

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

**Expressão do gene *uidA* dirigido por promotores preferencialmente  
ativados no floema de plantas transgênicas de laranja doce inoculadas com  
*Candidatus Liberibacter asiaticus***

**Luzia Yuriiko Miyata**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em  
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba  
2014**

**Luzia Yuriiko Miyata**  
**Engenheira Agrônoma**

**Expressão do gene *uidA* dirigido por promotores preferencialmente ativados no floema  
de plantas transgênicas de laranja doce inoculadas com *Candidatus Liberibacter*  
*asiaticus***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em  
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Miyata, Luzia Yuriko

Expressão do gene *uidA* dirigido por promotores preferencialmente ativados no floema de plantas transgênicas de laranja doce inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* / Luzia Yuriko Miyata. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.  
84 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Citros 2. Promotores tecido específico 3. Gene *uidA* (GUS) 4. Hunglongbing (HLB) 5. PCR em tempo real I. Título

CDD 634.31  
M685e

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

**A Deus, pelo amor incondicional**

**A meu amado pai e amigo Napoleão Tomio Miyata**

**A meu amado marido Higor**

**À minha preciosa filha Laura**

**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

À Palavra de Deus, por ser lâmpada para meus pés e luz para meus caminhos.

Ao meu orientador, professor e mestre Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela oportunidade e orientação.

À Professora Beatriz Madalena Januzzi Mendes (CENA), ao Pesquisador Ricardo Harakava (Instituto Biológico), ao Professor Doutor João Roberto Spotti Lopes, Doutor Helvécio Della Coletta Filho e Doutora Alessandra Alves de Souza, pela orientação, fornecimento de material e/ou por disponibilizarem seus laboratórios para a realização desse trabalho.

A todos da minha família, pelo apoio e carinho. Ao meu pai Napoleão Tomio Miyata (*in memoriam*), minha mãe Lúcia Ribeiro Miyata, meus irmãos Cristiano Takashi Miyata e Lucilene Tieme Miyata. Ao meu amado esposo Higor Alves Pinheiro de Azevedo, ao meu sogro Wilian Pinheiro, minha sogra Wilma Conceição Pinheiro, minha cunhada Erika Conceição Pinheiro e ao meu cunhado Cássio Pires.

A todos os amigos e irmãos da Comunidade Evangélica Sara Nossa Terra por todo carinho, amor e paciência. Em especial aos meus amados amigos que são como irmãos Marcelo e Lilian. E é claro a todos os queridíssimos ‘Areneiros’ do Arena Jovem Piracicaba.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, Liliane (Lili), Marina, Lívia, Nathália, Paulo, e Filipi. Em especial às minhas amigas e companheiras de trabalho Lísia e Tatiana pela ajuda, compreensão e amizade.

A todos do Viveiro Vasconcellos Citros pela gentileza de ceder os porta-enxertos utilizados nesse trabalho.

Aos funcionários Eder, Davi e Sr. José, pela amizade, paciência e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da USP/ESALQ, pela ajuda e ensinamentos.

À secretária da Pós-Graduação, Luciane, por toda gentileza e carinho nesses anos.

Aos secretários do Departamento de Produção Vegetal Célia, Jonly, Bete e Paulo.

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

“Quanto a mim, não julgo ter alcançado, mas uma coisa eu faço, que é esquecendo-me das coisas que para trás ficam, e avançando para as que estão adiante, prossigo para o alvo pelo prêmio da vocação celestial de Deus em Cristo Jesus.”

Filipenses 3.13 e 14.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Aspectos gerais da citricultura.....	25
2.2 Huanglongbing (HLB).....	27
2.3 Transformação genética de citros.....	30
2.4 Promotores.....	35
2.5 <i>Diaphorina citri</i> e a transmissão de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material vegetal.....	39
3.2 Inoculação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i> .....	41
3.3 Avaliação da presença e concentração de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	42
3.4 Extração de RNA total das plantas e síntese de cDNA.....	43
3.5 Análise da concentração bacteriana pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) .....	44
3.6 Análise da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	45
3.7 Análise de coeficiente de correlação entre expressão gênica e concentração bacteriana pela técnica de Pearson.....	48
4 RESULTADOS .....	51
4.1 Multiplicação das plantas selecionadas por enxertia.....	51
4.2 Inoculação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por <i>Diaphorina citri</i> .....	51

4.3	Análise da concentração de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) .....	53
4.4	Análise da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) .....	56
4.5	Correlações entre expressão relativa dos transgenes e a concentração de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	59
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69

## RESUMO

### **Expressão do gene *uidA* dirigido por promotores preferencialmente ativados no floema de plantas transgênicas de laranja doce inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus***

O Brasil é o maior produtor de laranja doce do mundo, mas a história da citricultura brasileira é marcada por sucessivas perdas devido a pragas e doenças que atacam os pomares. Entre as doenças que afetam os pomares de citros, o huanglongbing (HLB) tem merecido destaque nos últimos anos. O HLB já é conhecido desde 1900 na China, mas no Brasil essa doença está presente desde 2004 e tem causado perdas significativas a citricultura. Essa doença é associada a três espécies de "*Candidatus Liberibacter*", mas no Brasil a espécie *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) é a mais comum. Devido à ausência de plantas de laranja doce resistentes a essa doença, a busca por plantas transgênicas que apresentem resistência a essa doença têm se intensificado nos últimos anos. Uma estratégia para projetar uma construção gênica visando a CLAs é a utilização de promotores floema-específico, pois a CLAs coloniza o floema das plantas de citros infectadas. Entretanto, para provar que uma sequência promotora funciona é preciso desafiar a construção gênica na presença da CLAs. Portanto, conduziu-se este trabalho com o objetivo de multiplicar plantas de *Citrus sinensis* Osbeck (L.) cv. 'Hamlin' transgênicas contendo o gene *uidA* sob controle dos promotores floema-específicos *Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPP2), *Citrus phloem protein 2* (CsPP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSUC2), inocular com CLAs por *Diaphorina citri*, avaliar a interdependência entre a expressão do transgene (gene *uidA*) e a concentração de CLAs, para poder inferir sobre o controle da expressão dos promotores quando as plantas são inoculadas com CLAs. Para isso, cinco eventos de transformação de cada construção gênica, contendo apenas uma cópia do transgene foram selecionados, multiplicados e inoculados com CLAs por *Diaphorina citri*, dezoito meses após a inoculação, o DNA e o RNA das plantas foram coletados. Foi realizada análise para verificar a concentração de CLAs em todas as plantas inoculadas e a expressão do gene *uidA* foi realizada em uma linhagem transgênica de cada construção gênica. Com o auxílio da análise de coeficiente de correlação de Person, foi possível classificar qualitativamente a interdependência entre a concentração bacteriana e a expressão gênica. A frequência média de inoculação de CLAs por *Diaphorina citri* foi de 30 %, demonstrando que é possível inocular CLAs via *Diaphorina citri*. A análise de coeficiente de correlação de Person mostrou que nas construções com promotores AtPP2 e CsPP2 há baixa interdependência entre o controle da expressão gênica e a concentração de CLAs. A construção sob controle do promotor AtSUC2 apresentou correlação forte e positiva, mostrando que quanto maior a concentração de CLAs maior a expressão do transgene.

Palavras-chave: Citros; Promotores tecido específico; Gene *uidA* (GUS); Huanglongbing (HLB); PCR em tempo real



## ABSTRACT

### **Expression of the *uidA* gene driven by promoters preferentially activated in the phloem of transgenic sweet orange inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus***

Brazil is the largest producer of sweet oranges in the world, however the Brazilian citrus history is marked by successive losses due to pests and diseases attacking orchards. Among the diseases affecting citrus groves, the huanglongbing (HLB) has been highlighted in recent years. The HLB is known in China since 1900, although in Brazil this disease has been present since 2004 and has caused significant losses to citrus industry. This disease is associated with three species of "*Candidatus Liberibacter*", however, in Brazil *Candidatus Liberibacter asiaticus* species (CLAs) is the most common. Due to the absence of sweet orange plants resistant to this disease, the search for transgenic plants with resistance to this disease have intensified in recent years. One strategy to design a genetic construct targeting the CLAs includes the use of phloem-specific promoters, because the CLAs colonizes the phloem of infected citrus plants. On the other hand, to prove that a promoter sequence works it is necessary to challenge the genetic construct in the presence of CLAs. Therefore, we conducted this study with the objectives of multiplying transgenic *Citrus sinensis* Osbeck (L.) cv. 'Hamlin' bearing the *uidA* gene under the control of the phloem-specific promoters *Arabidopsis thaliana* phloem protein 2 (AtPP2), *Citrus phloem protein 2* (CsPP2) and *Arabidopsis thaliana* sucrose transporter 2 (AtSUC2), inoculate CLAs with *Diaphorina citri*, and evaluate the interdependence between the expression of the transgene (*uidA* gene) and the concentration of CLAs, to infer the promoter expression when the plants are inoculated with CLAs. Five events processing of each gene construct, containing only one copy of the transgene, and inoculated with CLAs by *Diaphorina citri*. The DNA and RNA of plants were collected after eighteen months of inoculation. The concentration of CLAs in the inoculated plants and the expression of the *uidA* gene were performed in each transgenic line of each gene construct, with the aid of the analysis of Pearson correlation coefficient. Thus it was possible to classify qualitatively the interdependence between bacterial concentration and gene expression. The average frequency of CLAs inoculation by *Diaphorina citri* was 30%, demonstrating that it was possible to inoculate CLAs via *Diaphorina citri*. Pearson correlation coefficient values suggested low interdependence between the control of gene expression and the concentration of CLAs in constructions with promoters AtPP2 and CsPP2. The construction under AtSUC2 promoter control showed strong positive correlation, indicating that the higher the concentration of CLAs the greater is the transgene expression.

**Keywords:** Citrus; Specific tissue promoter; *uidA* (GUS) gene; Huanglongbing (HLB); Real time PCR



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática dos vetores binários pCAMBIA utilizados nas transformações genéticas. A) Vetor binário pCAMBIA AtPP2/*uidA*, contendo o gene *uidA*, sob controle do promotor floema-específico AtPP2, e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor CaMV 35S. B) Vetor binário pCAMBIA AtSUC2/*uidA*, contendo o gene *uidA*, sob controle do promotor floema-específico AtSUC2, e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor CaMV 35S. C) Vetor binário pCAMBIA CsPP2/*uidA*, contendo o gene *uidA*, sob controle do promotor floema-específico CsPP2, e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor CaMV 35S..... 39
- Figura 2 - Ensaio histoquímico de GUS realizado nas plantas transgênicas matrizes. A) Esquema de amostragem dentro da planta matriz. B) Resultado do ensaio histoquímico de GUS. 1, 2, 3, 4 e 5) Número de amostras retiradas na planta..... 40
- Figura 3 - Curva de Melt obtida em ensaio com *primers* do gene *FBOX* mostrando apenas um pico de temperatura..... 46
- Figura 4 - Curvas de Melt do par de *primers* dos genes *FBOX* e *uidA* (GUS), mostrando apenas um pico de amplificação e demonstrando que não há amplificação inespecífica. A) Curva de melt do gene *FBOX*. B) Curva de Melt do gene *uidA* (GUS)..... 48
- Figura 5 - Ensaio histoquímico de GUS nas matrizes utilizadas nas análises de expressão gênica. 51  
A) Matriz H9. B) Matriz H46. C) Matriz H71.....
- Figura 6 - Avaliação da concentração de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por grama de folha das plantas inoculadas por *Diaphorina citri*, identificadas por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação. H3, H4, H6, H9 e H12. Plantas transformadas com a construção AtPP2/*uidA*. T3, T7 e T5. Controle não transgênico..... 54
- Figura 7 - Avaliação da concentração de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por grama de folha das plantas inoculadas por *Diaphorina citri*, identificadas por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação. H43, H44, H46 e H55. Plantas transformadas com a construção CsPP2/*uidA*. T3, T7 e T5. Controle não transgênico.... 55

- Figura 8 - Avaliação da concentração de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por grama de folha das plantas inoculadas por *Diaphorina citri*, identificadas por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação. H71 e H72. Plantas transformadas com a construção AtSUC2/*uidA*. T3, T7 e T5. Controle não transgênico..... 55
- Figura 9 - Plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*, após dezoito meses de inoculação. A) Planta com alta concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* apresentando sintomas típicos de Huanglongbing (HLB). B) Planta com baixa concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* assintomática..... 56
- Figura 10 - Avaliação da expressão gênica, dezoito meses após a inoculação, por meio da análise de PCR em tempo real da linhagem transgênica H9 que corresponde a plantas transformadas com a construção AtPP2/*uidA*. Planta H9.D (planta que não sofreu nenhum tipo de inoculação) amostra referência para as plantas H9.1, H9.2, H9.5, H9.7, H9.9 e H9.F. Planta H9.F planta inoculada com psílideo não infectivo..... 57
- Figura 11- Avaliação da expressão gênica, dezoito meses após a inoculação, por meio da análise de PCR em tempo real da linhagem transgênica H46 que corresponde a plantas transformadas com a construção CsPP2/*uidA*. Planta H46.A (planta que não sofreu nenhum tipo de inoculação) amostra referência para as plantas H46.1, H46.2, H46.3, H46.6 H46.8 e H46.F. Planta H46.F planta inoculada com psílideo não infectivo..... 58
- Figura 12 - Avaliação da expressão gênica, dezoito meses após a inoculação, por meio da análise de PCR em tempo real da linhagem transgênica H71 que corresponde a plantas transformadas com a construção AtSUC2/*uidA*. Planta H71.E (planta que não sofreu nenhum tipo de inoculação) amostra referência para as plantas H71.3, H71.5, H71.7, H71.8, H71.9, H71.10 e H71.J. Planta H71.J planta inoculada com psílideo não infectivo..... 59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizado para a identificação da concentração bacteriana das amostras..... 45
- Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do gene de referência *FBOX* e do gene *uidA* utilizados na análise de expressão gênica..... 46
- Tabela 3 - Resultados obtidos por PCR quantitativo em tempo real da inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri* em plantas de *Citrus sinensis* cv. ‘Hamlin’ transformadas com construção gênica contendo o gene *uidA* sob controle dos promotores floema-específico AtPP2, CsPP2 e AtSUC2. Células com sinal positivo (+) correspondem a plantas positivas para a presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Células em branco correspondem a plantas negativas para a presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. PAI Período de Acesso a Inoculação. Resultados obtidos dezoito meses após a inoculação com *Diaphorina citri*..... 52



**LISTA DE ABREVIATURAS**

AtPP2 - *Arabidopsis thaliana phloem protein 2*

AtSUC2 - *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2*

BAR - Gene que confere resistência ao herbicida Biolaphos

CaMV 35S - *Cauliflower mosaic virus*

CLaf - *Candidatus Liberibacter africanus*

CLam - *Candidatus Liberibacter americanus*

CLas - *Candidatus Liberibacter asiaticus*

CsPP2 - *Citrus phloem protein 2*

Ct - Cycle threshold

CTV - Citrus tristeza virus

CVC - Clorose variegada dos citros

GFP - *Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)

GUS -  *$\beta$ -glucuronidase*

HLB - Huanglongbing

HPT- Hygromycin phosphotransferase

Ipt - Isopentenyltransferase

*nptII* - Gene neomicina fosfotransferase II

pCAMBIA/2201 - Vetor binário dos plasmídeos utilizados (Cambia GPO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

T-DNA - *Transferred DNA* (DNA de transferência)

*uidA* - Gene  *$\beta$ -glucuronidase* (GUS)

X-GLUC - 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida



## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do citros se destaca no Brasil, que é o segundo maior produtor de frutas cítricas no mundo, o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado do mundo (FAO, 2014). O Estado de São Paulo é responsável pela maior parte da produção nacional. Entretanto, problemas fitossanitários são muito comuns no Brasil e isso é favorecido pela baixa variabilidade genética das variedades copas e porta-enxertos utilizadas (MACHADO; CRISTOFANI-YALY; BASTIANEL, 2011).

A cultura do citros é marcada por perdas com problemas fitossanitários. Entre eles, os causados por bactérias merecem destaque, pois, as cultivares comerciais são suscetíveis a três principais doenças causadas por bactérias, ou seja, à clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa*, ao cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e ao huanglongbing (HLB) associado a três espécies de *Candidatus Liberibacter* sp. As medidas de controle para essas doenças têm sido associadas ao uso de mudas sadias obtidas de viveiros certificados, a eliminação de plantas doentes e à eliminação de insetos vetores (no caso de CVC e HLB) (BOTEON; NEVES, 2005; KOIZUMI, 1993).

Uma alternativa para o melhoramento genético do citros para a obtenção de plantas resistentes a fitopatógenos é a transformação genética, pois, permite inserir características desejáveis as cultivares, que não podem ser obtidas por meio do melhoramento convencional (PEÑA et al., 2008).

Um dos maiores desafios dos programas de engenharia genética é projetar um cassete de expressão que, ao ser transferido para a planta de interesse, permita o controle preciso da atividade do transgene. A escolha do promotor para conferir expressão constitutiva, espacial e/ou temporal do transgene é uma das aplicações da biotecnologia vegetal. Nos últimos anos, alguns promotores de origem vegetal, viral ou bacteriana têm sido descritos, e utilizados na regulação da expressão dos transgenes em células vegetais (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004; WANG et al., 2005; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

Várias estratégias de engenharia genética em plantas utilizam promotores constitutivos fortes para o estudo de fatores de transcrição, bem como para a função conferida ao transgene (RANCE et al., 2002). O mais bem estudado e utilizado promotor na transformação genética de vegetais, o promotor CaMV 35S (*Cauliflower mosaic virus*) confere atividade constitutiva e indiscriminada em todos os tipos celulares em alto nível, e tem sido amplamente utilizado para estudos de transformação genética em citros. Entretanto, a forte expressão de forma

indiscriminada nos tecidos pode levar à planta um gasto desnecessário de energia (WANG et al., 2005). Uma forma de aumentar o controle da transcrição do transgene é a utilização de promotores tecido específico ou induzidos pelo patógeno e/ou estresse abiótico (BARBOSA-MENDES et al., 2009; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

Três sequências de promotores que controlam a expressão do transgene nos tecidos do floema de plantas foram utilizadas para transformar *Citrus sinensis* Osbeck (L.) cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pera’, sendo possível verificar a expressão do gene *uidA* no floema por meio da observação da coloração formada, após ensaio histoquímico (MIYATA, 2009).

