

# Transformação genética de citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) com o gene marcador fosfomanose isomerase (*pmi*)

José Geraldo Zaparoli Vieira<sup>1</sup>, Ricardo Tadeu Faria<sup>1\*</sup>, Luiz Gonzaga Esteves Vieira<sup>2</sup> e Hugo Bruno Correa Molinari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Cx. Postal 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto Agrônomo do Paraná, Cx. Postal 481, 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil.

\*Autor para correspondência. E-mail: faria@uel.br

**RESUMO.** Um protocolo de transformação usando manose como agente seletivo foi avaliado para transformação genética do porta-enxerto citrumelo Swingle. Dois experimentos independentes foram conduzidos visando definir a curva de resposta para determinar a menor concentração de manose capaz de inibir a multiplicação de brotos. Baseando-se nesses resultados, 5,0 mM de manose foi utilizado para a transformação genética de citrumelo Swingle. Plantas transgênicas foram obtidas via *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA105, com uma eficiência de transformação de 11%. Os resultados descritos neste estudo demonstram que apesar da frequência de transformação ainda ser considerada relativamente baixa, o gene *pmi* mostra-se como uma boa alternativa ao sistema de seleção mais comumente empregado para a transformação de citros baseado no gene *nptIII* para resistência a canamicina.

**Palavras-chave:** *Citrus*, manose, transformação genética, gene marcador, fosfomanose isomerase.

**ABSTRACT.** Genetic transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) with the marker gene phosphomannose isomerase (*pmi*).

A transformation protocol using mannose as selective agent was evaluated for genetic transformation of the rootstock Swingle citrumelo. Two independent experiments were carried out to define the smallest mannose concentration capable to inhibit the multiplication of adventitious buds. Based on these results, 5.0 mM of mannose was chosen for Swingle citrumelo genetic transformation. An 11% transformation efficiency was obtained using the *Agrobacterium tumefaciens* binary strain EHA105. The results described in this study showed that, despite the relatively low transformation frequency, the gene *pmi* is a good alternative to the most commonly used selection scheme for citrus transformation, based on gene *nptIII* for kanamycin resistance.

**Key words:** *Citrus*, mannose, genetic transformation, marker gene, phosphomannose isomerase.

## Introdução

De modo geral, para aumentar a eficiência dos protocolos de transformação de plantas, um gene marcador é co-introduzido juntamente com o gene de interesse. Para permitir a seleção das poucas células transformadas em uma grande população de células não transformadas, normalmente se utiliza gene de seleção que proporciona resistência a antibióticos ou herbicidas. A finalidade do uso de um gene marcador de seleção é permitir que apenas as células transformadas se desenvolvam. O ideal é que o gene marcador seja capaz de se expressar em todos os tecidos e em um grande número de espécies vegetais (Herrera-Estrella *et al.*, 1983).

Vários agentes seletivos e genes de resistência

foram investigados concomitantemente às metodologias de transferência de genes e de cultura de tecido. Os genes marcadores de seleção mais amplamente usados incluem o *nptII* (Bevan *et al.*, 1983), *bar* (Thompson *et al.*, 1987) e *hph* (Waldron *et al.*, 1985), codificando neomicina fosfotransferase (NPT), fosfinotricina acetil transferase (PAT), higromicina fosfotransferase (HPT) que conferem resistência a canamicina e outros aminoglicosídeos relacionados (gentamicina e paromomicina), fosfinotricina (PPT) e higromicina, respectivamente.

Na grande maioria dos trabalhos em transformação de plantas cítricas, o gene marcador de seleção utilizado é o *nptII* (Moore *et al.*, 1992;

Gutierrez *et al.*, 1997; Bond e Roose, 1998; Bespalhok Filho *et al.*, 2001). Apesar da baixa probabilidade e da falta de confirmação experimental da transferência de DNA de plantas para bactérias, há restrições ao seu uso em plantas transgênicas devido ao receio de sua possível transferência horizontal para bactérias de importância para a saúde humana. Assim, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com genes de seleção que conferem resistência a antibióticos, como o gene *nptII*, não é recomendável devido à grande polêmica gerada em inúmeros países importadores de produtos agrícolas.

