabalho, a máxima proliferação de gemas adventícias de tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni*) foi observada quando os explantes (segmentos de epicótilo) foram incubados primeiramente em escuro por 30 dias (SILVA et al., 2005b). A incubação de explantes de laranja ‘Pineapple’ (*C. sinensis*) em ausência de luz também aumentou a regeneração de gemas e brotações e a conseqüente conversão em plantas. Entretanto, naquele caso, foram utilizados segmentos internodais como explantes (DURAN-VILA et al., 1992). Na transformação genética de laranja ‘Hamlin’, foi constatado que o co-cultivo de segmentos de epicótilo com *Agrobacterium tumefaciens* na ausência de luminosidade foi mais eficiente na regeneração e obtenção de brotos adventícios expressando o transgene (Mendes et al., 2002). Em se tratando dos trabalhos em que se utilizaram segmentos de epicótilo e, considerando que foi adicionado BAP ao meio de cultivo, as diferenças encontradas nesses trabalhos e no presente estudo, provavelmente, se devem aos diferentes genótipos estudados. Em citros, muitos trabalhos têm evidenciado uma grande influência da espécie ou cultivar, seja na organogênese *in vitro* (DURAN-VILA; NAVARRO, 1989; GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998; SCHINOR, 2006), seja na transformação genética (MOORE et al., 1992; PEÑA et al, 1995b; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997), sugerindo a necessidade de estudos específicos para ajustes de protocolos de regeneração *in vitro*.

Diferentes concentrações de BAP e TDZ foram testadas em combinação ou não com ANA na propagação *in vitro* de toranja (*Citrus grandis* L. Osbeck) (PALDYAL; IIAQ, 2000). Foi verificado que o BAP mostrou-se muito eficaz na indução de múltiplas brotações, apesar de o número de brotos por explante decrescer gradualmente em concentrações superiores a 2,2 µM. O



maior número de brotos foi obtido na concentração 1,8  $\mu\text{M}$  BAP. Entretanto, TDZ não mostrou resultados satisfatórios para todas as concentrações utilizadas, acarretando em uma alta taxa de mortalidade dos explantes.

Neste trabalho, as concentrações de TDZ utilizadas, 0,01 e 0,02  $\text{mg L}^{-1}$  (correspondentes a 0,05 e 0,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente) não prejudicaram a resposta organogênica quando os explantes foram cultivados sob fotoperíodo de 16 h. Contudo, a maior dose utilizada refletiu numa resposta menos favorável, e inclusive, levou a morte de explantes quando cultivados em ausência de luz (Figura 3c).



Figura 3 – Indução e regeneração *in vitro* de brotações adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h). **a.** Explantes em MT com 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP; **b.** Explantes em 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  de CIN; **c.** Explantes em MT com 0,02  $\text{mg L}^{-1}$  de TDZ

A suplementação de combinações de citocininas e auxinas nos meios de cultura têm apresentado resposta variada na indução e formação de gemas adventícias em explantes de citros cultivados *in vitro*. No segundo experimento, diferentes concentrações de BAP e CIN combinadas ou não com ANA foram testadas para avaliação da resposta organogênica *in vitro* de segmentos de epicótilo de laranja azeda. Os explantes foram incubados em ausência de luz por 35 dias e, em seguida, avaliados e submetidos a fotoperíodo de 16 h. A suplementação de BAP em combinação ou não com ANA mostrou-se favorável a obtenção de explantes responsivos. Entretanto, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de CIN e, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de CIN e 3,0  $\text{mg L}^{-1}$  de CIN combinados com 0,3  $\text{mg L}^{-1}$  ANA, não demonstraram indução de organogênese (Tabela 2). Posteriormente, com o cultivo sob condições de fotoperíodo de 16 h, o percentual de explantes que desenvolveu gemas respondeu substancialmente em cultivo com 3,0  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP e 0,3  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA, proporcionando uma média de 76,7% de explantes responsivos. Schinor et al. (2006) constataram

que a suplementação com BAP ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi fundamental para citrange ‘Carrizo’, elevando de 40,7 para 93,3% o número explantes responsivos. Porém, nesse mesmo estudo, essa suplementação não foi favorável à laranja azeda e laranjas ‘Natal’ e ‘Pêra’ que obtiveram maiores percentuais (77,3; 92,0 e 77,2%, respectivamente) quando os explantes foram cultivados em meio MT sem fitorregulador. Com isso, esses autores consideraram que, embora o uso de reguladores estimule a organogênese, nem sempre sua utilização no meio de cultura é considerada essencial. As diferentes respostas quanto à necessidade do uso de reguladores na regeneração *in vitro* tem sido relatada (BORDÓN ; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; MOREIRA-DIAS et al., 2000; SILVA et al., 2005a), e pode ser atribuída a fatores como tipo e estado fisiológico do explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Tabela 2 – Explantes responsivos e gemas regeneradas por explante de laranja azeda cultivados em função da composição do meio de cultivo, avaliados aos 35 (ausência de luz) e 70 dias de cultivo (35 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h)

| Meio de cultura sem e com fitorregulador ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | Explantes responsivos (%) <sup>*</sup> | Gemas por explante (n <sup>o</sup> ) <sup>ns</sup> | Explantes responsivos (%) <sup>*</sup> | Gemas por explante (n <sup>o</sup> ) <sup>*</sup> |
|---|--|--|--|---|
|   | ----- 35 dias de cultivo -----         |  | ----- 70 dias de cultivo -----         |   |
| MT  | 3,3 ab                                 | 0,67   | 70,0 ab                                | 1,17 d  |
| MT + 1,0 BAP  | 16,3 ab                                | 1,08   | 51,3 abc                               | 1,59 bcd  |
| MT + 2,0 BAP  | 13,8 ab                                | 1,08   | 56,3 abc                               | 2,37 a  |
| MT + 3,0 BAP  | 5,0 ab                                 | 0,83   | 61,7 abc                               | 2,09 ab   |
| MT + 1,0 BAP + 0,3 ANA  | 20,0 ab                                | 1,13   | 58,3 c                                 | 1,42 cd   |
| MT + 2,0 BAP + 0,3 ANA  | 21,7 a                                 | 1,23   | 35,0 c                                 | 2,08 ab   |
| MT + 3,0 BAP + 0,3 ANA  | 18,3 ab                                | 1,26   | 76,7 a                                 | 1,86 abc  |
| MT + 1,0 CIN  | 0,0 b                                  | 0,00   | 73,3 ab                                | 1,18 d  |
| MT + 2,0 CIN  | 2,5 ab                                 | 0,50   | 70,0 ab                                | 1,15 d  |
| MT + 3,0 CIN  | 2,5 ab                                 | 0,25   | 71,3 ab                                | 1,30 cd   |
| MT + 1,0 CIN + 0,3 ANA  | 0,0 b                                  | 0,00   | 68,3 ab                                | 1,17 d  |
| MT + 2,0 CIN + 0,3 ANA  | 1,6 ab                                 | 0,33   | 56,7 abc                               | 1,12 d  |
| MT + 3,0 CIN + 0,3 ANA  | 0,0 b                                  | 0,00   | 46,7 bc                                | 1,18 d  |

\* Médias seguidas de mesma letra (coluna), em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>ns</sup> Não significativo ( $P < 0,05$ )

A concentração de fitorreguladores influenciou a indução de gemas por explante responsivo, sendo os maiores valores observados em meio de cultivo com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Tabela 2). A utilização de CIN não favoreceu a indução de gemas, mas, aquelas formadas tornaram-se brotações bem desenvolvidas.

Avaliando o efeito da interação BAP x cultivares de citros, Almeida et al. (2002) verificaram que a concentração  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP promoveu os maiores percentuais de explantes responsivos, considerando os explantes que desenvolveram brotações com cerca de 1,0 cm, para as laranjas ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Hamlin, com 85,4, 75 e 71,4%, respectivamente, e também foi a mais indicada para regeneração de brotos adventícios para estas cultivares, obtendo-se respectivamente, uma média de 1,59, 1,76 e 2,43 brotações por explante responsivo. Por outro lado, em limão ‘Cravo’, não houve influência do BAP avaliado em diferentes concentrações ( $0,0 - 4,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) para o percentual de explante responsivo. Entretanto, o maior número de brotações (1,57 por explante) foi obtido meio MT suplementado com  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  do referido regulador.

Combinações entre BAP e ANA foram estudadas na organogênese de limão ‘Cravo’ e laranja azeda. Constatou-se que a presença do BAP foi fundamental para induzir resposta morfo genética e, em combinações com baixos níveis de ANA, estimulou a regeneração de gemas. Porém, naquele estudo foram utilizados segmentos internodais como explantes (SCHINOR, 2006).

Neste trabalho, considerou-se satisfatório o número de gemas que se desenvolveram em brotações com mais de 0,5 cm de comprimento. Suplementações com  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP ou  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA ao meio MT constituíram-se nas melhores condições para induzir resposta organogênica em segmentos de epicótilo de laranja azeda, proporcionando um número médio de aproximadamente 133 e 142 gemas regeneradas, respectivamente, a cada 100 explantes introduzidos. Outros trabalhos também demonstraram que baixas concentrações de ANA combinadas com BAP estimularam a indução de gemas adventícias no cultivo *in vitro* de citrange ‘Troyer’ (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) (EDRISS; BURGER, 1984; MOREIRA-DIAS et al., 2000) e lima ‘Mexicana’ (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing.) e tangerina ‘Monica’ (*Citrus reticulata* Blanco cv. Monica) (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997).

No terceiro experimento, as citocininas BAP e CIN, também foram avaliadas em concentrações isoladas e combinadas entre si, na indução e formação de gemas adventícias. Não houve influência desses fitorreguladores no percentual de explantes responsivos. Com relação ao número de gemas por explantes responsivos, os maiores valores observados (3,14 por explante) foram obtidos no meio de cultivo suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Tabela 3).

Tabela 3 – Explantes responsivos, gemas regeneradas e brotações por explante de laranja azeda cultivados em meio MT sem e com fitorregulador (BAP e/ou CIN), após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h)

| Meio de cultura sem e com fitorregulador (mg L <sup>-1</sup> ) | Explantes responsivos <sup>ns</sup> (%) | Gemas por explante* (n°) | Brotações por explante <sup>ns (1)</sup> (n°) |
|--|---|--------------------------|---|
| MT   | 65,0                                    | 1,09 d                   | 0,91  |
| MT + 1,0 BAP   | 65,0                                    | 2,77 ab                  | 1,69  |
| MT + 1,0 CIN   | 45,0                                    | 1,18 d                   | 0,85  |
| MT + 1,0 BAP + 1,0 CIN   | 45,0                                    | 1,69 bcd                 | 0,84  |
| MT + 2,0 BAP   | 80,0                                    | 2,57 ab                  | 1,00  |
| MT + 2,0 CIN   | 50,0                                    | 1,28 cd                  | 0,77  |
| MT + 1,0 BAP + 2,0 CIN   | 55,0                                    | 2,45 abc                 | 1,27  |
| MT + 1,0 CIN + 2,0 BAP   | 70,0                                    | 3,14 a                   | 0,86  |

\* Médias seguidas de mesma letra (coluna), em cada variável, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>ns</sup> Não significativo ( $P < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Gemas que se desenvolveram em brotações com aproximadamente 1,0 cm de comprimento.

