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

**Expressão do gene *uidA* sob controle de promotores
preferencialmente expressos no floema de plantas transgênicas de
citrange ‘Carrizo’**

Yane Caroline dos Anjos Bezerra

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitotecnia

**Piracicaba
2017**

Yane Caroline dos Anjos Bezerra
Engenheira Agrônoma

Expressão do gene *uidA* sob controle de promotores preferencialmente expressos no floema de plantas transgênicas de citrange ‘Carrizo’

Orientador:

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2017

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

Bezerra, Yane Caroline dos Anjos

Expressão do gene *uidA* sob controle de promotores preferencialmente expressos no floema de plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' / Yane Caroline dos Anjos Bezerra. - - Piracicaba, 2017.

62 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Poncirus trifoliata* 2. *Citrus sinensis* 3. GUS 4. qPCR 5. Histolocalização
I. Título

Aos meus pais, Andrea Carolina dos Anjos Farias e Nax Charles Farias Bezerra e à
minha irmã, Alice Maria dos Anjos Farias

DEDICO

A toda minha família.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de força espiritual, por me conceder sabedoria e discernimento para trilhar essa caminhada.

A toda minha família, por entender a minha ausência, por todo apoio, incentivo e confiança.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela oportunidade, confiança, orientação e contribuição para a minha formação e amadurecimento profissional.

Aos laboratórios de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ/USP), Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), Biotecnologia (Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’/IAC) e ao Laboratório de Anatomia Vegetal (ESALQ/USP), por oferecerem a estrutura necessária para a realização do meu projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

À Dra. Juliana de Freitas Astúa por toda contribuição para este trabalho.

À Dra. Lísia Borges Attílio, pela ajuda nas análises de qPCR, além de todos os ensinamentos, amizade, incentivo e atenção.

Ao Dr. João Paulo Rodrigues Marques por todo suporte nas análises histológicas, escrita e troca de informações.

Aos técnicos Liliane Cristina Liborio Stipp, por toda ajuda em análises moleculares, escrita e dúvidas diárias, e Marcelo Favaretto Correa pelo auxílio nas análises de *Southern blot*.

À Luciane Aparecida Lopes Toledo, secretária do programa de Pós-graduação em Fitotecnia, por toda ajuda, prontidão, atenção e amizade.

Aos colegas de laboratório, Gabriel, Lígia, Jéssica e Meire, pela troca de conhecimento e ajuda em análises.

À minha amiga Girlaine Pereira Oliveira, que dividiu comigo momentos importantes durante essa caminhada, estando comigo desde o início e se tornando praticamente uma irmã para mim. Obrigada por todo cuidado, palavras de conforto, conselhos e risadas.

Ao meu namorado Ricardo Bordignon Medina, por estar ao meu lado nos melhores e nos piores momentos; por não medir esforços para me ajudar durante a elaboração deste trabalho; por compreender meus momentos de estresse e me ajudar a levantar a cabeça em momentos de dificuldade; por ser meu porto seguro enquanto estou longe da minha família. Obrigada por todo amor, carinho, segurança, sorrisos, compreensão e motivação.

Aos meus sogros, Herculano e Rita, por todo carinho e acolhimento, por toda ajuda e por me fazerem sentir parte da família de vocês.

Aos meus amigos e conterrâneos Ana Paula, Arthur, Lígia e Paul, por toda força que damos uns aos outros. A presença de vocês aqui por perto tornou essa trajetória mais prazerosa.

Ao meu amigo Rafael, que iniciou e finalizou sua trajetória no curso do mestrado junto comigo. Obrigada pelos momentos compartilhados, todo companheirismo e ajuda ao longo desses dois anos.

Aos amigos feitos durante a minha passagem pelo Laboratório de Anatomia Vegetal, Zélia, Alexandre, Fábila e minha também conterrânea Gabriela, por dividirem tantos momentos bons, boas conversas, troca de conhecimentos, ajuda e apoio.

Aos meus queridos professores da graduação Leila de Paula Rezende e Renan Cantalice de Souza por terem me apoiado e ajudado desde a decisão da inscrição para o curso de mestrado até os dias de hoje. Por toda a amizade, carinho e bons conselhos doados.

Aos colegas de salinha Matheus e Caio pelo companheirismo, troca de conhecimentos e apoio.

A todos os meus amigos que de longe sempre me ajudaram, incentivaram, me deram força e coragem para seguir em frente sempre.

A todos que me ajudaram e contribuíram de alguma forma para a realização e conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“A fé é o poder, a energia e a certeza da alma. Com ela podemos enfrentar com compreensão e tolerância os maiores problemas da vida”.

Prof. Walter Radamés Accorsi

SUMÁRIO

	RESUMO	8
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Aspectos gerais da citricultura	15
2.2	Principais doenças dos citros	17
2.3	Biotecnologia na cultura dos citros	19
2.4	Promotores de genes	21
2.5	Anatomia e funcionalidade do floema de citros	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Material vegetal	29
3.2	Análise de <i>Southern blot</i>	31
3.3	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	32
3.4	Análise histoquímica do padrão de expressão do gene <i>uidA</i> (GUS) em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo'	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Análise de <i>Southern blot</i>	37
4.2	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	39
4.3	Análise histoquímica do padrão de expressão do gene <i>uidA</i> (GUS) em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo'	40
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	53

RESUMO

Expressão do gene *uidA* sob controle de promotores preferencialmente expressos no floema de plantas transgênicas de citrange 'Carrizo'

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, liderando também a produção e exportação de suco concentrado congelado. Um dos fatores que ameaçam o setor é o grande número de doenças, principalmente, as bacterianas como o *Huanglongbing* (HLB). O HLB é considerado uma das mais graves doenças dos citros, que compromete seu desenvolvimento e produção, podendo levar à morte das plantas afetadas. Os agentes associados a esta doença são bactérias endógenas restritas ao floema (*Candidatus Liberibacter* spp.). No gênero *Citrus*, ainda não foram encontradas espécies resistentes ao HLB, o que tem estimulado a utilização de ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética, para auxiliar os programas de melhoramento genético, nos quais genes de interesse agrônomo são introduzidos visando resistência a doenças. Na busca por uma planta transgênica resistente ao HLB, é desejável obter construções gênicas nas quais o gene de interesse se expresse, preferencialmente, na região em que a bactéria coloniza a planta, ou seja, no caso do HLB, no floema. Este trabalho objetivou avaliar plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com gene *uidA* (β -glucuronidase), dirigido pelos promotores dos genes *CsPP2.1* (*Phloem protein 2*) e *CsVTE2* (*homogentisato fitiltransferase*) obtidos de *Citrus sinensis*. Foram analisadas as especificidades de cada promotor, e estes foram comparados com a ação do promotor constitutivo CaMV35S. Análises moleculares, como *Southern blot* e qPCR, foram realizadas a fim de verificar o número de cópias do transgene em cada planta avaliada, e quantificar a expressão relativa do gene *uidA* dirigido pelos diferentes promotores, respectivamente. Análises histológicas foram feitas para verificar a localização da expressão do gene repórter GUS (*uidA*). A expressão relativa do gene *uidA* dirigido pelos promotores específicos foi mais baixa quando comparada com o promotor constitutivo CaMV35S, uma vez que estes promotores direcionam a expressão apenas para tecidos específicos. O promotor *CsPP2.1* direcionou a expressão do gene *uidA* para o tecido floemático, mais especificamente junto às células companheiras e elementos de tubo crivado. O promotor *CsVTE2* direcionou a expressão do gene repórter preferencialmente para a periferia do parênquima cortical e para as células guarda, o que corresponde às áreas com presença de cloroplastos, além de também direcionar a expressão para o tecido floemático. Apesar de não ser específico de floema, o promotor *CsVTE2* constitui-se em uma boa alternativa para construções visando o combate a doenças vasculares por estar envolvido em importantes processos fisiológicos da planta, como o combate a estresses oxidativos e o carregamento de fotoassimilados no floema. Os resultados sugerem que *CsPP2.1* e *CsVTE2* são promotores potenciais para serem utilizados em construções gênicas visando o controle de doenças vasculares tais como o HLB.

Palavras-chave: *Poncirus trifoliata*; *Citrus sinensis*; GUS; qPCR; Histolocalização

ABSTRACT

Expression of the *uidA* gene controlled by promoters preferentially expressed in the phloem of 'Carrizo' citrange transgenic plants

Brazil is the world's largest sweet orange producer, leading also the export of frozen concentrated orange juice. However, the citrus industry is constantly threatened by diseases, particularly those caused by bacteria, such as Huanglongbing (HLB). HLB is considered one of the most harmful citrus diseases, leading the plants to their death. The associated agents of this disease are endogenous bacteria restricted to the phloem of the plants (*Candidatus Liberibacter* spp.). No resistance has been found in *Citrus* spp. that could be used in breeding programs. Therefore, biotechnological strategies, such as genetic transformation, could help such programs to introduce genes for disease resistance. It is desirable the use of gene constructs that are preferentially expressed where the bacterium colonizes the plant, i.e., the phloem in plants affected by HLB. This study aimed to evaluate transgenic plants of 'Carrizo' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *uidA* gene (β -glucuronidase), driven by the promoters of *CsPP2.1* (*Phloem protein 2*) and *CsVTE2* (*homogentisate 4-hydroxyltransferase*) genes obtained from *Citrus sinensis* plants. Each promoter specificity was analyzed and gene expression was compared with that induced by the constitutive promoter CaMV35S. Molecular analyses such as Southern blot and qPCR were performed in order to verify the number of transgenic copies in plants and to quantify relative expression of the *uidA* gene driven by different promoters, respectively. Histological analyses were done in order to identify the exact location of the GUS (*uidA*) reporter gene expression. Relative expressions of the *uidA* gene driven by specific promoters were lower than that driven by the CaMV35S constitutive promoter, since the expression was limited to specific tissues. The *CsPP2.1* promoter drove the *uidA* gene expression to the phloem tissue, specifically to the companion cells and sieve elements. On the other hand, *CsVTE2* promoter drove the reporter gene expression mainly to the periphery of the cortical parenchyma and to the guard cells, where high number of chloroplasts were present, and also drove the expression to the phloem. Although the *CsVTE2* promoter is not phloem-specific, it might be used in gene constructs aiming vascular disease control, since it is involved in physiological processes such as mitigating oxidative stress and photoassimilate phloem loading. The results suggest that *CsPP2.1* e *CsVTE2* are promising promoters to be used in gene constructs in order to control vascular diseases, such as HLB.

Keywords: *Poncirus trifoliata*; *Citrus sinensis*; GUS; qPCR; Histolocalization

1 INTRODUÇÃO

Originárias do sudeste asiático, as espécies cítricas encontraram boas condições para vegetar e produzir em território brasileiro, expandindo-se por todo o país (NEVES et al., 2010). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de citros, ocupando o primeiro lugar em produção de laranjas e exportação de suco de laranja concentrado. O estado de São Paulo é responsável por mais de 70% da produção nacional (IBGE, 2017).

Os sistemas de classificação botânica de citros existentes são bastante controversos. O mais aceito, proposto por Swingle e Reece (1967), sugere que o gênero *Citrus* reúna 16 espécies. Porém, em função de estudos filogenéticos mais recentes baseados em análises bioquímicas e moleculares, sugere-se que o gênero *Citrus* seja composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), pomelo (*C. maxima* (Burm.) Merrill) e tangerina (*C. reticulata* Blanco), sendo considerada ainda uma quarta espécie, *C. micrantha* Wester, que pode ter contribuído para as origens das principais cultivares. As espécies conhecidas atualmente seriam derivadas de hibridizações introgressivas sequenciais entre estas espécies verdadeiras (MOORE, 2001; WU et al., 2014).

A base genética, de certa forma restrita, favorece a vulnerabilidade a problemas fitossanitários. Entre as doenças que mais limitam a produção de citros no Brasil, citam-se as causadas por bactérias, como o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada por *Xylella fastidiosa*, e o Huanglongbing (HLB) ou greening, associado a bactérias de floema denominadas *Candidatus Liberibacter* spp. (BOTEON; NEVES, 2005; BOVÉ, 2006; NEVES et al., 2010).