O uso de agentes seletivos pode suprimir o desenvolvimento não somente das células não transformadas, mas também podem impedir a regeneração de tecidos transgênicos. Por isso, outros genes marcadores atuando para permitir vantagens fisiológicas às células transformadas (seleção positiva) e não em sistemas de detoxificação foram estudados. Joersbo e Okkels (1996) demonstraram que a manose juntamente com o gene da fosfomanose isomerase (*pmi*) pode ser utilizada como um agente para a seleção de plantas transgênicas *in vitro*. O sistema de seleção utiliza o gene *pmi* de *Echerichia coli* que codifica para a enzima fosfomanose isomerase (PMI, EC 5.3.1.8) que converte manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato que, por sua vez, pode ser utilizada como fonte de carbono por células transformadas. Células e tecidos transformados com esse gene podem utilizar manose como fonte de carbono, adquirindo assim, uma vantagem comparativa quando cultivados em meio contendo este carboidrato. Esse sistema de seleção já foi utilizado para a seleção de plantas transgênicas em beterraba (Joersbo *et al.*, 1998), arroz (Lucca *et al.*, 2001), milho e trigo (Wright *et al.*, 2001) e laranja doce (Boscariol *et al.*, 2003).

Citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* Raf.) é um importante porta-enxerto para a produção comercial de citros. Nos anos 40, esse híbrido começou a ser testado como porta-enxerto para variedades comerciais de citros, sendo introduzido no Brasil logo após esse período. Desde então, o citrumelo Swingle despontou em diversos experimentos em praticamente todas as regiões citrícolas mundiais como um ótimo porta-enxerto alternativo (Citroclima, 2002). Estima-se que mais de 50% das plantas cítricas cultivadas na Flórida estão sobre esse porta-enxerto (Castle e Stover, 2001). No Brasil, o maior produtor de cítricos do mundo, o citrumelo Swingle é o segundo porta-enxerto mais utilizado e vem ganhando maior importância devido à sua tolerância à Morte Súbita

dos Citros (MSC).

Visando buscar uma alternativa ao uso de genes que confirmam resistência a antibióticos, este trabalho teve como objetivos determinar a concentração de manose em meio de cultura para servir como agente de seleção para o porta-enxerto citrumelo Swingle e o estabelecimento de protocolo de transformação genética para esse porta-enxerto usando o gene *pmi* e manose como agente seletivo.

## Material e métodos

Sementes de citrumelo Swingle foram descascadas, removendo-se a dupla película que envolve a semente, desinfetadas superficialmente por 20min com uma solução de 2,5% (v/v) de hipoclorito de sódio e enxaguadas cinco vezes com água destilada estéril. As sementes desinfetadas foram semeadas individualmente em frascos de 150 x 25 mm com tampa de polipropileno, contendo 25 mL de meio constituído de sais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 87 mM de sacarose e solidificado com 2 g l<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup>, sem a adição de reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem por 20min a 121°C. Para o desenvolvimento das plântulas, as culturas foram mantidas no escuro a 27±1°C por 3 semanas.

Para os experimentos de otimização da concentração seletiva de manose e de transformação com o gene *pmi*, segmentos transversais de 1-2 mm foram retirados de epicótilos das plântulas cultivadas *in vitro*. A transformação genética de plantas utilizando genes marcadores de seleção tem como pré-requisito essencial determinar a dose inibitória dos agentes seletivos. Assim, visando avaliar a capacidade de seleção da manose em explantes de citrumelo Swingle, uma curva de resposta foi estabelecida em dois sistemas: explantes cultivados em presença de manose desde o início (Experimento 1), e explantes cultivados em meio com sacarose durante uma semana e, em seguida, subcultivados em meio de cultura com manose (Experimento 2). No primeiro experimento foram utilizadas as concentrações de 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM, 10,0 mM e 12,5 mM de manose no meio de cultura MS com 5 µM de 6BA (Benzilaminopurina) desde o início da cultura dos explantes. No segundo experimento, os explantes foram cultivados em meio MS com 5 µM de 6BA e 87 mM de sacarose por uma semana e em seguida transferidos para meio MS com manose, também nas mesmas concentrações acima descritas. Para se estabelecer a melhor concentração inibitória para a formação e o crescimento de brotos adventícios, foram avaliados o

