Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Transformação genética de	laranja doce	(Citrus sine	nsis L. Osbeck)
com o gene <i>D4E1</i> dirigido	pelos promo	otores CaMV	35S ou <i>AtPP2</i>

Lísia Borges Attílio

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

Piracicaba 2013

Lísia Borges Attílio Engenheira Agrônoma

Transformaçã	o genética d	e laranja	ı doce (<i>Citru</i>	ıs sinensis l	Osbeck)	com o g	ene
	D4E1 dirigid	o pelos	promotores	CaMV35S c	u <i>AtPP</i> 2		

Orientador:

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO

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

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

Attílio, Lísia Borges
Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene
D4E1 dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou AtPP2 / Lísia Borges Attílio.- - Piracicaba, 2013.

81 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Agrobacterium 2. Expressão gênica 3. Laranja 4. Melhoramento genético vegetal 5. Plantas transgênicas 6. Resistência genética vegetal 1. Título

CDD 634.31 A859t

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

Dedico

À minha querida filha *Anita*, ao meu marido *Castellane*, aos meus pais *João* e *Paulina*, aos meus irmãos *Allan* e *Dênia*. Pelo amor e incentivo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, por me dar força e perseverança. Obrigada pelos momentos de felicidade, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas dificuldades e experiências ao longo deste doutorado, que também fazem parte do meu aprendizado.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, primeiramente pela oportunidade e confiança, também pela paciência, orientação e ensinamentos durante este período.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Harakava por todo conhecimento compartilhado, pelo auxílio e apoio imprescindível para realização de todo trabalho.

À professora Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes, por disponibilizar seu laboratório para as análises, sempre que necessário, pelas idéias e pelas correções deste material.

Ao pesquisador Dr. José Belasque Júnior pelo indispensável auxílio e informações transmitidas para a realização do bioensaio, por disponibilizar o laboratório e funcionários do Fundecitrus.

Às amigas Tatiane Loureiro da Silva e Luzia Miyata por toda ajuda. Vocês sabem o quanto o auxílio de vocês foi essencial para a realização deste trabalho!

Aos colegas e amigos Alessandra Rigotto, Ernani Pereira Junior, Eveline Tavano, Fabiana Muniz, Filipi Augusto Rodrigues, Flávia Zambon, Leonardo Soriano, Liliane Libório Stipp, Lívia Mendes de Castro, Marina Caputo, Natália Ansante, Paulo Artur, Renata Beatriz Cruz, Rodrigo Cassarotti, por compartilhar experiências, ouvir os problemas, auxiliar nas atividades e pela companhia amigável e alegre.

Aos amigos Fabrício Jaciani e Tamires que conheci durante as análises realizadas no Fundecitrus, pessoas maravilhosas, exemplo de profissionalismo e dedicação. Muito obrigada pela incansável ajuda!

À pós-doutoranda Carolina Munari, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pela ajuda e informações para o uso dos softwares de análise dos dados de qPCR.

Aos Funcionários do Departamento de Produção Vegetal, Eder Cintra, David Ulrich, Aparecido Serrano e José Volpato, por toda ajuda e cuidados prestados na manutenção das plantas nas estufas.

À secretária do PPG em Fitotecnia Luciane Aparecida Lopes Toledo por todo auxílio prestado.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização do doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo auxílio financeiro.

E em especial agradeço aos meus amores:

Meus pais João Roberto Attílio e Paulina Estela Borges Attílio, pela educação, amor, incentivo e carinho.

Meu irmão Allan Borges Attílio e minha querida cunhada Carla Cristina por todo apoio e incentivo que me permitiram chegar até aqui.

Minha irmã Dênia Borges Attílio e meu cunhado Gustavo Mostaço, por todo apoio e ajuda.

Meu marido pela compreensão e apoio. Obrigada por todas as renúncias que fez para que eu pudesse conquistar este objetivo. Seu apoio incondicional tornou possível a realização deste trabalho.

Minha querida filha Anita, que veio como um presente de Deus em minha vida com sua alegria contagiante. Filha, obrigada por entender minhas ausências, "para que eu pudesse cuidar das plantinhas".

Minha grande amiga Elisângela Dupas, por todo auxílio, conselhos, ensinamentos, pelo carinho de sempre e pela amizade ao longo destes anos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente tenham contribuído para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Aspectos gerais da Citricultura	19
2.2 Cancro cítrico	21
2.3 Huanglongbing	24
2.4 Transformação genética de citros	28
2.5 Promotores de expressão gênica	30
2.6 Peptídeo antimicrobiano D4E1	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material vegetal	37
3.2 Construções gênicas	38
3.3 Manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium</i>	41
3.4 Preparo do inóculo para transformação genética	41
3.5 Transformação genética, seleção e regeneração	42
3.6 Enxertia in vitro	43
3.7 Análises moleculares	43
3.7.1 Análise de Southern blot	45
3.7.2 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real	46
4 RESULTADOS	51
4.1 Transformação genética e aclimatização das plantas	51
4.2 Análises moleculares	54
4.2.2 Análise de S <i>outhern blot</i>	56
4.2.3 Análise da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real	
(qPCR)	59
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2*