O HLB é considerado a doença mais devastadora na cultura dos citros, afetando todas as espécies conhecidas (BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010; FOLIMONOVA; ACHOR 2010), não se conhecendo ainda fontes de resistência (FU et al., 2016). Nenhum método curativo foi encontrado até o momento, gerando grandes perdas econômicas em áreas fortemente afetadas (BOVÉ, 2006; BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010; CARDINALI et al., 2012). A compreensão da sequência de eventos que ocorrem durante a infecção com as bactérias associadas ao HLB é fundamental para o desenvolvimento de medidas eficazes para o controle da doença (FOLIMONOVA; ACHOR 2010).

Vários trabalhos de melhoramento genético têm sido conduzidos com objetivo de selecionar possíveis fontes de resistência ou tolerância ao HLB. Como em diversas culturas de expressão econômica, os citros têm, nas técnicas de melhoramento convencional, a fonte de novas seleções comerciais. Porém, este método dispõe de dificuldades devido à incompatibilidade de cruzamentos e combinações copas/porta-enxertos, longos ciclos de geração, longo período de juvenil e apomixia. Essas dificuldades impulsionam a utilização de ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética de plantas, para mitigar essas dificuldades (MACHADO et al., 2005; CERVERA et al., 2009).

Dentre os diversos métodos de transformação genética, a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* tem se mostrado um dos mais eficientes para espécies de citros (DONMEZ et al., 2013). Na maioria dos trabalhos de transformação genética de citros, os genes introduzidos estão sob o controle de promotores constitutivos, que determinam a expressão do transgene em toda a planta, o que muitas vezes é desnecessário (FLEMING et al., 2000; DOMÍNGUEZ et al., 2004; GUO et al., 2004; MOLINARI et al., 2004; BOSCARIOL et al., 2006; DUTT et al., 2012). Poucos trabalhos relatam a expressão de transgenes controlada por promotores induzidos pelo patógeno ou promotores tecido-específicos. O uso desses promotores está ligado à necessidade de se obterem construções com maior especificidade de expressão (HULL et al., 2000; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012; ZOU et al., 2014).

Assim, a caracterização e validação de promotores floema-específicos torna-se de grande valia por representar um avanço no conhecimento de mecanismos que poderão auxiliar o controle a doenças que afetam o sistema vascular em citros. Além disso, a utilização de promotores de citros ou de espécies sexualmente compatíveis pode caracterizar uma vertente para minimizar as restrições da utilização da engenharia genética na produção de alimentos e a aceitação desses produtos geneticamente modificados no mercado (SCHAART et al., 2016). Esses promotores poderão servir como novas ferramentas para futuras construções gênicas visando tolerância ao HLB, direcionando a expressão do gene de interesse especificamente para o tecido que a bactéria coloniza a planta e onde o vetor se alimenta (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o padrão e a localização da expressão do gene *uidA* dirigido pelos promotores CsPP2.1 (*Phloem*

protein 2) e CsVTE2 (*homogentisato fitiltransferase*) de citros, ligados ao gene repórter *uidA*, por meio de análises moleculares e histológicas, comparando-os ao padrão de expressão do promotor constitutivo CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da citricultura

As espécies de citros pertencem à família botânica Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae. Dentre os gêneros pertencentes a esta família, *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* apresentam interesse comercial, sendo o gênero *Citrus* o de maior importância econômica. Entre outras espécies, o gênero *Citrus* engloba as laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas comuns (*C. reticulata* Blanco), limas ácidas (*C. aurantifolia* Swing.), limas doces (*C. limettoides* Tan.), limões (*C. limon* Burm F.), cidras (*C. medica* L.), pomelos (*C. paradisi* Macf.) e toranjas (*C. maxima* (Burm.) Merrill), além das espécies utilizadas como porta-enxertos, tangerinas ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex. Tanaka) e ‘Cléopatra’ (*C. reshini* hort. ex. Tanaka), laranjas azedas (*C. aurantium* L.) e limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) (CHAPOT, 1975; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Além destas, entre copas e porta-enxertos, existem ainda híbridos comerciais interespecíficos como tangelos (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) e tangores (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck), além de intergenéricos como citranges (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck), citrandarins (*C. sunki* hort. ex. Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e citrumelos (*C. paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (SWINGLE; REECE, 1967).

A classificação botânica das espécies de citros é bastante controversa. No geral, duas são as classificações de maior aceitação. A proposta por Swingle e Reece (1967) sugere que o gênero *Citrus* seja composto por 16 espécies, já a classificação de Tanaka (1977), indica ser este mesmo germoplasma subdividido em 162 espécies. Barrett e Rhodes (1976), através de análises filogenéticas baseadas em estudos bioquímicos e moleculares, sugeriram que o gênero *Citrus* seria composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*C. medica* L.), tangerina (*C. reticulata* Blanco) e toranja (*C. maxima* (Burm.) Merrill). Estudos filogenéticos mais recentes corroboram esses dados e sugerem que o gênero *Citrus* seja composto pelas espécies cidra, toranja e tangerina, sendo considerada ainda uma quarta espécie, *C. micrantha* Wester, que pode ter contribuído para a origem dos principais genótipos (WU et al., 2014).

O centro de origem do gênero *Citrus* está atribuído ao sudeste do continente asiático, com algumas espécies nativas de áreas que se estendem desde o centro da China ao Japão e do leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967). A introdução da cultura dos citros no Brasil ocorreu no início do século XVI, através das expedições colonizadoras. As plantas introduzidas logo se adaptaram às condições climáticas brasileiras, apresentando bom desenvolvimento e reprodução, facilitando a dispersão da cultura por todo o território nacional (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; NEVES et al., 2010). Atualmente, as culturas de citros estão distribuídas entre os paralelos 44° N e 41° S, onde encontram boas condições edafoclimáticas para o seu desenvolvimento. As principais regiões produtoras estão concentradas entre as latitudes 20° N e 20° S, em regiões subtropicais (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A comercialização das frutas cítricas tem grande expressão econômica no mundo. Em 2014, foram produzidas mais de 82 milhões de toneladas, sendo as laranjas, responsáveis por mais de 70 milhões. Brasil, China, Índia, Estados Unidos e México são os maiores produtores de laranja do mundo, sendo responsáveis por mais de 60% desta produção. No Brasil, são cultivados cerca de 680 mil hectares, produzindo mais de 16 milhões toneladas de laranja por ano (FAO, 2017).

O destino da produção brasileira de laranja é, majoritariamente, a indústria de sucos. O Brasil é responsável por 52% da produção mundial de suco de laranja, sendo que 98% do que é produzido no país é exportado (NEVES et al., 2012). Considerando o suco concentrado e integral, o Brasil exportou 2,5 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2017). Os principais destinos são a Europa, os Estados Unidos, Japão e China (CITRUSBR, 2017). A região sudeste do Brasil se destaca como a maior produtora de laranja do país. O estado de São Paulo, maior produtor nacional, detém 73% da produção, equivalente a 12,2 milhões de toneladas, em uma área plantada de 412 mil hectares, seguido do estado de Minas Gerais, com cerca de 6% da produção nacional (IBGE, 2017).

A produção de laranja doce no Brasil é predominantemente constituída pelas cultivares de maturação tardia 'Valência' e 'Natal', representando 55% das árvores plantadas, cultivares precoces como 'Hamlin' e outras, representando cerca de 23%, e 22% correspondendo a cultivares de meia estação, tais como a laranja 'Pera Rio'. Esse número restrito de cultivares torna a cultura vulnerável a problemas fitossanitários. Apesar da enorme importância econômica da citricultura para o

Brasil, nas décadas mais recentes, verificou-se uma queda na produção e na área plantada com laranja. Além dos diversos problemas fitossanitários enfrentados pelos produtores, há uma carência de políticas de incentivo à produção e de regulamentações que definam o valor da caixa paga ao produtor (NEVES et al., 2010).

2.2 Principais doenças dos citros

O histórico do cultivo de citros no Brasil é marcado por acontecimentos que levaram à oscilação da produção desde seu início até os dias atuais. Por volta de 1910, o surgimento da gomose, doença causada por oomicetos, principalmente *Phytophthora nicotianae* e *P. citrophthora*, afetou os pomares brasileiros, inviabilizando o uso da laranja 'Caipira' (*C. sinensis* (L.) Osbeck) como porta-enxerto, a qual foi então substituída pela laranja Azeda (*C. aurantium* L.). Na década de 30, praticamente todos os pomares comerciais de laranja eram enxertados sobre laranja Azeda, que é extremamente intolerante ao vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV). A introdução desse vírus nas lavouras brasileiras aniquilou a citricultura da época, que se ergueu somente após a substituição da laranja Azeda pelo limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), como porta enxerto tolerante ao CTV (FEICHTENBERGER et al., 2005; MATTOS JUNIOR et al., 2005).

Posteriormente, foram detectadas duas outras doenças nos pomares brasileiros, o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em 1957, e a Clorose Variegada dos Citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, na década de 80. Em 2001, a Morte Súbita dos Citros, de causa desconhecida, foi detectada atacando principalmente laranjeiras doces, tangerineiras 'Cravo' e 'Ponkan' enxertadas em porta-enxertos de limoeiros 'Cravo', 'Volkameriano' (*C. volkameriana* Ten. & Pasq.) e 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

Em 2004, foi feito o primeiro registro de sintomas de *Huanglongbing* (HLB) no Brasil, uma das doenças mais devastadoras da cultura em todo o mundo. Este fato ocorreu no estado de São Paulo, no município de Araraquara, considerada a maior região produtora da época. O HLB ou greening é uma doença associada a bactérias específicas de floema, denominadas *Candidatus Liberibacter* spp., e é conhecida

desde 1919 na China (COLETTA-FILHO et al., 2004; BOTEON; NEVES, 2005; NEVES et al., 2010).

Três espécies de bactérias associadas ao HLB foram identificadas e classificadas de acordo com o continente onde foram encontradas pela primeira vez: '*Candidatus Liberibacter africanus*' (CLaf), '*C. L. asiaticus*' (CLas), e '*C. L. americanus*' (CLam). Estas bactérias, pertencentes à ordem Rhizobiales, são capazes de colonizar o interior dos vasos de floema causando distúrbios no metabolismo das plantas infectadas. CLam e CLas são encontradas no Brasil, sendo transmitidas através da propagação por borbulhas infectadas ou pelo psílídeo *Diaphorina citri* (BOVÉ, 2006; MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2010). CLam, que inicialmente era prevalente no campo, praticamente não é mais encontrada nos pomares, tendo sido substituída por CLas, que é a principal espécie causadora do HLB em todo o mundo (LOPES et al., 2009; ISLAM et al., 2012).

Em *Citrus* e gêneros afins ainda não foram encontradas espécies resistentes ao HLB. Trabalhos realizados por Folimonova et al. (2009) permitiram, entretanto, agrupar genótipos e híbridos de citros em diferentes classes de acordo com o grau de suscetibilidade ou sensibilidade às bactérias associadas a esta doença em sensíveis (sintomas severos, levando à morte da planta), moderadamente tolerantes (alguns sintomas, sem levar à morte da planta), tolerantes (poucos sintomas), ou genótipos com reação variável. A partir dos métodos utilizados para quantificar a severidade da doença sobre os genótipos, Folimonova et al. (2009) e Boscariol-Camargo et al. (2010) verificaram haver diferença na expressão dos sintomas entre as plantas, indicando-se *Poncirus trifoliata* como o genótipo mais resistente e/ou tolerante ao HLB.

O HLB é uma doença cujo principal sintoma é a obstrução do fluxo de translocação de seiva elaborada. Isto ocorre devido a mecanismos de defesa da planta que envolvem a ação de proteínas estruturais do floema, denominadas proteínas P, e a indução de calose nos elementos de tubo crivado (ETC), que impede o transporte de fotoassimilados até o sistema radicular e leva ao colapso destes tubos. Apesar disso, as árvores infectadas permanecem viáveis e produzindo frutos por algum tempo após a infecção, sugerindo que a obstrução dos vasos do floema não se dá por completo, ou ainda, que existem vias alternativas para o transporte de fotoassimilados. Esses fatores parecem ser relevantes para o

estabelecimento da doença (FOLIMONOVA; ACHOR 2010; ETXEBERRIA; NARCISO, 2012).