Em trabalho utilizando a tecnologia de microarranjo Kim et al. (2009) demonstraram a expressão diferenciada de alguns genes quando plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck L.) foram inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Muitos desses genes estão relacionados com resistência da planta ao patógeno e a alta regulação desses genes pode ser uma indicação da ativação dos mecanismos de defesa da planta que levam a processos como a deposição de calose no tecido do floema quando plantas de laranja doce são inoculadas com CLAs. Um dos genes que teve sua expressão alterada na presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus* foi o gene de citros da família *phloem protein* (PP2) que codifica para a sequência de EST (CB292710), cuja sequência do promotor foi utilizado no trabalho de Miyata et al. (2012).

O trabalho de Kim et al. (2009) e o trabalho de Mafra et al. (2013) já demonstraram que os distúrbios causados pela CLAs promovem alterações na regulação da expressão de muitos genes, entre eles, genes relacionado ao transporte via floema e genes da família PP2. As PP2 são proteínas presentes na maioria das plantas (DINANT et al., 2003) e estão intimamente ligadas ao sistema vascular das plantas superiores. Alguns promotores dessas sequências já foram isolados e caracterizados (JIANG et al., 1999, THOMPSON; LARKINS, 1996; GUO et al., 2004). Miyata (2009) utilizou duas sequências de promotor de proteínas PP2 para transformar plantas de *Citrus sinensis* Osbeck L. cv. ‘Hamlin’. Uma sequência derivada de *Citrus* (*Citrus phloem protein 2* (CsPP2)), clonada a partir da sequência ortóloga de *Cucurbita melo* (gene L 31550) e outra de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPP2) clonada diretamente do gene At 4g19849. Uma terceira sequência utilizada no trabalho de Miyata (2009) foi clonada a partir de um gene de transportador de carboidratos em *Arabidopsis thaliana*, o gene AT1G22710 com sequência disponível no banco de dados Tair (NCBI). Miyata et al. (2012) demonstraram a eficácia no controle da expressão gênica dessas sequências como sendo de promotor que controlam a expressão gênica no floema de

plantas de *Citrus sinensis* Osbeck (L.) cultivares ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Pera’ transformadas com esses promotores.

O trabalho de Miyata et al. (2012) mostrou que os promotores *Citrus phloem protein 2* (CsPP2), *Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSUC2) controlaram a expressão do gene *uidA* no floema das plantas transgênicas e no trabalho de Kim et al. (2009) foi verificado que genes referentes ao floema de plantas inoculadas com CLas têm sua expressão alterada. Portanto, conduziu-se este trabalho com o objetivo de multiplicar plantas de *Citrus sinensis* Osbeck (L.) cv. ‘Hamlin’ transgênicas contendo o gene *uidA* sob controle dos promotores floema-específicos *Arabidopsis thaliana phloem protein 2* (AtPP2), *Citrus phloem protein 2* (CsPP2) e *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2* (AtSUC2), inocular com CLas por *Diaphorina citri*, avaliar a interdependência entre a expressão do transgene (gene *uidA*) e a concentração de CLas, para poder inferir sobre o controle da expressão dos promotores quando as plantas são inculadas com CLas.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais da citricultura

As espécies de citros pertencem à família Rutaceae, tribo Citreae e subtribo Citrinae (SWINGLE; REECE, 1967). Além do gênero *Citrus* também apresentam interesse comercial os gêneros *Poncirus* e *Fortunella*. Ao gênero *Citrus* relacionam-se as laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangerina comum (*C. reticulata* Blanco), limas ácidas (*C. aurantifolia* Swing.), limas doces (*C. limettioides* Tan.), limões (*C. limon* Burm F.), cidras (*C. medica* L.), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cleopatra’ (*C. reshini* hort. ex Tanaka), laranjas azedas (*C. aurantium* L.), pomelos (*C. paradisi* Macf.), toranjas (*C. grandis* Osbeck), e outras espécies, incluindo híbridos naturais (CHAPOT, 1975).

O sistema de classificação botânica das espécies cítricas é controverso, existindo dois sistemas aceitos, sendo o mais utilizado o proposto por Swingle e Reece (1967). Nesse sistema de classificação, o gênero *Citrus* é composto por 16 espécies. No entanto, no sistema de classificação proposto por Tanaka (1977), o gênero *Citrus* é composto por 162 espécies. Análises filogenéticas, baseadas em estudos bioquímicos e utilizando marcadores moleculares, sugerem que o gênero *Citrus* seja composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e toranja (*Citrus grandis* L.). O restante dos genótipos seria derivado da hibridação entre essas espécies verdadeiras (BARRETT; RHODES, 1976; SCORA, 1975).

A origem do gênero *Citrus* está atribuída ao sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Outros centros de origem são apontados, como o norte da região Indo-Burma, assim como a região de Yunnan, no centro sul da China (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A introdução da cultura do citros no Brasil foi feita pelos portugueses, no início do século XVI, por meio das expedições colonizadoras. A partir dessa época, sua expansão pelo litoral foi rápida, e o cultivo das plantas cítricas se expandiu por todo o país, em razão das condições ideais para crescer e produzir aqui encontradas (MOREIRA; MOREIRA, 1991). Porém, hoje, ao observamos um mapa da distribuição da citricultura em nosso país, é possível ver que existe uma concentração bastante acentuada na região sudeste e que o cultivo de citros

ocupa longas extensões de terra no estado de São Paulo, apesar de ser possível cultivar citros em todo país.

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

Entre as frutas comercializadas, as cítricas apresentam a de maior peso na economia mundial, tendo sido produzidas, no mundo, em 2010, mais de 123 milhões de toneladas de frutas cítricas (FAO, 2014). O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja, desde 1980 e, atualmente, é o segundo maior produtor mundial de frutas cítricas, tendo em 2010 contribuído com 27,5% da produção total de laranjas. Em 2010, o país produziu 21.327.480 toneladas de frutas cítricas (FAO, 2014) e exportou cerca de 60% do suco de laranja consumido no mundo (IBGE, 2013).

O Brasil, os Estados Unidos e a China são responsáveis por 45,5% da produção mundial de laranja e 44,6% da produção mundial de frutas cítricas (FAO, 2014). A citricultura brasileira gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos, e o sistema agroindustrial cítrico movimenta, anualmente, US\$ 9 bilhões (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009). Aproximadamente 98% do suco produzido é exportado, principalmente, para os Estados Unidos e União Europeia, além do Japão e outros 45 países (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

No Brasil, a região responsável pela maior parte da produção é o sudeste, tendo o Estado de São Paulo mais de 79% da produção nacional, seguido pela Bahia (IBGE, 2012). A citricultura brasileira é composta em 90% pelas cultivares de laranjas ‘Hamlin’, ‘Pera’, ‘Valência’ e ‘Natal’ (CONAB, 2011). Portanto, a citricultura brasileira está apoiada em um pequeno número de cultivares, o que tem contribuído para a vulnerabilidade, principalmente, quanto à ocorrência de doenças, causando redução da produtividade.

Por volta de 1910, os pomares brasileiros foram afetados pela gomose, doença causada pelo patógeno *Phytophthora* spp., que impossibilitou o uso da laranja ‘Caipira’ como porta-enxerto, sendo substituída pela laranja azeda (*Citrus aurantium* L). Na década de 30, constatou-se a presença do vírus da tristeza dos citros (CTV) em grande parte dos pomares brasileiros, essa doença foi controlada com a utilização do limão ‘Cravo’ como porta-enxerto em substituição à laranja azeda. A partir de 1957, os pomares foram atingidos pelo cancro cítrico, doença, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Em seguida, na década de 80, foi constatada a presença da CVC, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. No ano de 2001, a morte súbita do citros, doença de causa desconhecida foi detectada nos pomares da região sul do Triângulo Mineiro, Norte e Noroeste do Estado de São Paulo (MATTOS et al., 2005).

Em maio de 2004, o Huanglongbing, conhecido desde 1919 no sul da China, foi encontrado no Estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004) e nos últimos anos tem sido noticiado como outra doença bacteriana de grande importância para os pomares de citros do mundo.

A obtenção de variedades resistentes consiste no melhor método de controle de doenças sendo este o principal objetivo dos programas de melhoramento genético em citros, sendo desenvolvidos desde o século XIX (DAVIES; ALBRIGO 1994). Porém, programas tradicionais de melhoramento de citros enfrentam limitações quanto à biologia reprodutiva, como alta heterozigose, esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, poliembrião nuclear e juvenalidade (VARDI; SIEGEL-ROY; GALIUN, 1974; LING et al., 1989; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Sendo assim, a biotecnologia pode contribuir de forma eficiente no ganho ou potencialização de características desejáveis (MACHADO et al., 2005).

## 2.2 Huanglongbing (HLB)

O HLB, também conhecido como greening, é considerado uma das mais devastadoras doenças dos citros em todo o mundo (HALBERT; MANJUNATH, 2004). As bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. são os supostos agentes causais do HLB. Três *Candidatus Liberibacter* spp. estão associados com HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (TEIXEIRA et al., 2005), as quais podem ser transmitidas de uma planta para outra pelo psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:

Liviidae) (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006) e também por enxertia (LOPES et al., 2009). Essas bactérias foram classificadas como *Candidatus*, pois, não foi possível agrupá-las em outro grupo, decorrência da dificuldade de se obter o patógeno em cultura pura e finalizar os postulados de Koch (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). Na Flórida, no Brasil e na maioria dos outros países produtores de citros, o HLB é associado com CLas transmitida para o citros pelo psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (HALBERT; MANJUNATH, 2004; HALBERT, 2005).

O HLB provavelmente se originou na Índia em 1700, antes de se espalhar pela China e agora é encontrado na maioria das áreas produtoras de citros em todo o mundo, incluindo Ásia, Arábia Saudita, África e as Américas (BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010). A doença foi encontrada na Flórida, em 2005 (HALBERT, 2005), um ano depois de sua descoberta no estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2005). O nome Chinês HLB refere-se ao aparecimento de brotos amarelos na copa das árvores afetadas, que são o resultado de manchas assimétricas nas folhas ou clorose severa, semelhante da deficiência de zinco ou outros micronutrientes (MCCLEAN; SCHWARZ, 1970).

Frutos de árvores afetadas tornam-se disformes, desenvolvem sabor indesejável e ocorre a queda prematura dos frutos, gerando substanciais prejuízos aos citricultores nas áreas afetadas. O desenvolvimento de sintomas de HLB parece estar relacionado com colapso do floema e a obstrução do fluxo e translocação de carboidratos, como resultado de infecção pela bactéria (SCHNEIDER, 1968; ACHOR et al., 2010). Além disso, a infecção das plantas de citros por CLas induz grandes alterações no metabolismo de carboidrato, no metabolismo de moléculas envolvidas na regulação do crescimento e outras vias metabólicas (ALBRECHT; BOWMAN, 2008, 2012; KIM et al., 2009; FAN et al., 2010; ROSALES; BURNS, 2011).

Os sintomas foliares começam em poucos ramos e espalham-se lentamente para as outras partes da árvore, muitas vezes, ao longo de vários anos. Esse lento desenvolvimento de sintomas visuais não explica a queda rápida no rendimento que ocorre em árvores com sintomas iniciais. Estratégias de manejo do HLB consistem em plantio de árvores livres de doença, controle do inseto vetor, em combinação com manejo nutricional e remoção de plantas infectadas (BASSANEZI et al., 2010).

A maioria dos estudos sobre HLB têm se concentrado nos sintomas foliares, porque eles são claramente visíveis nos citros onde a transmissão da bactéria se deu via *Diaphorina citri* (HALBERT; MANJUNATH, 2004). No entanto, estudos sobre a distribuição de CLas em plantas inoculadas por borbulhas mostram que as bactérias invadem todos os tecidos do

sistema vascular e predominantemente o floema (TATINENI;SAGARAM; GOWDA, 2008, LI; LEVY; HARTUNG, 2009). O movimento inicial de CLas após a inoculação se dá via floema para diferentes tecidos na planta e os efeitos do HLB no tecido da raiz são pouco compreendidos (ETXEERRIA et al., 2009; FOLIMONOVA; ACHOR, 2010).

As razões para a reputação onerosa do controle do HLB são basicamente a falta de fontes conhecidas de resistência e a utilização de estratégias curativas aplicadas as árvores doentes (BOVÉ, 2006). Além disso, o manejo é baseado na redução contínua e frequente de inóculo bacteriano por remoção das árvores infectadas e controle químico de vetor para evitar que a doença se espalhe no pomar (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007).

Nas áreas endêmicas ou sem controle efetivo do inóculo da bactéria ou do inseto vetor há uma rápida progressão da doença no pomar (AUBERT et al., 1984; BASSANEZI et al., 2006; CATLING; ATKINSON, 1974; GATINEAU et al., 2006; GOTTWALD; AUBERT; HUANG, 1991; GOTTWALD; AUBERT; XUE-YAUN, 1989) e aumento da evolução da gravidade dos sintomas ao longo da copa (AUBERT, 1990; AUBERT et al., 1984; REGMI; LAMA, 1987; ROISTACHER, 1996) o que reduz drasticamente a vida econômica do pomar. Esses fatores levaram à destruição de dezenas de milhões de árvores, e colapso das indústrias cítricas em muitos países do sul e sudeste da Ásia, Indonésia, Filipinas, Índia e da Península Arábica (HALBERT; MANJUNATH, 2004; TOORAWA, 1998).

No Brasil, entre as técnicas empregadas na tentativa de controlar a disseminação da doença, podem ser citadas a produção de borbulhas livres de doenças por termoterapia, o uso de antibióticos, a produção de mudas em viveiros certificados, a eliminação de árvores infectadas, o controle do vetor por inseticidas e a liberação de inimigos naturais (BASSANEZI et al., 2011). No entanto, os métodos não são tão eficazes, possuem alto custo e a produção de citros ainda é limitada pela doença (KOIZUMI, 1993). Atualmente, as medidas mais efetivas adotadas para evitar a disseminação da doença têm sido a utilização de inseticidas para controle do inseto vetor e a eliminação de plantas sintomáticas (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009).

Em decorrência de todos os problemas enfrentados com o HLB, as pesquisas para o desenvolvimento de plantas que sejam resistentes ou tolerantes ao HLB por transformação genética vêm sendo intensificadas (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

### 2.3 Transformação genética de citros

No melhoramento genético de citros, os métodos tradicionais têm desempenhado um papel importante na melhoria das cultivares de citros, durante os últimos anos, especialmente a exploração de mutações. No entanto, os métodos de melhoramento convencional são demorados para a obtenção de mutantes desejáveis principalmente os relacionados à estresse abiótico como, por exemplo, tolerância à seca (GONG; LIU, 2013).

A seleção de mutantes naturais desejáveis tem sido mais frequentemente utilizada para selecionar características relacionadas com a qualidade das frutas, tais como tempo de maturação, cor da polpa e número de sementes, enquanto poucos trabalhos têm sido relacionados à descoberta de mutantes naturais para tolerância a estresse. Por outro lado, por meio da hibridação dos citros, método que permite a obtenção de maior heterozigosidade, tem assistido a poucos progressos, em decorrência de várias barreiras reprodutivas apresentadas pelo citros, tais como poliembrionia, incompatibilidade, esterilidade masculina e/ou feminina e longo período de juvenilidade apresentado pela cultura (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Desde a década de 70, a biotecnologia vegetal tem demonstrado seu potencial para modificar o crescimento e desenvolvimento das plantas, e promover o melhoramento da resistência ao estresse biótico e/ou abiótico nas plantas e promover a produção de produtos especiais em muitas espécies de plantas, tais como tomate (LYU et al., 2012), soja (LIU et al., 2012; ROSALES-MENDOZA et al., 2012), milho (YANG et al., 2013; WANG et al., 2013), maçã (PARIS et al., 2009), populus (YE et al., 2011; LI et al., 2012).

A engenharia genética é de fundamental importância para o melhoramento genético de citros na tolerância ao estresse, por meio da introdução de genes relacionados a estresses específicos. Além disso, a clonagem de genes e transformação genética pode evitar a segregação genética e manter as características agronômicas desejáveis em variedades comercial de citros (GONG; LIU, 2013).

O primeiro relato de transformação genética de citros foi feito por meio da transferência direta de DNA em protoplastos isolados de cultura em suspensão de calos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). Porém, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido utilizada com maior frequência nas transformações genéticas de citros, desde que foi relatado pela primeira vez (HIDAKA et

al., 1990). Atualmente, mais de 90% das plantas de citros transgênicas foram produzidas utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* (GONG; LIU, 2013).

Diferentes explantes têm sido utilizados na transformação genética de citros, tais como protoplastos, calos, cotilédones, hipocótilo e epicótilo que tem dado origem à uma alta frequência de transformação. Outro material empregado são os tecidos ditos maduros (adultos). A vantagem das plantas obtidas a partir de material maduro é o fato das plantas transgênicas obtidas não apresentarem período juvenil. Por exemplo, Cervera et al. (1998) obtiveram laranjeiras transgênicas, usando explantes maduros e as plantas regeneradas apresentaram morfologia e hábitos de crescimento de plantas adultas, que começaram a florescer após 14 meses da transformação.