O Brasil é o maior produtor de laranja doce do mundo. O histórico da citricultura brasileira é marcado por uma sucessão de doenças causadas por diferentes agentes etiológicos. Entre as principais doenças que afetam a cultura, têm levado a maiores prejuízos, as bacterianas, com destaque para o cancro cítrico causado por Xanthomonas citri subsp. citri e o Huanglongbing associado a três espécies de "Candidatus Liberibacter". Devido à ausência de cultivares de laranja doce resistentes a estas doenças, a transformação genética é uma alternativa promissora para obtenção de plantas resistentes. Uma das estratégias no uso da transgenia para conferir ação contra bactérias é a inserção de genes que codificam peptídeos antimicrobianos como o D4E1, um peptídeo sintético, que tem apresentado eficiência no controle de doenças fúngicas e bacterianas de várias culturas, in vivo e in vitro. Este trabalho foi realizado com o objetivo de obter plantas transgênicas de laranja doce das cultivares 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência', via Agrobacterium tumefaciens, expressando o gene D4E1, dirigido pelos promotores CaMV35S (Cauliflower mosaic virus 35S promoter) de expressão constitutiva ou pelo AtPP2 (Arabidopsis thaliana phloem protein 2) com expressão preferencial no floema, visando obter plantas resistentes a doenças bacterianas. Foram obtidas 13 plantas transgênicas da cultivar 'Hamlin', 10 da cultivar 'Pêra' e 8 da cultivar 'Valência', contendo a construção gênica CaMV35S/D4E1 e 19 plantas transgênicas da cultivar 'Hamlin', 6 da cultivar 'Pêra' e 15 da cultivar 'Valência' contendo a construção gênica AtPP2/D4E1. As plantas transgênicas apresentaram um a três eventos de inserção do T-DNA no genoma. Os níveis de expressão do transgene dirigido pelo promotor de expressão preferencial no floema foi menor comparado ao das plantas contendo o transgene dirigido pelo promotor de expressão constitutiva. Os resultados da expressão do transgene permitem selecionar plantas com maior expressão de cada uma das construções gênicas, para que, futuramente, estas sejam multiplicadas e avaliadas quanto à resistência ao cancro cítrico e ao HLB.

Palavras chave: Peptídeos antimicrobianos; Transgenia; Resistência a doenças; Melhoramento genético

ABSTRACT

Sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) genetic transformation using D4E1 gene driven by *CaMV35S* or *AtPP2* promoters

Brazil is the largest sweet orange producer in the world. The history of the Brazilian citrus industry is marked by a series of diseases caused by different etiologic agents. Among the diseases affecting the culture, those caused by bacteria are the ones that have caused more significant losses, especially the citrus canker caused by Xanthomonas citri subsp. citri, and huanglongbing (HLB) associated with three "Candidatus Liberibacter" bacteria species. Due to the absence of genetic resistance to these diseases in commercial sweet orange cultivars, the genetic transformation is a promising alternative to produce resistant plants. One of the strategies to produce transgenic resistant plants to bacteria is the use of genes that code for antimicrobial peptides, such as D4E1, a antimicrobial synthetic peptide, which has shown efficient results controlling diseases caused by bacteria and fungi in several crops, through in vitro and in vivo experiments. The aim of this study was to produce 'Hamlin', 'Pêra' and 'Valencia' sweet orange transgenic plants, via Agrobacterium tumefaciens, expressing the D4E1 gene driven by the constitutive promoter Cauliflower mosaic virus (CaMV35S) or Arabidopsis thaliana phloem protein 2 (AtPP2), a promoter preferentially expressed in the phloem. It was possible to regenerate 13 'Hamlin' transgenic lines, 10 'Pêra' transgenic lines and 8 'Valencia' transgenic lines bearing the gene construct CaMV35S/D4E1, whereas 19 'Hamlin' transgenic lines, 6 'Pêra' transgenic lines and 15 'Valencia' transgenic lines bearing the AtPP2/D4E1 gene construct were regenerated. The transgenic plants had one to three T-DNA insertion events in the genome. The transgene expression levels in transgenic plants for D4E1 gene driven by the phloem preferential promoter were lower than the transgenic expression levels of the transgene driven by the constitutive promoter. Transgene expression levels results may allow the selection of those plants with higher expression levels of each genetic construct for future multiplication and evaluation for citrus canker and HLB resistance.

Index terms: Antimicrobial peptides; Transgenes; Disease resistance; Genetic improvement

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fontes e tipos de explantes utilizados nos experimentos de	
	transformação genética. A: Plântulas utilizadas como fonte de	
	explante de epicótilo. B: Segmento de epicótilo utilizado como	
	explante nos experimentos de transformação genética. C:	
	semente de laranja 'Pêra' com a radícula emitida. D: segmento de	
	hipocótilo ligado ao cotilédone utilizado como explante	38
Figura 2 -	Representação esquemática do vetor pCAMBIA 2201 (Cambia),	
	contendo o gene de seleção nptll e o gene repórter uidA	40
Figura 3 -	Representação esquemática do vetor pCAMBIA CaMV35S/D4E1,	
	contendo o gene D4E1 e o gene de seleção nptll, ambos sob	
	controle do promotor constitutivo CaMV35S	40
Figura 4 -	Representação esquemática do vetor pCAMBIA AtPP2/D4E1,	
	contendo o gene D4E1 sob controle do promotor de expressão	
	preferencial no floema AtPP2 e o gene de seleção nptll sob	
	controle do promotor CaMV35S	41
Figura 5 -	Aclimatização das plantas. A e B: Plantas em aclimatização em	
	vasos de 0,5 L. C: Plantas PCR positivas aclimatizadas, em vaso	
	de 0,5L, transferidas para casa de vegetação. D: Plantas PCR	
	positivas para o gene D4E1 cultivadas em casa de vegetação em	
	vasos de 5 L	53
Figura 6 –	Análise de PCR de plantas de laranja doce transgênicas contendo	
	a construção gênica CaMV35S/D4E1 (A) e AtPP2/D4E1 (B). M:	
	marcador de 100 pb (Fermentas); C : controle negativo (DNA de	
	planta não transgênica); C ⁺ : controle positivo (reação com	
	plasmídeo); 1 a 3: laranja 'Hamlin'; 4 a 6: laranja 'Valência'; 7 a 9:	
	laranja 'Pêra'	54
Figura 7 -	Análise de Southern blot de plantas de laranja doce das cultivares	
	'Hamlin' (a), 'Pêra' (b) e 'Valência' (c) contendo a construção	
	gênica CaMV35S/D4E1. O DNA foi digerido com a enzima EcoRI	
	e hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene D4E1 e	
	terminador NOS. C ⁺ : controle positivo contendo amplicon D4E1-	
	NOS de 275 pb. C ⁻ : controle negativo (DNA de planta não	
	transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA digerido	