O efeito dos fitorreguladores BAP, CIN e ANA, isoladamente e em combinações, foi avaliado na multiplicação *in vitro* de brotos de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing, a partir de segmentos nodais (AL-BAHRAN, 2002). O maior número de brotos (9 por explante) foi obtido no cultivo em meio contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 1,0 mg L<sup>-1</sup> CIN e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Constatou-se ainda que, dependendo da concentração de BAP e CIN, ANA inibiu, estimulou ou não afetou a multiplicação de brotos. O comprimento máximo de brotos foi observado quando se utilizou 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de CIN e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e o maior desenvolvimento foliar dos brotos foi observado no meio com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de CIN e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Nos experimentos deste trabalho verificou-se que, mesmo não diferindo em quantidade de gemas adventícias formadas, o uso de CIN favoreceu o desenvolvimento dessas gemas em brotações acima de 0,5 cm de comprimento. Por isso, com o objetivo de maximizar a resposta organogênica, avaliaram-se as combinações de citocininas, já que, a utilização de BAP promove o desenvolvimento, em sua maioria, de pequenos brotos, provavelmente em função da quantidade regenerada por explante. Contudo, os resultados não mostraram diferença no número de brotações desenvolvidas (Tabela 3).

A composição e concentração de fitorreguladores no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Tem sido relatada a observação de diferenças entre as citocininas, sendo que o BAP

induz a formação de grandes números de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, enquanto que CIN e 2iP têm permitido apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS; HARIDASAN E FERREIRA, 1998).

Na indução de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda, a melhor resposta foi obtida em meio MT sem BAP. Por outro lado, a adição de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP ao meio, proporcionou maiores números de gemas por explante de citrange ‘Carrizo’ (3,2), limão ‘Volkameriano’ (1,5) e laranja ‘Natal’ (1,42) (SCHINOR et al., 2006). Com relação à laranja azeda, esses resultados diferem daqueles obtidos no presente estudo, onde foi verificado que a adição de citocininas assegurou melhores respostas na indução da organogênese *in vitro*. Apenas a suplementação com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN ao meio apresentou resultados semelhantes àqueles em que não foi utilizado fitorregulador. Vale ressaltar, que variações obtidas na resposta morfogênica, associadas à utilização ou não de fitorreguladores, devem estar relacionadas, entre outros fatores, à concentração endógena de auxinas e citocininas no tecido vegetal.

A suplementação do meio de cultura com citocinina, principalmente o BAP, tem sido considerada fundamental para se obter melhores respostas na organogênese *in vitro* em espécies cítricas (MOREIRA-DIAS et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a, 2005b), e isso foi verificado também neste trabalho.

#### **4.1.2 Indução e regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo e segmentos internodais de laranja azeda em função de BAP e CIN**

Foram feitos ensaios preliminares para encontrar a melhor condição de cultivo e desinfestação dos explantes provenientes das plantas cultivadas em casa de vegetação. Segmentos internodais dessas plantas não respondem ao estímulo dado para regeneração de gemas *in vitro* quando cultivados diretamente sob fotoperíodo de 16 horas (Dados não apresentados).

Em citros, a organogênese *in vitro* tem sido obtida com o cultivo de explantes como segmentos de epicótilo e segmentos internodais, em meios de cultura suplementado com BAP (GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998; MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a, 2005b; SCHINOR et al., 2006) ou com a combinação BAP e ANA (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997; BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; MOREIRA-DIAS, 2000, 2001; SCHINOR, 2006).

Neste experimento não houve efeito da interação tipo de explante x tipo de citocinina para o percentual de explantes que desenvolveram gemas nem para o número de gemas regeneradas. Por outro lado, o maior percentual de explantes responsivos (80,95%) foi obtido para o segmento de epicótilo quando se utilizou BAP no meio de cultivo (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentual de explantes responsivos em segmentos de epicótilo (obtidos *in vitro*) e segmentos internodais (obtidos de casa de vegetação) de laranja azeda cultivados *in vitro* em função do tipo de citocinina (BAP ou CIN) em combinação com ANA, após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) \*

| Regulador vegetal<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Segmento de epicótilo<br>(1,0 cm) | Segmento internodal<br>(1,0 cm) | Média  |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--------|
| BAP (1,0) + ANA (0,3)                      | 80,95                             | 19,05                           | 50,0 A |
| CIN (1,0) + ANA (0,3)                      | 23,81                             | 2,38                            | 13,1 B |
| Média                                      | 52,4 a                            | 10,70 b                         |        |

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula (coluna) ou minúscula (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O efeito isolado do regulador demonstrou que o BAP proporcionou maior percentual de explante responsivo (50%), como média superior àquela obtida para o cultivo de explantes em meio com adição de CIN (Tabela 4). O efeito isolado do tipo de explante também foi significativo, de modo que, o segmento de epicótilo assegurou a obtenção da maior média para o percentual de explantes que formaram gemas.

Com relação ao número de gemas regeneradas, não foi constatada diferença para o efeito isolado do explante. Entretanto, para o efeito isolado do regulador a maior média, 1,9 gema por explante, foi obtida com a utilização do BAP no meio de cultivo (Tabela 5).

Desta forma, a adição da citocinina BAP proporcionou os melhores resultados na resposta organogênica em explantes de laranja azeda e, considerando principalmente o percentual de explantes responsivos, o segmento de epicótilo é o mais indicado para obtenção da referida resposta (Figura 4). Como neste trabalho, outros estudos também consideraram essencial a suplementação do meio de cultura com BAP, por esta citocinina assegurar o desenvolvimento de um maior número de gemas adventícias em explantes de citros cultivados *in vitro* (MOREIRA-DIAS et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a, 2005b; SCHINOR et al., 2006).

Tabela 5 – Número de gemas e/ou brotações por explante responsivo em segmentos de epicótilo (obtidos *in vitro*) e segmentos internodais (obtidos de casa de vegetação) de laranja azeda regeneradas *in vitro*, em função do tipo de citocinina (BAP ou CIN) em combinação com ANA, após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) \*

| Regulador vegetal<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Segmento de epicótilo<br>(1,0 cm) | Segmento internodal<br>(1,0 cm) | Média  |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|--------|
| BAP (1,0) + ANA (0,3)                      | 1,80                              | 2,00                            | 1,90 A |
| CIN (1,0) + ANA (0,3)                      | 1,05                              | 0,25                            | 0,65 B |
| Média                                      | 1,42 a                            | 1,10 a                          |        |

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula (coluna) ou minúscula (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A adição de fitorreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz. Portanto, a resposta de explantes cultivados *in vitro* à adição de fitorreguladores ao meio de cultivo depende do seu estado fisiológico, o que por sua vez, está relacionado com a época do ano e estado geral (nutricional, fisossanidade, etc.) da planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Tem sido verificado que o BAP induz à formação de elevado número de brotos adventícios, enquanto a CIN tem permitido apenas o crescimento normal de brotações (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Foi utilizado o meio de cultura MT com adição de fitorreguladores em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores deste trabalho, considerando assim, que a adição de citocinina induz a uma melhor resposta organogênica. Além disso, o objetivo aqui foi a detecção ou não de diferenças entre os explantes (segmentos de epicótilo ou segmentos internodais) nesta resposta.

Na organogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de citrange ‘Troyer’ cultivados em meio com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, verificou-se uma média de 10,4 gemas por explante, das quais, 7,2 por explante desenvolveram-se em brotações (MOREIRA-DIAS et al. 2000), valores bem maiores do que aqueles obtidos no presente estudo.

Em seus estudos, Pérez-Molphe-Balch e Ochoa-Alejo (1997) verificaram 96 e 88% de explantes responsivos, respectivamente para lima ácida ‘Galego’ e tangerina ‘Monica’, bem como, um número de gemas por explante de 7,8 e 5,1 para estas variedades ao cultivarem segmentos internodais em meio MS suplementado com 7,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

As respostas relatadas são bem diferentes daqueles obtidas neste trabalho, quando foram utilizados segmentos internodais como explantes, e podem estar relacionadas tanto àquela elevada concentração de BAP utilizada, quanto ao potencial genético do cultivar.

Para pomelo, laranja azeda e *Citrus macropylla* foram obtidos, respectivamente, uma média de 4,1, 2,2 e 9,9 gemas por explante (segmentos internodais de plantas com 12 meses de idade), em meio suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (GHORBEL; NAVARRO E DURAN-VILA, 1998). Os resultados observados para laranja azeda são semelhantes àqueles encontrados no presente estudo (1,8 e 2,0 gemas por explantes) e superiores aos que foram relatados por Schinor et al. (2006) cultivando segmentos de epicótilo em meio com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (1,39 gema por explante).

Em outro estudo, o maior percentual de explantes responsivos para a laranja azeda, o limão ‘Cravo’ e o limão ‘Volkameriano’ foi obtido na ausência de fitorregulador. A utilização do BAP mostrou-se desfavorável à organogênese de laranja azeda a partir de segmentos de epicótilo, tendo em vista, que sua adição ao meio de cultivo diminuiu o número de explantes. Também foi na ausência de regulador que a laranja azeda apresentou maior número de gemas (SCHINOR, 2006). Contudo, os valores médios apresentados por esse autor divergem daqueles encontrados no presente trabalho, onde o BAP foi favorável à formação de gemas adventícias por explante.

As diferentes respostas encontradas podem estar relacionadas, principalmente, ao genótipo (ALMEIDA et al., 2002; SCHINOR et al., 2006) e podem ser influenciadas pela composição do meio de cultivo, fatores relacionados ao material vegetal (tipo e idade do explante) e condições de incubação (orientação do explante no meio e luminosidade) (BORDÓN; GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000; MOREIRA-DIAS et al., 2000; COSTA, et al. 2004; SILVA et al., 2005a). Nesse contexto, torna-se necessário o estudo de protocolos específicos e uma observação detalhada e minuciosa dos resultados da regeneração *in vitro*, caso o objetivo seja obter sucesso em trabalhos de transformação genética. Os resultados aqui encontrados mostraram que segmentos de epicótilo cultivados em meio com BAP são favoráveis à resposta organogênica *in vitro* de laranja azeda.