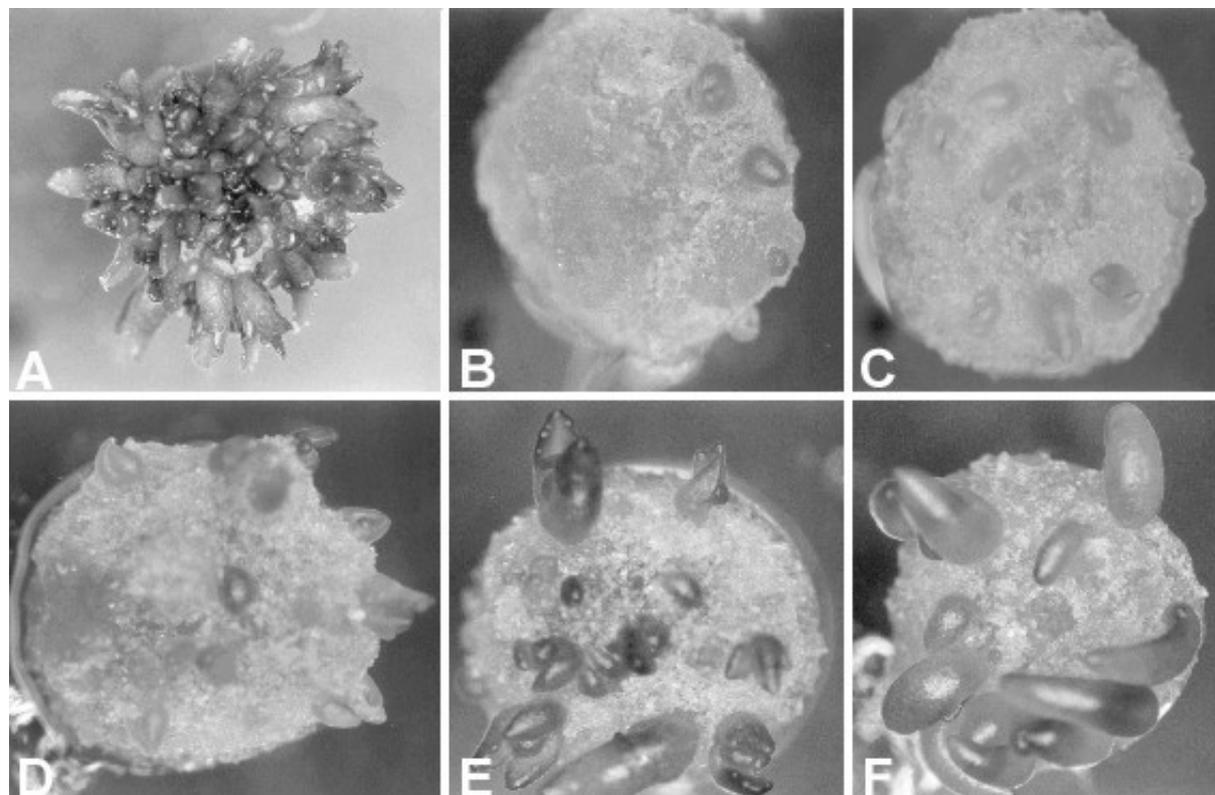
número de explantes com brotos e o número de brotos por explantes. Em cada experimento foram testados cinco tratamentos com três repetições, com 25 explantes para cada tratamento.