Analisando-se as modificações de atividade do hospedeiro durante a resposta de obstrução do fluxo de fotoassimilados, podem-se obter informações importantes sobre os mecanismos da interação patógeno-hospedeiro que podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias de proteção de plantas (ALBRECHT e BOWMAN, 2012; MAFRA et al., 2013; DALIO et al., 2017). Paralelamente ao modo de ação das bactérias na planta, esse conhecimento pode auxiliar as bases de pesquisa para o desenvolvimento de cultivares resistentes à doença com o uso de técnicas de biologia molecular para superar dificuldades do melhoramento convencional (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; CERVERA et al., 2009; DUTT et al., 2015).

2.3 Biotecnologia na cultura dos citros

Diante das dificuldades encontradas no melhoramento convencional dos citros, o uso de ferramentas biotecnológicas tem acarretado em considerável avanço na obtenção e seleção de genótipos promissores. Diversas técnicas, tais como a cultura de tecidos, fusão de protoplastos, genética molecular e a transformação genética de plantas, podem ser utilizadas em programas de melhoramento de citros possibilitando o aproveitamento tanto da variabilidade genética já disponível como a variabilidade de germoplasmas ainda não explorados, produzindo diferentes combinações que podem resultar em novas cultivares (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; MACHADO; CRISTOFANI-YALY; BASTIANEL, 2011; MIYATA et al., 2011).

A transformação genética tem se destacado como uma boa alternativa por possibilitar a obtenção de plantas modificadas a partir da introdução de genes de interesse agrônômico em seus genomas. Na transgenia, os genes envolvidos podem ser oriundos de organismos filogeneticamente semelhantes ou distantes do hospedeiro, independentemente das barreiras reprodutivas naturais existentes entre as espécies, sem alterar as características das cultivares (ANAMI et al., 2013). Com isso, caracteres desejados podem ser incorporados ou mantidos, enquanto caracteres indesejáveis podem ser suprimidos ou minimizados nos novos genótipos

(GANDER; MARCELINO; ZUMSTEIN, 1996; PEÑA et al., 2008; MACHADO; CRISTOFANI-YALY; BASTIANEL, 2011).

Em citros, os trabalhos de transformação genética são majoritariamente realizados buscando-se inserir ou aumentar a resistência das plantas a patógenos. Desse modo, podem ser utilizados genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese, que estimulem o sistema de defesa das plantas e confiram maior resistência, genes de avirulência derivados do próprio patógeno, ou genes que codificam peptídeos antimicrobianos (BOSCARIOL et al., 2006; BARBOSA-MENDES, et al., 2009).

Vários métodos de transformação genética são conhecidos, tais como a eletroporação de protoplastos (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989), transformação via *Agrobacterium tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990) e bombardeamento de partículas (YAO et al., 1996). Entre eles, a transformação via *A. tumefaciens* tem se mostrado muito eficiente pelo fato dessas bactérias transferirem naturalmente parte do seu genoma às células vegetais infectadas que, após regeneração por meio de cultura de calos darão origem às plantas transgênicas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; MOLINARI et al., 2004).

A dinâmica de ação da bactéria envolve um plasmídeo que contém um T-DNA de interesse, que é transferido para a planta durante a infecção. O T-DNA é composto por genes que são reunidos em um cassete de expressão, contendo basicamente um promotor, que será responsável por regular a expressão gênica, uma sequência codificadora correspondente ao gene de interesse, que codifica a proteína de interesse, e um terminador, que sinaliza o final da transcrição. Os T-DNAs são manipulados em *Escherichia coli* num vetor binário. O vetor é então introduzido numa estirpe de *A. tumefaciens* contendo um plasmídeo Ti (indutor de tumor), que contém as funções de virulência necessárias para a bactéria infectar a planta (ANAMI et al., 2013).

Juntamente com os processos de transformação genética, ao longo do tempo também foram desenvolvidos métodos para selecionar previamente as células transformadas, inserindo nos cassetes de expressão os chamados genes de seleção, como por exemplo, o gene *nptII* (neomicina fosfatase II) que confere resistência ao antibiótico canamicina, sendo o mais utilizado nas construções gênicas (PEÑA et al., 2004; BALLESTER; CERVERA; PEÑA, 2007). Além dos genes de seleção, genes repórteres que codificam proteínas de atividade enzimática

de produto facilmente detectável também podem ser inseridos no cassete, facilitando a identificação e a confirmação da transgenia (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

O gene repórter mais utilizado é o gene *uidA* (β -glucuronidase - GUS), que produz um precipitado insolúvel de coloração azul facilmente detectável por análise histoquímica com solução X-GLUC (5-bromo-4cloro-3-indolil-glucuronida). Este método tem, entretanto, a desvantagem de ser destrutivo (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; CERVERA, 2004). Alternativamente, outros genes repórteres são utilizados, como o gene GFP (Green Fluorescence Protein), derivado de *Aequorea victoria* que é visualizado facilmente em tecidos vivos por microscopia de luz fluorescente (GHORBEL et al., 1999).

Apesar das várias técnicas e processos desenvolvidos para obtenção e seleção de plantas transgênicas, o fato do gene de interesse ser introduzido na planta não garante a viabilidade e a obtenção de transgênicos potenciais. A produção eficiente de uma proteína heteróloga depende da obtenção de altos níveis transcrição do gene introduzido. Para isso, torna-se necessária a utilização de promotores que direcionem uma forte expressão (RANCE et al., 2002).

2.4 Promotores de genes

A expressão dos genes é regulada quantitativa e qualitativamente por sequências específicas de DNA conhecidas como promotores de genes. Essas sequências se encontram *upstream*, ou seja, a montante de uma sequência de DNA, e são responsáveis por regular o momento e a intensidade de transcrição de um gene. Os promotores são importantes para o processo de iniciação da transcrição, pois contêm sítios de ligação para os complexos proteicos da RNA polimerase, interagindo assim com complexos enzimáticos básicos de iniciação e com diversos fatores de transcrição (DUTT et al., 2014).

Os promotores de genes podem ser classificados de acordo com o tipo de regulação da expressão, sendo eles: 1) constitutivos, que conferem expressão na maioria das células, órgãos e/ou tecidos e em todas as fases de desenvolvimento da planta; 2) induzíveis, que conferem expressão em determinado estágio de desenvolvimento, órgão ou tecido, sendo induzidos por fatores bióticos, abióticos ou agentes químicos e físicos externos; e 3) tecido-específicos, que conferem

expressão direcionada a um determinado órgão ou tecido (POTENZA et al., 2004; DUTT et al., 2014).

Diversas são as fontes para obtenção de promotores de genes, tais como vírus, bactérias e plantas de diferentes gêneros. Como exemplos, citam-se o promotor CaMV35S, obtido do vírus do mosaico da couve flor (ODELL et al., 1985) e o FMV35S, obtido do vírus do mosaico da escrofulária (MAITI et al., 1997); manopina-sintetase (Mas) (DIRITA; GELVIN, 1987) e nopalina-sintetase (NOS) (BEVAN; FLAVELL; CHILTON, 1983) obtidos de *Agrobacterium tumefaciens*; e Actina 2 (ACT2) (AN et al., 1996) e *Medicago truncatula* (MtHP) (XIAO et al., 2005), obtidos de *Arabidopsis thaliana*.

Na maioria dos trabalhos de transformação genética de citros, os genes introduzidos estão sob o controle de promotores constitutivos, sendo utilizado, principalmente, o promotor CaMV35S. Porém, a expressão constitutiva de transgenes, por não apresentar especificidade, pode interferir em processos fisiológicos da planta. Essas informações evidenciam a necessidade de estudos que identifiquem e validem promotores mais específicos (POTENZA et al., 2004). O uso de promotores tecido-específicos está ligado à necessidade de obtenção de construções com maior especificidade, porém, poucos trabalhos relatam a expressão de transgenes controlada por promotores induzidos por patógenos ou com expressão específica (HULL et al., 2000; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012; ZOU et al., 2014).

Transformações genéticas utilizando promotores tecido-específicos já têm sido exploradas visando o direcionamento da expressão de transgenes a tecidos de interesse (ALBRECHT; BOWMAN, 2012). Além da maior eficiência quando se trata de promotores tecido-específicos, existem restrições ambientais e de biossegurança relacionadas à expressão constitutiva de genes heterólogos. O uso de promotores específicos pode amenizar esses problemas ao limitar a ação do transgene a locais de interesse e apenas nas condições necessárias (POTENZA et al., 2004; DUTT et al., 2014).

Alguns trabalhos para caracterização de promotores específicos vêm sendo realizados. O uso do promotor *GlutathioneS-transferase-1* (Gst1), que dirige a ação do transgene ao local de infecção com patógenos, associado ao gene *hrpN*, foi estudado para obtenção de plantas transgênicas de *Citrus sinensis* visando resistência ao cancro cítrico (BARBOSA-MENDES et al., 2009). Outro exemplo é o

caso do promotor *Arabidopsis thaliana* sucrose transporter-2 (AtSUC2), que direciona a expressão para o floema. Esse promotor foi associado a diferentes genes para obtenção de plantas de citros tolerantes ao HLB (DUTT et al., 2015; TAVANO et al., 2015).

A utilização de promotores preferencialmente expressos no floema visa à expressão do gene de interesse no local da infecção e possibilita um provável controle de doenças vasculares. A presença do produto da expressão do transgene no sistema vascular poderia dar uma resposta rápida em casos de ferimentos, devido à superexpressão direcionada do gene no local da infecção, podendo ser importante para o controle de doenças transmitidas por afídeos e outros insetos sugadores de seiva (DUTT et al., 2014).

Diversos trabalhos descreveram sequências de promotores floema-específicos buscando estratégias para a solução de problemas fitossanitários e adversidades climáticas em diferentes culturas (YANG; RUSSELL, 1980; WANG; BOULTER; GATEHOUSE, 1992; TRUERNIT; SAUER, 1995; IMLAU; TRUERNIT; SAUER, 1999; ZHAO; LIU; DAVIS, 2004; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012; DUTT et al., 2014). Em citros, promotores específicos de floema poderiam ser utilizados em construções utilizando diferentes estratégias a fim de combater as bactérias associadas ao HLB (ATTÍLIO et al., 2013; BENYON et al., 2013).

2.5 Anatomia e funcionalidade do floema de citros

O floema é o tecido vascular das plantas onde se realiza o transporte de substâncias a longas distâncias, principalmente fotoassimilados, mas também água, macro e micronutrientes, aminoácidos, lipídeos, hormônios, proteínas e RNAs. Sendo assim, o floema representa uma importante via para transmissão de sinais entre tecidos e órgãos fontes e drenos (VAN BEL, 2003; BENETEAU et al., 2010; MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2012; EVERT, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Trata-se de um tecido complexo de composição celular diversificada, sendo composto, basicamente, por elementos de tubo crivado (ETCs) e suas respectivas células companheiras (CCs), contendo ainda células parenquimáticas, fibras e esclereídes, que conferem proteção e sustentação (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2012; EVERT, 2013). O transporte de fotoassimilados no floema se dá por meio do complexo elemento de tubo crivado/célula companheira, que juntos

formam a unidade funcional dos tubos crivados das angiospermas. O sucesso desse sistema reside na interação entre esses dois tipos celulares (VAN BEL, 2003).

Os ETCs são células que, inicialmente, possuem todos os componentes de uma célula vegetal. À medida que se diferenciam, passam por complexas mudanças estruturais e fisiológicas tais como perda do núcleo e do tonoplasto (membrana do vacúolo) e formação de poros nas paredes, dando origem às áreas crivadas que conectam um elemento crivado a outro. As paredes terminais dos ETCs são denominadas placas crivadas. Nestas, os poros são maiores do que em outras áreas crivadas, facilitando a passagem de substâncias, dando origem a uma grande rede de células interligadas longitudinalmente, formando os tubos do floema. Quando maduros, os ETCs perdem o núcleo e outras organelas, mantendo apenas a membrana plasmática, retículo endoplasmático, plastídeos e mitocôndrias, que se encontram junto às paredes, deixando um espaço livre para a passagem de seiva de uma célula para outra. Já as células companheiras mantêm o núcleo quando maduras (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2012; EVERT, 2013).