Para facilitar a seleção de plantas transgênicas, genes reporter são frequentemente utilizados na construção gênica, bem como genes de seleção. Entre os genes de seleção, o gene de resistência à neomicina fosfatase II (*nptII*) é o mais utilizado (PEÑA et al., 2004; BALLESTER; CERVERA; PEÑA, 2008). Outros genes de seleção têm sido aplicados na seleção *in vitro* como *ipt* (isopentenyl transferase), *HPT* (hygromycin phosphotransferase) e *BAR* (gene de resistência ao herbicida Biolaphos) (HIDAKA et al., 1990; BALLESTER; CERVERA; PEÑA, 2007; LI; SHI; DENG, 2002). O gene reporter predominantemente utilizado é o gene reporte *uidA* (GUS) (GUTIEÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; MOORE et al., 1992; PENÃ et al., 1995; PENÃ et al., 1997). Como alternativa ao uso do repórter GUS, que é um método destrutivo, utiliza-se, também frequentemente o gene GFP (*Green fluorescence protein*), derivado de *Aequorea victoria* (GHORBEL et al., 1999; FLEMING et al., 2000; GUO; GROSSER, 2005). A utilização de GFP é um método não destrutivo e permite a seleção das plantas transgênicas em estágios iniciais do cultivo *in vitro*.

Em citros, a maioria dos trabalhos de transformação genética são realizados visando inserir ou aumentar a resistência a patógenos tais como *Phytophthora citrophthora* (FAGOAGA et al., 2001), *Xylella fastidiosa* (AZEVEDO, 2005), o vírus da tristeza dos citros (DOMÍNGUEZ et al., 2002; FAGOAGA et al., 2005), *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (BARBOSA-MENDES et al., 2009; BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2009).

Na transformação genética visando à resistência a patógenos, podem ser utilizados genes que codificam proteínas relacionadas à patogencidade do patógeno; genes que estimulam o sistema de defesa das plantas; genes de avirulência derivados do próprio patógeno; genes que codificam peptídeos antimicrobianos e genes do próprio genoma do

patógeno, baseando-se na resistência derivada do patógeno (MOURÃO FILHO; STIPP; MENDES, 2010).

Entretanto, sabe-se que somente a caracterização e introdução de um gene na planta não garante sua viabilidade na obtenção de transgênicos eficientes. A produção eficiente de uma proteína heteróloga em determinado organismo depende da obtenção de níveis adequados de transcrição do gene introduzido e, para isso, promotores altamente ativos são necessários (RANCE et al., 2002).

## 2.4 Promotores

Os cassetes de expressão empregados atualmente para a produção de plantas geneticamente modificadas de citros são baseados, na sua maioria, em promotores constitutivos fortes que determinam a expressão generalizada do transgene na planta (BOSCARIOL et al., 2006; FLEMING et al., 2000; MOLINARI et al., 2004; DOMÍNGUEZ et al., 2004; DUTT et al., 2012), o que muitas vezes não é necessário. A alternativa mais viável para substituição de tais promotores é investir na identificação e caracterização de promotores órgão/tecido-específicos ou estímulo-dependentes nas espécies de interesse (PAOLI et al., 2007; HARAKAVA, 2000; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

O promotor é o processador central da regulação de um gene uma vez que contém os sítios de ligação para os complexos protéicos das RNA polimerases responsáveis pela transcrição gênica (GRIFFITHS et al., 2000). A produção eficiente de uma proteína heteróloga em determinado organismo depende da obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido e, para isso, promotores altamente ativos são necessários (RANCE et al., 2002). A caracterização de promotores órgão/tecido específicos representa, portanto, um tema relevante de pesquisa visando disponibilizar novas ferramentas para a manipulação genética em citros.

Os promotores utilizados para expressar o gene alvo em uma construção são obtidos de várias fontes, entre eles existem os derivados de vírus, como as variações do promotor CaMV 35S (do Vírus do Mosaico da Couve Flor) (ODELL; NAGY; CHUA, 1985), os promotores derivados de bactéria como os derivados do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (DIRITA; GELVIN, 1987) ou o promotor NOS (BEVAN; FLAVELL; CHILTON, 1983). Os promotores utilizados na transformação genética também podem ser originários de plantas como, por exemplo, os promotores originários de sequências de *Arabidopsis thaliana* (AN et al., 1996; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012) ou de *Medicago truncatula* (XIAO et al., 2005).

Várias sequências de promotor floema específico têm sido descritas na literatura nos últimos anos. Essas sequências estão geralmente relacionadas com genes de expressão específica no floema ou células ou organismos limitados a esse tecido. A proteína de síntese de sacarose é um exemplo de proteína cuja expressão tem sido observada ligada aos feixes vasculares (NOLTE; KOCH, 1993; HAWKER; HATCH1, 1965). Sequências promotoras derivadas da proteína de síntese de sacarose têm sido descritas para a cultura do milho e do arroz (YANG; RUSSELL, 1980; WANG; BOULTER; GATEHOUSE, 1992) e sua atividade tem sido demonstrada em sistemas heterólogos (YANG; RUSSELL, 1980; SHI et al., 1994). Além disso, a *Arabidopsis Sucrose H<sup>+</sup>* (AtSUC2) tem sido descrita como um transportador de longa distância dentro dos tecidos vasculares (SAUER; STOLZ, 1994) e a utilização da sequência do promotor desta proteína ligada ao gene repórter *uidA* mostrou que esse promotor promove expressão específica em tabaco, morango e *citrus* (TRUERNIT; SAUER, 1995; IMLAU; TRUERNIT; SAUER, 1999; ZHAO; LIU; DAVIS, 2004; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

Outro exemplo de proteínas ligadas ao sistema vascular descrito na literatura são as Proteínas 2 de Floema (Phloem Protein 2 (PP2)). As PP2 são proteínas presentes na maioria das plantas (DINANT et al., 2003). Alguns promotores dessas sequências já foram isolados e caracterizados (JIANG et al., 1999; THOMPSON; LARKINS, 1996; GUO et al., 2004). Em citros, a transformação genética com promotores dessas sequências, tanto do próprio citros como de *Arabidopsis*, demonstraram que esses promotores são capazes de controlar a expressão no floema das plantas transformadas (MIYATA et al., 2012).

Estudos demonstraram a eficiência da transformação genética de citros com promotores tecido-específicos e que controlam a expressão do gene no tempo (patógeno estimulados). Linhagens transgênicas de laranja ‘Valência’ que contém o gene que codifica para *cecropin* MB39, um peptídeo antimicrobiano, foram produzidas sob o controle de um promotor do gene da *fenilalanina amônia-liase* de citros em uma tentativa de atingir a bactéria *Xylella fastidiosa*, que é agente causal da CVC e que coloniza os vasos do xilema (PAOLI et al., 2007). Em outro estudo, plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ expressando o gene *hrpN*, que é um harpina derivado *Erwinia amylovora* (BARBOSA-MENDES et al., 2009) foram produzidas. Para evitar a produção anormal de elicitores de planta, a construção inclui o promotor a partir do gene *gstI* de defesa de batata que codifica a *glutathione S transferase*, que é ativado por vários patógenos em batata. Algumas das linhagens transgênicas de laranja

doce, obtidas no trabalho de Barbosa-Mendes et al. (2009) após expostas a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* demonstraram um aumento da resistência a esse patógeno.

Uma estratégia a ser utilizada para o controle do HLB é a expressão de um peptídeo antimicrobiano no floema das plantas de citros, principalmente nas folhas jovens, porque essa doença é associada a bactérias restritas às células do floema, que são disseminadas basicamente por psilídeos, que se alimentam principalmente de ramos jovens das folhas de citros (DUTT et al., 2012). Outra vantagem da expressão tecido específico é que registra-se a diminuição da expressão do transgene em outros tecidos da planta (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004). Plantas transgênicas de *Citrus sinensis* contendo o peptídeo antimicrobiano sintético *D4E1* dirigido pelo promotor floema específico AtPP2 foram produzidos e a expressão do transgene foi confirmada por qPCR (ATTÍLIO et al., 2013).

Em organismos eucarióticos, somente alguns genes são transcritos constitutivamente, e mesmo esses em condições de estresse podem ser modulados negativamente. Os genes transcritos por um organismo oscilam consideravelmente durante o ciclo de vida, entre os tipos celulares e em resposta às condições ambientais diversas, como demonstrado no trabalho de White et al. (1999) trabalhando com *Drosophila melanogaster*; no trabalho de Iyer et al. (2001), quando trabalhou com levedura; no trabalho de Kayo (2001), trabalhando com macaco; e Ahn; Shin e Schachtman (2004) trabalhando com *Arabidopsis*.

É importante o conhecimento sobre promotores, já que se espera que, ao menos em parte, semelhanças nas regiões envolvidas na regulação da transcrição determinem padrões similares de expressão em diferentes espécies (OHLER; NIEMANN, 2001). Lauvergeat et al. (2002) demonstraram que a expressão nos tecidos vasculares determinada pelo promotor do gene *EgCAD2*, que codifica a cinamil álcool desidrogenase em *Eucalyptus gunnii*, se conserva em tabaco e populus. Já o trabalho de Ayre; Blair e Turgeon (2003), empregando o promotor do gene que codifica a *galactinol sintetase* de *Cucumis melo*, mostrou que o padrão de expressão tecido-específico é conservado em *Arabidopsis* e tabaco, apesar de nenhuma das duas espécies empregarem *galactinol* no processo de transporte via floema. Tais resultados representam exemplos de conservação de processos regulatórios em diferentes espécies.

A identificação e análise de promotores órgão/tecidos-específicos e/ou estresse estimulados auxiliam um aprofundamento dos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de expressão gênica. A disponibilidade de tais promotores facilita a obtenção de cassetes de expressão que permitam a expressão dos genes de interesse nos

tecidos alvos e no momento do estresse, possibilitando assim um aprimoramento dos processos biotecnológicos de transformação genética.

## 2.5 *Diaphorina citri* e a transmissão de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Dentre grande número de pragas apresentado pelos citros o psíldeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayana (Hemiptera: Liviidae) tem merecido destaque, em razão da sua importância como vetor das bactérias associadas como sendo o agente causal do HLB. Os danos diretos causados pela sucção de seiva não são ameaça ao pomar de citros, mas, desde 2004, quando foi detectada a presença das bactérias *Candidatus Liberibacter* sp. nos pomares do estado de São Paulo (COLETA-FILHO et al., 2004; TEIXERA et al., 2005) esses insetos ganharam destaque, em decorrência da sua importância no patossistema, já que transmitem tanto a espécie CLas como a espécie CLam (YAMAMOTO et al., 2006). Essas duas espécies de *Candidatus Liberibacter* sp. estão presentes nos pomares do estado de São Paulo.

Os insetos vetores não participam da patogênese da doença, mas atuam como agentes de transmissão, disseminação e inoculação do patógeno (COSTA, 1998). Portanto, para compreender o processo de transmissão de fitopatógenos é de fundamental importância conhecer o comportamento alimentar do inseto vetor, pois a aquisição e a inoculação ocorrem durante a alimentação do vetor no tecido vegetal. O hábito alimentar dos hemípteros não pode ser diretamente observado como ocorre com os insetos mastigadores, pois os hemípteros alimentam-se diretamente da seiva foliar, por meio da inserção de seus estiletes no tecido vascular da planta. Uma forma mais detalhada de se observar o hábito alimentar dos insetos sugadores é por meio da técnica de "Electrical Penetration Graph" (EPG). Estudos com essa técnica realizados por Bonani (2009) revelaram uma alta atividade dos estiletes dos insetos de *Diaphorina citri* em folhas jovens, no tecido do floema, na parte superior das plantas, na nervura principal e na face abaxial das folhas de citros.

O psíldeo-asiático-dos-citros, como também é conhecido a *Diaphorina citri* é um pequeno inseto com cerca de 2 mm de comprimento que, quando jovem, apresenta cor marrom clara e na forma adulta apresenta manchas escuras. As ninfas (forma jovem do inseto) são achatadas, pouco convexas, possuem pernas curtas e têm movimentação restrita. As formas adultas são mais ativas que as formas jovens, possuindo o terceiro par de pernas do tipo saltatória o que auxilia no vôo de um ramo para outro na planta, na busca de novos locais de alimentação e oviposição (GALLO et al., 2002).

Adultos recém emergidos atingem a maturidade sexual após um período de 10 dias e as fêmeas ovipositam em média 350 ovos em plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jack, com o pico da oviposição, ocorrendo 8 dias após a maturidade sexual (NAVA et al., 2007). Mais de 50 espécies são conhecidas como hospedeiras de *Diaphorina citri* (BOVÉ; GARNIER, 2002), mas a *Murraya paniculata* (L.) Jack oferece um ambiente ideal para o desenvolvimento da *Diaphorina citri* (NAVA et al., 2007).

O período ninfal foi didaticamente dividido em 5 ínstars, baseando-se na frequência de distribuição e largura da cápsula cefálica independentemente do hospedeiro. Na temperatura de 25°C em plantas de *Murraya paniculata* (L.) Jack Nava et al. (2007) observaram que o período de desenvolvimento médio das ninfas é de 14,93 dias e o ciclo biológico completo é de 44,4 dias. Os mesmos autores também observaram não haver influência significativa no ciclo de vida do inseto (ovo a adulto) em temperaturas entre 18 a 30°C. Entretanto, temperaturas acima de 32°C diminuíram a viabilidade do inseto em até 7%. A umidade relativa também influencia no ciclo de vida de *Diaphorina citri*. Estudos realizados por McFarland e Hoy (2001) mostram que *Diaphorina citri* pode sobreviver em umidades relativas entre 7 e 33%. Porém seu ótimo desenvolvimento se dá em umidade relativa entre 33 a 97%.

Os insetos vetores são o meio primário e natural de transmissão de doenças causadas por fitopatógenos ao qual compreende um processo biológico que necessita de compreensão em todos os seus aspectos. Tais aspectos são compreendidos pela importância de suas características epidemiológicas, como período de tempo necessário para inoculação, latência, persistência e eficiência de transmissão (PARRA et al., 2010).

São conhecidos quatro tipos de transmissão de fitovírus por Hemípteros e essa classificação pode ser dentro de certos limites adaptada para fitopatógenos bacterianos (NAULT, 1997). Os tipos de transmissão têm sua definição baseada no tempo de aquisição e inoculação do patógeno pelo inseto, se existe ou não período de latência (tempo necessário entre a aquisição e inoculação do patógeno pelo inseto) e se o patógeno se multiplica dentro do inseto vetor. Os tipos de transmissão podem ser do tipo não persistente, semipersistente, persistente circulativa e persistente propagativa (NAULT, 1997).

As características de transmissão de *Candidatus Liberibacter* sp. por *Diaphorina citri* ainda precisam ser melhor elucidadas, pois, existem dados contrastantes na literatura. No entanto, os trabalhos mostram que tanto adultos como ninfas podem adquirir e transmitir CLas (XU et al., 1988), mas as ninfas mostram-se mais eficientes que os adultos (VITCH

NETO et al., 2008). Para Xu et al. (1988) o período de aquisição dura de cinco a sete horas e o período de latência 24 horas, mas em outro estudo realizado por Capoor, Rao e Viswanath (1974) o tempo de aquisição foi de 15 a 30 minutos e o tempo de latência de 21 dias.

Hung et al. (2004) demonstraram que a bactéria permanece no inseto por até 12 semanas após Período de Acesso a Inoculação (PAI) de duas semanas em 75% dos insetos testados, demonstrando que a bactéria é do tipo persistente no inseto. Além disso, também foi demonstrado com o uso da técnica de qPCR que a bactéria se multiplica dentro do inseto ao longo do tempo (VICHIN-NETO et al., 2008; INOUE et al., 2009). Essas informações endossam suspeitas anteriores de que a transmissão de CLas por *Diaphorina citri* ocorre de forma persistente e propagativa (PARRA et al., 2010).

A taxa transmissão de bactéria por *Diaphorina citri* variou de 1 a 100% segundo Xu et al. (1988). Inoue et al. (2009) conseguiram uma taxa de transmissão de 67%, mas somente quando as ninfas se alimentaram por um período de 24 horas em plantas infectadas pela bactéria e transmitiram a bactéria quando adultos. As ninfas são mais eficientes em adquirir e transmitir a bactéria CLas que os adultos (INOUE et al., 2009). A transmissão vertical da bactéria dos insetos adultos à progênie, por meio dos ovos (transmissão transovariana) não foi constatada para *Diaphorina citri* (HUG et al., 2004), mas parece ocorrer para a forma africana do inseto *Trioza erytreae* (VANDENBERG; VANVUUREN; DEACON, 1992).

Assim como foi demonstrado que a forma africana da bactéria (CLaf) pode ser transmitida por enxertia (BOVÉ, 2006), as formas asiáticas e americanas da bactéria também são transmitidas por *Diaphorina citri* e podem ser transmitidas por enxertia de partes contaminadas em plantas sadias (COLETTA-FILHO et al., 2009; LOPES et al., 2009).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP e no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

#### 3.1 Material vegetal

As plantas de *Citrus sinensis* Osbeck (L.) cv. ‘Hamlin’ utilizadas no experimento foram previamente transformadas por Miyata (2009) via *Agrobacterium tumefaciens* com três vetores binários contendo o gene *uidA* sob controle de três diferentes promotores (Figura 1) o *AtPP2* (*Arabidopsis thaliana Phloem Protein 2*), o *AtSUC2* (*Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2*) e o promotor *CsPP2* (*Citrus phloem protein 2*). Na Figura 1, é possível verificar a representação esquemática dos três vetores binários utilizados nas transformações genéticas [esses mesmos vetores são descritos no trabalho de Miyata et al. (2012)].