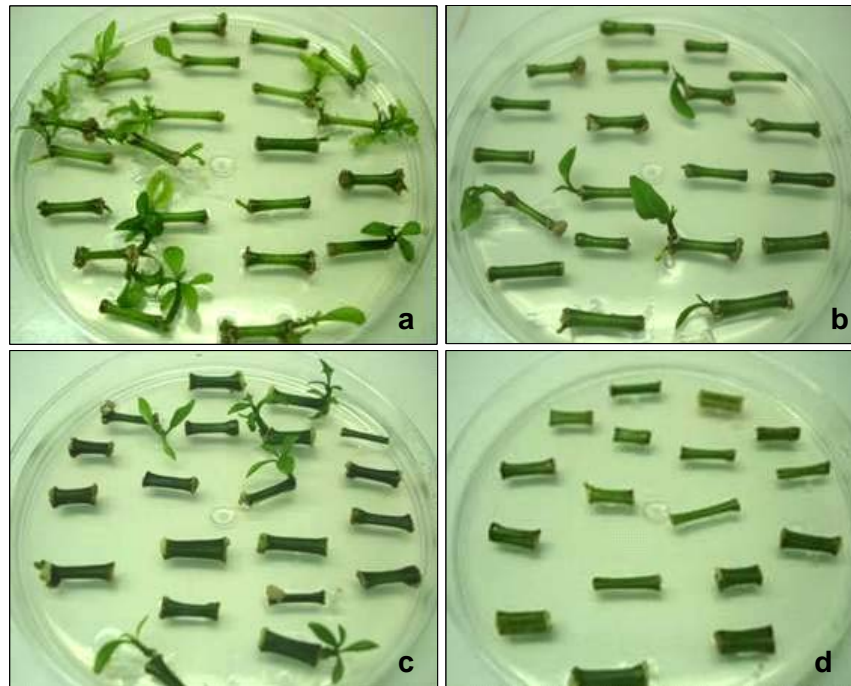


Figura 4 – Indução e regeneração *in vitro* de brotações adventícias em explantes de laranja azeda após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h) em meio com BAP ou CIN, combinados com  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. **a.** Segmentos de epicótilo cultivados com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; **b.** Segmentos de epicótilo em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN; **c.** Segmentos internodais em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP; **d.** Segmentos internodais em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de CIN

#### 4.1.3 Indução e regeneração *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja azeda em função do tipo de meio de cultura

Não foi constatada diferença entre os tratamentos (meios de cultivo) para as variáveis analisadas (percentual de explantes responsivos, número de gemas regeneradas e brotações desenvolvidas) (Tabela 6). Por outro lado, este foi o experimento que resultou em melhores resultados na indução e formação de gemas adventícias de laranja azeda.

Independente do meio de cultura utilizado, o segmento de epicótilo respondeu de maneira satisfatória à indução da organogênese *in vitro* de laranja azeda, proporcionando em média 80% de explantes com formação gemas e um número de 2,3 gemas regeneradas por explante, resultados semelhantes ou superiores a outros envolvendo este mesmo tipo de explante e a adição de BAP ao meio de cultivo (GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998; SCHINOR et al., 2006).

Tabela 6 – Explantes responsivos, gemas regeneradas e brotações desenvolvidas por explante (segmento de epicótilo) de laranja azeda cultivado em meio MT, MS e DBA<sub>3</sub>, após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h)

| Meio de cultivo  | Explantes responsivos <sup>ns</sup><br>(%) | Gemas por explante <sup>ns</sup><br>(n°) | Brotações por explante <sup>ns (1)</sup><br>(n°) |
|------------------|--|--|--|
| MT               | 81,88                                      | 2,32                                     | 1,13   |
| MS               | 81,67                                      | 2,27                                     | 1,04   |
| DBA <sub>3</sub> | 79,38                                      | 2,34                                     | 1,26   |

<sup>ns</sup> Não significativo ( $P < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Gemas que se desenvolveram em brotações com aproximadamente 1,0 cm de comprimento.

Em trabalho de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* com laranja ‘Hamlin’, Mendes et al. (2002) consideraram que o epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* por cerca de duas semanas no escuro, e em seguida, cultivadas no claro por uma a três semanas, demonstrou ser boa fonte de explantes para experimentos de transformação genética de citros, e essa também foi a condição dada à fonte de explante utilizada no presente estudo.

#### 4.1.4 Indução e regeneração de gemas adventícias, e obtenção de plantas *in vitro* a partir de diferentes explantes de laranja azeda

Explantes provenientes de diferentes origens foram avaliados num sistema de regeneração *in vitro* de plantas de laranja azeda, ou seja, na resposta à organogênese, bem como, na conversão das gemas regeneradas em plantas.

As maiores médias para o percentual de explantes que formaram gemas foram obtidas para Epi A (epicótilo alongado de plântulas germinadas *in vitro*), SI *in vitro* (segmentos internodais de plantas germinadas *in vitro* excluindo a região do epicótilo) Epi C (epicótilo curto de plantas germinadas *in vitro*), e Epi C, sendo superiores àquela obtida para SI cv (Tabela 7). Com relação ao número de gemas regeneradas, as melhores respostas foram obtidas para SI *in vitro* e Epi C, que induziram respectivamente, a formação de 3,1 e 2,5 gemas por explante. O SI cv foi o explante que se mostrou menos eficiente na resposta organogênica de laranja azeda.

Tabela 7 – Explantes responsivos e gemas e/ou brotações por explante responsivo de laranja azeda, cultivados em meio MT suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, avaliados após 60 dias de cultivo (30 dias em ausência de luz, seguidos de fotoperíodo de 16 h)

| Explante <sup>(1)</sup> | Explantes responsivos*<br>(%) | Gemas e/ou brotações por explante*<br>(n°) |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Epi A                   | 76,3 a                        | 2,0 bc                                     |
| SI <i>in vitro</i>      | 83,8 a                        | 3,1 a                                      |
| SI cv                   | 12,5 b                        | 1,4 c                                      |
| Epi C                   | 68,8 a                        | 2,5 ab                                     |

\* Médias seguidas de mesma letra (coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Epi A (epicótilo alongado de plântulas germinadas *in vitro*), SI *in vitro* (segmentos internodais de plantas germinadas *in vitro* excluindo a região do epicótilo), SI cv (segmentos internodais de plantas cultivadas em casa de vegetação) e Epi C (epicótilo curto de plantas germinadas *in vitro*), avaliados após 60 dias de cultivo.

Segmentos internodais de plantas de limão ‘Cravo’ germinadas *in vitro* foram avaliados em meio com diferentes concentrações de BAP, na indução da organogênese. A adição de 2,5 mg L<sup>-1</sup> deste regulador ao meio de cultura MT promoveu o maior percentual de explantes responsivos, bem como, o maior número de brotações adventícias por explante (MOURA et al., 2001). Considerando o mesmo tipo de explante, neste estudo, constatou-se 83,8% de explantes que formaram gemas e um número de 3,1 gemas por explante para laranja azeda, com o cultivo em MT com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP. Respostas mais favoráveis para lima ácida ‘Galego’ e tangerina ‘Monica’ foram observadas ao serem utilizados 7,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997).

A máxima indução de gemas adventícias em explantes de laranja ‘Pineapple’ e cidra foi obtida em meio MS com 3,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, enquanto que para lima acida ‘Galego’ foi com a adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP ao meio. Para isso, Duran-Vila e Navarro (1989) utilizaram segmentos internodais de plantas cultivadas em casa de vegetação como explante.

Na indução e formação de gemas adventícias em segmentos internodais de plantas de limão ‘Cravo’ e laranja azeda cultivadas em casa de vegetação, a melhor resposta quanto ao percentual de explantes responsivos foi obtida quando se utilizou 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, onde 82% dos segmentos regeneraram 1,9 gema por explante de limão ‘Cravo’ e 49%, 1,6 gema por explante de laranja azeda. Foi observado também que na ausência de BAP, explantes de laranja azeda não regeneraram gemas (SCHINOR, 2006). Na presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi verificado 38% de

explantes responsivos, média superior àquela obtida no presente trabalho (12,5%) ao utilizar segmentos internodais (SI cv).

Em outro estudo, em que se avaliou a combinação BAP e ANA na organogênese *in vitro* de azeda, a melhor resposta utilizando segmentos internodais foi obtida em MT com 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,3 mg L<sup>-1</sup> ANA (52% de explantes responsivos e 1,6 gemas por explante), e em DBA3 com 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA (63% de explantes responsivos e 2,2 gemas por explante) (SCHINOR, 2006). Percentuais de 70, 60 e 70% de explantes responsivos cultivados em meio suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, foram relatados respectivamente, para pomelo, laranja azeda e *Citrus macrophylla*, utilizando segmentos internodais de plantas mantidas em casa de vegetação (GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998).

Com o objetivo de determinar a eficiência de incubação de segmentos internodais de *Citrus aurantifolia* Swing., foi observado que os explantes cultivados em meio MS contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP e mantidos por 15 dias em escuro e em seguida transferidos para luz, promoveram a melhor resposta (41,9% de explante responsivo) (PEÑA et al., 1997). No presente trabalho, todos os explantes foram incubados por 30 dias no escuro e, em seguida, submetidos a fotoperíodo de 16 h durante 30 dias.

Quanto ao uso de segmentos de epicótilo (Epi A), observou-se que estes explantes mostraram-se favoráveis à indução da organogênese, onde 76,3% dos segmentos regeneraram 2,0 gemas por explantes em meio contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, diferindo dos resultados encontrados por Schinor et al. (2006) que verificaram apenas 39% com desenvolvimento de 1,4 gema por explante para a mesma variedade em estudo.

O Epi C foi estudado para observar se esta região respondia diferentemente daquela restante que compõe o eixo vertical da planta germinada *in vitro*. Como não foram observadas diferenças entre o Epi C e SI *in vitro*, plantas germinadas *in vitro* podem ter todo o seu comprimento explorado. Sendo assim, segmentos internodais de plantas germinadas *in vitro* e segmentos de epicótilo provenientes da germinação no escuro, seguida de luz, constituíram-se nos explantes mais indicados para indução da organogênese *in vitro* de laranja azeda (Figura 5).

As brotações obtidas a partir de Epi A, Epi C e SI *in vitro* desenvolveram-se satisfatoriamente (em torno de 1,0 cm de comprimento) e foram induzidas a emitir raízes em um novo experimento. A insuficiência da resposta obtida para SI cv, não permitiu que as brotações oriundas deste explante fossem avaliadas.

Embora a realização da microenxertia tenha sido considerada um sucesso, apresentando uma sobrevivência de 51, 60 e 94% para pomelo, laranja azeda e *Citrus macrophylla* Wester, respectivamente (GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998) e 100% para laranja ‘Pêra’ (SILVA et al., 2005a), o enraizamento *in vitro* também têm sido avaliado em protocolos de regeneração de plantas. Isto é interessante para se conhecer o comportamento morfo genético da espécie estudada.

A indução de enraizamento em citros tem sido obtida em meio sem regulador ou suplementado com auxinas, e em meio com metade da concentração de sais (BESPALHOK FILHO et al., 2001a; MOURA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; SILVA et al., 2005a, 2005b).

Neste trabalho, houve efeito da interação meio de cultivo x origem do explante no percentual de enraizamento dos brotos, e esse percentual variou de 48 a 88%. Brotos originados de explantes Epi A tiveram maiores percentuais de enraizamento quando cultivados em meio MT com metade da concentração de sais sem auxina e meio suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de IBA, do que em meio com 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA (Tabela 8).