	com a enzima EcoRI de Iaranja 'Hamlin' (a); Iaranja 'Pera' (b) e	
	laranja 'Valência' (c)	56
Figura 8 -	Análise de Southern blot de plantas de laranja doce das cultivares	
	'Hamlin' (a), 'Pêra' (b) e 'Valência' (c) contendo a construção	
	gênica AtPP2/D4E1. O DNA foi digerido com a enzima EcoRI e	
	hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene D4E1 e	
	terminador NOS. C ⁺ : controle positivo contendo amplicon D4E1-	
	NOS de 275 pb. C: controle negativo (DNA de planta não	
	transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA digerido	
	com a enzima <i>Eco</i> RI de laranja 'Hamlin' (a); laranja 'Pêra' (b) e	
	laranja 'Valência' (c)	57
Figura 9 -	Quantificação relativa da expressão do transgene D4E1 dirigido	
	pelo promotor CaMV35S ou AtPP2 em laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e	
	'Valência'. As colunas correspondem ao valor médio da expressão	
	relativa, HS, PS e VS: plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin',	
	'Pêra' e 'Valência' contendo a construção gênica AtPP2/D4E1; HA,	
	PA e VA: plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e	
	'Valência' com a construção gênica CaMV35S/D4E1; HT: controle	
	negativo (planta não transgênica)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes de	
	referência ciclofilina e ubiquitina, e do gene D4E1 utilizados na	
	análise de qPCR	48
Tabela 2 -	Número e tipo de explantes introduzidos, explantes responsivos,	
	plantas PCR positivas e eficiência de transformação genética de	
	três cultivares de laranja doce, com a construção gênica	
	CaMV35S/D4E1	51
Tabela 3 -	Número de explantes introduzidos, explantes responsivos,	
	plantas PCR positivas e eficiência de transformação genética de	
	três cultivares de laranja doce, com a construção gênica	
	AtPP2/D4E1	52

.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja doce e maior exportador de suco de laranja concentrado do mundo. É o segundo maior produtor mundial de frutas cítricas, sendo a China o maior produtor mundial (FAO, 2012). Apesar do destaque de produção e da importância econômica que a citricultura representa, o país tem um histórico assinalado por uma sucessão de doenças causadas por vírus, bactérias e fungos, principalmente devido à baixa variabilidade genética (MACHADO; CRISTOFANI-YALY; BASTIANEL, 2011).

Atualmente, as doenças bacterianas são as que causam maiores prejuízos para os cultivos de laranja doce no Brasil e as cultivares comerciais não apresentam resistência às três principais doenças bacterianas, ou seja, à clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa*, ao cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e ao huanglongbing (HLB) associado a três espécies de 'Candidatus Liberibacter'. As medidas de controle para estas doenças têm sido associadas ao uso de mudas sadias obtidas de viveiros certificados, a eliminação de plantas doentes e a eliminação dos insetos vetores (HLB e CVC) (BOTEON; NEVES, 2005; KOIZUMI, 1993). Uma alternativa para controle de fitopatógenos bacterianos é a transformação genética com o objetivo produzir plantas que apresentem resistência aos mesmos (CARY et al., 2000). A transgenia é uma opção interessante, pois permite inserir características desejáveis às cultivares, que não podem ser obtidas através do melhoramento convencional, que é limitado à variabilidade genética obtida do cruzamento dos indivíduos (PEÑA et al., 2008).

Entre os possíveis genes a serem utilizados na transformação genética de plantas, estão os que codificam peptídeos antimicrobianos, destacando-se o *D4E1*, peptídeo sintético, derivado de uma cecropina, com potente atividade antimicrobiana comprovada *in vitro* (DE LUCCA et al., 1998; RAJASEKARAN, 2001) e *in vivo*, no controle de fitopatógenos de tabaco (CARY, et al., 2000), populus (MENTAG et al., 2003) e algodão (RAJASEKARAN et al., 2005).

Levando em consideração a ação do D4E1 contra diversos fungos e bactérias em plantas transgênicas, a obtenção de plantas de citros transgênicas das cultivares de laranja doce, com o gene *D4E1*, seria uma alternativa promissora para conferir resistência aos fitopatógenos bacterianos de citros.

Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de obter plantas transgênicas de laranja 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' expressando o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *AtPP2* (*Arabidopsis thaliana phloem protein 2*) de expressão preferencial no floema e *CaMV35S* (*Cauliflower mosaic vírus 35S promoter*) de expressão constitutiva e avaliar o nível de expressão do transgene das plantas obtidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da Citricultura

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

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

Entre as frutas comercializadas, as cítricas apresentam a maior expressão econômica mundial, tendo sido produzidas, no mundo, em 2010, mais de 123 milhões de toneladas de frutas cítricas (FAO, 2012). O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja, desde 1980, e atualmente, é o segundo maior produtor mundial de frutas cítricas, tendo em 2010 contribuído com 27,5% da produção total de laranjas. Em 2010, o país produziu 21.327.480 toneladas de frutas cítricas (FAO, 2012) e exporta cerca de 60% do suco de laranja consumido no mundo (IBGE, 2012).