A estirpe hipervirulenta EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada no experimento de transformação. O plasmídeo vetor pNOV2819 usado para transformação dos porta-enxertos contém o gene marcador de seleção *pmi* (seleção positiva - Positech™), sob o controle do promotor constitutivo CMPS (Cestrium Yellow Leaf Curling). A introdução do plasmídeo pNOV2819 na estirpe EHA 105 de *A. tumefaciens* foi feita por eletroporação. O cultivo da estirpe EHA105, contendo o vetor pNOV2819, foi feito a 28°C em meio líquido YMB (Hooykaas *et al.*, 1977) suplementado com 20 mg l<sup>-1</sup> de rifampicina e 50 mg l<sup>-1</sup> de espectinomicina e mantido sob agitação (150 rpm). Após ajuste da concentração de bactéria (OD<sub>600</sub> = 0.2), foram adicionadas 200 µM de acetoseringona ao meio de cultura para posterior co-cultura com explante.

Para a co-cultura, explantes originados de corte fino de epicótilos de plântulas estioladas de citrumelo Swingle foram imersos na suspensão de *A. tumefaciens* por 5min e secos sobre papel de filtro

Whatman n° 1 esterilizado. Após 3 dias a 27±1°C, os explantes foram transferidos para meio de indução de brotos (micro e macronutrientes do meio MS com 5 µM de BA, 87 mM de sacarose, 200 mg L<sup>-1</sup> de timetina e cefotaxima e 8 g l<sup>-1</sup> de Bacto Agar) (Figura 1). Os explantes permaneceram uma semana em meio de indução de brotos suplementado com sacarose, sendo posteriormente subcultivados no mesmo meio, contendo 5,0 mM de manose para seleção dos brotos transgênicos putativos. Após três semanas, explantes contendo brotos foram transferidos para meio de alongamento (micro e macronutrientes do meio MS, acrescido de 5 µM 6BA) contendo as mesmas concentrações de cefotaxima, timetina e manose. Após três semanas, explantes com brotos alongados foram transferidos para frascos Magenta™ (4-5 explantes por frasco), contendo as mesmas concentrações de timetina, cefotaxima e 6BA, porém, sem agente seletivo, e subcultivados após quatro semanas para promover o rápido crescimento dos brotos.

A análise das plântulas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do transgene *pmi* em



**Figura 1.** Explantes cultivados em meio de indução de brotos suplementado com 87 mM de sacarose por uma semana e, em seguida, subcultivados no mesmo meio contendo diferentes concentrações de manose, após seis semanas. A – controle, sacarose 87 mM; B - manose 2,5 mM; C - manose 5,0 mM; D - manose 7,5 mM; E - manose 10,0 mM; F - manose 12,5 mM.