Tabela 8 – Enraizamento de brotos de laranja azeda obtidos a partir de diferentes explantes (Epi A, SI *in vitro* e Epi C) cultivados em meio MT sem auxina ou com a adição de IBA ou ANA, após 60 dias de cultivo sob fotoperíodo de 16 h

| Origem do explante <sup>(1)</sup> | Meios para a indução do enraizamento |                                   |                                   |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                                   | MT sem auxina *                      | MT + 1,0 mg L <sup>-1</sup> IBA * | MT + 1,0 mg L <sup>-1</sup> ANA * |
| Epi A                             | 84 a                                 | 56 ab                             | 48 b                              |
| SI <i>in vitro</i>                | 80 a                                 | 64 a                              | 88 a                              |
| Epi C                             | 64 a                                 | 88 a                              | 64 a                              |

\* Médias seguidas de mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Epi A (epicótilo alongado de plântulas germinadas *in vitro*), SI *in vitro* (segmentos internodais de plantas germinadas *in vitro* excluindo a região do epicótilo) e Epi C (epicótilo curto de plantas germinadas *in vitro*).

A ausência de auxina também promoveu 58% de brotos enraizados de laranja ‘Pêra’ (SILVA, et al., 2005a) e 85% de tangerina ‘Cleópatra’ (SILVA et al., 2005b) obtidos a partir de segmentos de epicótilo. Entretanto, 100% de enraizamento em brotos de citrange ‘Troyer’ também regenerados a partir desse explante foi obtido utilizando-se 2,0 mg L<sup>-1</sup> ANA (EDRISS; BURGER, 1984).

Em brotações provenientes de segmentos internodais de plantas de limão ‘Cravo’ germinadas *in vitro* a utilização de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  ANA promoveu 80% de enraizamento. Esta mesma concentração também favoreceu a emissão de raízes em 75 e 80% de brotos de laranjas ‘Pêra’ e ‘Valência’, respectivamente, sendo que estes brotos foram originados da região do epicótilo (MOURA et al., 2001).

A utilização de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  IBA provocou uma resposta de 75, 54 e 56% de enraizamento, respectivamente em laranjas ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Pêra’ e uma média de 94,6% para limão ‘Cravo’, obtidos a partir de segmentos de epicótilo (ALMEIDA et al., 2002).

Os índices de enraizamento encontrados neste trabalho são considerados favoráveis, comparando-os aos de trabalhos anteriores, como 80% para laranja ‘Pineapple’ (DURAN-VILA et al., 1992), 84% para *Citrus Macrophylla* (GHORBEL; NAVARRO; DURAN-VILA, 1998), 70 % para lima ácida ‘Galego’ (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997) e 86% para citrange ‘Troyer’ (MOREIRA-DIAS et al., 2000).

Independentemente dos tipos de explantes aqui considerados como os mais favoráveis à organogênese *in vitro* de laranja azeda, o meio de cultura com metade da concentração de sais e sem adição de auxinas asseguraram o enraizamento de brotos (Figura 5). Além disso, esses brotos emitiram raízes que variaram de 5,3 a 15,0 cm de comprimento. Este fato deve ter contribuído para que praticamente todas as plantas fossem aclimatizadas e adaptadas às condições de casa de vegetação.

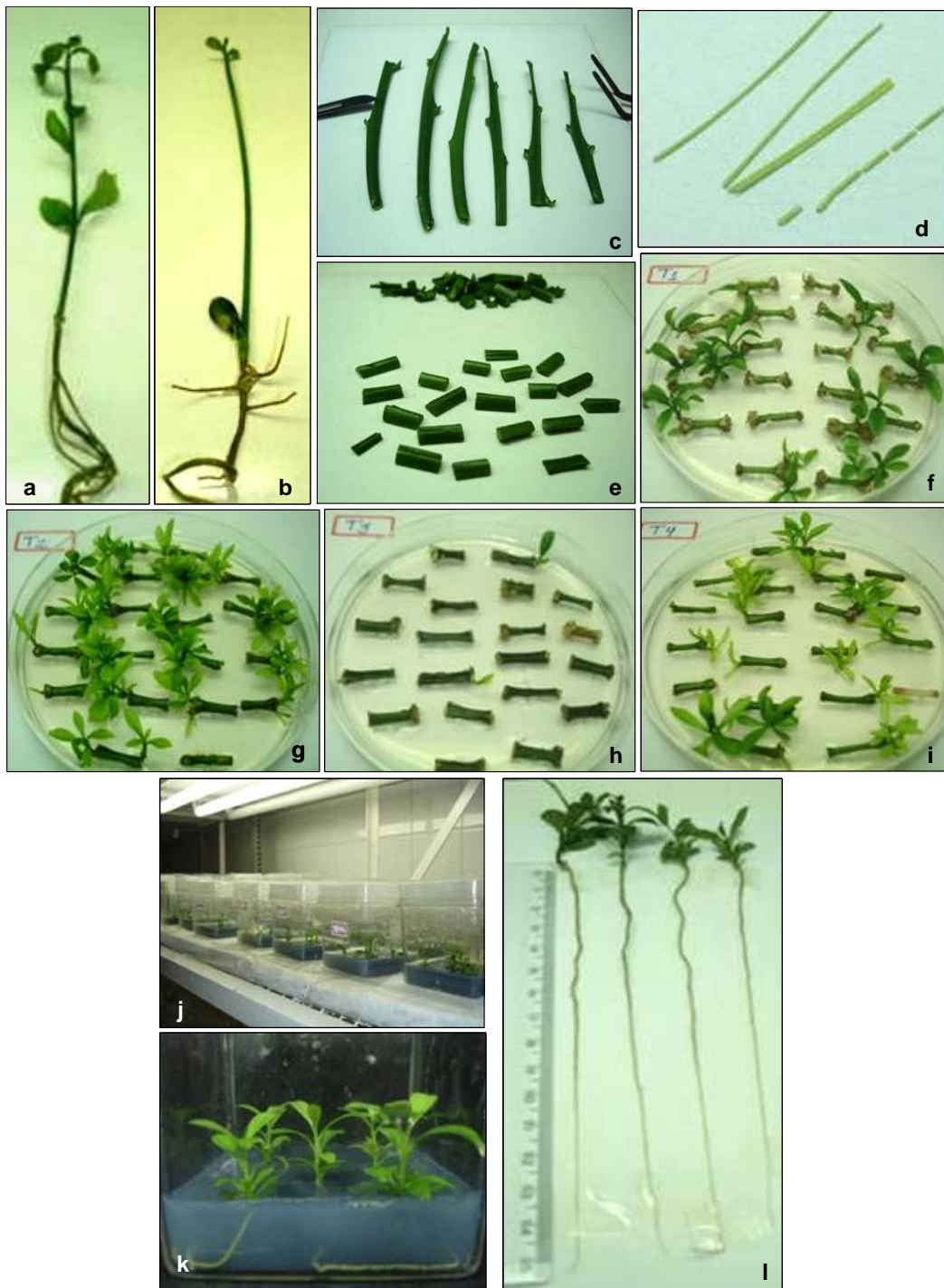


Figura 5 – Indução de organogênese e obtenção de plantas *in vitro* de laranja azeda a partir de diferentes explantes. **a.** Planta germinada *in vitro*, utilizada como fonte de explantes; **b.** Plântula germinada *in vitro* com o epicótilo alongado; **c.** Segmentos de ramos de plantas de estufa; **d.** Segmentos de epicótilo; **e.** Segmentos internodais de ramos; **f-i.** Formação de gemas adventícias em explantes (**f.** Epi A; **g.** SI *in vitro*; **h.** SI cv; **i.** Epi C); **j.** Indução de enraizamento; **k, l.** Brotações enraizadas

#### 4.2 Transformação genética com o gene da replicase do *Marafivirus*

Foram realizados 30 experimentos visando a introdução do gene da replicase do *Marafivirus* no genoma das plantas, sendo que 12 foram realizados limão ‘Cravo’ e 18 com laranja ‘Valência’. Foi utilizado o protocolo de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando-se como explantes segmentos de epicótilo e segmentos internodais provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação, mas, houveram experimentos onde alguns testes foram feitos com o objetivo de otimizar o processo de regeneração de plantas transgênicas, acarretando em algumas modificações no protocolo.

Os testes supracitados envolveram entre outros, a comparação dos antibióticos cefotaxime e timentin na eliminação da *A. tumefaciens* após o co-cultivo, período de co-cultivo de um a três dias, incubação dos explantes diretamente na luz ou no escuro após o período de co-cultivo, uso de acetoseringona (100 mM) no meio de co-cultivo, variações na temperatura de co-cultivo, suspensão do antibiótico de seleção canamicina nos primeiros 15 dias de incubação após o co-cultivo, diferentes concentrações de bactéria ( $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^4$  e  $5 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>) e o uso de ácido ascórbico no meio de co-cultivo e/ou cultivo dos explantes, visando inibir uma oxidação constantemente observada nos explantes. Contudo, não foram obtidos melhores resultados no que se refere à obtenção de plantas transgênicas durante a realização dos experimentos, embora em alguns casos tenha melhorado substancialmente a regeneração de brotos que posteriormente, foram identificados como escapes (brotações adventícias regeneradas, mas não transformadas).

A eficiência de transformação genética foi obtida pelo cálculo do percentual de brotos PCR+ em relação ao número total de explantes inoculados e introduzidos no experimento de transformação.

Nas transformações genéticas com o limão ‘Cravo’, foram obtidas 19 brotações transgênicas em um total de 259 brotos avaliados (Tabela 9). Essas brotações foram microenxertadas em citrange ‘Carrizo’ ou laranja ‘Hamlin’. Entretanto, a maioria não desenvolveu após a microenxertia ou não sobreviveram durante a fase de aclimatização, totalizando ao final um número de sete plantas transgênicas aclimatizadas em estufa. Essas plantas foram obtidas a partir de segmentos internodais de plantas juvenis cultivadas em casa de vegetação, os quais, foram incubados em meio MT suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,3 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Figura 6).



Tabela 9 – Número de explantes que desenvolveram gemas adventícias por total de explantes (segmentos internodais) de limão ‘Cravo’ introduzidos, número de gemas regeneradas por explantes, brotos PCR+ por brotos avaliados, eficiência de transformação e total de plantas aclimatizadas contendo o gene da replicase do *Marafivírus*

| <b>Experimento</b> | <b>Nº de explantes com gemas/ total de explantes (%)</b> | <b>Nº de gemas formadas/ explantes com gemas</b> | <b>Brotos PCR+/ brotos avaliados (%)</b> | <b>Eficiência de transformação (%)</b> | <b>Plantas transgênicas aclimatizadas</b> |
|--------------------|--|--|--|--|---|
| 1                  | 163/440 (37,0)   | 390/163  | 13/135 (9,6)                             | 2,95                                   | 5   |
| 2                  | 10/410 (2,4)   | 18/10  | 4/13 (30,8)                              | 0,98                                   | 1   |
| 3                  | 0/380  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 4                  | 0/100  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 5                  | 26/150 (17,3)  | 46/26  | 2/25 (8,0)                               | 1,33                                   | 1   |
| 6                  | 5/120 (4,2)  | 5/5  | 0/4                                      | 0                                      | 0   |
| 7                  | 29/300 (9,7)   | 57/29  | 0/40                                     | 0                                      | 0   |
| 8                  | 28/380 (7,4)   | 48/28  | 0/17                                     | 0                                      | 0   |
| 9                  | 1/270 (0,4)  | 4/1  | 0/1                                      | 0                                      | 0   |
| 10                 | 0/210  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 11                 | 5/120 (4,2)  | 8/5  | 0/5                                      | 0                                      | 0   |
| 12                 | 0/100  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| <b>Total</b>       | <b>267/2980</b>  | <b>576/267</b>                                   | <b>19/259</b>                            |  | <b>7</b>                                  |

No experimento 1 (Tabela 9), foram avaliados os antibióticos cefotaxime e timentin na eliminação da bactéria, juntamente com canamicina para a seleção de plantas transformadas. Foi verificada a regeneração de 191 gemas em 83 explantes quando se utilizou timentin + canamicina e de 199 gemas em 80 explantes quando se utilizou cefotaxime + canamicina, não sendo constatada diferença significativa. Além disso, ambos os tratamentos possibilitaram a regeneração de brotos transgênicos.