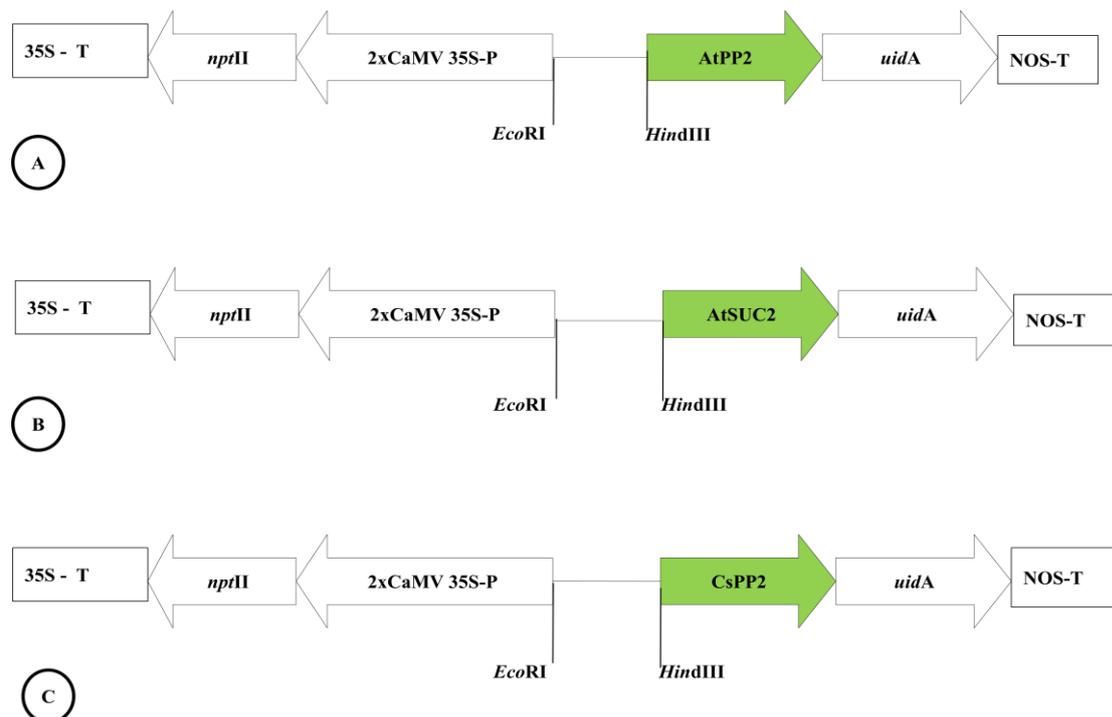


Figura 1 - Representação esquemática dos vetores binários pCAMBIA 2201 utilizados nas transformações genéticas. A) Vetor binário pCAMBIA 2201 *AtPP2/uidA*, contendo o gene *uidA*, sob controle do promotor floema-específico *AtPP2*, e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor *CaMV35S*. B) Vetor binário pCAMBIA 2201 *AtSUC2/uidA*, contendo o gene *uidA*, sob controle do promotor floema-específico *AtSUC2*, e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor *CaMV35S*. C) Vetor binário pCAMBIA 2201 *CsPP2/uidA*, contendo o gene *uidA*, sob controle do promotor floema-específico *CsPP2*, e o gene de seleção *nptII*, sob controle do promotor *CaMV35S*

Cinco eventos de transformação de cada construção contendo apenas uma inserção do transgene (seleção previa feita por Miyata (2009) com base em resultados de PCR e *Southern blot*) foram selecionados para multiplicação e avaliação. Essas plantas foram multiplicadas por enxertia e cada matriz forneceu 20 borbulhas que foram enxertadas em um porta-enxerto não transgênico de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia*).

Uma planta não transgênica obtida a partir dos experimentos de transformação também foi multiplicada para servir como testemunha não transgênica. Essa planta também forneceu 20 borbulhas que foram enxertadas em porta enxerto de limão ‘Cravo’ não transgênico.

Ao final das enxertias, foram obtidas 320 plantas, sendo 20 plantas de cada evento de transformação e 100 plantas por construção gênica. Para confirmar que todos os clones eram transgênicos e não havia quimeras entre as borbulhas, nessa fase realizou-se a coleta de cinco amostras de folha de cada planta matriz escolhida e essa foi submetida à análise histoquímica pelo teste de GUS descrita por Brasileiro e Carneiro (1998), segundo esquema mostrado na Figura 2. A coleta do material, utilizado no ensaio histoquímico, foi feita de forma aleatória nos ramos escolhidos para fornecimento de borbulha antes do procedimento de enxertia.

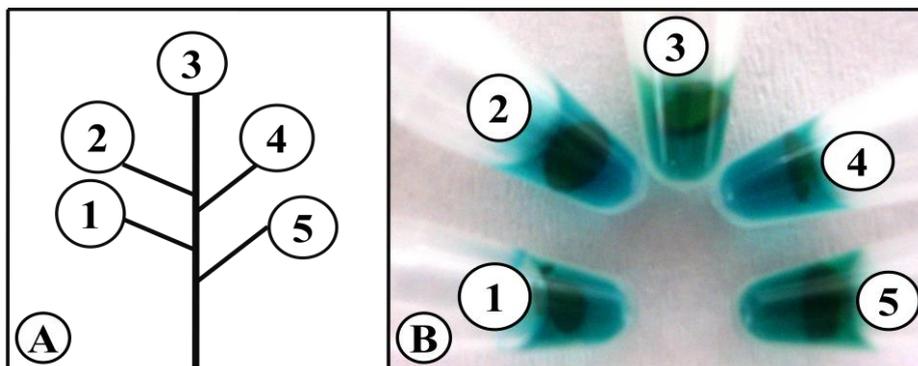


Figura 2 – Ensaio histoquímico de GUS realizado nas plantas transgênicas matrizes. A) Esquema de amostragem dentro da planta matriz. B) Resultado do ensaio histoquímico de GUS. 1,2,3,4 e 5) Número de amostras retiradas na planta

As linhagens de plantas de *Citrus sinensis* cv. ‘Hamlin’ utilizadas foram: H3, H4, H6, H9 e H12, contendo a construção gênica *AtPP2/uidA*, H43, H 44, H45, H46 e H 55 contendo a construção gênica *CsPP2/uidA*, H71, H72, H73, H75 e H76 contendo a construção genica *AtSUC2/uidA* e uma linhagem não transgênica.

### 3.2 Inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*

Todos os insetos utilizados foram criados e mantidos no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, do Departamento de Entomologia e Acarologia, da ESALQ/USP. A colônia de *Diaphorina citri* foi mantida em plantas de murta, *Murraya paniculata* (L.) Jack (Rutaceae), planta que se apresenta como hospedeiro adequado para a criação do inseto (NAVA et al., 2007). A criação foi acondicionada em caixas com revestimento de tela antiafídica e porta de acrílico transparente (35 x 35 x 53 cm) contendo mudas de murtas com brotações novas, mantidas em sala aclimatizadas ( $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10$  % UR e fotoperíodo de 14 h).

Insetos das colônias de terceiro e quarto instar foram mantidos no laboratório para fazer a aquisição da bactéria CLas junto às plantas de laranja doce previamente testadas para a presença da bactéria. Gaiolas feitas de copo plástico (500 ml) e tela antiafídica foram fixados nos ramos das plantas de *Citrus sinensis*, contendo bactéria CLas e as ninfas (de terceiro e quarto instares) foram transferidas das colônias de murta para essas gaiolas onde ficaram por um período de 10 dias. Após esse Período de Acesso de Aquisição (PAA), os insetos foram transferidos para as plantas transgênicas e não transgênicas a serem inoculadas.

A inoculação foi realizada em 10 plantas de cada linhagem transgênica e em uma linhagem testemunha não transgênica. Para uniformizar a inoculação após o pegamento e crescimento das borbulhas, as plantas foram podadas e apenas um broto novo foi utilizado para a inoculação com os insetos. Esses brotos continham apenas um par de folha totalmente expandida.

Gaiolas feitas de copo plástico (500 ml) e tela antiafídica foram fixadas nas plantas de forma que toda a brotação ficasse dentro do recipiente e 10 insetos que passaram pelo PAA foram transferidos para essa gaiola onde ficaram por 10 dias em um Período de Acesso a Inoculação (PAI). Nesse período, as plantas inoculadas e os insetos foram mantidos em casa de vegetação do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, do Departamento de Entomologia e Acarologia, da ESALQ/USP, com, certificado de qualidade em biossegurança (CQB).

Por se tratar de um número considerável de insetos e de plantas, dividiu-se o experimento em três, ou seja, o processo foi realizado três vezes com intervalo de 10 dias para cada experimento de PAA e PAI. Dessa forma, três experimentos de PAA e três de PAI foram realizados. No primeiro experimento, foram inoculadas duas plantas de cada linhagem, no

segundo foram inoculadas seis plantas e no terceiro experimento foram inoculadas duas plantas com 10 insetos por planta.

Após os 10 dias de PAI, os insetos foram retirados das gaiolas, colocados em solução de álcool 70 % e armazenados em tubo de 1,5 ml a -20 °C. As gaiolas feitas de copos plásticos e tela antiafídica foram desmontadas e as plantas foram transferidas para outra casa de vegetação no laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP, onde foram pulverizadas com inseticida (Tiametoxam) para a eliminação de todos os insetos remanescentes.

Foram utilizadas cinco linhagens transgênicas (eventos de transformação diferentes) de cada construção gênica e uma linhagem não transgênica (testemunha) para a realização dos experimentos de inoculação. Cada linhagem foi multiplicada por enxertia, fornecendo dez borbulhas cada linhagem. Essas dez plantas foram divididas em três diferentes experimentos de PAI como informado acima.

### **3.3 Avaliação da presença e concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus***

As plantas foram conduzidas em haste única, todos os brotos foram eliminados à medida que apareceram e somente o ramo principal foi mantido. A cada seis meses, foi realizada a coleta de duas folhas do material inoculado, tendo o cuidado de não retirar as folhas onde os insetos se alimentaram.

A cada seis meses foram coletados pecíolos de folhas maduras para a realização da extração de DNA e RNA total das plantas inoculadas com CLas (data das coletas: Jun. de 2012, Dez. de 2012 e Jun. de 2013) em um total de 3 coletas. Para obter um nível de infecção maior e também maior número de plantas, as análises moleculares foram realizadas com o material de 18 meses após a inoculação (coleta de Jun. de 2013).

Em todas as coletas, foi coletado material para a extração de DNA e RNA. Sendo assim, o mesmo material utilizado para a extração de DNA para verificação da concentração bacteriana foi utilizado para as análises de expressão gênica.

O DNA das plantas foi extraído pelo método descrito por Murray e Thompson (1980). Foram utilizados 250 mg de pecíolos coletados das plantas inoculadas e das não inoculadas. Esse material foi cortado em pequenos pedaços e colocados em 800µl Tampão de Extração 1 (composto por 10 ml de Tris HCL pH 7,5 1M; 2 ml EDTA 0,5M; 14 ml de NaCL 5M; 33 ml

de MiliQ) sendo macerados em almofariz de cerâmica com o auxílio de pistilos do mesmo material.

Todo o material macerado foi transferido para tubos de 2 ml e em câmara de exaustão adicionou-se ao material 500µl de Tampão de Extração 2 (composto por 8 ml de PVP 5%; 8 ml de CTAB 10%; 32 µl de Betamercaptoetanol 140 mM). Após adicionar Tampão de Extração 2, os tubos foram agitados suavemente na câmara de exaustão por 1 minuto para a mistura e homogeneização das soluções. Em seguida, os tubos foram levados para banho-maria por 30 minutos a 65 °C e, após esse processo, o material foi centrifugado 10000 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, 700 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos 1,5 ml estéreis, adicionou-se igual volume de CIA (Clorofórmio/Álcool Isso-amilíco 24:1) e foi realizada a mistura do material e homogeneização por inversão dos tubos em movimento suaves por 2 minutos. Depois disso, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos e 500 µl do sobrenadante foram transferidos para novos tubos e adicionaram-se 300 µl de álcool isopropílico gelado. Foi realizada a homegeinização das soluções e os tubos foram transferidos para freezer -20 °C por 30 minutos.

Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm a 10 °C, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de álcool etílico 70%. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado e os tubos foram abertos e colocados em estufa ventilada por 15 minutos a 55 °C. Após a secagem do precipitado, acrescentaram-se 50 µl de MiliQ e o material foi mantido em temperatura ambiente por 2 horas para ressuspender o DNA extraído. Em seguida, o material foi analisado em espectrofotômetro Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific) para verificar a concentração do DNA extraído e fazer a uniformização da concentração de todas as amostras. Todas as amostras foram uniformizadas para a concentração de 10 ng.µL<sup>-1</sup>.

### **3.4 Extração de RNA total das plantas e síntese de cDNA**

A extração de RNA total foi realizada com o auxílio do produto TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), utilizando-se o protocolo de extração recomendado pelo fabricante. Após as extrações, foi realizada a purificação do RNA, utilizando-se o kit de purificação RNeasy Plant Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen), acrescido do tratamento com DNase, utilizando-se o RNase-FreeDNase Set<sup>®</sup> (Qiagen).

A purificação e concentração do RNA foram verificadas por espectrofotômetro Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific), sendo mensurada a razão entre o valor da absorbância a  $\lambda=260$  nm e o valor da absorbância a  $\lambda=280$  nm, obtendo valores ótimos entre 1,8 a 2,2. Para determinar a integridade do RNA, este foi analisado em gel de agarose (1,5%), a 60 V, por 40 minutos.

Para proceder a síntese do cDNA, utilizou-se a enzima M-MLV (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante, sendo utilizados 1 $\mu$ g de RNA, 1 $\mu$ L de primeroligodT, 1  $\mu$ L de dNTPmix a 10 mM e água destilada livre de RNase para completar o volume de 12  $\mu$ L, sendo essa mistura incubada a 65°C por 5 minutos, e depois colocada em gelo. Para inibir a ação de RNases, foi utilizado o RNase OUT (Invitrogen), sendo adicionado 4  $\mu$ L de 5X First-Strand Buffer, 2  $\mu$ L de DTT a 0,1M e 1  $\mu$ L de RNaseOUT (40U  $\mu$ L<sup>-1</sup>).

Essa solução foi incubada a 37 °C por 2 minutos, e acrescida de 1  $\mu$ L da enzima M-MLV RT (Invitrogen), totalizando um volume de 20  $\mu$ L, e essa solução foi mantida a 37 °C, por 50 minutos, e, posteriormente, foi realizada a inativação da enzima a 70 °C, por 15 minutos. A concentração de cDNA de cada amostra foi considerada como se todo RNA fosse convertido em cDNA (1  $\mu$ g de RNA em 20  $\mu$ L de reação). Após o término da reação, as amostras de cDNA foram padronizadas para 6,6 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> e estocadas a -20 °C. Ao final da síntese de cDNA, realizou-se a quantificação da expressão relativa, por meio da análise de PCR quantitativo em tempo real.

### **3.5 Análise da concentração bacteriana pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

A concentração bacteriana foi mensurada segundo a metodologia desenvolvida por Coletta-Filho et al. (2010) e a otimização da qPCR foi feita utilizando 0,8  $\mu$ M de *primers* (Forward e Reverse) e 0,2  $\mu$ M de sonda para a identificação de sequência específica do 16S rDNA da bactéria CLas (CARLOS et al., 2006) segundo sequências disponíveis na Tabela 1. Para a realização da qPCR foi utilizado o Master Mix 1X Taq fast universal<sup>®</sup> (Applied Biosystems) e utilizou-se 4  $\mu$ L de DNA total extraído em uma concentração de 10 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>. A PCR foi realizada no equipamento ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System<sup>®</sup> (Applied Biosystems). O protocolo de amplificação da curva foi 2 min. a 50 °C e 10 min. a 95 °C seguidos por 40 ciclos de amplificação de 15 seg. a 95 °C e 1 min. a 60 °C.

Tabela 1- Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* utilizado para a identificação da concentração bacteriana das amostras

Gene	Sequência 5'-3' <i>F</i>	Sequência 5'-3' <i>R</i>
16S rDNA	TCACCGGCAGTCCCTATAAAAAGT	GGGTTAAGTCCCGCAACGA
Sonda	ACATCTAGGTAAAAACC	

A concentração de CLas no tecido vegetal foi estimada com base em curva padrão previamente estabelecida segundo metodologia apresentada por Coletta-Filho et al. (2010). Para a elaboração da curva padrão, utilizou-se fragmento de 16S rDNA de CLas clonado anteriormente em plasmídeo pGEM contendo um inserto de 1200 pb. Esse plasmídeo foi diluído em concentrações conhecidas e por meio de recursos matemáticos foi possível estabelecer uma curva padrão entre a concentração do plasmídeo (número de cópias do gene alvo) e os respectivos valores do limiar de fluorescência (Ct-thresholdcycle) para cada diluição.

### 3.6 Análise da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a realização da análise de expressão gênica por qPCR, é necessário utilizar genes referência, para garantir que quantidade de cDNA seja a mesma em todas amostras. Portanto, os genes utilizados como referência devem ser genes que estão presentes na maioria das células e são necessários para a sobrevivência da mesma, garantindo que sua expressão bastante similar em todas as células. A síntese do mRNA dos genes de referência, nas células deve ser estável, mesmo quando sofre algum tipo de tratamento experimental (THELLIN et al., 1999).