O Brasil, a China e os Estados Unidos são responsáveis por 45,5% da produção mundial de laranja e 44,6% da produção mundial de frutas cítricas (FAO

2012). O setor citrícola promove grande fonte de emprego e renda no Brasil. A citricultura brasileira gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos, e o sistema agroindustrial citrícola movimenta aproximadamente US\$ 9 bilhões anualmente, de suco de laranja (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009). Aproximadamente 98% do suco produzido é exportado, principalmente, para os Estados Unidos e União Europeia, além do Japão e outros 45 países (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

No Brasil, a região responsável pela maior parte da produção é o sudeste, tendo o Estado de São Paulo mais de 79% da produção nacional, seguido pela Bahia (IBGE, 2012). O parque citrícola brasileiro é composto em 90% pelas cultivares de laranjas 'Hamlin', 'Pêra', 'Valência' e 'Natal' (CONAB, 2011). Constatase, portanto, que a citricultura brasileira está apoiada em um pequeno número de cultivares, o que tem contribuído para sua vulnerabilidade, principalmente, quanto à ocorrência de doenças, causando redução da produtividade. A média nacional de 50 kg planta-¹ano-¹ é considerada baixa, e atualmente, com o aumento no custo de produção devido aos gastos para controle e erradicação de plantas com sintomas do HLB, têm-se reduzido a margem de lucro ao produtor (AGRIANUAL, 2012). Em 2010, a produtividade de laranja doce no Brasil foi de 22,6 t ha-¹, enquanto que nos Estados Unidos, o segundo maior produtor de laranja do mundo foi de 28,7 t ha-¹ (FAO, 2012).

Ao longo da história da citricultura brasileira, várias doenças foram identificadas afetando a cultura, como a tristeza dos citros (CTV- Citrus tristeza virus), a pinta preta (Guignardia citricarpa Kiely), a verrugose (Elsione spp.), a rubelose (Corticium salmonicolor), a melanose (Diaporthe citri), a podridão floral (Colletotrichum acutatum), a podridão de Phytophthora spp. Entre as doenças causadas por bactérias citam-se o cancro cítrico (Xanthomonas citri subsp. citri), a clorose variegada dos citros (CVC - Xyllela fastidiosa) e o Huanglongbing (HLB), doença associada a três bactérias de 'Candidatus Liberibacter' (BOTEON; NEVES, 2005; FEICHTENBERGER, 2005).

Entre as doenças bacterianas de maior importância para a citricultura, destacam-se o cancro cítrico e o HLB, responsáveis por grandes danos e prejuízos ao setor (FIGUEIREDO et al., 2009).

2.2 Cancro cítrico

O cancro cítrico é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Esta espécie foi identificada e classificada pela primeira vez como *Pseudomonas citri* por HASSE (1915). Posteriormente, foi renomeada como *Bacillus citri* (HOLLAND, 1920) e depois, como *Phytomonas citri* (BERGEY et al., 1923). Em 1939, com a criação do gênero *Xanthomonas* (DOWSON, 1939) foi reclassificada como *Xanthomonas citri*, e mais tarde como *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (DYE et al.,1980). Em 1995, foi novamente reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995), e em 2006, teve a nomenclatura modificada, para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* que é a utilizada atualmente (SCHAAD et al., 2006).

As bactérias deste gênero estão sempre associadas a plantas. Foram relatadas a ocorrência de *Xanthomonas spp.* em mais de 124 espécies de monocotiledônias e 268 de dicotiledôneas, o que confirma a grande importância deste gênero, não só na cultura dos citros, mas também em várias outras. Existem centenas de subclassificações das espécies de *Xanthomonas*, estas estão relacionadas à espécie hospedeira (LEYNS et al., 1984).

Entre as doenças causadas pelas espécies de *Xanthomonas*, o cancro cítrico, também conhecido como cancrose A e cancro asiático, é a de maior ocorrência e gravidade. Causado pela estirpe A da *X. citri* subsp. *citri*, afeta laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limas doces (*C. limetta* Risso) e pomelos (*C. paradisi* Macfadye). Esta estirpe encontra-se disseminada em muitas regiões da Ásia, África, Oceania e Américas. (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

Além da estirpe A de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, outras duas variantes foram identificadas, denominadas de A* (VERNIÈRE et al., 1998) e A* (SUN et al., 2004). Ambas possuem limitada gama de hospedeiros e são consideradas menos severas para a citricultura quando comparadas com o tipo A. Produzem sintomas típicos do cancro cítrico. Apesar de possuírem patogenicidade restrita, semelhante à *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*, causadora das cancroses B e C, são geneticamente similares à *X. citri* subsp. *citri* (VERNIÈRE et al., 1998). A "bacteriose dos citros", detectada no México em 1981, em plantas de *Citrus aurantifolia* foi considerada como cancrose D, pela semelhança dos sintomas com os do cancro cítrico, e acreditava-se que esta doença estaria relacionada à ocorrência de uma estirpe D de

Xanthomonas citri, porém, posteriormente foi constatado que o agente etiológico é o fungo *Alternaria limicola* e a doença deixou de ser classificada como cancrose (PALM; CIVEROLO, 1994).

O cancro cítrico tem como provável fonte de origem o continente Asiático, do Sudeste da China, Indonésia ou Índia (KOIZUMI, 1985). No Brasil, foi detectado pela primeira vez, em 1957, na região de Presidente Prudente pela entrada de material contaminado (BITANCOURT, 1957; CIVEROLO, 1985).