Figura 6 – Regeneração *in vitro*, microenxertia e aclimatização de plantas de limão ‘Cravo’ após transformação genética. **a.** Início da regeneração de gemas adventícias em segmento internodal de limão ‘Cravo’ (indicados pelas setas); **b.** Brotações desenvolvidas em meio de cultivo; **c.** Plântula germinada *in vitro* a ser utilizada para microenxertia; **d.** Brotação a ser microenxertada; **e.** Brotação microenxertada *in vitro*; **f.** Planta em desenvolvimento durante a aclimatização; **g.** Aclimatização; **h.** Plantas aclimatizadas a serem avaliadas por PCR; **i.** Planta transgênica a ser transferida para estufa

As plantas obtidas foram analisadas por PCR, amplificando um fragmento de 630 pb (Figura 7), correspondente à seqüência gênica introduzida. Posteriormente, a inserção do transgene no genoma das plantas de limão ‘Cravo’ foi confirmada pela análise de ‘Southern blot’ para seis das sete plantas obtidas (Figura 8), tendo em vista, que uma planta ainda não está desenvolvida o suficiente para fornecer tecido vegetal para extração de DNA em quantidade necessária para a análise. O DNA das plantas foi digerido pela enzima de restrição *EcoRI* e hibridizado com sonda específica, confirmando a transformação com um a quatro eventos de inserção do transgene.

A eficiência de transformação nesses experimentos foi variável e a máxima obtida foi 2,95%. Almeida et al. (2003b) relataram uma eficiência de 19,3% na regeneração de plantas de limão ‘Cravo’ GUS+. Entretanto, índices de eficiência variando entre 0,2-1,5% foram obtidos para essa mesma variedade na transformação genética com seqüências do genoma do CTV (SCHINOR, 2006). Melhores resultados têm sido relatados para outras espécies cítricas (YU et al., 2002; MENDES et al., 2002). No caso do limão ‘Cravo’, os resultados mostram baixa eficiência, permitindo considerar que deve haver uma forte relação entre as espécies ou variedades na eficiência de transformação genética de citros (ALMEIDA et al., 2003b).

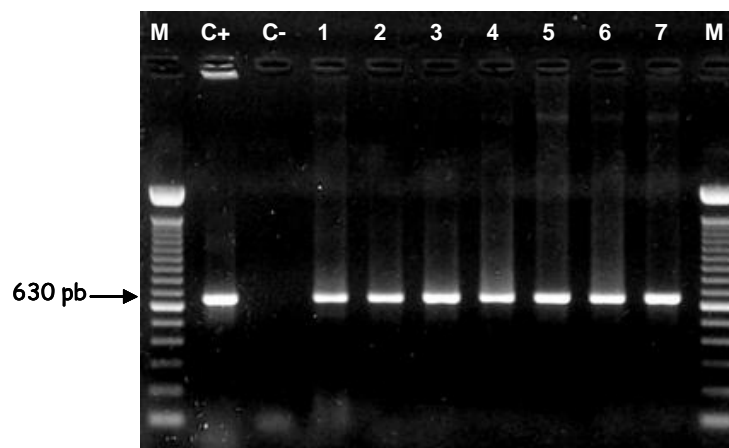


Figura 7 – Análise da PCR das plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ contendo o gene da replicase do *Marafivírus*. M = marcador 100 pb (Invitrogen); C+ = controle positivo (bactéria contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201 com a seqüência do gene); C- = controle negativo (planta não transgênica); 1 a 7 = plantas transgênicas de limão ‘Cravo’

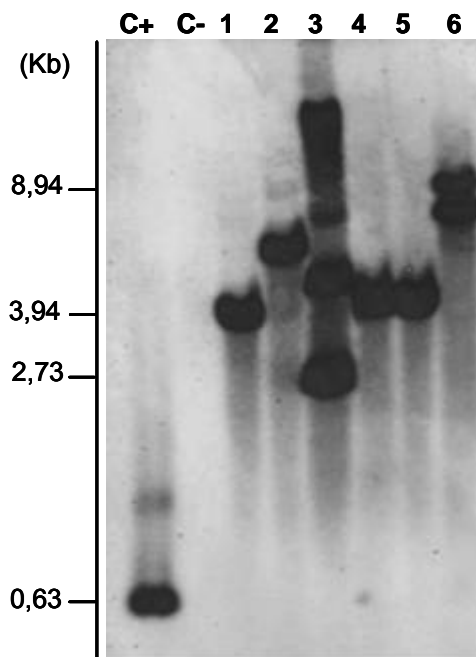


Figura 8 – Análise de ‘Southern blot’ em plantas de limão ‘Cravo’ utilizando sonda do gene da replicase do *Marafivírus*. C+ = controle positivo (fragmento do gene amplificado por PCR); C- = controle negativo (DNA de planta de limão ‘Cravo’ não transformada); 1 a 6 = DNA de plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ digerido com a enzima *EcoRI*

Dos experimentos realizados com explantes de laranja ‘Valência’, apenas o número 3 permitiu a constatação de uma brotação transgênica em 24 avaliadas. No total, foram analisadas 220 brotações que se desenvolveram das 1451 gemas regeneradas em segmentos de epicótilo e segmentos internodais (Tabela 10).

A referida brotação transgênica foi obtida a partir de segmentos internodais co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* em meio MT sem regulador e em seguida cultivado em meio MT suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $5,0 \text{ mL L}^{-1}$  de ácido ascórbico. Posteriormente, foi microenxertada em citrange ‘Carrizo’ e aclimatizada para condições de casa de vegetação (Figura 9). A transgenia foi confirmada por análises de PCR, utilizando-se ‘primers’ específicos para detecção do gene da replicase do *Marafivírus* demonstrando a amplificação de um fragmento de 630 pb (Figura 10a) e para detecção do gene *nptII* com a amplificação de um fragmento de 700 pb (Figura 10b).

Tabela 10 – Número de explantes que desenvolveram gemas adventícias por total de explantes de laranja ‘Valência’ introduzidos, número de gemas regeneradas por explantes, brotos PCR+ por brotos avaliados, eficiência de transformação e total de plantas aclimatizadas contendo o gene da replicase do *Marafivírus*

| <b>Experimento*</b> | <b>Nº de explantes com gemas/ total de explantes (%)</b> | <b>Nº de gemas formadas/ explantes com gemas</b> | <b>Brotos PCR+/ brotos avaliados (%)</b> | <b>Eficiência de transformação (%)</b> | <b>Plantas transgênicas aclimatizadas</b> |
|---------------------|--|--|--|--|---|
| 1                   | 10/400 (2,5)   | 16/10  | 0/2                                      | 0                                      | 0   |
| 2                   | 5/300 (1,7)  | 6/5  | 0/1                                      | 0                                      | 0   |
| 3                   | 41/380 (10,8)  | 85/41  | 1/24 (4,1)                               | 0,26                                   | 1   |
| 4                   | 5/140 (3,6)  | 10/5   | 0/5                                      | 0                                      | 0   |
| 5                   | 5/100 (5,0)  | 9/5  | 0/0                                      | 0                                      | 0   |
| 6                   | 22/120 (18,3)  | 39/22  | 0/2                                      | 0                                      | 0   |
| 7                   | 19/300 (6,3)   | 34/19  | 0/14                                     | 0                                      | 0   |
| 8                   | 3/180 (1,7)  | 4/3  | 0/0                                      | 0                                      | 0   |
| 9                   | 0/120  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 10                  | 4/140 (2,9)  | 5/4  | 0/2                                      | 0                                      | 0   |
| 11                  | 43/150 (28,7)  | 203/43   | 0/46                                     | 0                                      | 0   |
| 12                  | 13/200 (6,5)   | 19/13  | 0/11                                     | 0                                      | 0   |
| 13                  | 0/230  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 14                  | 0/170  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 15                  | 0/180  | 0  | 0  | 0                                      | 0   |
| 16                  | 4/200 (2,0)  | 6/4  | 0/4                                      | 0                                      | 0   |
| 17                  | 144/250 (57,6)   | 525/144  | 0/70                                     | 0                                      | 0   |
| 18                  | 131/360 (36,4)   | 490/131  | 0/39                                     | 0                                      | 0   |
| <b>Total</b>        | <b>449/3920</b>  | <b>1451/449</b>                                  | <b>1/220</b>                             |  | <b>1</b>                                  |

\* Experimentos 1-11 utilizou-se segmentos internodais e experimentos 12-18 utilizou-se segmentos de epicótilo como explantes.

A eficiência de transformação obtida, 0,26%, foi considerada baixa comparando-se a outros índices relatados para laranja valência, como 13,8% por Almeida et al. (2003a), 11,3 e 13,7% por Boscariol (2004), 5,6% por Barbosa-Mendes (2006) e 7,3% por Paoli et al. (2007).

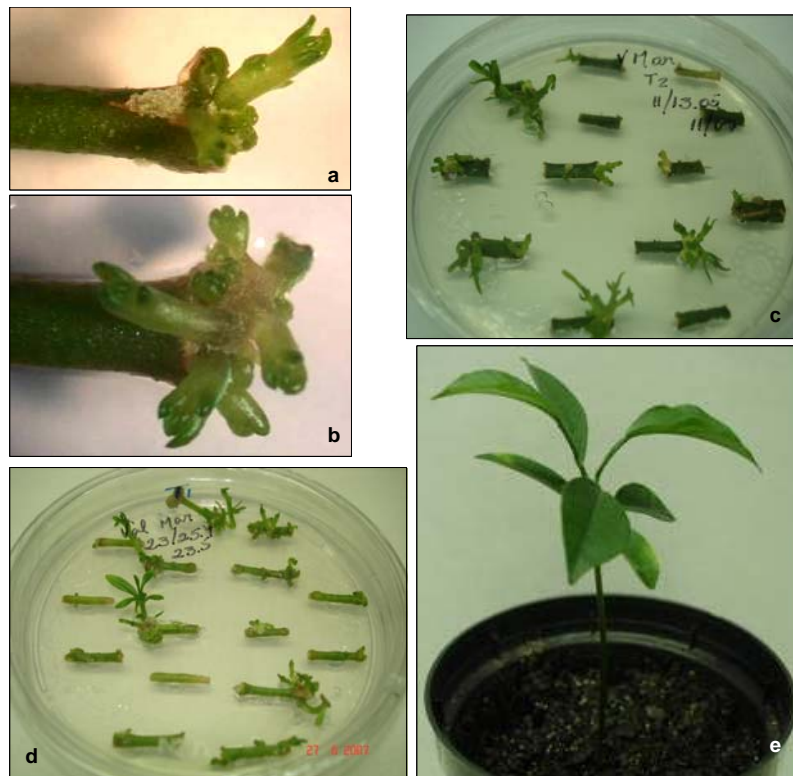


Figura 9 – Regeneração *in vitro* de laranja ‘Valência’ após transformação genética. **a, b, d.** Formação de múltiplas brotações adventícias em segmentos de epicótilo. **c.** Formação de gemas adventícias em segmentos internodais; **e.** Planta transgênica aclimatizada