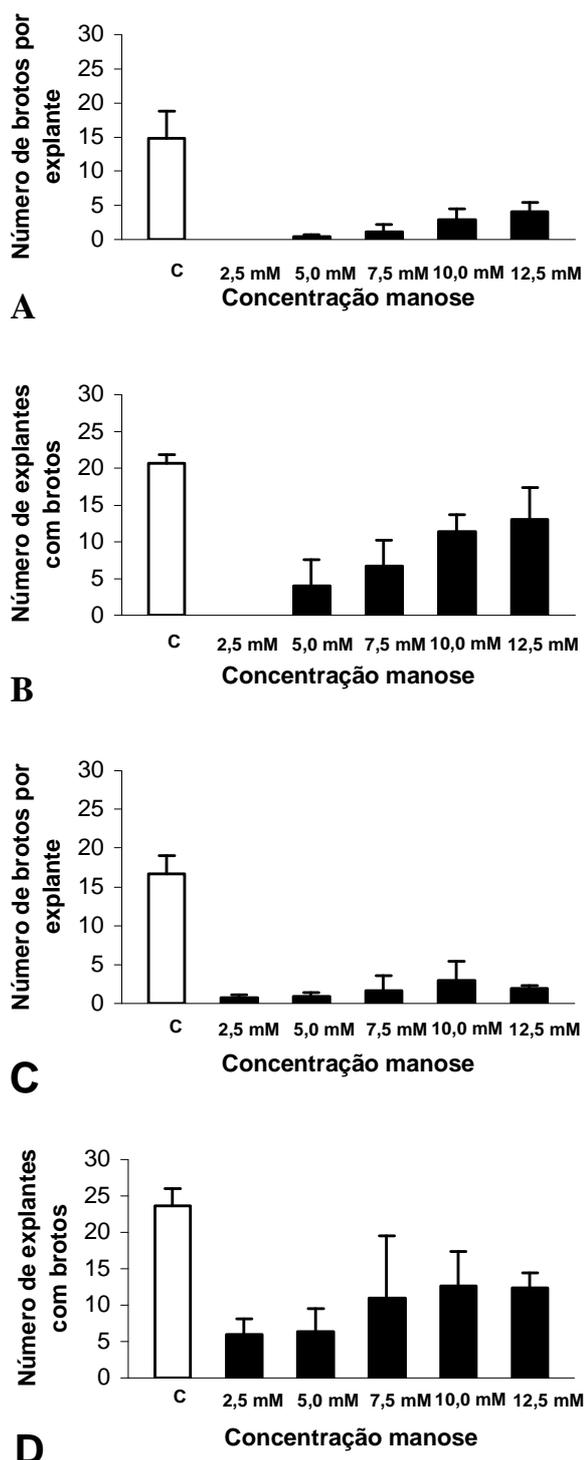
plântulas putativas de citrumelo Swingle. DNA genômico foi extraído de plântulas *in vitro* através de protocolo baseado em Dellaporta *et al.* (1983). Para a reação de PCR, os oligonucleotídeos iniciadores, 5'-ACAGCCACTCTCTCCATTCA-3' e 5'-GTTTGCCATCACTTCCAG-3', foram utilizados para amplificação de um fragmento de 514 pb, referentes à posição interna ao gene *pmi*, e os iniciadores 5'-CACGCAACGCATCCTCGATCAGCT-3' e 5'-ATGCGCATGAGGCTCGTCTTCTTCGAG-3' para amplificação de seqüência do gene *VirG*, visando detectar a presença ou ausência de contaminação com *Agrobacterium*. Cada reação (20 µL) continha 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase, 50 ng de DNA e 5 µM de cada iniciador específico para o gene *pmi*. As reações foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas: 3min a 94°C, seguido de 29 ciclos de amplificação (1min a 94°C; 30 s a 60°C; 1min a 72°C) e extensão final de 5min a 72°C, em termociclador PTC-100™ (MJ Research, MA, U.S.A). Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em tampão TBE 0,5X em gel de agarose 1,5%, visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), sob luz UV.

### Resultados e discussão

A presença de manose no meio de cultura causou uma visível alteração na capacidade de regeneração dos explantes, quando comparados com o controle (meio somente com sacarose durante todo o tempo em cultura). O número de brotos por explantes e o número de explantes com brotos produzidos em citrumelo Swingle estão representados na Figura 2.

Diferentemente do verificado em outros sistemas (Morten *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002; Boscaroli *et al.*, 2003), em que concentrações maiores do agente seletivo inibiram o desenvolvimento e regeneração de brotos, neste estudo, a utilização de maior quantidade de manose desde o início dos experimentos favoreceu a formação de brotos nos explantes, apesar do seu número reduzido (Figura 2A,B).