No estado de São Paulo, desde a detecção do cancro cítrico, era realizada a erradicação das plantas sintomáticas. A partir de 1997, adotou-se a eliminação de plantas num raio de 30 metros da planta identificada com a doença. Após a introdução da larva minadora dos citros no Estado de São Paulo, houve um importante aumento na incidência do cancro cítrico o que levou a modificação da lei a partir de 1999. Nesta modificação, ficou determinada a eliminação de todas as plantas dos talhões infestados que tivessem mais de 0,5% de incidência. Para incidências iguais ou menores que 0,5%, as plantas doentes e as demais contidas num raio de trinta metros eram eliminadas. O cancro cítrico representa um alto dispêndio anual com inspeções e erradicações de plantas doentes. No Brasil, entre 1999 a 2008, foram gastos cerca de 476 milhões de dólares (BASSANEZI; BELASQUE JÚNIOR; MASSARI, 2009). Gottwald (2000) estimou que nos Estados Unidos, entre 1995 e 2005, o impacto econômico do cancro cítrico, em um bilhão de dólares com inspeções, erradicação e indenizações.

Apesar do significativo controle da doença que era realizado pela erradicação de plantas doentes, no Brasil, desde 2009, a erradicação de plantas e ou talhões contaminados deixou de ser uma obrigação, ficando sob responsabilidade do produtor o controle da doença. Esta medida promoveu um rápido aumento nos níveis de incidência da doença nos talhões de citros passando de 0,14%, para 0,44% em 2010 e estimada em 1% em 2011 (BELASQUE JÚNIOR; BEHLAU, 2011). Este aumento vem ameaçando a citricultura nacional.

Em citros, a infecção por *Xanthomonas* ocorre pela entrada em tecidos jovens por meio de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, ou por ferimentos em tecidos maduros (BROWN, 2001). A larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), também contribui para a disseminação, pois, apesar de não ser vetor da doença, colabora com a disseminação por causar ferimentos nas folhas, tornando-as suscetíveis à infecção pela bactéria causadora da doença (BELASQUE JÚNIOR et

al., 2005). Durante a alimentação, as larvas rompem a cutícula e a epiderme expondo o mesófilo foliar, tornando o hospedeiro mais suscetível à infecção (CHAGAS et al., 2001; JESUS JUNIOR et al., 2006).

A disseminação a curtas distâncias ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas que associadas com ventos, promovem uma maior disseminação e a longa distância dá-se pelo transporte de material vegetal infectado. No Brasil, o cancro cítrico é mais severo no início do verão, quando altas temperaturas, chuvas intensas e ventos ocorrem ao mesmo tempo e num período no qual as plantas hospedeiras apresentam grande quantidade de tecidos imaturos (ramos, folhas e frutos) (CIVEROLO, 1985).

Após penetrarem no hospedeiro, as bactérias multiplicam-se nos espaços intercelulares e produzem polissacarídeos extracelulares, principalmente a goma xantana, que desempenha um papel importante na patogenicidade e na sobrevivência da bactéria, oferecendo proteção contra radiação UV, congelamento e dessecação (LEACH et al.; 1957; MEYER; BOGDANOVE, 2009). A diminuição dos espaços intercelulares e o acúmulo de goma resultam em aspecto de encharcamento no tecido infectado, uma vez que ocorre o aprisionamento da água do xilema devido ao potencial higroscópico da goma (PADMANABHAM et al., 1974). Posteriormente, durante a infecção foliar ou vascular, as células vegetais adjacentes às colônias de bactérias começam a se degradar. As organelas vegetais se degeneram, a parede celular se fragmenta e finalmente as bactérias invadem e se multiplicam dentro da célula vegetal (RUDOLPH, 1993).

As plantas contaminadas com a bactéria apresentam inicialmente manchas oleosas circulares na superfície abaxial das folhas e depois também na superfície adaxial. Essas lesões tornam-se coriáceas e circunscritas por um halo amarelo. Sintomas da doença também ocorrem no caule e frutos. Quando atingem uma grande área da planta, podem ocasionar desfolha e queda de frutos. O sintoma de cancro, ocorre pela hiperplasia celular, que é resultante da atividade do gene *pthA* da bactéria, que codifica uma proteína de sinalização de divisão celular, secretada pelo sistema de secreção tipo III (SSTT) da bactéria e causa divisões celulares excessivas no hospedeiro (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Os sintomas do cancro cítrico em si não constituem o maior problema ocasionado pela doença, pois, raramente, levam a planta à morte. Todavia, devido ao estresse biótico, a planta responde produzindo diversas substâncias, levando a

um desequilíbrio hormonal (CROZIER et al., 2001). Após a entrada do patógeno na planta, esta inicia a produção de etileno como resposta de defesa ao patógeno, o que desencadeia a queda prematura de frutos imaturos. Os frutos que caem são inadequados tanto para o mercado de frutas frescas quanto para o processamento de sucos (GOTO et al., 1980).

As espécies e cultivares de citros apresentam grande variação quanto à resistência a esta doença, porém nenhuma é totalmente imune. São classificadas como moderadamente resistentes as cultivares 'Valência' e 'Pêra' premunizada, moderadamente suscetível a cultivar 'Natal' e como suscetíveis as cultivares 'Hamlin', 'Bahia', 'Baianinha' e 'Seleta' (FEICHTENBERGER et al., 2005). Para a prevenção e controle do cancro cítrico, além do uso de mudas sadias e eliminação de plantas doentes, é recomendado o uso de quebra-ventos para reduzir riscos de introdução e disseminação do patógeno, fazer aplicações de cobre em fluxos vegetativos novos em pomares próximos a áreas contaminadas e realizar a descontaminação de materiais e equipamentos utilizados nas (BASSANEZI; BELASQUE JÚNIOR; MASSARI, 2009). É previsto o aumento desta doença, devido a não obrigatoriedade da eliminação de plantas doentes (BELASQUE JÚNIOR; BEHLAU, 2011).