A normalização é necessária para garantir a reprodutibilidade e precisão da expressão quantitativa. Neste trabalho, foi utilizado como gene de referência o gene *FBOX* descrito no trabalho de Mafra et al. (2012) como sendo um gene onde não se observaram alterações na expressão, quando as plantas foram submetidas a tratamento com bactérias fitopatogênicas. Também foi utilizado o gene *uidA* como gene de interesse, já que esse está ligado diretamente aos promotores aos quais se pretendem analisar. O par de *primers* utilizado para amplificar a sequência do gene *uidA* e do gene *FBOX* está descrito na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do gene de referência *FBOX* e do gene *uidA* utilizados na análise de expressão gênica

Gene	Sequência 5'-3' <i>F</i>	Sequência 5'-3' <i>R</i>	Amplicon (pb)
<i>FBOX</i>	TTGGAAACTCTTTCGCCACT	CAGCAACAAAATACCCGTCT	112
<i>uidA</i>	ACCTCGCATTACCCTTACGCTAAA	GCCGACAGCAGCAGTTTCATCAAT	87

Neste trabalho foi realizado um ensaio prévio com cDNA de várias plantas com concentrações distintas de bactéria em cuja extração obtiveram concentrações de RNA diferentes. No presente experimento, não foi possível verificar nenhum tipo de alteração nas curvas de Melt (Figura 3). As alterações de Ct entre as amostras foram muito próximas (o Ct foi de  $30 \pm 1$ ). Além disso, a eficiência de amplificação dos *primers* foi de 97%. Este resultado nos deu segurança para utilizar o gene *FBOX* como gene de referência nas análises de qPCR.

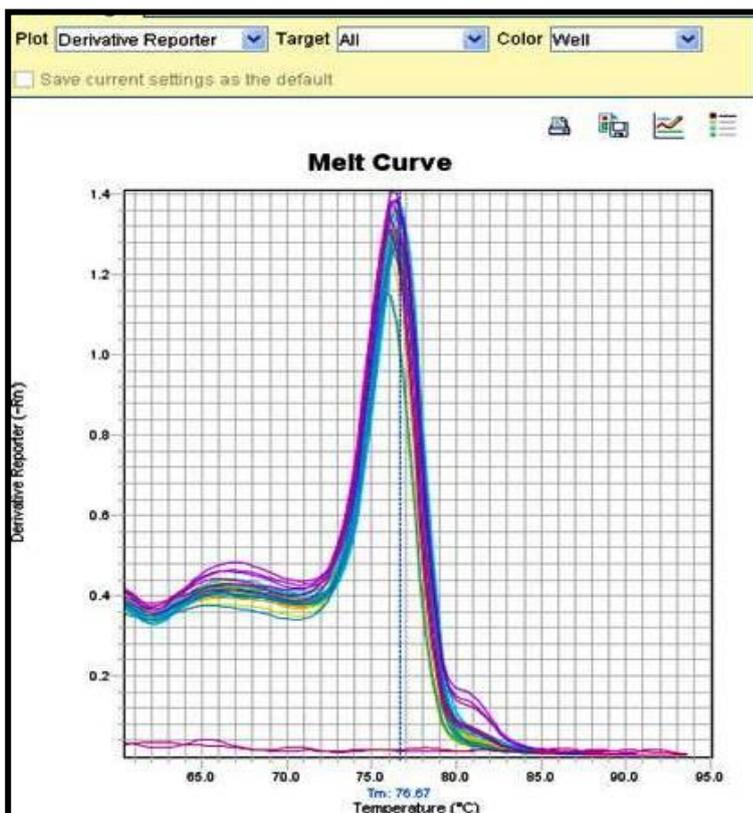


Figura 3 - Curva de Melt obtida em ensaio com *primers* do gene *FBOX* mostrando apenas um pico de temperatura

Para a realização das análises de PCR quantitativo em tempo real, foram utilizados 15  $\mu$ L de solução contendo 5  $\mu$ L de cDNA o que corresponde a 30 ng de cDNA, 0,3  $\mu$ L de

primer forward e reverse, 7,5 µL de Fast SYBR Green Master Mix e 1,9 µL de água livre de nucleases.

As amplificações foram realizadas em três réplicas técnicas de cada planta incluindo as amostras de plantas não transgênicas, e amostra controle sem DNA para verificar possíveis contaminações dos reagentes utilizados. As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas no equipamento 7500 Fast (Applied Biosystems), utilizando-se o Fast SYBR Green Master Mix (4385612). A metodologia utilizada pelo aparelho foi o comparativo no modo FAST, no programa padrão do equipamento que atua nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95 °C por 20 s; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos.

Ao final da reação, foi realizada a verificação do produto amplificado por meio da análise de Melting (RIRIE et al., 1997), que determina o ponto de fusão médio dos amplicons formados durante a reação. Durante essa análise, as amostras foram submetidas a um ciclo a 95 °C por 15 s, para a desnaturação das duplas fitas amplificadas e aquecidas de 60 a 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,3 °C s<sup>-1</sup>, sendo realizadas medidas de fluorescência continuamente e, finalmente, submetidas a 60 °C por 15 segundos. Para cada planta transgênica, foi detectado o valor de Ct tanto para o gene alvo quanto para o gene de referência. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado.

Os dados gerados durante a análise de qPCR foram submetidos à análise no programa LinReg PCR (RAMAKERS et al., 2003) para determinação da eficiência média para cada gene. Esse software realiza uma regressão linear para cada curva de amplificação, encontrando um valor de eficiência para cada reação e uma eficiência média de amplificação para cada gene.

Após o cálculo da eficiência de amplificação dos genes utilizados foi realizado o cálculo de  $\Delta\Delta Ct$  utilizando-se a diferença entre os Ct do gene de referência e do gene alvo. Na fórmula de Quantificação Relativa ( $RQ = 2^{-(\Delta Ct \text{ da amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$ ), que corresponde a  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O valor do Ct do gene alvo é subtraído do valor do Ct do gene de referência e resulta no valor de  $\Delta Ct$ ; o valor de  $\Delta Ct$  do gene alvo é, então, subtraído do valor do  $\Delta Ct$  do calibrador, e é encontrado o valor de  $\Delta\Delta Ct$ . Esse valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A eficiência de amplificação dos *primers* do gene *FBOX* foi de 97% e dos *primers* do gene *uidA* (GUS) foi de 98% sendo assim, a somatória da eficiência dos genes ficou muito próxima de 100% o que possibilitou a análise de RQ (Quantificação Relativa) pelo método de  $\Delta\Delta Ct$ . Também não houve amplificação inespecífica como pode ser verificado nas curvas de Melt apresentadas na Figura 4 A e B.

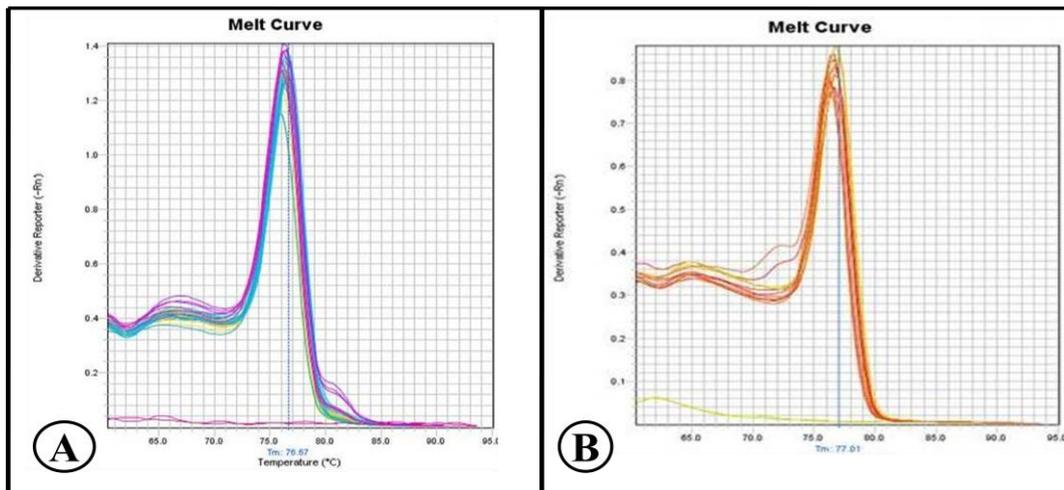


Figura 4 - Curvas de Melt do par de *primers* dos genes *FBOX* e *uidA* (GUS), mostrando apenas um pico de amplificação e demonstrando que não há amplificação inespecífica. A. Curva de melt do gene *FBOX*. B. Curva de Melt do gene *uidA* (GUS)

A quantificação relativa foi realizada comparando-se o RQ de uma planta de cada linhagem transgênica testada não inoculada com as demais plantas transgênicas inoculadas da mesma linhagem.

### 3.7 Análise de coeficiente de correlação entre expressão gênica e concentração bacteriana pela técnica de Pearson

O coeficiente de Pearson ( $\rho^{\wedge}$ ) é interpretado como um indicador que descreve a interdependência entre as variáveis X e Y, com a forma  $Y^{\wedge} = \alpha^{\wedge} + \beta^{\wedge}X$ , onde  $\alpha^{\wedge}$  e  $\beta^{\wedge}$  são constantes (ALDRICH, 1995).

A interpretação do coeficiente quando  $\rho^{\wedge} = 1$  é de que existe correlação linear perfeita entre as variáveis X e Y. A correlação é linear perfeita positiva quando  $\rho^{\wedge} = 1$  e linear perfeita negativa quando  $\rho^{\wedge} = -1$ . Quando se tem  $\rho^{\wedge} = 0$ , não existe correlação linear entre as variáveis X e Y.

Entretanto, ocorrem diferentes valores de ( $\rho^{\wedge}$ ). A interpretação do valor de  $\rho^{\wedge}$  depende muito dos objetivos de sua utilização e as razões pelas quais este é calculado. Segundo Callegari-Jacques (2003), o coeficiente de correlação pode ser avaliado qualitativamente da seguinte forma:

se  $0,00 < \rho^{\wedge} < 0,30$  , existe fraca correlação linear;

se  $0,30 \leq \rho^{\wedge} < 0,60$  , existe moderada correlação linear;

se  $0,60 \leq \rho^{\wedge} < 0,90$  , existe forte correlação linear;

se  $0,90 \leq \rho^{\wedge} < 1,00$  , existe correlação linear muito forte

Nesse trabalho, os valores atribuídos a variável X correspondem à quantificação relativa da expressão gênica e os valores atribuídos a variável Y correspondem à concentração bacteriana.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Multiplicação das plantas selecionadas por enxertia

Após a escolha das plantas com base nos resultados de PCR e *Southern blot* obtidos por Miyata (2009), realizou-se o ensaio histoquímico de GUS das plantas selecionadas e foi possível verificar que não houve diferença visível na coloração das reações (Figura 5), descartando a presença de quimeras entre as borbulhas utilizadas. Esse ensaio foi realizado para todas as matrizes utilizadas mais aqui são apresentados apenas os resultados das matrizes utilizadas nas análises de expressão gênica realizada posteriormente com a matriz H9 (Figura 5 A), com a matriz H46 (Figura 5 B) e com a matriz H71 (Figura 5 C).

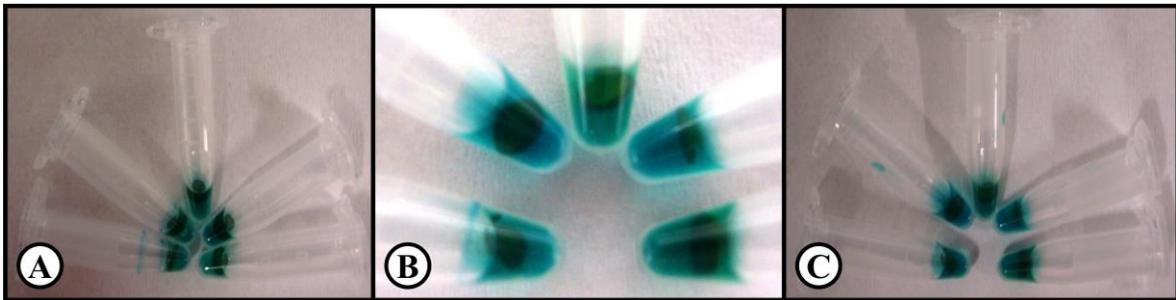


Figura 5 - Ensaio histoquímico de GUS nas matrizes utilizadas nas análises de expressão gênica. A) Matriz H9. B) Matriz H46. C) Matriz H71

### 4.2 Inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*

Após o PAI, realizou-se a retirada dos insetos das plantas inoculadas e foi possível observar uma sobrevivência de 90% dos insetos. Também foi possível observar que os insetos ovipositaram nas plantas inoculadas e por esse motivo várias aplicações de inseticidas foram feitas após esse período para a completa eliminação dos insetos.

Foram inoculadas no experimento dez plantas de cinco matrizes transgênicas de cada construção e também dez plantas de uma matriz não transgênica. Como trabalhamos com três construções gênicas (*AtPP2/uidA*, *AtSUC2/uidA* e *CsPP2/uidA*) e cinco matrizes transgênicas para cada construção, obtivemos ao final do experimento um total de 160 plantas inoculadas. Entretanto, somente 48 plantas foram confirmadas por qPCR como sendo positivas para a presença de CLas (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados obtidos por PCR quantitativo em tempo real da inoculação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri* em plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' transformadas com construções gênicas contendo o gene *uidA* sob controle dos promotores floema-específico AtPP2, CsPP2 e AtSUC2. Células com sinal positivo (+) correspondem a plantas positivas para a presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Células em branco correspondem a plantas negativas para a presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. PAI Período de Acesso a Inoculação. Resultados obtidos dezoito meses após a inoculação com *Diaphorina citri*

Construção Gênica	Evento de transformação	Clone (Repetição)										Frequência de Inoculação	Média da frequência de Inoculação por construção gênica
		PAI <sup>1</sup>		PAI <sup>2</sup>						PAI <sup>3</sup>			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
AtPP2	H 3	+									+	20%	32%
	H 4		+					+		+		30%	
	H 6										+	10%	
	H 9	+	+	+	+	+	+	+		+	+	90%	
	H 12								+			10%	
CsPP2	H 43		+	+	+	+	+					50%	30%
	H 44								+			10%	
	H 45											0%	
	H 46	+	+	+		+	+		+			60%	
	H 55		+				+				+	30%	
AtSUC2	H 71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100%	28%
	H 72		+	+	+	+						40%	
	H 73											0%	
	H 75											0%	
	H 76											0%	
Controle não transgênico				+		+		+				30%	
Média frequência de inoculação por PAI		34,37%		30,20%						25%		30 %	
Média da frequência da inoculação:													

<sup>1</sup> Primeiro PAI (28/11/2011), <sup>2</sup> Segundo PAI (07/12/2011) e <sup>3</sup> Terceiro PAI (17/12/2011).

A inoculação não foi uniforme entre as linhagens transgênicas havendo uma variação de 0 a 100% de frequência de inoculação no experimento. Quatro linhagens não apresentaram plantas positivas para a presença de CLAs.

Houve pouca diferença entre as frequências de inoculação entre os três diferentes períodos de acesso a inoculação (PAI). Média da frequência de inoculação por PAI variou de 25 % a 34,37 %.

As plantas inoculadas com psilídeos que não foram submetidos ao PAA (Período de Acesso a Aquisição) foram analisadas por qPCR para a presença de CLAs e não apresentaram resultados positivos para a presença da CLAs. Da mesma forma, as plantas não inoculadas também não apresentaram resultados positivos para presença de CLAs, como o esperado.

Observou-se também que a linhagem não transgênica (controle não transgênico) apresentou três plantas positivas para a presença de CLAs e sua frequência média de

inoculação é próxima à das linhagens transgênicas, o que descarta a possibilidade da influência dessas construções gênicas na inoculação de CLas via *Diaphorina citri*.

A média da frequência da inoculação foi de 30 % para todos os experimentos de inoculação. Entretanto, é muito variável a frequência de inoculação entre as linhagens testadas. Apenas a linhagem H71 apresenta 100 % de frequência de inoculação e quatro linhagens transgênicas apresentam 0 % de frequência de inoculação dezoito meses após a inoculação realizada por *Diaphorina citri*.

#### **4.3 Análise da concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

Houve uma grande variação da concentração bacteriana entre as plantas inoculadas tanto dentro da mesma linhagem transgênica, como entre linhagens e dentro do mesmo PAI. As Figuras 6, 7 e 8 mostram a concentração bacteriana nas diferentes construções e há clara variação de concentração entre as plantas positivas para a presença de CLas dentro da mesma construção gênica. Mesmo entre as plantas não transformadas inoculadas com CLas que foram positivas para a inoculação houve grande variação da concentração bacteriana e nenhuma das três plantas não transgênicas (T3, T5 e T7) com presença de CLas confirmada apresentou sintomas típicos de HLB no período de avaliação das plantas.

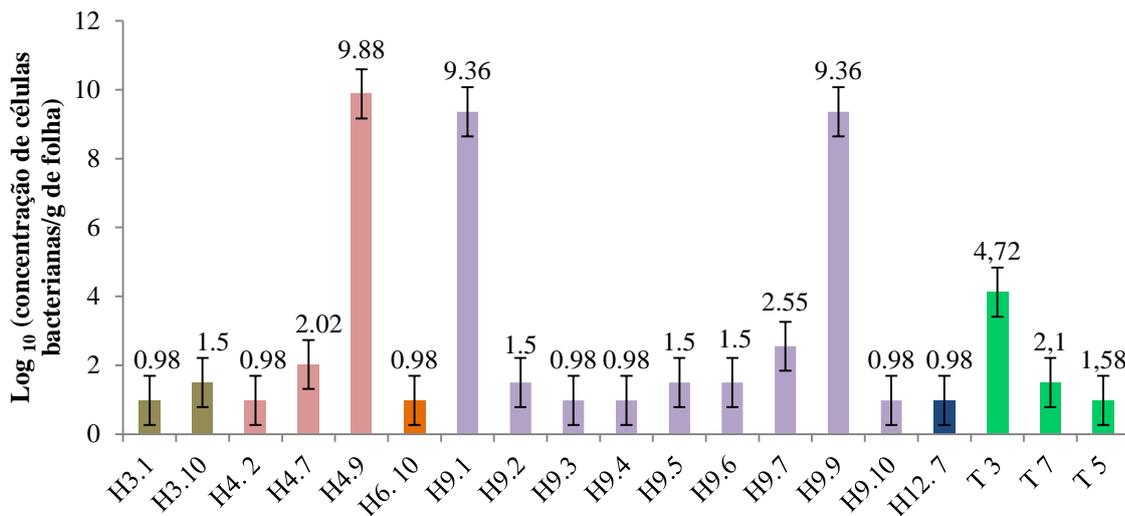


Figura 6 – Avaliação da concentração de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por grama de folha das plantas inoculadas por *Diaphorina citri*, identificadas por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação. H3, H4, H6, H9 e H12. Plantas transformadas com a construção AtPP2/*uidA*. T3, T7 e T5. Controle não transgênico

A concentração células de CLas por grama de folha obtida, após avaliação por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação variou de 0,98 a 9,88 para as plantas positivas da construção AtPP2/*uidA* (Figura 6). A linhagem transgênica H9 apresenta 90 % de frequência de inoculação e todas as linhagens dessa construção apresenta plantas positivas para a presença de CLas. Entretanto, somente três plantas (H4.9, H9.1 e H9.9) apresentaram alta concentração de CLas das quinze plantas positivas que foram obtidas nessa construção.