Nas concentrações mais baixas de manose houve um número muito reduzido de gemas formadas, tanto no experimento somente com manose desde o início do cultivo dos explantes quanto no experimento com a presença de sacarose na primeira semana de cultivo. Enquanto que na concentração de 2,5 mM de manose não foi possível observar explantes com brotos quando esse carboidrato foi usado de maneira exclusiva, a presença de sacarose



**Figura 2.** Número de explantes com brotos e número de brotos/explante em meio de cultura com manose após 6 semanas. A e B - explantes cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de manose desde o início do experimento. C e D - explantes cultivados em meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono por 1 semana e subcultivados em diferentes concentrações de manose. □ = meio MS suplementado com 87 mM de sacarose ■ = meio MS suplementado com concentrações crescentes de manose.

no início do período de cultura permitiu a formação de células meristemáticas (6 brotos/explante) em um pequeno número de explantes (Figura 2A,B).

No experimento em que se utilizou somente manose, as concentrações mais elevadas dessa fonte de carbono possibilitaram a formação de um número maior de explantes com brotos do que em concentrações mais baixas, alcançando a média de 13 explante com presença de brotos por placa na concentração de 12,5 mM de manose (Figura 2B). Isso indica que esse carboidrato pode servir como fonte de carbono para células de citrumelo, ainda que com eficiência bastante inferior à sacarose (média de 20,6 explantes com brotos/placa). Nenhuma atividade endógena da enzima PMI foi detectada em células de plantas até o momento (Todd e Tague, 2001). Por outro lado, Herold e Lewis (1977) sugerem que alta tolerância metabólica de plantas a manose pode ser devida a uma expressão endógena da enzima PMI, permitindo que células de plantas utilizem o açúcar manose como fonte de carbono. Outrossim, a capacidade dos explantes de citrumelo formarem brotos nas concentrações mais altas pode ser devida às baixas concentrações de manose utilizadas neste trabalho comparativamente àquelas comumente utilizadas em protocolos de seleção de outras espécies, uma vez que em altas concentrações ocorre o acúmulo da manose-6-fosfato e conseqüentemente, inibição da enzima fosfoglicose isomerase, a qual bloqueia a glicólise (Goldsworthy e Street, 1965); diminui o "pool" de pirofosfato (Pi) necessário para produção de ATP (Herold e Lewis, 1977); reprime a transcrição de genes associados com a fotossíntese e o ciclo glioxalato (Jang e Sheen, 1997) e causa a apoptose (Stein e Hansen, 1999). Desta forma, as baixas concentrações de manose aqui usadas podem não ter sido capazes de cessar o crescimento dos explantes e causar efeitos deletérios significativos no crescimento inicial dos brotos de citrumelo Swingle.

Resultados similares quanto à resposta dos explantes para a formação de brotos em concentrações mais altas de manose também foram observados quando a sacarose foi usada na primeira semana de cultivo (Figura 2D).

Conforme mencionado acima, quando a manose foi utilizada como única fonte de carbono, as concentrações maiores de manose proporcionaram o aumento do número de brotos por explante (máximo de 4,0 brotos/explante a 12,5 mM) (Figura 2B), porém, com alterações no tamanho, morfologia e pigmentação dos brotos formados (dados não apresentados). No experimento 2, a cultura de explantes em meio com sacarose pelo período de

uma semana antes da transferência dos explantes para meio com manose favoreceu a uniformização das gemas formadas em comparação com aquelas produzidas no experimento 1. Entretanto, a combinação de sacarose no início da cultura com a maior concentração de manose (12,5 mM) no período subseqüente diminuiu pela metade o número de brotos/explante (1,9 brotos/explante) em comparação com o meio de cultura somente com manose (Figura 2A, C). Esses dados mostram que a sacarose pode ter um efeito aditivo no que se refere à diminuição da formação de brotos. Apesar de esses dados serem contrários a resultados obtidos em outros trabalhos, os quais mostram que os efeitos tóxicos da manose aumentam com a diminuição/ausência de sacarose no meio de cultura (Joersbo *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2001), outros autores observaram que sacarose contribuiu para a inibição da formação de brotos em altas concentrações de manose (Kim *et al.*, 2002). A razão para esse efeito aditivo da sacarose é possivelmente devido à falta de Pi nas células quando hexoses derivadas da quebra da sacarose seqüestram Pi quando da sua fosforilação, o que pode ocasionar a diminuição da produção de ATP (Brouquisse *et al.*, 2001). Isso mostra que a presença de sacarose no meio de cultura aumenta a pressão de seleção proporcionada pela manose.