Devido à inexistência de genótipos resistentes, a transformação genética de variedades comerciais de citros é uma das mais promissoras estratégias para combater esta doença (YANG et al., 2011).

2.3 Huanglongbing

O huanglongbing (HLB) foi primeiramente constatado na China. Este nome tem origem chinesa e significa "doença do ramo amarelo". Antes da adoção do termo como nome oficial da doença, o HLB teve outras denominações como likubin (Taiwan), leaf mottling (Fillipinas), die back (Índia), vein-phloem degeneration (Indonésia) e greening (África do Sul) (FEICHTENBERGER et al., 2005; BOVÉ, 2006).

O HLB é associado a bactérias Gram-negativas restritas ao floema e que, por enquanto, não tiveram o Postulado de Koch fechado. Devido a isto, o nome desses organismos conta com a palavra *Candidatus* antes do binômio latino (LARANJEIRA et al., 2005). De acordo com as normas de nomenclatura de organismos ainda não

classificados, o termo *Candidatus*, em itálico com a primeira letra maiúscula, precede o nome em latim da espécie, que deve ser grafada de acordo com as normas de termos binomiais, mas não em itálico; o termo completo deve sempre ser citado entre aspas: "*Candidatus* Liberibacter americanus" (Bul, et. al., 2008).

Apesar de existir um trabalho que relata o isolamento *in vitro* das bactérias associadas à doença, segundo o autor, o isolamento foi realizado utilizando meio de cultura semelhante ao utilizado para crescimento de *Xyllela fastidiosa*, acrescido de fosfatos, NADP, cicloheximida e extrato de homogeneizado de pecíolo e nervura central de folha de laranja doce (SECHLER et al., 2009). Apesar do Postulado de Koch não ter sido completado, os autores consideram que seus resultados confirmam a associação dessas bactérias com o HLB em citros. Porém, outros grupos vêm tentando repetir esse isolamento, sem sucesso (MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLETTA-FILHO, 2010).

As bactérias associadas ao HLB são "Candidatus Liberibacter africanus" (CLaf), "Candidatus L. asiaticus" (CLas), e "Candidatus L. americanus" (CLam) sendo que a classificação foi feita dando o nome do continente no qual foram detectadas pela primeira vez (BOVÉ, 2006; JAGOUEIX; BOVE; GARNIER, 1994). No Brasil, a espécie CLam foi a bactéria de maior ocorrência até 2004, porém, a partir de 2008, a ocorrência de CLas passou a ser mais frequente que a CLam (LOPES et al., 2009a). A explicação para esta diferença se dá pela quantidade de bactéria CLam, em plantas de citros, ser menor que a quantidade de CLas, o que resulta em uma menor eficiência de transmissão da CLam pelo inseto vetor (LOPES et al., 2009b) além da maior tolerância a alta temperatura apresentada pela CLas. Esta diferença de transmissão explica a diminuição na ocorrência de CLam e o aumento da ocorrência de CLas nos pomares do Estado de São Paulo (LOPES et al., 2009b).

A transmissão da doença ocorre por material de propagação contaminado ou por psilídeos. Estes são insetos sugadores do floema, que atuam como vetores da doença. Existem duas espécies de psilídeos vetores do HLB, o *Diaphorina citri* (ZHAO, 1982; BOVÉ 2006), vetor da doença no Brasil e Ásia, e o *Trioza erytreae*, vetor na África (DA GRAÇA, 1991). O *D. citri* tem preferência por brotações jovens, o ciclo biológico varia de 15 a 40 dias, cada fêmea deposita aproximadamente 800 ovos (PARRA et al., 2010). O psilídeo adquire a bactéria com maior eficiência ainda

na fase ninfal, porém a aquisição também já foi constatada em adultos. Ninfas infectadas podem transmitir o patógeno mesmo após a ecdise para a fase adulta (INOUE et al., 2009).

Na família Rutaceae existem outras espécies hospedeiras da bactéria, com destaque para a *Murraya* spp., planta comumente utilizada como ornamental. Esta é hospedeira preferencial de *D. citri* e hospedeira de bactérias associadas ao HLB, portanto recomenda-se a eliminação de murtas próximas a pomares de citros (LOPES et al., 2006).

Nas espécies de citros, existem controvérsias quanto à possibilidade de existência de resistência ao HLB, embora alguns autores afirmem não haver cultivares com maior ou menor resistência ao HLB (BOVÉ, 2006). O grupo dos trifoliatas (*Poncirus trifoliata* Raf.), incluindo seus híbridos são considerados mais tolerantes (MARENGO et al., 2009), ou seja, as bactérias associadas ao HLB se desenvolvem em seus tecidos, mas não há manifestação de sintomas (LARANJEIRA et al., 2005). Recentemente um estudo classificou híbridos de citrange Carrizo e outros porta-enxertos quanto à sua tolerância à infecção por Clas. Segundo esta classificação, Carrizo US-897 e US-942 são tolerantes, US-802, US-812 e limão 'Volkameriano' são moderadamente tolerantes e tangerina 'Cleopatra' é suscetível (ALBRECHT; BOWMAN, 2012b).