Tendo em vista a importância no transporte de substâncias e na sinalização, danos ao tecido floemático causam sérios prejuízos às plantas. Existe um elaborado mecanismo de defesa das plantas para conter os danos aos elementos de tubo crivado do floema. O mecanismo de vedação mais imediato envolve proteínas estruturais de floema denominadas proteínas-P (*Phloem-protein*, *P-protein*, do inglês). Já o mecanismo a longo prazo envolve um polissacarídeo (β -1,3 glucano), denominado calose (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

Em caso de injúrias nos ETCs, a diminuição da alta pressão hidrostática mantida no interior dos tubos provoca o deslocamento do fluxo do conteúdo floemático em direção ao ferimento, o que levaria a grandes perdas caso não houvesse uma contenção. Quando injuriados, os ETCs apresentam acúmulo de proteínas P e outras inclusões celulares no local do ferimento, ocasionando a vedação dos mesmos. Dessa forma, as proteínas P têm função fundamental no mecanismo de defesa das plantas contra perda de seiva em caso de ferimentos ou injúrias, porém, outras funções na defesa contra patógenos e pragas também são atribuídas a elas. Sugere-se que esta proteína possua função na defesa da planta por meio de sua ligação às paredes celulares ácidas de microrganismos, imobilizando-os quimicamente e impedindo a multiplicação e dispersão destes (READ; NORTHCOTE, 1983; VAN BEL, 2003).

Encontradas no citoplasma periférico de ETCs maduros, as proteínas P funcionam como uma espécie de endoesqueleto, mantendo o citoplasma dessas células especializadas em posição parietal, ou seja, junto às paredes (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2012). No início da diferenciação do complexo elemento de tubo crivado/célula companheira, as proteínas se apresentam como corpúsculos discretos com formato esferoidal, fusiforme ou espiral, podendo haver apenas um ou mais corpúsculos por célula. O aparecimento dos primeiros corpúsculos se dá logo após a divisão do precursor do elemento de tubo crivado. Os corpúsculos então se desenvolvem e começam a se unir, formando entremeados que se ligam às paredes das células. Corpúsculos de proteína P são encontrados também no lúmen da célula e nos poros das placas crivadas (EVERT, 2013).

A produção dessas proteínas está atribuída às células companheiras dos complexos elemento de tubo crivado/célula companheira, onde são sintetizadas e, posteriormente, transportadas para os ETCs através de plasmodesmos. Nos ETCs em diferenciação são encontradas proteínas P polimerizadas, que vão atuar na formação da estrutura dessas células (VAN BEL, 2003).

A nível microscópico, as proteínas P apresentam forma tubular, com subunidades filamentosas. Esses filamentos tendem a se unir conforme há o desenvolvimento do ETC, sendo arranjados em espiral. Em geral, a organização estrutural dos filamentos de proteína P estão associados a dois tipos de proteínas muito abundantes na seiva de angiospermas, a proteína floemática 1 (PP1) e a proteína floemática 2 (PP2) (CLARK et al., 1997; EVERT, 2013). A PP1 é um filamento proteico de 96kDa e sua função foi atribuída a selar os poros de elementos de tubo crivado que sofreram injúrias, constituindo a primeira forma de defesa contra a perda exacerbada de fotoassimilados. Já a PP2 é uma lecitina dimérica de 25kDa que se encontra na corrente de assimilados e pode não estar relacionada exclusivamente às funções da PP1 ou às funções vasculares específicas, podendo interagir com bactérias e fungos, imobilizando-os junto as paredes dos elementos de tubo maduros (EVERT, 2013).

Genes da superfamília PP2 já foram identificados em 17 gêneros de angiospermas e gimnospermas (DINANT et al., 2003). Em citros, foi identificada, através de imunoenaios com anticorpos específicos para a detecção de proteínas PP2, a presença dessas proteínas obstruindo poros de ETCs em folhas de plantas

de laranja doce e pomelo infectadas com '*C. L. asiaticus*', demonstrando a importância dessa proteína na defesa da planta (ACHOR et al., 2010).

Albrecht e Bowman (2012) e Mafra et al. (2013), em trabalhos semelhantes utilizando análises transcricionais, identificaram genes PP2 sendo superexpressos em plantas de citros desafiadas com '*C. L. americanus*' e '*C. L. asiaticus*', respectivamente. Identificaram, também, outros genes envolvidos com a funcionalidade do floema com o intuito de selecionar genes associados à tolerância ao HLB e que pudessem ser utilizados em engenharia genética como forma de controle para essa doença. No trabalho de Mafra et al. (2013), entre os transcritos induzidos pela presença da bactéria, cita-se também um homogentisato fitiltransferase (VTE2), codificador de uma enzima envolvida na biossíntese do tocoferol.

Os tocoferóis são antioxidantes lipossolúveis fundamentais para a proteção do aparato fotossintético das plantas a danos oxidativos, agindo na proteção das membranas de cloroplastos contra espécies reativas de oxigênio. Além da sua importante função antioxidante, estudos demonstraram que essas substâncias possuem um importante papel na adaptação de plantas a baixas temperaturas e no carregamento de substâncias no floema (MAEDA et al., 2006; MAEDA et al., 2014).

Informações sobre a atuação dessas proteínas relacionadas ao tecido floemático podem gerar novas possibilidades para a engenharia genética. O conhecimento do local da expressão dessas proteínas através do uso de seus promotores ligados a genes repórteres disponibilizará resultados sobre a especificidade e força de expressão dos mesmos. Tais promotores poderão ser, eventualmente, utilizados em construções gênicas direcionadas ao combate de doenças vasculares, tais como o HLB (BOSCARIOL et al., 2006; ALBRECHT; BOWMAN, 2012).

Neste contexto, análises histoquímicas podem auxiliar na validação de trabalhos de transformação genética de plantas, pois permitem demonstrar a localização da expressão de genes repórteres dirigidos por diferentes promotores em células e tecidos de plantas transformadas (JEFFERSON, 1987). Atualmente, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando-se genes repórteres e microscopia para complementar e enriquecer as informações obtidas através de análises moleculares (DUTT et al., 2012; BENYON et al., 2013; LU et al., 2016).

Logo, a utilização de análises histoquímicas para detecção da atividade de genes repórteres auxiliam na confirmação e seleção de plantas transformadas geneticamente, além de indicar a localização da expressão do transgene direcionada por um promotor. Isso se torna útil para a validação de promotores de genes de interesse agrônômico, com o intuito de obterem-se construções gênicas mais eficientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com o gene *uidA* (β -glucuronidase), dirigido por diferentes promotores. As plantas foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA105, contendo o vetor binário pCAMBIA2301 ou pCAMBIA2201. Estas foram alocadas em casa de vegetação localizada no Centro Avançado de Pesquisa e Tecnologia do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, em Cordeirópolis, SP. As plantas foram mantidas em sacos plásticos com capacidade para 4,8 litros de substrato e fertirrigadas.

Foram avaliadas 31 plantas, com idades entre cinco e seis anos, sendo que cada planta contém o gene *uidA* dirigido por um dos promotores avaliados (Figura 1). As plantas foram obtidas em trabalhos anteriores coordenados pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, compreendendo as construções AtSUC2::*uidA* (1 planta), AtPP2::*uidA* (2 plantas) e CsPP2::*uidA* (1 planta), e pela Dra. Juliana de Freitas Astúa, compreendendo as construções CsPP2.1::*uidA* (16 plantas), CsVTE2::*uidA* (8 plantas), CaMV35S::*uidA* (3 plantas).

A confirmação da transgenia foi feita por meio de ensaios histoquímicos para a detecção da atividade da glucuronidase (GUS) (Figura 2). A reação baseia-se na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucuronida (X-GLUC) pela glucuronidase, enzima codificada pelo gene *uidA*. O resultado dessa reação consiste em um precipitado insolúvel de coloração azul (BRASILEIRO; CARNEIRO 1998).

Para isso, secções de pecíolos de folhas maduras foram acondicionados em microtubos contendo X-GLUC. A solução de X-GLUC foi preparada dissolvendo-se o substrato em DMSO e diluindo-se em solução tampão (100 mM Tris-HCL, pH 7,0; 50 mM Cloreto de sódio; 0,5 mM Ferricianeto de potássio, pH 7,0; 0,5 mM Ferrocianeto de potássio, pH 7,0; 0,01% Triton X-100). A reação ocorreu em ausência de luz, a 37 °C, por duas horas. Após este período, as amostras foram lavadas com álcool etílico (70%) para parar a reação e também para a retirada da clorofila. As plantas avaliadas neste trabalho foram selecionadas a partir deste ensaio.

Figura 1 - Representação esquemática da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas, contendo o gene *uidA*, dirigido por diferentes promotores e utilizadas na obtenção dos diferentes eventos de transformação genética avaliados. A: Vetor binário pCAMBIA2301/CsPP2.1::*uidA*; B: Vetor binário pCAMBIA2301/CsVTE2::*uidA*; C: Vetor binário pCAMBIA2301/CaMV35S::*uidA*; D: Vetor binário pCAMBIA2201/AtSUC2::*uidA*; E: Vetor binário pCAMBIA2201/AtPP2::*uidA*; F: Vetor binário pCAMBIA2201/CsPP2::*uidA*. *nptII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina; 2xCaMV35S: promotor CaMV35S duplicado; 35S-T: terminador; NOS-T: terminador nopalina sintase; LB: borda esquerda; RB: borda direita

Figura 2 – Ensaio histoquímico da atividade da glucuronidase (GUS) para confirmação de plantas transgênicas. A; C: Pecíolos de planta não transgênica utilizada como controle negativo. B; D: Pecíolos de planta transgênica contendo o promotor CsPP2 apresentando reação positiva para GUS

3.2 Análise de *Southern blot*

Para esta análise, foram macerados sob nitrogênio líquido 1,4 g de folhas recém expandidas de todas as plantas avaliadas e o DNA foi extraído utilizando-se o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). As amostras de DNA foram quantificadas por fluorimetria utilizando-se o aparelho “Qubit™” Fluorometer (Invitrogen) e o reagente “QuantiT™ dsDNA BR assay kit”, conforme orientações do fabricante.

Para iniciar a análise de *Southern blot*, foi utilizada uma alíquota de 10 a 30 µg de DNA de cada planta avaliada, submetida à reação de digestão utilizando-se 5 unidades da enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) por micrograma de DNA. A enzima de restrição foi escolhida por cortar apenas uma vez a região do T-DNA, fora do gene *uidA*. A reação ocorreu a 37 °C, por 16 horas. Posteriormente, o DNA digerido foi precipitado utilizando-se acetato de amônio (7,8 M) e álcool absoluto, ressuspendido em água, submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, e corado com brometo de etídeo (0,03 µg.mL⁻¹). A etapa de eletroforese foi realizada a 35 V por 16 horas, para separação dos fragmentos de DNA. Em seguida, foram realizadas as lavagens do gel. Após as lavagens, transferiu-se o DNA do gel para membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences Little Chalfont, Alemanha), por capilaridade, durante 16 horas.

Após a transferência, os fragmentos foram fixados a 80 °C, por duas horas. A membrana foi hibridizada por 16 horas a 60 °C com 150 ng de sonda marcada para a detecção do gene *uidA*. Essa sonda foi preparada por PCR pela amplificação de um fragmento de 412 pb do gene *uidA*, a partir do plasmídeo pCAMBIA2201 de *E. coli* (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit - Promega) utilizando-se os *primers*: F:5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3' e R:5'-TGGATCCCGGCATAGTTAAA-3'. O produto da PCR foi purificado com o kit “QIAEX II Gel Extration” (QIAGEN GmbH, Alemanha). A marcação da sonda foi realizada com o kit ‘AlkPhos Direct Labelling Reagents’ (Amersham Biosciences, Reino Unido).