As maiores concentrações de células de CLas por grama de folha foram obtidas nas plantas da construção contendo o promotor CsPP2. A concentração de CLas variou de 1,7 a 10,49 nas plantas positivas para a presença da CLas dessa construção (Figura 7). Nessa construção gênica, apenas a linhagem H45 não apresentou nenhuma planta positiva para a presença de CLas.

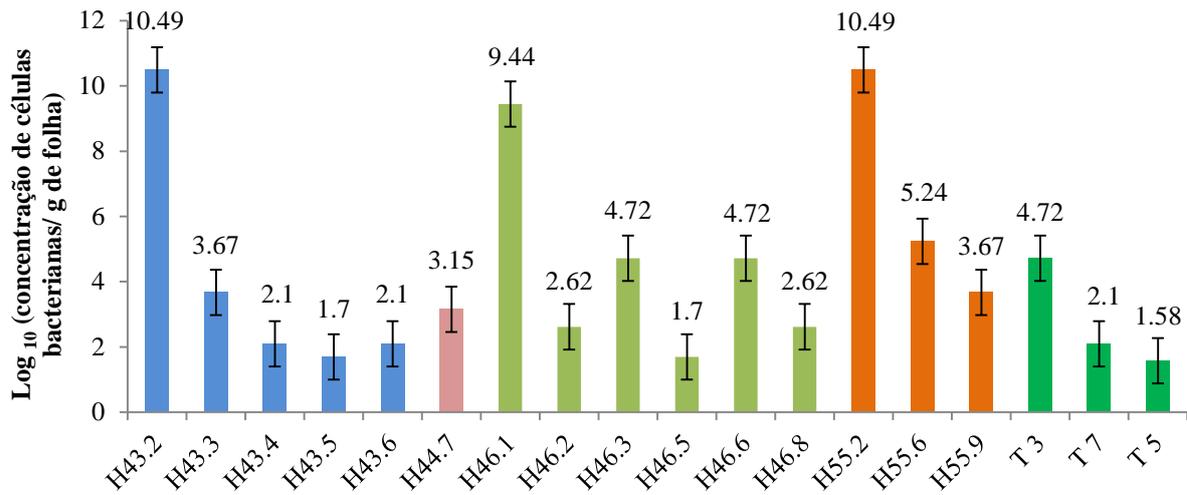


Figura 7 - Avaliação da concentração de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por grama de folha das plantas inoculadas por *Diaphorina citri*, identificadas por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação. H43, H44, H46 e H55. Plantas transformadas com a construção CsPP2/*uidA*. T3, T7 e T5. Controle não transgênico

A variação da concentração de CLAs é de 1,7 a 10,49 nas plantas da construção CsPP2/*uidA* o que mostra que as plantas inoculadas positivas apresentaram maiores concentrações de CLAs que as plantas das outras construções gênicas testadas. Três plantas apresentaram concentração de CLAs superiores a 9,44 e seis plantas têm concentração de bactéria que variam de 3,15 a 5,2 (Figura 7).

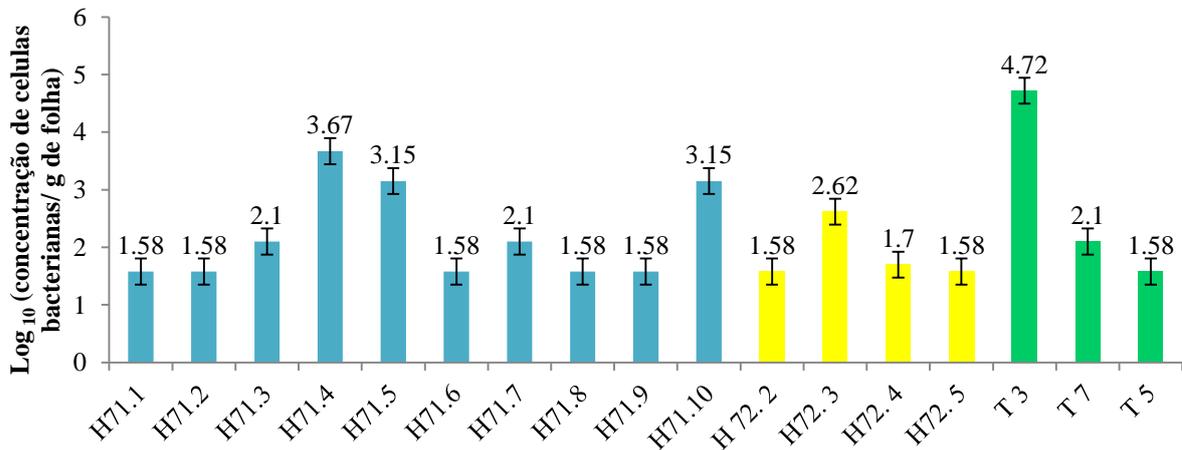


Figura 8 - Avaliação da concentração de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por grama de folha das plantas inoculadas por *Diaphorina citri*, identificadas por PCR quantitativo em tempo real, dezoito meses após a inoculação. H71 e H72. Plantas transformadas com a construção AtSUC2/*uidA*. T3, T7 e T5. Controle não transgênico

As plantas positivas, para a presença de CLAs, da construção AtSUC2/*uidA* apresentaram as concentrações de CLAs mais baixas, que as outras construções testadas, variando de 1,58 a 3,67 (Figura 8). Apenas duas linhagens transgênicas apresentaram plantas

positivas para a presença de CLAs (H71 e H72) e nas outras três linhagens inoculadas não se verificou a presença de CLAs no período de avaliação das plantas.

Todas as plantas com concentração bacteriana ( $\text{Log}_{10}$  (concentração de células bacterianas/g de folha) acima de 9,36 apresentaram sintomas típicos de HLB (Figura 9 A). Entretanto, a maioria das plantas analisadas por qPCR, apresentou valores menores que 9,36 não apresentando sintomas típicos de HLB (Figura 9 B). Em todas as plantas da construção *AtSUC2/uidA*, e entre as plantas não transgênicas inoculadas, não se verificou nenhuma planta com sintomas típicos de HLB.



Figura 9 – Plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *Diaphorina citri*, após dezoito meses de inoculação. A) Planta com alta concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* apresentando sintomas típicos de Huanglongbing (HLB). B) Planta com baixa concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus* assintomática

#### 4.4 Análise da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para realização da análise de expressão gênica foram realizadas curvas de eficiência dos primers. A eficiência dos primers (*FBOX* e *uidA*) ficaram ao redor de 96%. Portanto, para cálculo da quantidade relativa da expressão gênica, utilizou-se método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Para o cálculo da quantidade relativa da expressão gênica, uma amostra da linhagem que não sofreu qualquer tipo de inoculação foi utilizada como calibrador (amostra referência) e é o zero de onde foi feito as comparações com a expressão das outras amostras.

Todas as amostras transgênicas analisadas por qPCR amplificaram para o primer *uidA*, o que demonstra que em todas as plantas transgênicas analisadas houve expressão gênica. A análise da expressão gênica relativa foi realizada com as matrizes onde foi possível coletar RNA de qualidade e também com um número maior de repetições possível de plantas com

mesma concentração de CLas. Dessa forma, foi escolhido as matrizes H9, H46 e H71 para a realização da análise de expressão gênica e coeficiente de correlação de Pearson.

A expressão relativa é muito variável mesmo em plantas com a mesma concentração bacteriana. Ao observarmos a Figura 10, fica clara a diferença entre a expressão relativa da planta H9.1 e H9.9. Entretanto, essas plantas têm a mesma concentração bacteriana.

É possível notar grande variação na expressão gênica entre as construções e entre as amostras de uma mesma construção (Figura 10,11 e 12), o que demonstra que outros fatores além da construção gênica e da concentração de CLas influenciam na expressão do transgene analisado.

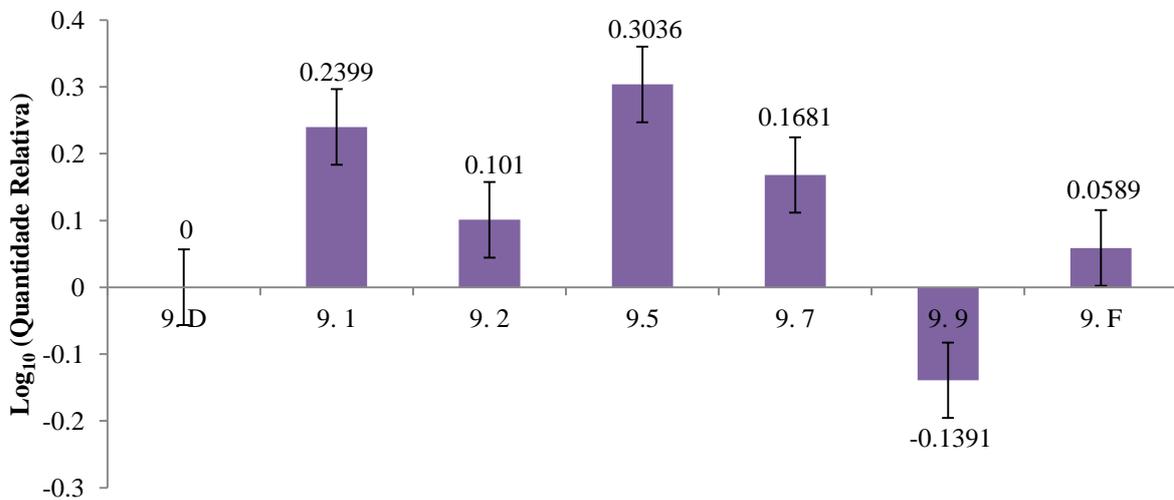


Figura 10 - Avaliação da expressão gênica, dezoito meses após a inoculação, por meio da análise de PCR em tempo real da linhagem transgênica H9 que corresponde a plantas transformadas com a construção *AtPP2/uidA*. Planta H9.D (planta que não sofreu nenhum tipo de inoculação) amostra referência para as plantas H9.1, H9.2, H9.5, H9.7, H9.9 e H9.F. Planta H9.F planta inoculada com psílideo não infectivo

A quantidade relativa da expressão gênica da construção gênica *AtPP2/uidA* (linhagem H9) variou de -0,1391 a 0,3036. Cinco plantas da linhagem H9 contendo concentrações de CLas distintas e uma planta inoculada com *Diaphorina citri* não infectiva (H9. F) foram analisadas a partir de comparações pelo método de  $\Delta\Delta C_t$  utilizando a planta H9. D como calibrador, pois essa amostra não sofreu nenhum tipo de inoculação. Apenas a planta H9. 9 apresenta expressão gênica menor que o calibrador (-0,1391).

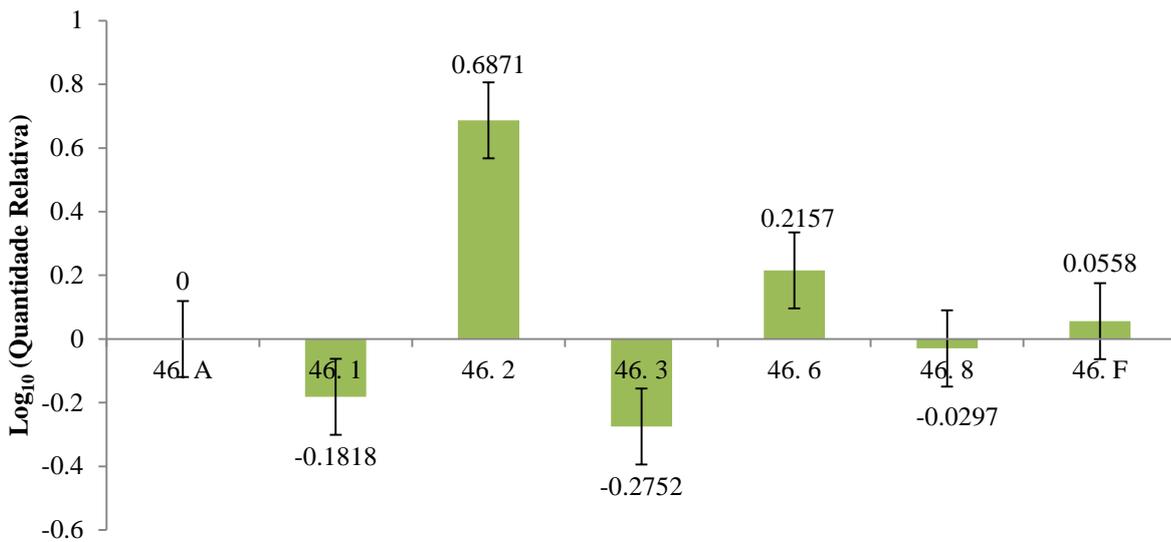


Figura 11 - Avaliação da expressão gênica, dezoito meses após a inoculação, por meio da análise de PCR em tempo real da linhagem transgênica H46 que corresponde a plantas transformadas com a construção CsPP2/*uidA*. Planta H46.A (planta que não sofreu nenhum tipo de inoculação) amostra referência para as plantas H46.1, H46.2, H46.3, H46.6 H46.8 e H46.F. Planta H46.F planta inoculada com psílideo não infectivo

A avaliação da expressão gênica da linhagem H46 (construção CsPP2/*uidA*) foi realizada utilizando a planta H56.A como amostra referência (calibrador) para as outras amostras analisadas. A expressão gênica das plantas variou de -0,2752 a 0,6871 entre as plantas inoculadas com CLAs e a expressão gênica da planta H46.F (planta inoculada com psílideo não infectivo) foi de 0,0558. A concentração de CLAs das plantas H46.3 e H46.6 é a mesma mas a expressão gênica é modulada de forma positiva para a planta H46.6 e de forma negativa para a planta H46.3 (Figura 11) indicando que a expressão gênica deve ser influenciada por outros fatores além da concentração de CLAs.

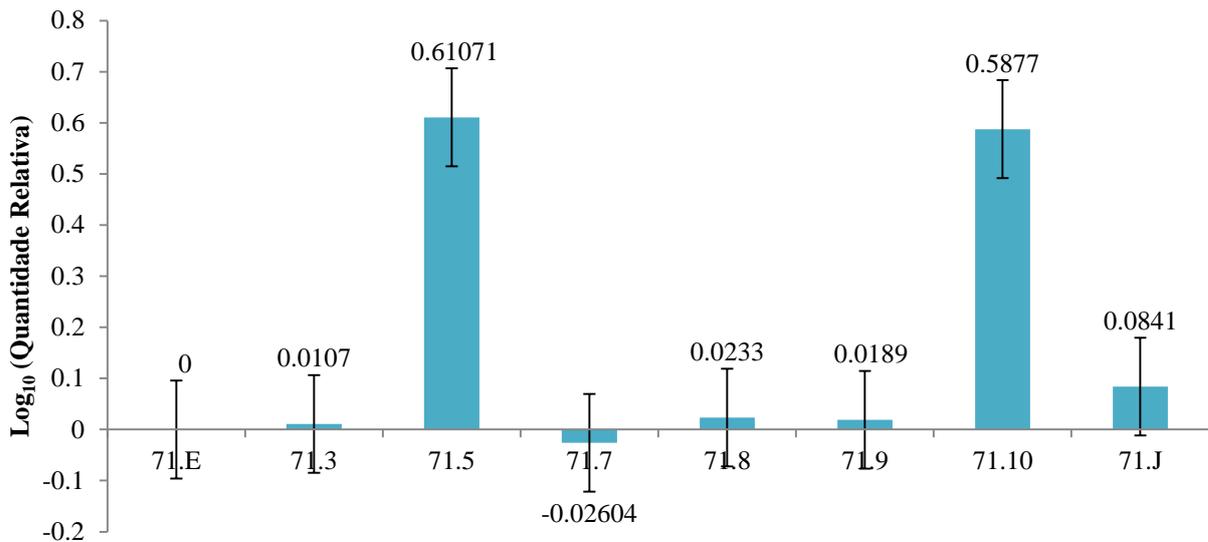


Figura 12 - Avaliação da expressão gênica, dezoito meses após a inoculação, por meio da análise de PCR em tempo real da linhagem transgênica H71 que corresponde a plantas transformadas com a construção *AtSUC2/uidA*. Planta H71.E (planta que não sofreu nenhum tipo de inoculação) planta referência para as plantas H71.3, H71.5, H71.7, H71.8, H71.9, H71.10 e H71.J. H71.J inoculada com psílideo não infectivo

A expressão gênica relativa da construção *AtSUC2/uidA* foi feita avaliando-se a quantidade relativa da expressão gênica da linhagem H71 com base no método de  $\Delta\Delta Ct$  utilizando a amostra H71.E como calibrador. A expressão gênica variou entre as plantas analisadas de - 0,02604 a 0,61071. Sendo modulada positivamente para a maioria das plantas e apenas a planta H71.7 teve sua expressão modulada negativamente.