O HLB é, atualmente, a mais grave e devastadora doença de citros no mundo (BOVÉ, 2006), principalmente devido à dificuldade de controle do vetor e à facilidade de disseminação da doença dentro do pomar. (BASSANEZI et al., 2010; BELASQUE JÚNIOR et al., 2010). Uma vez infectadas, não há cura para as plantas de citros (LOPES et al., 2006).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu simultaneamente pelo Fundecitrus e pelo Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica de Citros Sylvio Moreira-IAC em junho de 2004, em pomares próximos ao município paulista de Araraquara (COLETTA FILHO et al., 2004). A confirmação da presença da bactéria em plantas sintomáticas só pode ser realizada pelo uso de microscopia eletrônica (BOVÉ, 2006) ou por meio de técnicas moleculares, sendo o mais comum o uso da PCR (COLETTA FILHO; CARLOS, 2010). Quando comprovada a presença da bactéria, a identificação de "Candidatus Liberibacter spp." é baseada na amplificação da sequência do gene 16S, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico

(rDNA 16S) utilizando-se *primers* específicos de cada espécie (JAGOUEIX; BOVE et al.,1994).

Os sintomas das plantas infectadas com as bactérias associadas ao HLB não são sempre os mesmos e podem ocorrer isoladamente ou em conjunto. Os mais frequentes incluem ramos amarelados, folhas mosqueadas, reduzido tamanho e assimetria dos frutos, abortamento de sementes e maturação incompleta. Os sintomas do HLB nas folhas podem ser confundidos com os da tristeza do citros, infecção por *Phytophthora* e deficiência de alguns nutrientes, o que dificulta a identificação da doença no campo (BOVÉ, 2006).

Nas folhas de plantas com sintomas do HLB é encontrado excesso de amido, quando comparado a folhas de plantas não sintomáticas. Alguns autores acreditam que este amido seria proveniente do amido normalmente acumulado nas raízes que são redistribuídos para o restante da planta, levando ao rompimento de cloroplastos, causando mosqueados nas folhas, ou até mesmo clorose (ETXEBERRIA et al., 2009). Uma outra explicação para o acúmulo de amido nas folhas seria devido a emissão de compostos voláteis pelo patógeno que afeta o metabolismo de carboidratos primários promovendo o acúmulo de amido nas folhas (EZQUER et al., 2010). Este estudo foi realizado em outras culturas, porém, em citros já foi comprovado que a ocorrência do acúmulo de amido está relacionada com a superexpressão da enzima transportadora de glicose-6-fosfato e outras enzimas associadas a biosíntese de amido e a sub-expressão da enzima tioredoxina e enzimas envolvidas com a oxidação do amido. Isto sugere que a infecção por "Candidatus Liberibacter spp." em citros deve ter um mecanismo semelhante de acúmulo de amido para garantir a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (ALBRECHT; BOWMAN, 2012a).

Em plantas sintomáticas também existe a formação de calose nos elementos de tubos crivados do floema, o que impede a distribuição de fotoassimilados. Esta obstrução ocorre pelo aumento da expressão de genes da síntese de proteínas e calose no floema. Desta forma, estas substâncias são depositadas nos elementos de tubo crivado do floema, impedindo o fluxo da seiva elaborada para as flores, frutos, folhas jovens e sistema radicular (KIM et al., 2009), causando diminuição na formação de raízes secundárias (DA GRAÇA, 1991; ETXEBERRIA et al., 2009), morte de ponteiros, diminuição da produtividade, diminuição do tamanho dos frutos, assimetria, bem como aumento da acidez e diminuição do teor de sólidos solúveis,

causando diminuição da qualidade dos frutos (DAGULO et al., 2009). Trabalhos que avaliaram plântulas obtidas a partir de sementes de plantas sintomáticas comprovam que não ocorre a disseminação da "*Ca.* Liberibacter sp." via sementes (ALBRECHT; BOWMAN, 2009; HARTUNG et al., 2010; VAN VUUREN et al., 2011).

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

As pesquisas para o desenvolvimento de plantas que sejam resistentes ou tolerantes ao HLB por transformação genética vêm sendo intensificadas (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Após a transformação genética, há a necessidade de propagar as plantas e desafiá-las com as bactérias associadas à doença, porém existe uma grande dificuldade na obtenção de inoculações eficientes utilizando-se psilídeos, além do tempo demandado para que as bactérias se multipliquem nos tecidos das plantas comecem a apresentar sintomas ou possam ser detectadas através das análises moleculares (FELIPE, 2011).

2.4 Transformação genética de citros

Apesar das cultivares comerciais terem sido selecionadas através do método de melhoramento por cruzamentos, este tipo de melhoramento é dificultado devido às características da biologia reprodutiva dos citros, tais como esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, alta heterozigose, longo período juvenil e poliploidia (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Tendo em vista estes problemas enfrentados no melhoramento genético de citros pelo método convencional, a transformação genética oferece uma importante alternativa, pois, possibilita a introdução de genes sem alterar as características das cultivares. Estes genes poderiam ser advindos de outras espécies cítricas ou mesmo de plantas de outras

espécies ou de bactérias, fungos, insetos, ampliando as possibilidades de melhoramento (PEÑA et al., 2008).

Através da transgenia é possível realizar a inserção estável de um transgene em um genoma hospedeiro dando origem a um indivíduo geneticamente igual ao receptor da molécula de DNA recombinante, porém, acrescido de uma característica diferente e particular (QUECINI; VIEIRA, 2001). Esta técnica tem apresentado grande potencial para a obtenção de novas cultivares, por tornar possível a introdução de genes que conferem características agronômicas desejáveis, de forma controlada, sem a transferência de características deletérias (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990).

Em citros, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem se mostrado eficiente na obtenção de plantas transgênicas (MOORE et al., 1992), sendo aplicada para transformação de laranja doce, laranja azeda, limão, toranja, *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos (PEÑA et al., 2003). Porém, neste sistema, o sucesso para obtenção de plantas transgênicas é dependente do genótipo e sua afinidade com a *Agrobacterium tumefaciens* (ALMEIDA et al., 2003). Ressalta-se ainda que a eficiência de transformação genética de citros varia de acordo com a construção gênica utilizada (GHORBEL et al., 2000; MIYATA et al., 2011).