Posteriormente à hibridização da membrana, prosseguiu-se com as lavagens para a retirada do excesso de solução de hibridização e secagem da mesma. A reação de detecção foi realizada com o kit ‘CDP Star™ Detection Reagent’ (Amersham Biosciences, Reino Unido), conforme as orientações do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi envolvida em plástico

transparente e colocada em cassete fotográfico (Amersham Life Science, Estados Unidos) em contato com uma chapa fotográfica por, pelo menos, 1 hora. A revelação da chapa fotográfica foi realizada em solução reveladora (Kodak) por 5 minutos. Após lavagem em água, o filme foi submerso em solução fixadora (Kodak), enxaguado novamente em água e colocado para secar em temperatura ambiente. Todas as etapas foram realizadas de acordo com o protocolo de Southern (1975).

3.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a realização da qPCR, realizou-se a extração do RNA total a partir de folhas recém-expandidas das plantas avaliadas. O RNA total foi extraído pelo método de cloreto de lítio, de acordo com o protocolo adaptado de Chang (1993). Para isto, as folhas foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e colocadas em microtubos de 2 mL ($\frac{1}{4}$ da folha) com uma esfera de metal e trituradas em Tissue lyser (QIAGEN) em racks pré-resfriadas. Depois de triturado, foi adicionado ao material vegetal 1 mL de tampão de extração CTAB pré-aquecido a 65 °C, preparado com H₂O DEPC 0,01% autoclavada. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 65°C por 10 minutos. Com as amostras em gelo, após a incubação, foi adicionado 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Prosseguiu-se com uma centrifugação a 8000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. A fase superior foi coletada e transferida para novo tubo, agora de 1,5 mL. Nesta etapa, foi novamente adicionado clorofórmio:álcool isoamílico (meio volume do total coletado) e as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo de 1,5 mL, repetindo-se a última operação para precipitação de qualquer material indesejado que tenha sido misturada à solução. Coletou-se o sobrenadante, que foi transferido para novo tubo e centrifugado a 13000 rpm, por 30 minutos, a 4°C. Ao final, foram coletados aproximadamente 550µL de sobrenadante e transferidos para novo tubo de 1,5 mL, com cuidado para não coletar o material depositado no fundo do tubo. Adicionou-se então cloreto de lítio 10 M, 0,25x do volume total, incubando-se a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 75%, por duas vezes, e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Ao final da última

lavagem, o álcool foi descartado e o restante foi retirado com o auxílio de uma pipeta. O pellet foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e, posteriormente, ressuspensionado em 300 µL de água livre de RNase.

Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (RNase-free, Thermo Scientific, Estados Unidos) para evitar qualquer contaminação por DNA. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotômetro NanoDrop® modelo 8000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). Para verificar a integridade do RNA, seguiu-se com uma etapa de eletroforese em gel de agarose (1,5%), a 60 V, por aproximadamente 15 minutos.

Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit Platus Transcriber RNase H- cDNA First Strand (Sinapse, Inc, Estados Unidos). Para iniciar a reação, foi utilizado 1 µg de RNA, 1 µL de *primer* oligo dT, e água destilada livre de RNase para completar o volume de 12 µL. A solução foi incubada a 65 °C por 5 min, e depois acondicionada por 3 minutos em gelo. Para inibir a ação de RNases, foi utilizado 1 µL RNase Inhibitor (20 U/µL) e 2 µL de dNTP (10mM), incubando-se a solução em banho-maria (37 °C; 2 min). Por fim, adicionou-se 1 µL da enzima H Minus Transcriptase Reversa (200 U/µL), totalizando um volume de 20 µL, e a reação foi incubada a 45 °C (60 min). Posteriormente, a reação foi mantida a 70 °C (5 min) para inativação da enzima.

A concentração de cDNA de cada amostra foi considerada como se todo RNA fosse convertido em cDNA (1 µg de RNA em 20 µL de reação). Após o término da reação, as amostras de cDNA foram padronizadas para 1 ng µL⁻¹ e estocadas a -20 °C. Ao final da síntese, o cDNA obtido foi utilizado para a análise de qPCR, no equipamento 7500 Fast™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), para a obtenção da quantificação da expressão relativa.

As reações foram preparadas utilizando-se 3 µL do cDNA diluído (1 ng µL⁻¹), 0,5 µL de *primers* específicos para o gene *uidA* (10 µM), 7,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, Estados Unidos) e 4 µL de água livre de RNase. Foram realizadas três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para cada planta e gene analisado, incluindo as amostras de plantas não transgênicas, e amostra controle sem DNA para verificar possíveis contaminações dos reagentes utilizados. Para a amplificação, utilizou-se o programa padrão do equipamento 7500 Fast™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), no modo FAST, realizado da seguinte maneira: ciclo inicial a 95 °C por 20 segundos, seguido

de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos. Ao final da reação, foi determinado o ponto de fusão médio dos amplicons formados durante a reação, por meio da curva de Melting, submetendo-se as amostras a 95 °C por 15 segundos para a desnaturação das duplas fitas amplificadas, aquecendo-as gradativamente de 60 a 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,3 °C s⁻¹, sendo realizadas medidas de fluorescência continuamente, e em seguida, submetidas a 60 °C (15 segundos).

Para esta análise, foram utilizados os genes de referência *f-box* e *ef1-α* (MAFRA et al., 2013) para normalização dos níveis de expressão do gene *uidA*, de acordo com os *primers* descritos na Tabela 1. Ao final da reação, para cada planta transgênica, foi obtido um valor de C_q (ciclo de quantificação), tanto para o gene alvo, quanto para os genes de referência. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. Os dados gerados pelo aparelho foram submetidos à análise no software Real-Time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005) para o cálculo do C_q e eficiência das curvas de amplificação.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para amplificação dos genes *f-box*, *ef1-α* e *uidA* utilizados na análise de qPCR e tamanho dos amplicons

Gene	Sequência 5'-3' <i>F</i>	Sequência 5'-3' <i>R</i>	Amplicon (pb)
<i>f-box</i>	TTGGAAACTCTTTGCGCCACT	CAGCAACAAAATACCCGTCT	112
<i>ef1-α</i>	TCAGGCAAGGAGCTTGAGAAG	GGCTTGGTGGGAATCATCTTAA	80
<i>uidA</i>	TGTGGAGTATTGCCAACGAA	GAGCGTCGCAGAACATTACA	135

Os dados de C_q obtidos foram submetidos ao software GenEx (versão 6) para o cálculo da expressão gênica (*fold change*). Neste programa, utilizou-se a eficiência média calculada no Real-Time PCR Miner para corrigir o valor de C_q de cada amostra. Após a correção da eficiência, o Software comparou os dados utilizando a fórmula de Quantificação Relativa $RQ = 2^{-(\Delta C_q \text{ da amostra} - \Delta C_q \text{ calibrador})}$, que corresponde a $RQ = 2^{-\Delta \Delta C_q}$. O valor do C_q do gene alvo foi subtraído do valor do C_q do gene de referência e resultou no valor de ΔC_q ; o valor de ΔC_q do gene alvo foi, então, subtraído do valor do ΔC_q do calibrador (planta de menor expressão), e foi encontrado o valor de $\Delta \Delta C_q$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de

expressão, onde o número 2 representa o somatório da eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

3.4 Análise histoquímica do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) em plantas transgênicas de citrange ‘Carrizo’

A histolocalização da expressão do gene *uidA* foi realizada em amostras de ramos jovens de caules de plantas transgênicas contendo as construções CsPP2.1::*uidA*, CsVTE.2::*uidA* e CaMV35S::*uidA*. Foram coletados ramos de aproximadamente 45 cm de comprimento, de onde foram retiradas porções de 3-5 cm, distantes 10-15 cm do ápice. As porções de ramos foram transportadas ao laboratório onde foram imediatamente seccionadas à mão livre no sentido longitudinal e transversal com o auxílio de bisturi. As secções foram submersas em 1 mL de solução X-GLUC (1 mM) (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998) para ativar a reação da enzima glucuronidase e incubadas durante períodos entre 30 a 120 minutos a 37 °C, em ausência de luz. O período de incubação corresponde ao tempo que o tecido leva para reagir com o X-GLUC, variando de planta para planta. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas de acordo com a metodologia de Jefferson (1987) com solução etanol:ácido acético (3:1) para paralisar a reação enzimática, como também para a remoção da clorofila. As amostras foram conservadas na mesma solução. As lâminas foram montadas em etanol 70% para realização das imagens sobre a reação da glucoronidase. Também foram feitos testes para detecção do núcleo das células companheiras. Para tanto, os cortes foram hidratados em série etílica decrescente (70, 50, 30, 10%) e então lavadas em água e posteriormente transferidas para o corante fluorescente DAPI (0.1 mg/ml em tampão fosfato).

Com intuito de obter uma visão geral da expressão do gene *uidA* nos diferentes tratamentos e na planta controle foram capturadas imagens em esteromicroscópio Leica M205 C acoplado em câmera Leica DFC295, software LAS 4.0. Para o detalhamento da histolocalização da expressão do gene *uidA* foram feitas imagens ao microscópio de epifluorescência Leica DM5500B com câmera de vídeo Leica DFC295 acoplada. No caso da análise dos cortes corados com DAPI utilizou-se o filtro DAPI (Ex: 340-380; Em: 425). Ao longo das análises, foram feitas

imagens em campo claro as quais foram sobrepostas com imagens de fluorescência, objetivando detectar o núcleo das células companheiras.

4 RESULTADOS

4.1 Análise de *Southern blot*

Por meio desta análise foi possível observar sinais de hibridização que indicam os eventos de inserção do T-DNA no genoma das plantas. Não foram observados sinais de hibridização nas amostras de DNA de plantas não transgênicas, utilizadas como controle negativo. Foi confirmada a inserção do transgene em todas as plantas avaliadas. O número de cópias do transgene variou de uma a duas cópias, sendo que a maioria das plantas apresentou apenas uma cópia. As inserções de T-DNA ocorreram em diferentes posições do genoma das plantas avaliadas com as diferentes construções (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 3 - Análise de *Southern blot* em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. C-: Controle negativo (DNA de planta não transgênica); C+: Controle *uidA* positivo. A; B: construção gênica AtPP2::*uidA*; C: construção gênica AtSUC2::*uidA*; D: construção gênica CsPP2::*uidA*; E-M: construção gênica CsPP2.1::*uidA*. O DNA foi digerido com a enzima *EcoRI* e hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene *uidA* e terminador NOS

Figura 4 - Análise de *Southern blot* em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. C-: Controle negativo (DNA de planta não transgênica); C+: Controle *uidA* positivo. A - D: construção gênica CsPP2.1::*uidA*; E; F: construção gênica CsVTE2::*uidA*; O DNA foi digerido com a enzima *EcoRI* e hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene *uidA* e terminador *NOS*

Figura 5 - Análise de *Southern blot* em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. C-: Controle negativo (DNA de planta não transgênica); C+: Controle *uidA* positivo. A - C: construção gênica CsPP2.1::*uidA*; D - I: construção gênica CsVTE2::*uidA*; J - L: construção gênica CaMV35S::*uidA*; O DNA foi digerido com a enzima *EcoRI* e hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene *uidA* e terminador *NOS*

4.2 Análise da expressão do transcrito por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A análise de qPCR foi realizada em todas as plantas transgênicas, de todas as construções confirmadas por ensaio histoquímico e pela análise de *Southern blot* (Tabela 2). Para o cálculo da expressão relativa, foi utilizada uma das plantas transgênicas contendo a construção CsPP2.1::*uidA* como parâmetro de comparação para todas as plantas analisadas por ter apresentado o menor valor da expressão do gene *uidA* (planta de referência ou calibrador).

A expressão do gene *uidA* sob o controle dos diferentes promotores apresentou grande variação, tanto entre plantas transgênicas dos diferentes promotores, quanto entre plantas transformadas com um mesmo promotor (Tabela 2). Os valores da expressão relativa do gene *uidA* estão apresentados na figura 6.

Considerando a média da expressão relativa das plantas avaliadas para as diferentes construções, os promotores de expressão tecido-específicos apresentaram valores correspondentes a 5% (AtPP2), 8% (CsPP2.1), 41% (AtSUC2) e 31% (CsVTE), em relação a expressão direcionada pelo promotor CaMV35S.