Apesar de 2,5 mM de manose inibir completamente a formação de brotos, essa concentração não foi a escolhida para os experimentos de transformação de citrumelo Swingle, pois o efeito inibitório observado pode ser mais devido à baixa concentração de uma fonte de carboidrato no meio de cultura do que ao acúmulo de manose nas células. Portanto, para obtenção de plantas transgênicas de citrumelo Swingle foi utilizada a concentração de 5,0 mM de manose, pois essa além de mostrar um efeito inibitório para o crescimento dos brotos também mostrou-se como a menor concentração de manose que permitiu um pequeno desenvolvimento de brotos mais vigorosos, evitando o confundimento da limitação da fonte de carboidrato.

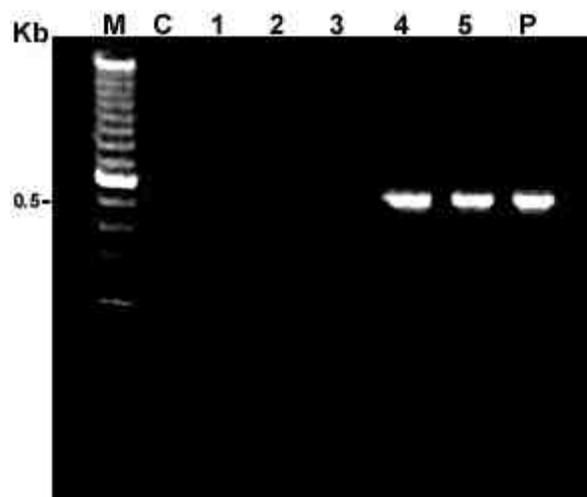
Na avaliação da transformação genética do citrumelo Swingle via *A. tumefaciens* a eficiência de transformação foi obtida dividindo-se o número de brotos *pmi*-positivos pelo número de brotos regenerados, multiplicado por 100. Desta forma, foi obtida uma eficiência de transformação de 11% para o porta-enxerto citrumelo Swingle (Tabela 1). Outros estudos que usaram manose como agente seletivo mostraram eficiências de transformação mais altas que as observadas com o emprego de

genes para resistência a antibióticos (Joersbo *et al.*, 1998; Lucca *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001). Apesar de que a comparação direta não ser possível devido ao uso de diferentes vetores, nossos resultados mostraram que a eficiência de transformação de explantes de citrumelo Swingle com manose foi muito semelhante a obtida com canamicina (11,6%) (Molinari, 2003), que é o agente seletivo mais comumente utilizado para transformação de *Citrus* spp.

**Tabela 1.** Eficiência de transformação via *A. tumefaciens* do porta-enxerto citrumelo Swingle

| Porta-enxerto     | Nº de explantes inoculados | Nº de brotos regenerados | Nº de brotos <i>pmi</i> positivos |
|-------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| citrumelo Swingle | 175                        | 18                       | 2                                 |

O produto da amplificação com iniciador específico para o gene *pmi* pode ser observado na Figura 3. A amplificação com o iniciador para verificar a presença do gene *VirG* foi negativa em todas as plantas (dados não apresentados).



**Figura 3.** PCR de plantas do porta-enxerto citrumelo Swingle transformadas com o gene *pmi*. Linha M, marcador de peso molecular 100 pb; linha C, controle negativo de citrumelo Swingle (planta não transformada); linhas 1-3, plantas não transformadas (escapes), linhas 4-5, plantas transformadas; P, controle positivo (plasmídeo pNOV2819).

### Conclusão

A manose inibiu o crescimento de brotos adventícios de citrumelo Swingle, podendo ser usada como agente de seleção em protocolos de cultura de tecidos para fins de transformação genética.