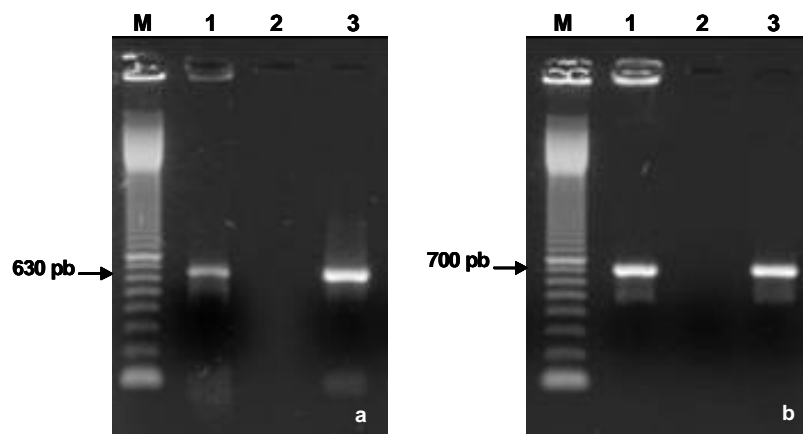


Figura 10 – Análises da PCR da planta transgênica de laranja ‘Valência’. **a.** PCR com ‘primers’ específicos para detecção do gene da replicase do *Marafivirus*: M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle positivo (bactéria contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201 com a sequência do gene); 2 = controle negativo (planta não transgênica); 3 = planta transgênica. **b.** PCR com ‘primers’ específicos para detecção do gene *nptII*: M = marcador 100 pb (Invitrogen); 1 = controle positivo (bactéria contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201 com a sequência do gene); 2 = controle negativo (planta não transgênica); 3 = planta transgênica

Durante a realização dos experimentos observou-se um crescimento excessivo da bactéria quando se realizou o co-cultivo com 3 dias. A partir de então, passou-se a transferir os explantes para o meio de seleção e regeneração com 2 dias de co-cultivo.

Foi verificado também que a presença de antibióticos afetava a regeneração de brotos *in vitro*. Como controle, explantes não inoculados de laranja ‘Valência’ foram mantidos em meio de regeneração sem antibióticos e outros foram cultivados em meio com antibióticos, sendo subcultivados nas mesmas condições dos explantes que foram inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*. Os resultados obtidos evidenciaram que a presença de canamicina no meio prejudicava a regeneração. Molinari et al. (2004) observaram que o antibiótico canamicina pode influenciar no desenvolvimento de gemas.

Nos experimentos 11, 17 e 18 (Tabela 10) o uso do antibiótico canamicina foi suprimido nos primeiros 15 dias após o co-cultivo com *A. tumefaciens*. Tanto o percentual de explantes responsivos, quanto o número de gemas regeneradas, aumentaram substancialmente com o cultivo dos explantes em meio MT com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e cefotaxime ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ). Foram registrados os maiores valores obtidos no referente à regeneração de gemas. Contudo, muitas gemas não desenvolveram o suficiente para avaliação e microenxertia. Posteriormente, aquelas passíveis de avaliação foram identificadas como escapes, mesmo tendo utilizado canamicina nos subcultivos após os primeiros 15 dias, e observado que muitas gemas amareleceram e morreram, enquanto outras demonstraram bom desenvolvimento no meio de cultivo. Explantes de citrumelo ‘Swingle’ foram incubados em meio sem o agente seletivo canamicina, durante 7 dias após o co-cultivo com *A. tumefaciens* e, posteriormente, em meio com  $25 \text{ mg L}^{-1}$  do mesmo. Foram obtidos menos de 10% de escapes e uma eficiência de transformação de 8,6% (MOLINARI et al., 2004). Vale ressaltar que esses autores utilizaram  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxime e timentin no meio de cultivo, enquanto no presente trabalho utilizou-se apenas cefotaxime numa concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Em alguns experimentos deste trabalho, o antibiótico timentin foi avaliado. Verificou-se que com o seu uso houve uma maior permanência da bactéria nos explantes e, possivelmente, isso afetou a regeneração. Entretanto, em nenhum momento este antibiótico foi adicionado junto com o cefotaxime, talvez isso pudesse trazer melhores resultados.

Nos experimentos de transformação genética, inicialmente foi estimada a obtenção de um elevado número de plantas transgênicas, principalmente, para a variedade de limão ‘Cravo’. Posteriormente, as plantas já aclimatizadas em estufa foram novamente avaliadas por análise de

PCR e não demonstrava a amplificação do fragmento esperado, como detectado antes. É possível, que isso tenha ocorrido devido a erros na seleção das plantas na fase de microenxertia ou que esses falsos positivos tenham sido gerados pela presença de *Agrobacterium tumefaciens* residual nos tecidos vegetais analisados ainda na fase de seleção, com as brotações ainda em meio de cultura.

As variedades utilizadas nos trabalhos de transformação genética do presente estudo mostraram-se recalcitrantes ao processo de transferência gênica, tendo em vista, que foram obtidos baixos valores de eficiência de transformação quando comparados aos obtidos em outros trabalhos. Em citros, a eficiência de transformação tem se mostrado bastante variada de acordo com o genótipo utilizado. Entretanto, variações também são observadas para o mesmo genótipo, de modo que, já foram relatados valores de 2% (MOORE et al., 1992), 20,6% (PEÑA et al., 1995b) e até 80% (YU et al., 2002) para citrange ‘Carrizo’. Baixos valores são encontrados para variedades de laranja doce (HIDAKA et al., 1990, MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a) assim como já foram observados até 34% para a laranja ‘Hamlin’ (MENDES, et al., 2002). Isso permite considerar que é necessário o estabelecimento de um sistema eficiente de transformação genética, seja este, por métodos diretos ou indiretos para cada variedade cítrica estudada.

Neste trabalho ocorreram elevados índices de regeneração de escapes, ou seja, gemas regeneradas, mas não transformadas, porém, isso é um problema freqüente em trabalhos de transformação genética em citros (PEÑA, et al., 1995a; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; ALMEIDA et al., 2003a). A regeneração de brotos escapes ou quiméricos em alta freqüência tem sido bastante reportado). Cerca de 95% de brotos regenerados de citrange ‘Carrizo’, citrumelo ‘Swingle’ e lima ácida ‘Galego’ foram escapes, quando utilizaram  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  do agente seletivo canamicina (MOORE et al., 1992). Em transformação genética com laranja Pineapple, 92% das brotações obtidas foram escapes (PEÑA et al., 1995a). Gutiérrez; Luth e Moore (1997) estudando fatores que poderiam afetar a transformação genética de citros com o gene da capa protéica CTV, também observaram grande quantidade de gemas escapes de laranja azeda e laranja ‘Pineapple’. A alta freqüência de regeneração de brotos escapes pode ser atribuída à proteção que as células transformadas fazem às células não-transformadas da ação do agente seletivo canamicina e a persistência da *Agrobacterium* no tecido do explante por um longo período após o co-cultivo que pode favorecer a formação de falsos positivos ou ainda brotos quiméricos (DOMÍNGUEZ et al., 2004).



Resultados divergentes têm sido relatados, no que se refere à associações feitas com o número de cópias do transgene integradas no genoma de plantas que passaram por processo de transferência gênica. Craig et al. (2005) relataram que não houve correlação entre o número de inserções do gene e o nível de expressão do mesmo. Com isso, foi sugerido que múltiplas inserções podem ter pouco ou nenhum efeito na expressão de transgenes. Recentemente, em avaliação da resistência ao CTV em plantas transgênicas de pomelo, não foi encontrada uma associação entre resistência e número de cópias do transgene. Linhagens demonstradas suscetíveis apresentaram uma cópia, assim como a linhagem que mostrou maior resistência, e, a linhagem considerada parcialmente resistente apresentou três cópias do transgene integradas ao seu genoma (FEBRES; LEE; MOORE, 2008). Entretanto, em outros trabalhos, foi encontrada uma correlação direta entre número de cópias do transgene e resistência por silenciamento gênico (LINDBO; DOUGHERTY, 1992; WHTERHOUSE; GRAHAM; WANG, 1998). O silenciamento gênico pós-transcricional foi verificado em linhagens transgênicas contendo mais que três cópias do T-DNA e não foi observado em linhagens transgênicas que apresentavam apenas uma cópia do T-DNA (TANG; NEWTON; WEIDNER, 2007).

As plantas transgênicas obtidas neste trabalho, sete da variedade limão ‘Cravo’ e uma de laranja ‘Valência’, foram submetidas à análises de RT-PCR e ‘northen blot’ para a verificação da expressão do transgene. Dessas plantas, seis de limão ‘Cravo’ foram analisadas por ‘Southern blot’, confirmando a integração do transgene ao genoma e, como citado anteriormente, foi possível a observação de um a quatro eventos de inserção do transgene.

A análise de RT-PCR revelou a amplificação de um produto esperado de 630 pb quando se utilizaram ‘primers’ específicos para detecção do gene da replicase do *Marafivirus* e de 700 pb quando se utilizaram ‘primers’ específicos para detecção do gene *nptII* com a utilização do cDNA das plantas transgênicas (Figura 11), indicando que está ocorrendo a transcrição desses genes.

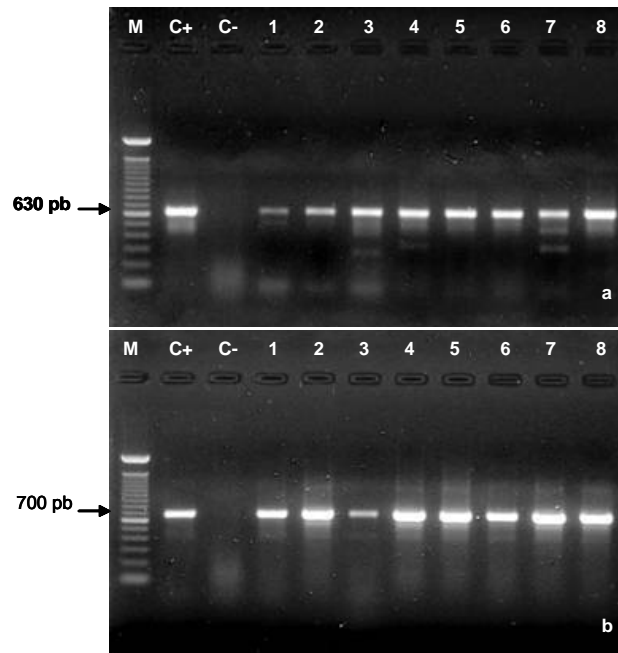


Figura 11 – Confirmação da transcrição do transgene em plantas de limão ‘Cravo’ e laranja ‘Valência’. **a.** RT-PCR para detecção do RNAm do gene da replicase do *Marafivirus*: M = marcador 100 pb (Invitrogen); C+ = controle positivo (DNA de planta transgênica); C- = controle negativo (cDNA de planta não transgênica); 1 a 7 = cDNA de plantas transgênicas de limão ‘Cravo’; 8 cDNA de planta transgênica de laranja ‘Valência’. **b.** RT-PCR para detecção do RNAm do gene *nptII*: M = marcador 100 pb (Invitrogen); C+ = controle positivo (DNA de planta transgênica); C- = controle negativo (cDNA de planta não transgênica); 1 a 7 = cDNA de plantas transgênicas de limão ‘Cravo’; 8 cDNA de planta transgênica de laranja ‘Valência’

Na análise de ‘northern blot’ para o gene da replicase do *Marafivirus* nas plantas transgênicas, apenas duas plantas de limão ‘Cravo’ apresentaram um leve sinal de hibridização. Entretanto, para o gene *nptII*, a análise de ‘northern blot’ detectou a expressão gênica na maioria das plantas (Figura 12). A RT-PCR é uma análise mais sensível que o ‘northern blot’. Sendo assim, se a expressão do transgene for fraca ou se a maior parte do RNA mensageiro estiver degradado, é possível obter um resultado positivo na RT-PCR e negativo no ‘northern blot’.