Tabela 2 - Variação da expressão do gene *uidA* para os diferentes promotores em relação à expressão relativa da planta referência

Construção	Plantas avaliadas	Variação da expressão (fold change)
CsPP2.1	16	2,5 - 21,3
CsVTE2	8	7,3 - 107,5
CaMV35S	3	46,1 - 258
AtSUC	1	70,4
AtPP2	2	3,3 - 14,7
CsPP2	1	6,5

Figura 6 - Quantificação por qPCR da atividade do gene *uidA* dirigido por diferentes promotores em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' [Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus sinensis (L.) Osbeck]. 1; 2: promotor AtPP2. 3: promotor AtSUC2. 4: promotor CsPP2. 5 - 19; 31: promotor CsPP2.1. 20 - 27: promotor CsVTE2. 28 - 30: promotor CaMV35S. A planta de número 31 foi utilizada como calibrador

4.3 Análise histoquímica do padrão de expressão do gene *uidA* (GUS) em plantas transgênicas de citrange 'Carrizo'

As análises histológicas permitiram identificar os locais de expressão do gene repórter *uidA* (GUS) por meio da reação da enzima glucuronidase com substrato X-GLUC (Figura 7). O tratamento controle (planta não transgênica) não apresentou qualquer reação ao tratamento com X-GLUC (Figura 7 A; E). Já nas plantas transgênicas contendo o gene repórter sob controle dos diferentes promotores, o produto da reação do GUS ocorreu em diferentes tecidos. Para a construção gênica contendo o promotor constitutivo CaMV35S, notou-se que a reação que confere a cor azul ocorreu de forma generalizada, ou seja, em todos os tecidos do caule (Figura 7 B; F).

Diferentemente das plantas transformadas com o promotor CaMV35S, as plantas contendo gene *uidA* dirigido pelos promotores CsPP2.1 e CsVTE2 apresentaram expressão da glucuronidase em tecidos específicos. No caso das

plantas transformadas expressando o gene *uidA* dirigido pelo promotor CsPP2.1, foi observada a coloração azul resultante da atividade enzimática, preferencialmente no tecido floemático (Figura 7 C; G). No córtex e epiderme, o produto da atividade da glucuronidase não foi observada (Figura 8 A). Tanto em secção transversal quanto longitudinal foi possível verificar que o floema é o tecido alvo da expressão do promotor CsPP2.1 (Figura 8 B; C). Quando analisado em detalhe, verificou-se o produto da reação da glucuronidase junto às paredes em contato com as células companheiras (Figura 8 D; E), nas placas crivadas e dispersas no interior dos elementos de tubo crivado (Figura 8 F). O uso do DAPI nas secções longitudinais de plantas contendo o gene *uidA* dirigido pelo promotor CsPP2.1 tornou possível evidenciar as células companheiras por meio da visualização do núcleo (Figura 8 G). Além disso, pôde-se observar que essas células apresentam produto da reação da glucuronidase.

As análises de plantas transgênicas com promotor CsVTE2 apresentaram uma forte presença do produto da reação da glucuronidase no parênquima cortical, principalmente na região próxima à epiderme (Figura 7 D; H). Observou-se também a coloração azul junto ao floema, indicando que apesar de não ser floema-específico, este promotor também direciona a expressão para o tecido floemático (Figura 9 A). Em detalhe, as células que apresentaram conteúdo com o produto da reação da glucuronidase foram as do parênquima cortical mais externas e que apresentavam cloroplastos, ou seja, o clorênquima (Figura 9 B; C). Essa intrínseca relação com os cloroplastos também foi verificada na epiderme, onde as únicas células com cloroplastos, as células-guarda, também apresentaram a coloração indicativa da atividade da glucuronidase, ao contrário das demais células ordinárias da epiderme (Figura 9 D).

Figura 7 - Ensaio histoquímico para detecção da atividade do gene repórter *uidA* (GUS) sob controle dos promotores CaMV35S, CsPP2.1 e CsVTE2. Cortes transversais (A - D) e longitudinais (E - H) de ramos jovens de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Imagens feitas sob estereomicroscópio. A; E: Controle negativo (planta não transgênica). B; F: CaMV35S::*uidA*. Nota-se a expressão do transgene em todos os tecidos do caule. C; G: CsPP2.1::*uidA*. Expressão do gene *uidA* preferencialmente na região que compreende o floema (*). D; H: CsVTE2::*uidA*. Expressão do gene *uidA* preferencialmente na região cortical

Figura 8 - Detecção por microscopia de luz do local de expressão do gene repórter *uidA* (GUS) sob controle do promotor CsPP2.1 em ramos jovens de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Seções longitudinais (A, B, F; G) e seções transversais (C - E). A: Região Cortical. Nota-se ausência da reação da enzima glucuronidase. B: Floema apresentando células com reação positiva. C: Secção transversal indicando o floema. D; E: Detalhamento da região do floema. Elementos de tudo crivado (ETC) e células companheiras (CC) indicando a expressão do gene *uidA* junto à parede celular que divide o ETC e CC (ponta de seta em E). F: Secção longitudinal indicando a deposição do produto da reação junto às placas crivadas (círculo) e no interior dos ETCs. G: Sobreposição de imagem de campo claro e de fluorescência após coloração com DAPI. Os núcleos apresentam fluorescência azul (setas). Nota-se as células companheiras com núcleos evidentes e acúmulo do produto da reação da glucuronidase. EP: Epiderme; CT: Córtex; FL: Floema; XL: Xilema

Figura 9 - Detecção por microscopia de luz do local de expressão do gene repórter *uidA* (GUS) sob controle do promotor CsVTE2 em ramos jovens de citrange 'Carrizo' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Seção transversal (C) e seções longitudinais (A, B; D). A: Visão geral dos tecidos condutores, parênquima cortical e epiderme. Nota-se ausência da reação da enzima glucuronidase no xilema e na epiderme. B: Parênquima cortical apresentando células com reação positiva. C: detalhamento do córtex. Nota-se a forte expressão nas células com cloroplastos. D: Detalhamento da epiderme. A seta indica um estômato e suas células-guarda, únicos elementos da epiderme com reação positiva. EP: Epiderme; CT: Córtex; FL: Floema; XL: Xilema

5 DISCUSSÃO

A ausência de cultivares de citros resistentes ao HLB tem impulsionado a pesquisa e a seleção de possíveis fontes de resistência a essa doença (BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010). A identificação de traços de resistência em germoplasmas ainda não estudados de *Citrus* e gêneros semelhantes é uma estratégia para a obtenção de cultivares resistentes. Porém, o melhoramento genético de citros utilizando métodos convencionais esbarra em dificuldades, como o longo período juvenil que pode variar de 4 a 12 anos, prolongando o processo de avaliação das variedades obtidas e possíveis resultados positivos (DUTT et al., 2015).

Devido a isso, a engenharia genética tem sido um método muito utilizado para obtenção de genótipos de interesse com resultados potencialmente mais precisos e rápidos (DUTT et al., 2015). A transformação genética de plantas, uma das técnicas mais utilizadas em engenharia genética, é muito recente quando comparada ao melhoramento clássico, com seu primeiro relato há pouco mais de 30 anos (ANAMI, 2013) e, desde então, vem contribuindo para a obtenção de resultados relevantes. Esta técnica permite a incorporação de transgenes de interesse agrônomo em organismos geneticamente distantes, gerando um material vegetal melhorado que irá satisfazer interesses agrônômicos e/ou comerciais (VISARADA et al., 2009).

Na cultura dos citros, os trabalhos envolvendo transformação genética buscam principalmente genes de interesse para o combate ou indução de resistência a doenças bacterianas (BOSCARIOL et al., 2006; BARBOSA-MENDES et al., 2009; DUTT et al., 2012). Porém, na maioria dos casos, os transgenes são dirigidos sob o controle de promotores constitutivos, conferindo a expressão do transgene em todos os tecidos da planta. Quando se trata de doenças que ocorrem em locais específicos, como é o caso do HLB, a expressão constitutiva do transgene não seria necessária, portanto, a validação e caracterização de promotores tecido-específicos é de grande interesse (POTENZA et al., 2004; DUTT et al., 2014).

Promotores tecido-específicos já foram relatados na literatura (YANG; RUSSELL, 1980; WANG; BOULTER; GATEHOUSE, 1992; TRUERNIT; SAUER, 1995; IMLAU; TRUERNIT; SAUER, 1999; ZHAO; LIU; DAVIS, 2004; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012, DUTT et al., 2014), embora a maior parte destes sejam provenientes de organismos geneticamente distantes, o que pode dificultar a

aceitação desses organismos geneticamente modificados (OGMs) (LASSEN; MADSEN; SANDOE, 2002).

Frente a isso, novos conceitos de OGMs têm sido criados a partir da introdução de novas técnicas mais precisas de melhoramento de plantas. Essas técnicas têm em comum a utilização de genes da própria espécie a ser melhorada ou de espécies sexualmente compatíveis, podendo caracterizar uma vertente para a aceitação desses produtos no mercado. Conceitos como cisgenia e intragenia vêm sendo explorados a fim de minimizar as restrições da utilização da engenharia genética na produção de alimentos (SCHAART et al., 2016).

Os termos cispênese e intrapênese correspondem aos processos de obtenção de plantas geneticamente modificadas a partir de genes e elementos genéticos provenientes de um doador sexualmente compatível, sendo da mesma espécie ou de uma espécie relacionada. Cisgenia corresponde ao uso da técnica de transformação usando sequências completas de genes com seus elementos genéticos, sendo da mesma espécie ou de uma espécie filogeneticamente próxima. Já a intragenia implica na manipulação de genes e elementos reguladores desde que sejam de espécies semelhantes ou sexualmente compatíveis (GALARZA; DELGADO; HENRÍQUEZ, 2016).

Com base nas exigências sociais e ambientalistas, há um grande interesse em validar promotores de citros para serem utilizados em futuras construções gênicas, busca-se alternativas de controle a doenças como o HLB. Neste trabalho, foram avaliados promotores de citros previamente isolados, como também promotores de *Arabidopsis* e de vírus já conhecidos e estudados, sendo avaliados pelos níveis de expressão e por ensaio histoquímico para determinar o padrão de expressão do gene *uidA*, visando a comparação entre eles e a caracterização de promotores tecido-específicos em citros.

A técnica de Southern blot foi utilizada para confirmar a presença do transgene no genoma das plantas avaliadas, além de permitir o conhecimento do número de cópias do transgene incorporadas ao DNA de cada planta. Verificou-se de 1 a 2 eventos de inserção do transgene no genoma de cada planta. Um menor número de eventos de inserção do transgene é desejável na seleção de plantas transgênicas promissoras, já que a inserção de muitas cópias do T-DNA pode influenciar nos níveis de expressão do transgene, podendo ser positivamente

correlacionado ou não correlacionado, ou ainda causar o silenciamento do transgene (SCHUBERT et al., 2004; FAN et al., 2011).

O nível de expressão do gene *uidA* sob controle dos diferentes promotores foi avaliado pela análise de qPCR. O PCR quantitativo em tempo real é um método de quantificação precisa e sensível de sequências de ácidos nucleicos (ZHAO; FERNALD, 2005; LEFEVER et al., 2009), sendo bastante utilizado para avaliação da expressão de transgenes. O parâmetro utilizado para quantificar esta expressão é o Cq (quantification cycle – ciclo de quantificação), de acordo com a nomenclatura proposta por Bustin et al. (2009). Os resultados obtidos mostraram uma variação na expressão relativa tanto entre plantas contendo um mesmo promotor quanto em plantas contendo diferentes promotores. A expressão do gene *uidA* dirigido pelo promotor AtPP2 variou de Log^{10} 0,52 a 1,16. Já a expressão direcionada pelo promotor de citros CsPP2.1 apresentou valores de expressão relativa entre Log^{10} 0,4 e 1,32. Valores semelhantes foram observados por Atílio et al. (2013) trabalhando com o promotor AtPP2 em plantas de laranja ‘Pera’ e ‘Valência’.