O período de uma semana em meio suplementado com sacarose e posterior sub-cultura com 5,0 mM de manose foi adequado para obter plantas transgênicas do porta-enxerto citrumelo

Swingle.

O sistema de seleção positiva com o gene *pmi* que codifica a enzima PMI (fosfomanose isomerase) pode substituir os sistemas tradicionais de seleção que utilizam genes para resistência a antibióticos e herbicidas em citrumelo Swingle.

### Referências

- BESPALHOK FILHO, J.C. *et al.* *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. *Crop Breed. Appl. Biotech.*, v. 1, p. 27-34, 2001.
- BEVAN, M. *et al.* A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, London, v. 304, p. 184-187, 1983.
- BOND, J.E.; ROOSE, M.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 18, p. 229-234, 1998.
- BOSCARIOL, R.L. *et al.* The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 22, p. 122-128, 2003.
- BROUQUISSE, R. *et al.* Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. *Plant Physiol.*, Bethesda, v. 125, p. 1485-1498, 2001.
- CASTLE, B.; STOVER, E. Update on use of Swingle citrumelo rootstock. *Agricultural Science*. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, USA. 4 p. 2001.
- CITROCLIMA. Disponível em <http://www.citroclima.com.br/>. Acesso em: 25 nov. 2002.
- DELLAPORTA, S.L. *et al.* A plant miniprep: version II. *Plant Mol. Biol.*, Dordrecht, v. 1, p.19-20. 1983.
- GOLDSWORTHY, A.; STREET, H.E. The carbohydrate nutrition of tomato roots. VIII. The mechanism of the inhibition by d-mannose of the respiration of excised roots. *Ann. Bot.*, London, v. 29, p. 45-58, 1965.
- GUTIERREZ, E.M.A. *et al.* Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 16, p. 745-753, 1997.
- HEROLD, A.; LEWIS, D.H. Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol.*, Cambridge, v. 79, p. 1-40, 1977.
- HERRERA-ESTRELLA, L. *et al.* Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.*, Oxford, v. 2, p. 987-995, 1983.
- HOOYKAAS, P.J.J. *et al.* Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium* "ex planta". *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 98, p. 477-484, 1977.
- JANG, J.C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants.

*Trends Plant Sci.*, Oxford, v. 2, p. 208-214, 1997.

JOERSBO M.; OKKELS, F.T. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 16, p. 219-221.

JOERSBO, M. *et al.* Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.*, Dordrecht, v. 4, p. 111-117, 1998.

KIM, Y.J. *et al.* A new selection system for pepper regeneration by mannose. *J. Plant Biotechnol.* v. 4, p. 129-134, 2002.

LUCCA, P. *et al.* Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Mol. Breed.*, Dordrecht, v. 7, p. 43-49, 2001.

MOLINARI, H.B.C. *Transformação genética de porta-enxertos para Citrus spp. visando obter maior tolerância ao estresse hídrico.* 2003. Tese (Mestrado)—Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

MOORE, G.A. *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 11, p. 238-242, 1992.

MORTEN, J. *et al.* Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.*, Dordrecht, v. 4, p. 111-117, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

STEIN, J.C.; HASEN, G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol.*, Bethesda, v. 121, p. 1-9, 1999.

THOMPSON, C.J. *et al.* 1987 Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.*, Oxford, v. 6, p. 2519-2523, 1987.

TOOD, R.; TAGUE B. W. Phosphomannose Isomerase: A versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germline transformation. *Plant. Mol. Biol.*, Dordrecht, v. 19, p. 307-319, 2001.

WALDRON, C. *et al.* Resistance to hygromycin B - a new marker for plant transformation studies. *Plant Mol. Biol.*, Dordrecht, v. 5, p. 103-108, 1985.

WRIGHT, M. *et al.* Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant Cell Rep.*, Berlin, v. 20, p. 429-436, 2001.

*Received on January 31, 2005.*

*Accepted on September 16, 2005.*