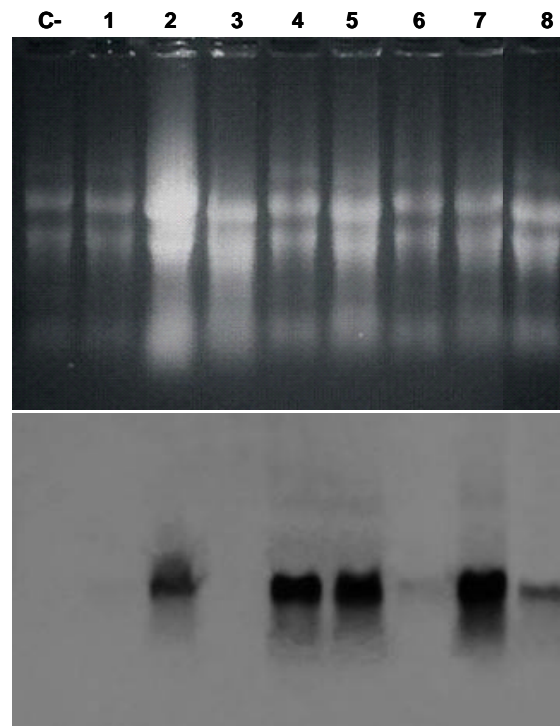


Figura 12 - Análise de 'northern blot' das plantas transgênicas de limão 'Cravo' e laranja 'Valência'. C- = C- = controle negativo (planta não transgênica); colunas 1 a 7 = plantas transgênicas de limão 'Cravo'; coluna 8 = planta transgênica de laranja 'Valência'. Parte superior: gel de RNA total extraído de folha das plantas; parte inferior: transferência de 'northern' em que foi utilizada a sonda do gene *nptII*

O gene da replicase do *Marafivirus* está na construção gênica em seqüência sense e antisense, interligadas por um íntron obtido do gene da quitinase dos citros, em uma construção tipo hairpin. Alguns estudos têm demonstrado que construções gênicas, onde o gene se encontra em seqüência sense e antisense (repetições invertidas) interligadas por um íntron, formariam os hpRNAs (RNA hairpin) por complementariedade, e que a presença do íntron auxiliaria na hibridização do RNA, promovendo a formação do dsRNA, silenciando de 90-100% de plantas transformadas com determinado gene (SMITH et al., 2000; WESLEY et al., 2001). Um complexo de RNases específicas para esses dsRNAs, conhecidas como Complexo DICER ou RNases tipo III, são responsáveis pela degradação dessas moléculas e, em conseqüência, levariam ao PTGS, tornando a planta resistente a determinado vírus (CERUTTI, 2003). O fato de não ter sido verificada a expressão do gene da replicase do *Marafivirus* na análise de 'northern blot' indica que pode estar ocorrendo algum mecanismo de silenciamento gênico nessas plantas, uma vez que, foi confirmada a sua integração ao genoma das mesmas.

As plantas transgênicas estão sendo cultivadas em estufa e, até o momento apresentam bom desenvolvimento, sem nenhuma alteração fenotípica. Em trabalhos futuros essas plantas deverão ser avaliadas quanto à tolerância à morte súbita dos citros. As plantas contendo o gene da replicase do *Marafivirus* podem ser inoculadas por enxertia, com material coletado de plantas com sintomas de morte súbita, e posteriormente, deve-se tentar quantificar o *Marafivirus* nestas plantas. Futuras análises para a detecção de SiRNAs também fornecerão resultados mais conclusivos.

## 5 CONCLUSÕES

A organogênese *in vitro* de laranja azeda é favorecida pela adição de BAP, em combinação ou não com ANA, e em combinações com CIN ao meio de cultura, e é prejudicada pela ausência de luz.

Segmentos de epicótilo de plântulas germinadas *in vitro* e segmentos internodais de plantas também germinadas *in vitro* são explantes indicados para resposta organogênica de laranja azeda.

O máximo enraizamento observado para as brotações regeneradas em explantes de laranja azeda foi obtido em meio MT com metade da concentração de sais, sem auxinas ou com adição de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  IBA.

Foi possível obter plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ e de laranja ‘Valência’ contendo o gene da replicase do *Marafivirus*.

## REFERÊNCIAS

- 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, p.35-40, 2002.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Histological characterization of *in vitro* adventitious organogenesis in *Citrus sinensis*. **Biologia Plantarum**, Praha, v.50, n.3, p.321-325, 2006.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2003b.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerick, v.164, p.203-211, 2003a.
- AL-BAHRANY, A.M. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm) Swing. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.95, p.288-295, 2002.
- ANDRADE, G.M.; SARTORETTO L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, p.465-476, 2003.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; SCHINOR, E.H. Proteção integrada: doenças. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J.D.; FIGUEREDO, J.O. **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2003. Cap. 7, p. 113-146.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 6, p. 127-143.
- ASTUA-MONGE G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p. 48-53, 2004.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA, J.M.; GONZALEZ, S.G.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with bO (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Amsterdam, v. 24, p.185-196, 2006.
- BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene hrpN (Harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico**

(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). 2007. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

BARBOSA, C.J. ; SANTOS FILHO, H.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; MELO, R.L. Vírus e viróides dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, n.209, p. 88-94, mar./abr. 2001.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 281-297, 2004.

BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T.R.; BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analyses of Citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, p.502-512, 2003.

BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Current Biology**, London, v.12, n.3, p.82-84, 2002.

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

BENEDDRA, T.; PICARD, C.; PETIT, A.; NESME, X. Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p.225-231, 1996.

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.28, p.229-234, 2001b.

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; HISSANO, Z.; VIEIRA, L.G.E. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, p.27-34, 2001a.

BEYL, C.A. Getting started with tissue culture. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap.3, p.21-38.

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

BOND, J.E.; ROOSE, M.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p.229-234, 1998.

BONGA, J. M. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. Dordresht: Marthinus Nijhoff; Junk Publishers, 1982. p.387-412.

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

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

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M. TAKAHASHI, E.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 A.F.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin* A gene from *Tricloplucia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.

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

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1999. v. 2, p. 679-735.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. Introdução à transformação genética de plantas. In: BRASILERO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargen, 1998. p.13-16.

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

CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F.; MICHAUX-FERRIÉRE, N.; DAMBIER, D.; DALNIC, R.; TEISSON, C. Characteristics of Citrus cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p. 464-470, 1995.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecido e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/EMBRAPA, v. 1, p.87-132, 1998.

CARDOSO, S.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L. Avaliação de resistência ao cancro cítrico em plantas de laranja 'Hamlin' transformadas com o gene *Xa21*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31 (Suplemento), p.174, 2006.



- CERUTTI, H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? **Trends in Genetics**, Amsterdam, v.19, n.1, p.39-46, 2003.
- CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p.271-278, 1998b.
- CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.75, p.26-30, 2000.
- CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, London, v.7, p.51-59, 1998a.
- CHATUVERDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. **HortScience**, Alexandria, v.9, p.118-120, 1974.
- CHÁVEZ-VELA, N.A.; CHÁVEZ-ORTIZ, L.I.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Transformación genética del naranjo agrio usando *Agrobacterium rhizogenes*. **Agrociencia**, Montecillo, v.37, n.6, p.629-639, 2003.
- CHILTON, M.D.; DRUMMOND, M.H.; MERLO, D.J.; SCIAKY, D.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v.11, p.263-271, 1977.
- CITRICULTURA paulista: mais uma chance perdida. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, v. 6, n.64, dez. 2007. Disponível em: <[www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil](http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil)>. Acesso em: 31 de jan. 2008.
- COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G.; MOSQUIMA, P.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.100, p.63-74, 2004.
- CRAIG, W.; GARGANO, D.; SCOTTI, N.; NGUYEN, T.T.; LAO, N.T.; KAVANAGH, T.A.; DIX, P.J.; CARDI, T. Direct gene transfer in potato: A comparison of particle bombardment of leaf explantes and PEG-mediated transformation of protoplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.24, p.603-611, 2005.
- DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITER, F.G.J. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cv. 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.49, p.55-62, 1992.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.427-433, 2000.

- DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.14, p. 171-183, 2004.
- 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: IAC; Fundag, 2005. cap. 1, p. 3-15.
- DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue cultures of three *Citrus* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.16, p.123-133, 1989.
- DURAN-VILA, N.; GORGOCENA, Y.; ORTEGA, V.; ORTIZ, J.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.): effect of temperature and photosynthetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Doichecht, v.29, p. 11-18, 1992.
- EDRISS, M. H.; BURGER, D. W. *In vitro* propagation of 'Troyer' citrange from epicotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, p.159-162, 1984.
- FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 12 mar. 2008.
- FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.51, p.167-194, 2000.
- FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MENDOZA, A.H.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.60, p.153-165, 2006.
- FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU, J. PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Increased tolerance to *Phytophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 175-185, 2001.
- FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza vírus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.27, p.93-104, 2008.
- FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closteovirus genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.23, p.421-428, 2003.
- FEICHTENBERGER E.; BASSANEZI R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JUNIOR, 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.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v.391, p.806-811, 1998.

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

FUNDECITRUS. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em: 11 jan. 2008.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. **Manual de morte súbita dos citros**. Araraquara, 2003. 11p.

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

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

GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Tristeza. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS PRESS, 1989. p.48-50.

GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; PURCIFULL, D. E. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.6, p.965-968, 1977.

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

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

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

GIMENES-FERNANDES, N. BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.95, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

JESUS JUNIOR, W.C.; BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A. Morte súbita dos citros ainda tem origem desconhecida. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p. 34-39, 2004.

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

KAYIM, M.; CECCARDI, T.L.; BERRETA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; DERRICK, K.S. Introduction of a citrus blight-associated [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. x *Poncirus trifoliata* (L.)Raf.] by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 377-385, 2004.

- KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, p. 99, 2003.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v.64, p.91-97, 1989.
- KOCHBA, J.; SPEIGEL-ROY, P.; NEUMANN, H.; SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Kazamizara, v.105, p. 359-368, 1982.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TÔRRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa- CNPH, 1999. p.519-531.
- KLEE, H.J.; HORSCH, R.B.; ROGGERS, S.G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.38, p.467-486, 1987.
- KUNITAKE, H. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 280-298. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30).
- LEE, Y.W.; JIN, S.; SIM, W.S.; NESTER, E.W. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the Vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v.92, p.12245-12249, 1995.
- LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus*-replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, Amsterdam, v.189, p.725-733, 1992.
- LUTH, D.; MOORE, G. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.57, p. 219-222, 1999.
- MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F.; ZACHARIAS, P.R.A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPÇÃO, L.C.; CAMAROTTE, G. ; CARDOZO, J. ; CASAGRANDE, E.C. ; FERRARI, F. ; FRANCO, S.F. ; GIACHETTO, P.F. ; GIRASOL, A. ; JORDÃO Jr., H. ; SILVA, V.H.A. ; SOUZA, L.C.A. ; AGUILAR-VILDOSO, C.I. ; ZANCA, A.S. ; ARRUDA, P. ; KITAJIMA, J.P. ; REINACH, F.C. ; FERRO, J.A. ; SILVA, A.C.R. Identification and genomic characterization of new virus (Tymoviridae family) associated with citrus sudden death disease. **Journal of Virology**, Washington, v.79, n.5, p.3028-3037, mar., 2005.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 9, p. 223-277.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MÜLLER, G.W. Morte súbita dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.1, p.69-79, 2004.

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

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

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

MENDES, M. Ótima perspectiva para citricultura profissional. In: FNP consultoria e comércio. **Agriannual 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 277-279.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplast of brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.727-732, abr. 2000.

MLOTSHWA, S.; VOINNET, O.; METTE, M.F.; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S.; PRUSS, G.; VANCE, V. RNA silencing and the mobile silencing signal. **Plant Cell**, Rockville, v.14, p.289-301, 2002. Supplement.

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

MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, p. 238-242, 1992.

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.116-144.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.87, p.275-290, 2001.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, London, v.85, p.103-110, 2000.

MOURA, T.L.M.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, J.M.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese in vitro de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, ago. 2001.

MSC está restrita ao sul do Triângulo Mineiro e ao norte do Estado de São Paulo. **Fundecitrus**, Araraquara, n.136, nov./dez., p.7, 2006.

MSC ainda está viva. **Fundecitrus**, Araraquara, ano 23, n.141, set./out. 2007. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em: 9 jan. 2008.

MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.) **Citricultura brasileira**. 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.735-762.

MULLER, G.W.; RODRIGUEZ, O.; COSTA, A.S. A tristeza virus complex severe to sweet orange varieties. In: INT. ORG. CITRUS VIROL., 4., 1966, Roma. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1968. p.64-71.

MULLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 19, p. 569-604.

MULLER, G.W.; NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MARTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JUNIOR, J.; SOBRINHO, J.T.; CARVALHO, S.A.; GIROTTO, L.F.; MACHADO, M.A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, p.371-386, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

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

NEVES, M.F.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; AMARO, A.A., NEVES, E.M.; JANK, M.S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Atlas, 2007. 110p.

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

OMAR, A.A.; SONG, W.J.; GROSSER, J.W. Introduction of *Xa21*, a *Xanthomonas*-resistance gene from rice, into 'Hamlin' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 82, n. 6, p.914-923, 2007.

PALDYAL, K.P.; IIAQ, N. *In vitro* propagation og pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck). In **Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v.36, p.515-516, 2000.

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

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

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

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

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, M. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* OR *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, London, v.19, p.263-267, 2001.

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

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

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, p.591-596, 1998.

PERIANI, L.; RADKE, S.; WILKE-DOUGLAS, M.; BOSSERT, M. Gene transfer methods for crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 68, p. 566-570, 1986.

PESQUISA fundamental. **Fundecitrus**, Araraquara, ano 23, n.137, jan./fev. 2007. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> . Acesso em 9 jan. 2008.

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

RICCI, A.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PIEDADE, S.M.S. somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, p.41-46, 2002.



- ROCHA-PEÑA, M. A.; LEE, R.F.; LASTRA, R. NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.M.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. Citrus triteza virus and its aphid vector *Toxoptera citricidus* – Threats to citrus production in the Caribbean and central and North America. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.5, p.437-445, 1995.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, London, v.113, p.395-405, 1985.
- SAUTON, A.; MOURAS, A.; LUTZ, A. Plant regeneration from citrus root meristems. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.57, p.227-231, 1982.
- SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G. AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.463-466, 2006.
- SCHROEDER, C.A.; SPECTRO, C. Effect of giberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. **Science**, Washington, v.126, p.701-702, 1957.
- SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **Plant Cell**, Rockville, v.8, n.19, p.1699-1710, 1996.
- SILVA, R.P.; COSTA, M.A.P.C; SOUZA, A.S. ALMEIDA, W.A.B. Regeneração de plantas de laranja ‘Pêra’ via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.12, p.1153-1159, 2005a.
- SILVA, R.P.; SOUZA, E.S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.484-487, 2005b.
- SILVA, R.P.; ALMEIDA, W.A.B.; SOUZA, E.S.; MOURÃO FILHO, F.A. *In vitro* organogenesis from adult tissue of ‘Bahia’ sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Fruits**, Paris, v.61, n.6, p.367-371, 2006.
- SMITH, N.A.; SINGH, S.P.; WANG, M.-B.; STOUTJESDIJK, P.A.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, London, v.407, p.319-320, 2000.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

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

SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; FREITAS JUNIOR, W.; SCHINOR, E.H.; STACH-MACHADO, D.R.; HARAKAVA, R. MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Reação à infecção pelo *citrus tristeza virus* (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' transformadas com sequências do genoma do CTV. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v.19, 2007. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 11, 2007, Gramado. 1 CDROM.

STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v.318, p.624-629, 1985.

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

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subf. Aurantioideae). In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1943. v.1, p. 129-474.

TANG, W.; NEWTON, R.J.; WEIDNER, D.A. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in castor white pine. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.58, p.545-554, 2007.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. chap.2, p.17-36.

TOZATTI, G. Novas tecnologias aperfeiçoam a citricultura. In: FNP Consultoria & Comércio. **Agriannual 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006.

VANECK, J.M.; KITTO S.L. Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.41-49, 1992.

VIANA, M. M.; BRAGA, D. Citros: cenário continua positivo em 2008. **Hortifruti Brasil**, ano 6, n.64, dez. 2007. Disponível em: <[www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil](http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil)>. Acesso em: 31 de jan. 2008.

VITTI, A. Exportações avançam. **Hortifruti Brasil**, ano 6, n.63, nov. 2007. Disponível em: <[www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil](http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil)>. Acesso em: 31 jan. 2008.

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

WATERHOUSE, P.; WANG, M.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. **Nature**, London, v.411, p.834-842, 2001.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, London, v.114, p.308-309, 2001.

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

WASSENEGGER, M. RNA-directed DNA methylation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.43, p.203-220, 2000.

WESLEY, S.V.; HELLIWELL, C.A.; SMITH, N.A.; WANG, M.-B.; ROUSE, D.T.; LIU, Q.; GOODING, P.S.; SINGH, S.P.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P.A.; ROBINSON, S.P.; GLEAVE, A.P.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal**, New York, v.27, n.6, p.581-590, 2001.

WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, H.W.; WANG, M.B. Virus resistance and silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v.95, p.13959-13964, 1998.

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

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

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

**ANEXO**

## MEIOS DE CULTURA

### Soluções estoque do meio MT (Murashige & Tucker, 1969) para cultivo de explantes

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

**MT Cálcio estoque (66x)**CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O**g L<sup>-1</sup>**

29,33

**Soluções estoque do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) para cultivo de explantes****MS Macronutrientes estoque (50x)**NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>**g L<sup>-1</sup>**

82,5

KNO<sub>3</sub>

95,0

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

18,5

KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>

8,5

**MS Micronutrientes estoque (100x)**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>**g L<sup>-1</sup>**

0,62

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O

2,23

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,86

KI

0,083

NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

0,025

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

0,0025

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

0,0025

**MS Ferro estoque (200x)**Na<sub>2</sub>EDTA**g L<sup>-1</sup>**

7,45

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

5,57

**MS Vitaminas estoque (100x)**

Myo-inositol

**g L<sup>-1</sup>**

10,0

Tiamina-HCL

0,01

Pyridoxina-HCL

0,05

Ácido nicotínico

0,05

Glicina

0,2

|                                      |                         |
|--------------------------------------|-------------------------|
| <b>MS Cálcio estoque (66x)</b>       | <b>g L<sup>-1</sup></b> |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 29,33                   |

### **Composição dos meios de cultura para cultivo de explantes**

#### **MT**

|                                   |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|
| MT Macronutrientes estoque (50x)  | 20,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MT Micronutrientes estoque (100x) | 10,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MT Vitaminas estoque (100x)       | 10,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MT Cálcio estoque (66x)           | 15,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MT Ferro estoque (200x)           | 5,0 mL L <sup>-1</sup>  |
| Sacarose                          | 25,0 g L <sup>-1</sup>  |
| Ágar                              | 8,0 g L <sup>-1</sup>   |

#### **MS**

|                                   |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|
| MS Macronutrientes estoque (50x)  | 20,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MS Micronutrientes estoque (100x) | 10,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MS Vitaminas estoque (100x)       | 10,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MS Cálcio estoque (66x)           | 15,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MS Ferro estoque (200x)           | 5,0 mL L <sup>-1</sup>  |
| Sacarose                          | 25,0 g L <sup>-1</sup>  |
| Ágar                              | 8,0 g L <sup>-1</sup>   |

#### **DBA<sub>3</sub>**

|                                   |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|
| MT Macronutrientes estoque (50x)  | 18,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MT Micronutrientes estoque (100x) | 9,0 mL L <sup>-1</sup>  |
| MT Vitaminas estoque (100x)       | 9,0 mL L <sup>-1</sup>  |
| MT Cálcio estoque (66x)           | 15,0 mL L <sup>-1</sup> |
| MT Ferro estoque (200x)           | 5,0 mL L <sup>-1</sup>  |
| Água de côco                      | 20,0 mL L <sup>-1</sup> |
| Sacarose                          | 25,0 g L <sup>-1</sup>  |

Ágar 8,0 g L<sup>-1</sup>

**Obs:** Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o ágar e foram autoclavados por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg cm<sup>2</sup>).

**Composição do meio YEP para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens***

|                     | g L <sup>-1</sup> |
|---------------------|-------------------|
| <b>YEP líquido</b>  |                   |
| Peptona             | 10,0              |
| Extrato de Levedura | 10,0              |
| NaCl                | 5,0               |

**Obs:** o meio de cultura YEP teve o pH ajustado para 7,0 antes de adicionar o ágar, e autoclavados por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg cm<sup>2</sup>). Meio YEP sólido: adição de 15 g L<sup>-1</sup> de ágar.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)