A expressão relativa do gene *uidA* quando dirigido pelo promotor AtSUC2 foi de Log^{10} 1,84, o que está dentro dos valores encontrados por Benyon et al. (2013) avaliando o mesmo promotor em um híbrido de toranja com *Poncirus trifoliata*, porém um pouco abaixo dos valores encontrados por Tavano et al. (2015) trabalhando com laranja ‘Hamlin’ e utilizando o mesmo promotor. Ainda, Dutt et al. (2012) observaram valores médios de Log^{10} 3,0 utilizando o mesmo promotor em plantas de *C. aurantifolia*.

Para o promotor CsVTE2, a expressão do gene *uidA* foi de Log^{10} 0,73 a 1,74. Comparando os resultados com a expressão dos promotores CsPP2 e AtSUC2, CsVTE2 tem uma expressão relativa mais alta do que os promotores CsPP2 tanto de *Arabidopsis* como de citros, porém, um pouco mais baixa do que a expressão direcionada pelo promotor AtSUC2.

Entre os promotores específicos, o AtSUC2 se destaca como sendo o de mais forte expressão, sendo citado em outros trabalhos como um bom promotor tecido-específico de floema, podendo ser utilizado em estratégias de combate ao HLB (TAVANO et al., 2015; BENYON et al., 2013). Porém, este promotor foi isolado de *A. thaliana*, uma espécie filogeneticamente distante dos citros, sendo interessante, portanto, validar promotores de genes isolados de citros ou de espécies sexualmente compatíveis, que atinjam as expectativas desejadas, minimizando

assim as restrições da utilização da engenharia genética na produção de alimentos (SCHAART et al., 2016).

A variação da expressão gênica em plantas contendo uma mesma construção é um fenômeno conhecido e relatado em outros trabalhos envolvendo transformação genética e expressão gênica (BHULLAR et al., 2009; ATTÍLIO et al., 2013, BENYON et al., 2013; AGARWAL et al. 2014). As diferenças nos níveis de expressão estão relacionadas ao número de cópias e à posição que o transgene ocupou no genoma da planta transformada (BUTAYE et al., 2005). No presente trabalho todas as plantas avaliadas tinham somente uma ou duas cópias do transgene, o que se considera ideal. Portanto, a variação da expressão nestes casos deve estar associada ao local de inserção do transgene no genoma de cada evento.

O promotor CaMV35S foi utilizado neste trabalho para comparar os níveis de expressão desse promotor constitutivo forte já conhecido com os níveis de expressão dos promotores específicos avaliados. Os resultados da análise de qPCR mostraram que a expressão dos promotores AtPP2, CsPP2.1, AtSUC2 e CsVTE2 tiveram resultados equivalentes a aproximadamente 5%, 8%, 41% e 31%, respectivamente, em relação aos níveis de expressão conferido pelo promotor CaMV35S.

A expressão dos promotores específicos em relação ao constitutivo CaMV35S é menor, provavelmente, devido à restrição da expressão destes promotores. Ou seja, enquanto o promotor CaMV35S expressa-se em todos os tecidos, os outros são restritos, exibindo níveis de expressão mais baixos. Embora os promotores específicos tenham se apresentado menos ativos do que o promotor CaMV35S, sua ação foi restrita a tecidos específicos, representando uma boa alternativa para utilização em construções visando a resistência a doenças bacterianas.

Malnoy et al. (2006) trabalhando com frutos de maçã após inoculação bacteriana e fúngica, demonstraram que o uso de promotores induzíveis pela ação de patógenos é mais vantajoso que o uso de promotores constitutivos para conduzir transgenes em busca de resistência a doenças fúngicas e bacterianas. Neste trabalho, os autores compararam a ação do promotor Gst1 de batata (*Solanum tuberosum* L.) com a ação do promotor constitutivo CaMV35S, ambos sob controle do gene repórter *uidA* (GUS). Apesar de o promotor Gst1 exibir baixo nível de expressão (8-15%) em comparação com o nível de expressão do promotor CaMV35S, sua capacidade de resposta a agentes patogênicos no local da infecção

pode ser útil na condução da expressão de transgenes para promover a resistência a doenças bacterianas e fúngicas.

A localização da expressão do gene repórter dirigido pelos diferentes promotores foi possível por meio de ensaios histoquímicos da atividade GUS. Nas análises realizadas em plantas contendo o gene repórter dirigido pelo promotor CsPP2.1 observou-se que a expressão foi direcionada ao tecido floemático, podendo ser constatada pela presença da coloração azul, resultado da reação do gene *uidA* com o substrato X-GLUC. Os resultados obtidos corroboram com os resultados de Miyata et al. (2012), que demonstraram a expressão específica do gene *uidA* no tecido floemático de plantas transgênicas de laranja doce de diferentes cultivares contendo construções conduzidas pelo promotor PP2, porém isolado de *Arabidopsis* (AtPP2).

O produto da reação da glucuronidase foi observado no tecido floemático, em especial nas células companheiras e elementos de tubo crivado, mas também em algumas células do parênquima. A expressão do gene *uidA* em células companheiras se dá, provavelmente, por estas células serem responsáveis pela síntese dessas proteínas (BOSTWICK et al., 1992; DINANT et al., 2003; VAN BEL, 2003).

A deposição do produto da reação enzimática GUS junto às paredes dos ETCs pôde ser observada em cortes longitudinais, sustentando as informações sobre a localização dessas proteínas em ETCs maduros. A ligação de proteínas P às paredes tem uma importância estrutural para o ETC, além de possuir propriedades químicas de ligação à microrganismos que podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de combate a doenças vasculares (MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2012; EVERT, 2013).

O padrão de expressão do gene repórter em plantas contendo o promotor CsVTE2 demonstra o direcionamento da expressão para o parênquima cortical, principalmente próximo à epiderme, como também para o tecido floemático. O gene *CsVTE2* está envolvido na biossíntese de tocoferol, uma importante substância de resposta à estresses oxidativos em plantas, além de atuar no carregamento de assimilados no floema, e foi encontrado sendo diferencialmente expresso em plantas de laranja 'Hamlin' desafiadas com '*C. L. americanus*' (MAFRA et al., 2013). Esses compostos são sintetizados em células fotossinteticamente ativas, o que pode

explicar o direcionamento da expressão do gene repórter para o parênquima cortical, onde há uma alta concentração de cloroplastos (YABUTA et al., 2013).

Além da forte expressão no parênquima cortical, observou-se também o produto da reação da glucuronidase nas células-guarda dos estômatos, na epiderme. As células-guarda são as únicas células da epiderme que possuem cloroplastos, o que as diferem das demais células ordinárias da epiderme, evidenciando a ligação desse promotor a plastídeos (EVERT, 2013; YABUTA et al., 2013).

Apesar do promotor CsVTE2 direcionar a expressão principalmente para o parênquima cortical, estudos relatam a sua influência na translocação de fotoassimilados (MAEDA et al., 2006; YABUTA et al., 2013, MAEDA et al., 2014). No geral, a expressão do gene *uidA* quando dirigido pelo promotor CsVTE2 foi superior ao nível de expressão direcionado pelo promotor CsPP2 e comparável aos níveis direcionados pelo promotor AtSUC2 obtidos por Benyon et al. (2013) e Tavano et al. (2015). Com base nesses resultados, pode-se sugerir que esse promotor seja potencialmente interessante para ser explorado.

Estudos feitos em mutantes biossintéticos de VTE em *Arabidopsis*, demonstraram a importância dos tocoferóis tanto na fotoproteção contra estresses oxidativos, como também no carregamento de fotoassimilados e na adaptação de planta a baixas temperaturas. Plantas mutantes VTE2, deficientes em tocoferol, apresentaram inibição do transporte de assimilados, seguido de aumento nos níveis de açúcares solúveis e acúmulo de amido em folhas, coincidindo com a deposição de calose no parênquima floemático, que posteriormente é depositada também em células do complexo elemento de tubo crivado/célula companheira. Essa sequência de eventos é similar ao que acontece em plantas infectadas com as bactérias causadoras do HLB em citros. O dano gerado ao fluxo de fotoassimilados é um dos principais fatores que comprometem as plantas infectadas por *Liberibacter*. Com isso, supõe-se que a superexpressão de CsVTE2 durante o início da infecção poderia melhorar ou até aumentar o fluxo de translocação de nutrientes no floema, minimizando os sintomas da doença (MAEDA et al., 2006; MAEDA et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

É possível caracterizar a localização da expressão de um gene repórter dirigido por diferentes promotores por meio de ensaios histoquímicos.

Os resultados sugerem que os promotores CsPP2.1 e CsVTE2 isolados de citros constituem boas alternativas ao uso de promotores constitutivos e tecido-específicos isolados de organismos filogeneticamente distantes.

Construções gênicas explorando as características intrínsecas de cada promotor aliadas às diferentes estratégias da engenharia genética se mostram promissoras na busca do controle a doenças como o HLB.

Apesar de os níveis de expressão alcançados por promotores tecido-específicos terem sido mais baixos quando comparados com o promotor CaMV35S, os mesmos direcionam a expressão a locais de interesse.

REFERÊNCIAS

- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, 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**, v. 9, p. 56-64, 2010.
- AGARWAL, P.; GARG, V.; GAUTAM, T.; PILLAI, B.; KANORIA, S.; BURMA, P.K. A study on the influence of different promoter and 5' UTR (URM) cassettes from *Arabidopsis thaliana* on the expression level of the reporter gene β glucuronidase in tobacco and cotton. **Transgenic research**, v. 23, n. 2, p. 351-363, 2014.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, v. 185, p. 118–130, 2012.
- 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. **The Plant Journal**, v. 10, n. 1, p. 107–121, 1996.
- ANAMI, S.; NJUGUNA, E.; COUSSENS, G.; AESAERT, S.; LIJSEBETTENS, M.V. Higher plant transformation: Principles and molecular tools. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 6-7-8, p. 483–494, 2013.
- 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*, v. 48, n. 7, p. 741-747, 2013.
- 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, n. 1, p. 39-45, 2007.
- BARBOSA-MENDES J.M.; MOURÃO FILHO F.A.A.; BERGAMIN FILHO A.; HAKAKAVA, 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**, v. 122, n. 1, p. 109–115, 2009.
- BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. **Systematic Botany**, v. 1, n. 2, p. 105-136, 1976.
- BENETEAU, J.; RENARD, D.; MARCHÉ, L.; DOUVILLE, E.; LAVENANT, L.; RAHBÉ, Y.; DUPONT, D.; VILAINE, F.; DINANT, S. Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 1345-1361, 2010.

BENYON, L.S.; STOVER, E.; BOWMAN, K.D.; NIEDZ, R.; SHATTERS JR., R.G.; ZALE, J.; BELKNAP, W. GUS expression driven by constitutive and phloem-specific promoters in citrus hybrid US-802. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 3, p. 255-265, 2013.

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

BHULLAR, S.; CHAKRAVARTHY, S.; PENTAL, D.; BURMA, P.K. Analysis of promoter activity in transgenic plants by normalizing expression with a reference gene: anomalies due to the influence of the test promoter on the reference promoter. **Journal of biosciences**, v. 34, n. 6, p. 953-962, 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* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.

BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRISTOFANI-YALI, M.; MALOSSO, A.; COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2010.

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. **The Plant Cell**, v. 4, n. 12, 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 Agronômico; FUNDAG, 2005. Cap. 2, p. 19-36.

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

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. 1.ed. Brasília: Embrapa, Cenargen, 1998. 309 p.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUTAYE, K.M.J.; CAMMUE, B.P.A.; DELAURÉ, S.L.; DE BOLLE, M.F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. **Molecular Breeding**, v. 16, n. 1, p. 79-91, 2005.

CARDINALI, M.C.B.; BOAS, P.R.V.; MILORI, D.M.B.P.; FERREIRA, E.J.; SILVA, M.F.; MACHADO, M.A.; BELLETE, B.S.; SILVA, M.F.G.F. Infrared spectroscopy: A potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis. **Talanta**, v. 91, p. 1-6, 2012.

CERVERA M. Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection. **Transgenic plants. Methods and protocols**. Totowa, p. 203–214, 2004.

CERVERA, M.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Gene stacking in 1-year-cycling APETALA1 citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. **Journal of Biotechnology**, v. 140, n. 3, p. 278–282, 2009.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating rna from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.

CHAPOT, H. The Citrus plant. In: HAFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**. Switzerland: Ciba-Geigy Agrochemicals, 1975. p.6-13.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos.