#### 4.5 Correlações entre expressão relativa dos transgenes e a concentração de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

A correlação entre a expressão relativa e a concentração bacteriana foi realizada utilizando o coeficiente de Pearson ( $\rho^{\wedge}$ ), que é interpretado como um indicador que descreve a interdependência entre as variáveis X e Y, com a forma  $Y^{\wedge} = \alpha^{\wedge} + \beta^{\wedge}X$ , onde  $\alpha^{\wedge}$  e  $\beta^{\wedge}$  são constantes.

Com os dados de expressão gênica e concentração bacteriana de cada linhagem se estabeleceu o valor do coeficiente de Pearson ( $\rho^{\wedge}$ ) e foi possível classificar o coeficiente decorrelação qualitativamente em fraco, moderado, forte e muito forte com base na metodologia descrita por Callegari-Jacques (2003).

O valor de Pearson quando se correlacionou à expressão da linhagem H9 com suas respectivas concentrações bacterianas, foi de -0,12, valor considerado fraco. Dessa forma,

existe fraca correlação negativa entre a expressão gênica e a concentração bacteriana para a linhagem H9, demonstrando que, a variável x e a variável y têm baixa interdependência, ou seja, a variação da concentração bacteriana interfere muito pouco na expressão gênica.

A linhagem H46 apresentou valores de correlação maiores ( $\hat{\rho} = - 0,32$ ) que a linhagem H9 e a correlação entre expressão gênica e concentração bacteriana é classificada, segundo Pearson, como moderada e negativa indicando que existe moderada dependência entre as variáveis.

Os melhores resultados de correlação foram obtidos para a linhagem H.71 onde o valor de  $\hat{\rho}$  (0,68) classificaram a correlação como forte e positiva, ou seja, quanto maior a concentração bacteriana maior expressão gênica. Esse valor de Person indica que as variáveis expressão gênica e concentração bacteriana estão se comportando de forma interdependente nessa linhagem transgênica, ou seja, uma variável aumenta em consequência do aumento da outra.

## 5 DISCUSSÃO

A utilização das técnicas de engenharia genética tem como objetivo primário a produção de uma cadeia polipeptídica heteróloga nos organismos transformados. Para garantir a síntese dessa cadeia polipeptídica (proteína heteróloga) além da introdução de um gene de interesse deve haver a garantida transcrição do mesmo no interior das células do organismo transformado, assim como a tradução de RNA gerado na transcrição. A transcrição de um gene depende do reconhecimento de sequências específicas chamadas de promotores pelos cofatores da RNA polimerase (RANCE et al., 2002). Os promotores são os locais onde a RNA polimerase se ligam antes de iniciar a transcrição de um gene (GRIFFITHS et al., 2000).

Atualmente, várias sequências de promotores têm sido descritas na literatura, clonadas e utilizadas em plantas (YANG; RUSSELL, 1980; WANG; BOULTER; GATEHOUSE, 1992; YANG; RUSSELL, 1990; SHI et al., 1994). O interesse na utilização de promotores diferenciados tem aumentado, devido ao maior controle da expressão gênica que essas sequências têm propiciado ao transgene e conseqüentemente têm levado as ganhos nas culturas utilizadas (WANG et al., 2005).

Para desenvolvermos construções gênicas mais eficientes contra o HLB precisamos entender melhor o patossistema para construir cassetes de expressão mais efetivos no controle das bactérias associadas a essa doença. Com esse objetivo, buscamos sequências de promotor que controlassem a expressão gênica no local onde a bactéria CLas fica alojada na planta de citros (TATINENI; SAGARAM; GOWDA, 2008; LI; LEVY; HARTUNG, 2009), ou seja, promotores que fossem floema-específicos.

As bactérias associadas ao HLB estão alojadas no floema de citros. Portanto, buscamos primeiramente clonar e transformar plantas de citros com sequências promotoras para verificar a eficiência do controle da expressão floema-tecido-específico destas sequências. Essa etapa foi realizada com sucesso por Miyata (2009). Entretanto, após a transformação o questionamento que se faz é: Como esse transgene vai se comportar sob o estresse para o qual ele foi desenvolvido?

A única forma de responder esse questionamento é colocando o transgênico sob o estresse para o qual ele foi programado. Com esse objetivo, as plantas que já haviam sido transformadas por Miyata (2009) precisavam ser selecionadas, propagadas e inoculadas com o CLas. Para selecionar as plantas utilizou-se as técnicas de PCR e *Southern blot*, levando a seleção de cinco plantas de cada construção gênica. Os resultados mostram que plantas

analisadas por *Southern blot* transformadas com essas construções apresentaram apenas uma inserção da construção gênica. Por isso, essas plantas foram escolhidas para a propagação e inoculação de CLas por *Diaphorina citri*.

No Brasil a CLas é a principal bactéria associada ao HLB presente no campo e para inocular a CLas é utilizado a técnica enxertia de borbulhas contaminadas, a cuscuta e a inoculação via psílideo *Diaphorina citri* (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006; LOPES et al., 2009). Apesar da inoculação de CLas ter respostas demoradas e eficiência aleatória, esta é a forma natural de transmissão de CLas de uma planta para outra (HALBERT; MANJUNATH, 2004; HALBERT, 2005).

A inoculação de CLas via psílideo tem apresentado na literatura resultados controversos (XU et al., 1988; INOUE et al., 2009). Os resultados mostram que é possível inocular CLas via *Diaphorina citri* com a metodologia adotada, mas é necessária a utilização de um número significativo de experimentos de PAI para a obtenção de um número adequado de plantas contaminadas com CLas ao final do experimento, pois a frequência de inoculação é muito variável. Isso pode ser observado na diferença de frequência de inoculação existente entre uma linhagem transgênica e outra.

Após quatro meses da conclusão dos experimentos de inoculação de CLas os primeiros sintomas de HLB foram observados em cinco plantas (H9.1, H9.9, H43.2, H46.1 e H55.2). As plantas com sintomas de HLB foram confirmadas para a presença de CLas e os sintomas se mantiveram por todo o período de avaliação das plantas. Entretanto, as avaliações moleculares foram realizadas com amostras de 18 meses após a inoculação para garantir maior frequência de inoculação e maior variação de concentrações bacterianas possíveis.

A partir da obtenção de concentrações bacterianas diferentes, foi possível inferir a influência das diferentes concentrações de CLas na expressão do transgene e tentar responder o questionamento inicial proposto na tese. Essa inferência foi realizada por meio da utilização do coeficiente de Person, que descreve numericamente a interdependência entre duas variáveis distintas (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Nesse trabalho, as variáveis são a expressão gênica e concentração de CLas.

As concentrações de CLas e a frequência de inoculação variaram independentemente da construção gênica utilizada, mas o coeficiente de Person mostrou que nas construções PP2 (promotores AtPP2 e CsPP2) a expressão gênica sofre menos influência da concentração bacteriana que na construção de transportador de açúcares já que os valores de Person estão

mais próximos de zero (CALLEGARI-JACQUES, 2003), o que indica maior independência de cada variável. Entre a construção com promotor de *Citrus* (CsPP2/*uidA*) e a construção com promotor de *Arabidopsis* (AtPP2/*uidA*) há uma diferença considerável no coeficiente de correlação de Person e isso pode ser explicado pelo fato de apesar das sequências serem derivadas de PP2 os promotores tem domínios funcionais distintos.

A família PP2 são proteínas abundantes entre as plantas superiores e a clonagem e utilização de várias sequências de promotor desta família já têm sido realizada com sucesso em varias culturas (DINANT et al., 2003; JIANG et al., 1999; THOMPSON; LARKINS, 1996; GUO et al., 2004) inclusive em citros (MIYATA et al., 2012). Apesar dos promotores AtPP2 e CsPP2 serem derivados de mesma família gênica, seus domínios funcionais são distintos já que a sequência derivada de *Arabidopsis* foi clonada diretamente do gene At 4g19849 de *Arabidopsis* e a sequência derivada de *citrus* foi clonada a partir de uma sequência ortóloga de *Cucurbita maxima* (gene (L31550)), gene presente no GenBak cujo promotor já tinha sido caracterizado como floema-específico (BOSTWICK et al.,1992). O alinhamento entre estas duas sequências, com auxílio do software desenvolvido por Corpet (1988) revelou que as apresentambaixa identidade (26,8%).

Em organismos eucarióticos, somente alguns genes são transcritos constitutivamente, e mesmo esses em condições de estresses podem ser modulados negativamente (WHITE et al.,1999; AHN; SHIN; SCHACHTMAN, 2004). Por isso, o conhecimento sobre promotores é importante, já que se espera que, ao menos em parte, semelhanças nas regiões envolvidas na regulação da transcrição determinem padrões similares de expressão em diferentes espécies (OHLER; NIEMANN, 2001).

Lauvergeat et al. (2002) demonstraram que o padrão de expressão vascular determinado pelo promotor do gene *EgCAD2*, que codifica a cinamil álcool desidrogenase em *Eucalyptus gunnii*, se conserva em tabaco e populus. Já o trabalho de Ayreet al. (2003), empregando o promotor do gene que codifica a *galactinol sintetase* de *Cucumis melo*, mostrou que o padrão de expressão tecido-específico é conservado em *Arabidopsis* e tabaco, apesar de nenhuma das duas espécies empregarem *galactinol* no processo de transporte via floema. Tais resultados representam exemplos de conservação de processos regulatórios em diferentes espécies.

A construção gênica cujo promotor é derivado de um transportador de açúcares em *Arabidopsis*(AtSUC2/*uidA*) obteve os melhores resultados de correlação de Pearson. A correlação é classificada como forte e positiva que mostra que maiores concentrações de CLas levam a maiores expressões gênicas. Esse resultado mostra que a utilização deste promotor é

promissora em construções gênicas onde o objetivo é atingir a CLas, pois a medida que a concentração de CLas aumentar a expressão gênica também aumentará.

Barbosa-Mendes et al. (2009) demonstraram que quando se utilizou promotor estimulado pelo patógeno as plantas transgênicas responderam positivamente ao patossistema inoculado. Wang et al. (2005) também demonstraram que quando se utilizou promotor estimulado pelo estresse à seca, as plantas transgênicas têm maior eficiência no uso da água apresentando maior resistência a períodos de seca o que levou a um ganho significativo na produtividade ao longo de três anos de colheita de canola transgênica.

A expressão gênica oscila consideravelmente durante o ciclo de vida de um organismo, entre os tipos celulares e condições ambientais diversas (WHITE et al., 1999; IYER et al., 2001; KAYO, 2001; MODY et al., 2001; AHN; SHIN; SCHACHTMAN, 2004). Sendo assim, a caracterização de um gene não garante sua utilidade na obtenção de transgênicos. A produção eficiente de uma proteína heteróloga em determinado organismo depende da obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido e, para isso, promotores altamente ativos são necessários (RANCE et al., 2002).

A busca por plantas resistentes a doenças sempre foi um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de citros (DAVIES; ALBRIGO 1994) e o desenvolvimento de uma planta que apresente resistência ou tolerância ao HLB tem sido intensificada nos últimos anos (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Entretanto, a produção de um transgênico eficiente contra uma doença deve levar em consideração a produção de um cassete de expressão que demonstre níveis de expressão da proteína heteróloga em níveis adequados no momento e no local adequado onde o patógeno está e a utilização dos promotores apresentados, neste trabalho representa mais uma ferramenta na busca por uma planta transgênica resistente ao HLB.

Os resultados demonstram que as plantas escolhidas para serem linhagens transgênicas inoculadas com CLas, mesmo tendo apenas uma inserção do transgene, apresentam expressão gênica. Isso, comprova que os promotores utilizados promovem a expressão gênica do gene *uidA* confirmando que essas sequências funcionam como promotor da expressão de transgenes na cultura do citros. A eficiência dessas sequências como promotor avaliadas pela expressão gênica pela técnica de qPCR confirmam os resultados obtidos por Miyata et al. (2012); Dutt et al. (2012) e Attílio et al. (2013).

Plantas com o promotor AtPP2 controlando a expressão do peptídeo antimicrobiano sintético *D4E1* já foram produzidas por Attílo et al. (2013) e expressão dos pepitídeos também foi confirmada pelos autores por qPCR. Outros genes poderão ser colocados sob o controle dos promotores AtPP2, CsPP2 e AtSUC2 e as plantas transgênicas podem apresentar resistência ao HLB.



## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível inocular CLas, por *Diaphorina citri*, nas plantas transgênicas contendo as construções gênicas AtPP2/*uidA*, CsPP2/*uidA* e AtSUC2/*uidA* e nas plantas não transgênicas com uma eficiência média de 30 %.
- As plantas inoculadas com CLas por *Diaphorina citri* apresentam grande variação na concentração bacteriana.
- A construção AtSUC2/*uidA* apresenta correlação forte positiva entre a expressão gênica e a concentração de CLas. As construções AtPP2/*uidA*, CsPP2/*uidA* apresentam correlação fraca e negativa não demonstrando interdependência entre a variável expressão gênica e concentração de CLas.



## REFERÊNCIAS

- ACHOR, D.S.; EXTEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in *citrus* affected with Huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, Oxford, v. 9, p. 56-64, 2010.
- AHN, S.J.; SHIN, R.; SCHACHTMAN, D.P. Expression of *KT/KUP* Genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> Uptake. **Plant Physiology**, Berkeley, v. 134, n. 3, p. 1135-1145, 2004.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. **Plant Science**, Limerick, v. 175, p. 291-306, 2008.
- \_\_\_\_\_. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, Limerick, v. 185, p. 118-130, 2012.
- ALDRICH, J.H. "Correlations genuine and spurious in Pearson and Yule". **Statistical Science**, Olkin, v. 10, n. 4, p. 364-376, 1995.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; AZEVEDO, F.A. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 2, p. 203-211, 2003.
- AN, Y.Q.; MCDOWELL, J.M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E.C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R.B. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **Plant Journal**, Malden, v. 10, p. 107-121, 1996.
- ATTÍLIO, L.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; HAKAKAVA, R.; SILVA, T.L.; MIYATA, L.Y.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of sweet oranges with the *D4E1* gene driven by the AtPP2 promoter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 7, p. 741-747, 2013.
- AUBERT, B. Integrated activities for the control of Huanglongbing-greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. In: AUBERT, B.; TONTYAPORN, S.; BUANGSUWON, S.D. (Ed.). **Rehabilitation of citrus industry in the Asia Pacific Region**. Rome: UNDP; FAO, 1990. p. 133-144.
- AUBERT, B.; SABINE, A.; GESLIN, P.; PICARDI, L. Epidemiology of the greening disease in Reunion Island before and after the biological control of the African and Asian citrus psyllas. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Davis, v. 1, p. 440-442, 1984.
- AYRE, B.G.; BLAIR, J.E.; TURGEON, R. Functional and phylogenetic analyses of a conserved regulatory program in the phloem of minor veins. **Plant Physiology**, Berkeley, v. 133, p. 1-11, 2003.
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes *bacteriopsina (bO)*, *cecropina egus***. 2005. 76p. Tese (Doutorado Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BALLESTER, A.; CERVERA, M.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of marker gene by site-specific recombination. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 26, p. 39-45, 2007.

\_\_\_\_\_. Evaluation of selection strategies alternative to *nptII* in genetic transformation of citrus. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 27, p.1005-1015, 2008.

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

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

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; BUSATO, L.A.; STUCHI, E.S. Damages caused by Huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. In: HUANGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, RIBEIRÃO, 2006, Preto. **Proceedings...** Araraquara: Fundecitrus, 2006. p.39.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GASPAROTO, M.C.G.; BERGAMIN, A.; AMORIM, L. Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 130, p. 577-586, 2011.

BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; SPÓSITO, M.B.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J. MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 14, 2009

BEVAN, M.W.; FLAVELL, R.B.; CHILTON, M.D. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, New York, v. 304, p. 184-187, 1983.

BHATTACHARYYA-PAKRASI, M.; PENG, J.; ELMER, J.S.; LACO, G.; SHEN, P.; KANIEWSKA, M.B.; KONONOWICZ, H.; WEN, F.; HODGES, T.K.; BEACHY, R.N. Specificity of a promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression in phloem tissues. **Plant Journal**, Malden, v. 4, p. 71-79, 1993.

BONANI, J.P. **Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayma (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) OSbeck.** 2009. 82p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

- BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, G.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C., CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusiani* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* sp. citri in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.
- BOSTWICK, D.E.; DANNENHOFFER, J.M.; SKAGGS, M.I.; LISTER, R.M.; LARKINS, B.A.; THOMPSON, G.A. Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. **Plant Cell**, Oxford, v. 4, p. 1539-1548, 1992.
- 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; FUNDAG, 2005. p.19-36.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, new lyemerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.
- BOVÉ, J.; GARNIER, M. Ploem-and xylem-restried plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Amisterdam, v. 164, p. 423-438, 2002.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p.
- CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. *Diaphorinacitri*: a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, Hiderabade, v. 37, p. 572-576. 1967.
- \_\_\_\_\_. Greening disease of citrus in the Decan Trap Coutry and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNACIONAL ORGANIZACION OF CITROS VIROLOGISTS, 6., 1974, Richmond. **Proceedings...** Richmond: University of California, 1974. p. 43-49.
- CARLOS, E.F.; COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.; MACHADO, M.A. quantitative real-time PCR based on TAQMAN probes for the molecular detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. In: HUANGLONGBING-GRENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Riberão Preto. **Proceedings...** Riberão Preto: Fundecitrus, 2006.p.58.
- CATLING, H.D.; ATKINSON, P.R. Spread of greening by *Trioza erytreae* (Del Guercio) in Swaziland. In CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., 1972, Swaziland. **Proceedings...** Riverside: IOCV; University of California, 1974.p. 33-39.
- CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 1, p. 26-30, 2000.

CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PENÑ, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants by passing the juvenile stage. **Transgenic Research**, New York, v. 7, p. 51-59, 1998.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLINGER, E. (Ed.). **Citrus**. Basle: CIBA-GEIGY, 1975. p. 14-20.

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

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2014.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

COSTA, C.L. Vetores de virus de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 6, p. 103-171, 1998.

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

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

DAVIS, M.J., MONDAL, S.N., CHEN, H., ROGERS, M.E., BRLANSKY, R.H. Co-cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' with actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Disease**, Dordrecht, v. 92, p. 1547-1550, 2008.

DINANT, S.; RIPOLL, C.; PIEPER, M.; DAVID, C. Phloem specific expression driven by wheat dwarf geminivirus V-sense promoter in transgenic dicotyledonous species. **Plant Physiology**, Berkeley, v. 121, p.108-116, 2004.

DINANT, S.; CLARK, A.M.; ZHU, Y.; VILAINÉ, f.; PALAUQUI, J.C.; KUSIAK; C.; THOMPSON, G.A. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. **Plant Physiology**, Berkeley, v. 131, p. 114-128, 2003.

DIRITA, V.J.; GELVI, S.B. Deletion analysis of the *mannopine synthase* gene promoter in sunflower crown gall tumors and *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Gene Genetics**, London, v. 207, p. 233-241, 1987.

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

DOMÍNGUEZ, A.; DE MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its *p25coat* protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, n. 1/2, p. 1-10, 2002.

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

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

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

ETXEBERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.74, p.76-83, 2009.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the *p23* gene of Citrus tristeza virus are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 5, p. 435-445, 2005.

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

FAN, J.; CHEN, C.; BRLANSKY, R.H.; GMITTER, J.R.; LI, Z.G. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, p. 1037-1043, 2010.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 10 jan.2014.

FÁVERO, P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of three sweet orange cultivars from explants of adult plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poznan, v. 34, p. 471-477, 2012.

FELIPE, R.T.A. **Avaliação da resistência à *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranjas doce expressando o gene *attA* ou *hrpN***. 2011. 85p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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 Desenvopmental Biology-Plant**, Columbia, v.36, p. 450-455, 2000.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citros. In: \_\_\_\_\_. **Agrianual** 2013: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2013. p. 208-209.

FOLIMONOVA, S.Y.; ACHOR, D.S. Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology**, Saint Paul, v.100, p. 949-958, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARUALDO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, Z.; PARRA, J.R.P.; ZOCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GATINEAU, F.; LOC, H.T.; TUYEN, N.D.; TUAN, T.M.; HIEN, N.T.D.; TRUC, N.T.N. Effects of two insecticide practices on population dynamics of *Diaphorina citri* and on huanglongbing incidence in South Vietnam. In: HUANGLONGBING-GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Araraquara: Fundecitrus, 2006. p.110.

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

GONG, X.Q.; LIU, J.H. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in *Citrus* and its related genera. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 13, p. 137-147, 2013.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.

GOTTWALD, T.R.; AUBERT, B.; HUANG, K.L. Spatial pattern analysis of citrus greening in Shantou, China. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 11., 1989. Orlando. **Proceedings...** Riverside: IOC; University of California, 1991. p. 421-427.

GOTTWALD, T.R.; AUBERT, B.; XUE-YAUN, Z. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 687-693, 1989.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007. Disponível em: <<http://apsnet.org/education/lessonsplantpath/huanlongbingr>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Regulation of gene transcription. In: \_\_\_\_\_. **Modern genetic analysis**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: **W.H. Freeman** 2000. p. 306-307.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, Hoboken, v. 8, p. 339-374, 1990.
- GUO, H.; CHEN, X.; ZHANG, H.; FANG, R.; YUAN, Z.; ZHANG, Z.; TIAN, Y. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin *PP2* gene promoter. **Transgenic Research**, London, v. 13, p. 559-566, 2004.
- GUO, W.W.; GROSSER, J.W. Somatic hybrid vigor in Citrus: direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the *GFP* gene. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, p. 1541-1545, 2005.
- GUTIEÉRREZ-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 Report**, Berlin, v. 16, p. 745-753, 1997.
- HALBERT, S.E. The discovery of huanglongbing in Florida. In: INTERNATIONAL CITRUS CANKER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2., 2005, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Florida Citrus Mutual, 2005. p. H-3.
- HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of *citrus*: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomology**, Gainesville, v. 87, p. 330-353, 2004.
- HARAKAVA, R. **Citrus variegated chorois**: development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis. 2000. 70p. Thesis (Ph.D.) - University Florida, Gainesville, 2000
- HAWKER, J.S.; HATCH, M.D. Mechanism of sugar storage by mature stem tissue of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v.18, p. 444-453, 1965.
- HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAKI, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; OHSHIMA, M.; MOTOYOSHI, F. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, Ozaka, v. 40.p. 199-207, 1990.
- HUG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, HJ. Detection by PCR *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus Huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-phogen relationships. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p. 96-102, 2004.
- IMLAU, A.; TRUERNIT, E.; SAUER, N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. **Plant Cell**, Dordrecht, v. 11, p. 309-322, 1999.
- INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASKIHARA, W. Enhance proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter*

asiaticus by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**: junho de 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

IYER, V.R.; HORAK, C.E.; SCAFE, C.S.; BOSTEIN, D.; SNYDER, M.; BROWN, P.O. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. **Nature**, London, v.409, p.533-538, 2001.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloema-limited bacterium of reening disease of the proteobacteria. **International Journal of Systemic Bacteriology**, Reding, v.44, p. 379-386, 1994.

JIANG, H.; QIN, H.M.; YU, H.M.; TIAN, Y.C. Cloning and function of the phloem protein gene promoter from *Cucurbita maxima*. **Journal of Agricultural Biotechnology**, Xangai, v. 7, p. 63-68, 1999.

KAYO, T. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.98, p.5093-5098, 2001.

KIM, J.S.; SAGARAUM, U.S.; BURNS, J.K.; LI, J.L.; WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 50-57, 2009.

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

KOIZUMI, M.M.; PROMMINTARA, G.; LINWATTANA,.; KAISUWAN, T. Field evaluation of citrus cultivars for greening resistance in Thailand. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1993. p. 274-279.

LAUVERGEAT, V.; RECH, P.; JAUNEAU, A.; GUEZ, C.; COUTO-THEVENOT, P.; GRIMA-PETTENAI, J. The vascular expression pattern directed by the Eucalyptus gunniicinnamyl alcohol dehydrogenase *EgCAD2* promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. **Plant Molecular Biology**, Hoboken, v.50, p.497-509, 2002.

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

\_\_\_\_\_. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing *thepTA29-barnase* gene. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, n. 17, p. 1209-1215, 2003.

- LI, D.; SONG, S.; XIA, X.; YIN, W. Two CBL genes from *Populus euphratica* confer multiple stress tolerance in transgenic triploid white poplar. **PlantCell,TissueandOrganCulture**, Dordrecht, v. 109, p. 477-489, 2012.
- LI, W.B.; LEVY, L.; HARTUNG, J.S. Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, p.139-144, 2009.
- LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* v. Lour.). **ScientiaHorticulturae**, Amsterdam, v. 39, p. 325-333, 1989.
- LIU, M.; LI, D.; WANG, Z.; MENG, F.; LI, Y.; WU, X.; TENG, W.; HAN, Y.; LI, W. Transgenic expression of *ThIPK2* gene in soybean improves stress tolerance, oleic acid content and seed size. **Plant Cell,Tissueand OrganCulture**, Dordrecht, v.111, p. 277-289, 2012.
- LIVAK, K.J.;SCHMITTGEN,T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, Dordrecht, v. 25 p. 402–408, 2001.
- LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.;CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and *Ca.Liberibacter asiaticus* in citrus plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009.
- LYU, J.I.; MIN, S.R; LEE, J.H.; LIM, Y.H.; KIM, J.K.; BAE, C.H.; LIU, J.R. Over expression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. **Plant Cell, Tissue and OrganCulture**, Dordrecht ,v. 112, n. 2, p. 257-262, 2012.
- MACFARLAND, C.D.; HOY, M.A. Suriva of *Diaphorina citri* (Hymenoptera: Psyllidae) and its parasitoids, *Tamarixia radiate* (Hymenoptera): Eulophidae) and *Diaphorencyrtus aligarhenis* (Hymenoptera: Encyrtidae), under different relative humidities and temperature regimes. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, p. 227-233, 2001.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 34–45, 2011.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. melhoramento genético 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.
- MAFRA, V.; MARTINS, P.C.; FRANCISCO, C.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **Bio Medical Central Genomics**, Minnesota, v. 14, p. 214, 2013.

- MAFRA, V.; KUBO, S.K.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; SATUART, R.M.; BOAVA, L.P.; RODRIGUES, C.M.; MACHADO, M. Genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos One**, East Carolina, v. 7, n. 2, p. 312263, 2012.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. 929p.
- MAULT, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, Lacham, v. 90, n. 5, p. 521-541, 1997.
- MCCLEAN, A.P.D.; SCHWARZ, R.E. Greening or blotchy-mottle disease of citrus. **Phytophylactica**, Fort Pierce, v. 2, p. 177-194, 1970.
- MEDBERRY, S.L.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, N.E. The commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. **Plant Cell**, Dordrecht, v. 4, p. 185-192, 1992.
- MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 68-75, 2009.
- MIYATA, L.Y. **Promotores específicos para expressão gênica no floema na transformação genética de citros**. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- MIYATA, L.Y.; HARAKAVA, R.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MOURÃO FILHO, F.A.A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 31, n. 11, p. 2005-2013, 2012.
- MODY, M.; YANXIANG, C.; ZHENZHONG, C.; KHOON-YEN, T.; SHYONG, A.; SHIMIZU, E.; SCHULTZ, P.K.; WELSH, D.; TSIEN, J.Z. Genomewide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.98, p.8862-8867, 2001.
- MOLINARI, H.B.C.; BRSPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swinglecitrumelo (*Citrus paradise* Macf. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyls sections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, p. 379-385, 2004.
- MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.C.P.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.1-18.
- 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 Report**, Berlin, v. 11, p. 238-242, 1992.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Perspectivas da produção e utilização de transgênicos para o controle do Huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 91-100, 2010.

MURRAY, M.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p. 432-435, 1980.

NAVA, D.E.; GÓMEZ TORREZ, M.L.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Bionomics of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of applied entomology**, Berlin, v.131, n. 10. p. 709-715, 2007.

NOLTE, K.D.; KOCH, K.E. Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. **Plant Physiology**, Berkeley, v. 108, p. 899-905, 1993.

ODELL, J.T.; NAGY, F.; CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, London, v. 313, p. 810-812, 1985.

OHLER, U.; NIEMANN, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. **Trends in Genetics**, Ashford, v.17, n.2, p.56- 60, 2001.

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

PARIS, R.; COVA, V.; PAGLIARANI, G.; TARTARINI, S.; KOMJANC, M.; SANSAVINI, S. Expression profiling in *HcrVf2*-transformed apple plants in response to *Venturia inaequalis*. **Tree Genet Genome**, Pracha, v. 5, p. 81-91. 2009.

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

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 Report**, Berlin, v. 1, p. 731-737, 1997.

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 Report**, Berlin, v. 14, p. 616-619, 1995.

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOGA, C.; PEREZ, R.; ROMETRO, J.; JUAREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus In: CITRUS IS. **Transgenic crops of the world-essential protocols**. Valência, 2004. p. 145-157.

- PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; ROMERO, J.; BALLESTER, A.; SOLER, N.; PONS, E.; RODRIGUEZ, A.; PERIS, J.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Citrus. In: KOLE, C.; HALL, T.C. (Org.) **Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts**. Oxford; Wiley-Blackwell, 2008. v. 5, p.1-62.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. cap. 3, p. 39-60.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. cap. 4, p. 63-104.
- RANCE, I.; NORRE, F.; GRUBER, V.; THEISEN, M. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v.162, p.833-842, 2002.
- REGMI, C.; LAMA, T.K. Greening incidence and greening vector population dynamics in Pokhara. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1986, Valencia. **Proceedings...** Riverside: IOCV; University of California, 1987. p. 238-243.
- RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 245, p.154-160, 1997.
- ROSALES, R.; BURNS, J.K. Phytohormone changes and carbohydrate status in sweet orange fruit from huanglongbing-infected trees. **Journal of Plant Growth Regulation**, Davis, v. 30, p. 312-321, 2011.
- ROISTACHER, C.N. The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 13., 1995, Fuzhou. **Proceedings...** East Carolina: IOCV; University of California, 1996. p. 279-285.
- ROHDE, W.; BECKER, D.; RANGLES, J.W. The promoter of coconut foliar decay-associated circular single-stranded DNA directs phloem-specific reporter gene expression in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 27, p. 623- 628, 1995.
- ROSALES-MENDOZA, S.; PAZ-MALDONAD, L.M.T.; GOVEA-ALONSO, D.O.; KORBAN, S.S. Engineering production of antihypertensive peptides in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 112, n. 2, p. 159-169, 2012.
- SAUER, N.; STOLZ, J. *SUC1* and *SUC2*: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*: expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p.67-77, 1994.
- SCHMULLING, T.; SCHELL, J.; SPENA, A. Promoters of the *rol A*, *B*, and *C* genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants. **Plant Cell**, Dordrecht, v. 1, p. 665-670, 1989.

SCHNEIDER, H. Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, p. 262-266, 1968.

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

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, p. 480-486, 2009.

SHI, Y.; WANG, M.B.; POWELL, K.; VAN DAMME, S.E.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J.A. Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem-specific expression of  $\beta$ -glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 623-631, 1994.

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

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

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). **Neuroscience Letters**, Limerik, v. 339, p. 62-66, 2003.

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, p.592-599, 2008.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; AYRES, A.J. BOVÉ, J.M. A new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, is associated with Huanglongbing in São Paulo. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004, Monterrey. **Program & abstract...** Monterrey: IOCV, 2004. p.81.

TEIXEIRA, D.C.; AYRES, A.J.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANET, J.L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 107, 2005.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E., Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Maryland Heights, v.75, p. 291-295, 1999.

THOMPSON, G.A.; LARKINS, B.A. **Phloem-specific promoter**. US patent US005495007A. 1996.

TOORAWA, P. **La maladie du huanglongbing (greening) des agrumes a L'île Maurice. Detection de "Candidatus Liberobacter asiaticus" et "Candidatus Liberobacter africanus" dans les agrumes et les insectes vecteurs.**1998. 93 p.Thersis (Doctoral in Entomologie) - L'University de Bordeaux, Bourdeaux, 1998.

TRUERNIT, E.; SAUER, N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *SUC2* sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by *SUC2*. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 564-570, 1995.

VANDENBERG, M.; VANUUREN, F.; DECON, V.E. Estudios on greening disease transmission by the citrus psylla *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae). **Israel Journal of Entomology**, Bet Dagan, v. 25/26, p. 51-56, 1992.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culturale; isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 69, p. 231-236, 1974.

VICHIN NETO, R.; NASCIMENTO, F.E.; BALBINOTTE, J.; COLETTA-FILHO, H.D.; LOPES, J.R.S. Comparação da capacidade de aquisição de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em citrus por ninfas e adultos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA USP,16.,2008, São Paulo. **Resumos...**São Paulo: USP, 2008.p.16.

WANG, M.B.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J.A.A complete sequence of the rice sucrose synthase-1 (*RSsl*) gene. **Plant Molecular Biology**, Warwick, v. 19, p. 881-885, 1992.

WANG, X.; LI, Z.; YAN, F.; KHALIL, R.; REN, Z.; YANG, C.; YANG, Y.; DENG, W. *ZmSKIP*, a homologue of SKIP in maize, is involved in response to abiotic stress in tobacco. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Dordrecht, v. 112, n. 2, p. 203-216, 2013.

WANG, Y.; YING, J.; KUZMA, M.; CHALIFOUX, M.; SAMPLE, A.; McARTHUR, C.; UCHACZ, T.; SERVAS, C.; WAN, J.; DENNIS, D.T.; McCOURT, P.; HUANG, Y. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. **The Plant Journal**, Malden,v.43, p. 413-424, 2005.

WANG, Z.; ZHANG, K.;SUN, X.; TANG, K.; ZHANG, J. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *gna* into maize plants. **Journal of Bioscience**, New Delhi, v. 30, n.5, p. 627-638, 2005.

WHITE, K.P.; RIFKIN, S.A.; HURBAN, P.; HOGNESS, D.S. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. **Science**, Washington, v.286, p.2179-2184, 1999.

XIAO, K.; ZHANG, C.; HARRISON,M.; WANG. Z.Y. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 15, p. 221-231, 2005.

XU, C.F.; XIA, Y.H.; LI, K.B.; KE, C. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceeding**... Riverside: University of California, 1988. p. 243-248.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: HUANGLONGBING – GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings**... Araraquara: Fundecitrus, 2006. p. 96.

YANG, C.; DENG, W.; TANG, N.; WANG, X.; YAN, F.; LIN, D.; LI, Z. Over expression of *ZmAfB2*, the maize homologue of *AfB2* gene, enhances salt tolerance in transgenic tobacco. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Dordrecht, v. 112, n. 2, p. 171-179, 2013.

YANG, N.S.; RUSSELL, D. Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem specific expression of gus gene in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 4144-4148, 1980.

YE, X.; BUSOV, V.; ZHAO, N.; MEILAN, R.; MCDONNELL, L.M.; COLEMAN, H.D.; MANSFIELD, S.D.; CHEN, F.; LI, Y.; CHENG, Z.M. Transgenic populus trees for forest products, bioenergy, and functional genomics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Hoboken, v. 30, p. 415-434, 2011.

ZHAO, Y.; LIU, Q.Z.; DAVIS, R.E. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 4, p. 224-230, 2004.