Exportações totais de suco de laranja em toneladas de FCOJ Equivalente e milhares de US\$ FOB. 2017. Disponível em: <

http://www.citrusbr.com/download/Relatorio_MARCO_2017_ano_civil.pdf >. Acesso em: 07 abril 2017.

CLARK, A.M.; JACOBSEN, K.R.; BOSTWICK, D.E.; DANNENHOFFER, J.M.; SKAGGS, M.I.; THOMPSON, G.A. Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, Phloem Protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. **The Plant Journal**, v. 12, n. 1, p. 49-61, 1997.

COLETA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JUNIOR, J.; DO AMARAL, A.M.; MULLER, G.W. & MACHADO, M.A. First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, New York, v. 88, n. 12, p. 1382, 2004.

DALIO, R.J.D.; MAGALHÃES, D.M.; RODRIGUES, C.M.; ARENA, G.D.; OLIVEIRA, T.S.; SOUZA-NETO, R.R.; PICCHI, S.C.; MARTINS, P.M.M.; SANTOS, P.J.C.; MAXIMO, H.J.; PACHECO, I.S.; DE SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus–pathogen interactions. **Annals of Botany**, p. mcw238, 2017.

DINANT, S.; CLARK, A.M.; ZHU, Y.; VILAINE, F.; PALAUQUI J-C, KUSIAK, C.; THOMPSON, G.A. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. **Plant Physiology**, v. 131, n. 1, p. 114–128, 2003.

DIRITA, V.J.; GELVIN, S.B. Deletion analysis of the mannopine synthase gene promoter in sunflower crown gall tumors and *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 207, n. 2, p. 233–241, 1987.

- 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 Agronômico; FUNDAG, 2005. cap. 1, p. 3-18.
- DONMEZ, D.; SIMSEK, O.; IZGU, T.; KACAR, Y.A.; MENDI, Y.Y. Genetic transformation in citrus. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.
- 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.
- DUTT, M.; DHEKNEY, S.A.; SORIANO, L.; KANDEL, R.; GROSSER, J.W. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. **Horticulture Research**, v. 1, n. 14047, 2014.
- DUTT, M.; BARTHE, G.; IREY, M.; GROSSER, J. Transgenic Citrus Expressing an Arabidopsis NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). **PloS one**, v. 10, n. 9, 2015.
- EVERT, R.F. **Anatomia das plantas de Esau: meristemas, célula e tecidos do corpo da planta: sua estrutura e função e desenvolvimento**. São Paulo, Blucher, 2013. 728 p.
- ETXEBERRIA, E.; NARCISO, C. Citrus Section - Phloem Anatomy of Citrus Trees: Healthy vs. Greening-affected. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, 2012. P. 67-70.
- FAO- **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. 2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/brasil/pt/> >. Acesso em: 23 março 2017.
- FAN, J.; LIU, X.; XU, S.; XU, Q.; GUO, W. T-DNA direct repeat and 35S promoter methylation affect transgene expression but do not cause silencing in transgenic sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 2, p. 225, 2011.
- FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 2, p. 239-269, 2005.

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, n. 6, p. 450-455, 2000.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the Responses of Different Genotypes of Citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) Under Different Conditions. **Phytopathology**, v. 99, n. 12, p. 1346-1354, 2009.

FOLIMONOVA, S. Y.; ACHOR, D. S. Early Events of Citrus Greening (Huanglongbing) Disease Development at the Ultrastructural Level. **Phytopathology**, v. 100, n. 9, p. 949-958, 2010.

FU, S.; SHAO, J.; ZHOU, C.; HARTUNG, J.S. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus' and two strains of Citrus Tristeza Virus. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 349, 2016.

GALARZA, J.I.; DELGADO, N.; HENRÍQUEZ, V. Cisgenesis and intragenesis in microalgae: promising advancements towards sustainable metabolites production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 24, p. 10225-10235, 2016.

GANDER, E.S.; MARCELINO, L. H.; ZUMSTEIN, P. **Biotechnologia para pedestres**. Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1996. 68 p.

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, n. 1, p. 350-358, 1999.

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

GUO, H.; X. CHEN; H. ZHANG; R. FANG; Z. YUAN; Z. ZHANG; TIAN, Y. Characterization and activity enhancement of the phloemspecific pumpkin PP2 gene promoter. **Transgenic Research**, v. 13, n. 6, p. 559–566, 2004.

HIDAKA, T., OMURA, M., UGAKI, M., TOMIYAMA, M., KATO, A., OHSHIMA, M., MOTOYOSHI, F. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of Citrus from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, v. 40, n. 2, p. 199–207, 1990.

HULL, R.; COVEY, S.N.; DALE, P. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal - PAM**. 2015. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613> >. Acesso em: 04 abril 2017.

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.

ISLAM, M.S.; GLYNN, J.M.; BAI, Y.; DUAN, Y.P.; COLETTA-FILHO, H.D.; KURUBA, G.; CIVEROLO, E.L.; LIN, H. Multilocus microsatellite analysis of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' associated with citrus Huanglongbing worldwide. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 39, 2012.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. Gus fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higherplants. **The EMBO jornal**, v. 6, n. 13, p. 3901–3907, 1987.

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

LASSEN, J.; MADSEN, K.; SANDOE, P. Ethics and genetic engineering-lessons to be learned from GM foods. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, n. 5, p. 263-271, 2002.

LEFEVER, S.; HELLEMANS, J.; PATTYN, F.; PRZYBYLSKI, D.R.; TAYLOR, C.; GEURTS, R.; UNTERGASSER, A.; VANDESOMPELE, J. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 7, p. 2065-2069, 2009.

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**, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009.

LU, S.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; ZHU, K.; XU, Q.; DENG, X. Isolation and Functional Characterization of a Lycopene b-cyclase Gene Promoter from Citrus. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1367, 2016.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas, Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. Cap. 9, p. 222-277.

MACHADO, M.A.; LOCALI-FABRIS, E.C.; COLETTA-FILHO, H.D. 'Candidatus Liberibacter spp.', agentes do huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2010.

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. 158-172, 2011.

MACHADO, S.R.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Floema. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**, Viçosa, Editora UFV, 2012. Cap. 6. P. 147-168.

MAEDA, H.; SONG, W.; SAGE, T.; DELLAPENNA, D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 18, n. 10, p. 2710-2732, 2006.

MAEDA, H.; SONG, W.; SAGE, T.; DELLAPENNA, D. Role of callose synthases in transfer cell wall development in tocopherol deficient Arabidopsis mutants. **Frontiers in plant scienci**, v. 5, n. 46, 2014.

MAFRA, V.; MARTINS, P. K.; FRANCISCO, C. S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. Candidatus Liberibacter americanus induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 247, 2013.

MAITI, I.B.; GOWDA, S.; KIERNAN, J.; GHOSH, S.K.; SHEPHERD, R.J. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. **Transgenic Research**, v. 6, n. 2, p. 143–156, 1997.

MALNOY, M.; REYNOIRD, J.P.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; ALDWINCKLE, H.S. Activation of the pathogen-inducible Gst1 promoter of potato after elicitation by Venturia inaequalis and Erwinia amylovora in transgenic apple (Malus domestica). **Transgenic research**, v. 15, n. 1, p. 83-93, 2006.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**, Campinas, Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 929 p.

MIYATA, L.Y.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCARPARE FILHO, J.A.; ZAMBON, F.; BASSAN, M.M.; MENDES, B.M.J.; HARAKAVA, R. Eficiência de transformação genética de citrange 'Carrizo' com duas construções gênicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 311-315, 2011.

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.

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 Horticultrae**, Amsterdam, v.99, n. 3, p. 379-385, 2004.

MOORE, G.A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 9, p. 536-540, 2001.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R.B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Elaborado por: MARKESTRAT (Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia). Coordenador: Marcos Fava Neves. Ribeirão Preto, 2010.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; KALAKI, R.B.; LOPES, F.F. **A laranja do campo ao copo**. São Paulo, Atlas, 2012. 218 p.

ODELL, J.T.; NAGY, F.; CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, n. 6005, p. 810–812, 1985.

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, p. 145-157, 2004.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOGA, 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, v. 5, p.1-62, 2008.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Invited review: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 1, p. 1–22, 2004.

RANCE, I.; NORRE, F.; GRUBER, V.; THEISEN, M. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein overexpression in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, n. 5, p. 833-842, 2002.

READ, S.M.; NORTHCOTE, D.H. Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae. **Planta**, v. 158, n. 2, p. 119–127, 1983.

SCHAART, J.G.; VAN DE WIEL, C.C.M.; LOTZ, L.A.P.; SMULDERS, M.J.M. Opportunities for products of new plant breeding techniques. **Trends in plant science**, v. 21, n. 5, p. 438-449, 2016.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, London, v.3, n. 6, p.1101-1108, 2008.

SCHUBERT, D.; LECHTENBERG, B.; FORSBACH, A.; GILS, M.; BAHADU, S.; SCHMIDT, R. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **The Plant Cell**, v. 16, n. 10, p. 2561-2572, 2004.

SOUTHERN, E.M. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 Ed., 2013. 918p.

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

TAVANO, E.C.R.; VIEIRA, M.L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J. Genetic Transformation of Citrus Sinensis “Hamlin” With Attacin a Driven By a Phloem Tissue-Specific Promoter for Resistance To Candidatus Liberibacter Spp. **Acta Horticulturae**, v. 1065, p. 695–702, 2015.

TRUERNIT, E.; SAUER, N. The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H⁺ 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.

VAN BEL, A.J.E. The phloem, a miracle of ingenuity. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 1, p. 125-149, 2003.

VISARADA, K.B.R.S.; MEENA, K.; ARUNA, C.; SRUJANA, S.; SAIKISHORE, N.; SEETHARAMA, N. Transgenic Breeding: Perspectives and Prospects. **Crop Science**, v. 49, n. 5, p. 1555-1563, 2009.

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, n.5, p. 881-885, 1992.

WU, G.A.; PROCHNIK, S.; JENKINS, J.; SALSE, J.; HELLSTEN, U.; MURAT, F.; PERRIER, X.; RUIZ, M.; SCALABRIN, S.; TEROL, J.; TAKITA, M.A.; LABADIE, K.; POULAIN, J.; COULOUX, A.; JABBARI, K.; CATTONARO, F.; DEL FABBRO, C.; PINOSIO, S.; ZUCCOLO, A.; CHAPMAN, J.; GRIMWOOD, J.; TADEO, F.R.; ESTORNELL, L.H.; MUÑOZ-SANZ, J.V.; IBANEZ, V.; HERRERO-ORTEGA, A.; ALEZA, P.; PÉREZ-PÉREZ, J.; RAMÓN, D.; BRUNEL, D.; LURO, F.; CHEN, C.; FARMERIE, W.G.; DESANY, B.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN, M.; HARKINS, T.; FREDRIKSON, K.; BURNS, P.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKI, M.; REFORGIATO, G.; FREITAS-ASTÚA, J.; QUETIER, F.; NAVARRO, L.; ROOSE, M.; WINCKER, P.; SCHMUTZ, J.; MORGANTE, M.; MACHADO, M.A.; TALON, M.; JAILLON, O.; OLLITRAULT, P.; GMITTER, F.; ROKHSAR, D. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 656-662, 2014.

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**, v. 15, p. 221–231, 2005.

YABUTA, Y.; TANAKA, H.; YOSHIMURA, S.; SUZUKI, A.; TAMOI, M.; MARUTA, T.; SHIGEOKA, S. Improvement of vitamin E quality and quantity in tobacco and lettuce by chloroplast genetic engineering. **Transgenic research**, v. 22, n. 2, p. 391-402, 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, 1990.

YAO, J.-L., WU, J.-H., GLEAVE, A.P., MORRIS, B.A.M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, v. 113, n. 2, p. 175–183. 1996.

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.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1047-1064, 2005.

ZOU, X.; SONG, E.; PENG, A.; HE, Y.; XU, L.; LEI, T.; YAO, L.; CHEN, S. Activation of three pathogen-inducible promoters in transgenic citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) after *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infection and wounding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V. 117, n. 1, p. 85–98, 2014.