Na transformação genética, os tipos de tecidos vegetais utilizados são diversos. Em citros, os mais utilizados são os segmentos de epicótilo (CERVERA et al., 2000; BOSCARIOL et al., 2003), mas também utilizam-se segmentos de hipocótilo ligado ao cotilédone (TAVANO et al., 2009), cotilédones (KHAWALE et al., 2006) segmentos de internódios de plantas adultas, obtidos em casa de vegetação (ALMEIDA et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2008) e protoplastos transformados através da eletroporação (NIEDZ et al., 2003). A regeneração de brotos na transformação genética pode ser direta ou indireta, pela indução de calos, dependendo das condições que o explante é submetido (GARCÍA-LUIS et al., 1999).

Para facilitar a seleção de plantas transgênicas são utilizados genes de seleção. Existem diferentes tipos de genes de seleção incluindo o gene *bar*, de *Streptomyces* que codificam a proteína PAT, fosfinotricina acetil-transferase, conferindo resistência ao herbicida glufosinato de amônio (WHITE; CHANG; BIBB, 1990); o gene *nptll* de *Escherichia coli*, o qual codifica a neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência a antibióticos aminoglicosideos contendo grupo 3'-hidroxila

como a canamicina (DATLA et al., 1992); o gene *hpt* de *E. coli* o qual codifica a higromicina B fosfotransferase, conferindo resistência ao antibiótico higromicina B (DUTT; LEE; GROSSER, 2010b) e o gene *man*A, derivado da *E. coli*, que codifica fosfomanose isomerase permitindo a metabolização da manose (BOSCARIOL et al., 2003).

Além dos genes de seleção, na transformação genética podem ser utilizados genes repórteres, que permitem selecionar os brotos transformados dos demais. Exemplos de genes repórteres são o *GFP* e *EGFP* os quais codificam a proteína GFP (*green fluorescent protein*), visível quando submetida à luz ultra violeta, método não destrutivo (DUTT; GROSSER, 2009) e o gene β-glucuronidase *uidA* (GUS), visualizado por análise histoquímica com o X-GLUC (5-bromo-4cloro-3-indolil glucuronida), tem como desvantagem ser um método destrutivo (CERVERA, 2005).

Em citros embora existam trabalhos de transformação genética visando melhorar a qualidade dos frutos (LI; SHI; DENG, 2003; COSTA; OTTONI; MOORE, 2002), aumentar tolerância a salinidade (CERVERA, et al., 2000), diminuir o período juvenil (PEÑA, et al., 2001), a maioria dos trabalhos de transformação são realizados visando inserir ou aumentar a resistência a patógenos como *Phythophthora citrophthora* (FAGOAGA et al., 2001), *Xylella fastidiosa* (AZEVEDO, 2005), o vírus da tristeza dos citrus (DOMÍNGUEZ et al., 2002; FAGOAGA et al., 2005), *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (BARBOSA-MENDES et al., 2009; BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2009; HE et al., 2011).

Visando resistência a patógenos, na transformação genética, podem ser utilizados genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese; genes que estimulam o sistema de defesa das plantas; genes maiores de resistência; genes de avirulência derivados do próprio patógeno; genes que codificam peptídeos antimicrobianos e genes do próprio genoma do patógeno, baseando-se na resistência derivada do patógeno (MOURÃO FILHO; STIPP; MENDES, 2010).

2.5 Promotores de expressão gênica

Os promotores controlam a expressão gênica podendo ser constitutivos, promovendo a expressão generalizada em todas as células do organismo, ou de expressão preferencial em algum tecido específico. Além do promotor *CaMV35S*, amplamente utilizado como promotor constitutivo, existem outros promotores

também já foram identificados e utilizados em transformações genéticas. Ente estes, citam-se o nopaline synthase (NOS) (SANDERS et al., 1987), o figwort mosaic vírus (FMV) (SANGER et al., 1990); o Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid mannopine synthetase (mas) (SANGER et al., 1990); Ubiquitin 1 gene promoter (Ubi1) (MCELROY; BRETTELL, 1994).

Os promotores constitutivos são amplamente utilizados para expressar genes de seleção e/ou genes repórteres (MCELROY; BRETTELL, 1994). Na transformação genética de citros, tem sido empregado promotores constitutivos visando expressar o transgene em todos seus os tecidos, para controle de patógenos com ocorrência generalizada na planta, como a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, que coloniza todos os órgãos das plantas (MENDES et al., 2009; HE et al., 2011). Porém, em certas circunstâncias é desejável a expressão preferencial em tecidos ou órgãos das plantas. Com isso, evita-se a produção constante do produto do transgene (GUO et al., 2004). Considera-se que promotores derivados de plantas sejam mais indicados na transformação genética de citros, visto que, apesar da expressão de genes, dirigido por promotores derivados de plantas ser menor, estes são mais aceitos pelos consumidores, em relação a um promotor que não seja derivado de plantas (DUTT et al., 2012).

Em plantas de citros, a expressão de um peptídeo antimicrobiano no floema, em especial, em folhas jovens, pode ajudar no controle do HLB, visto que esta doença está associada a bactérias restritas ao floema (DUTT et al., 2012). Outra vantagem da expressão preferencial no floema é que evita a presença do transgene nos frutos (DUTT; BARTHE; GROSSER, 2010a; ZHAO; LIU; DAVIS, 2004).

Em Curcubitaceas, dentre mais de 100 proteínas do floema, estão as *phloem protein 1* (PP1) e *phloem protein 2* (PP2), altamente expressas nas células companheiras e transportadas para o floema. Trabalhos comprovam a expressão preferencial no floema em plantas de tabaco transgênicas contendo o promotor da PP2 (GUO et al., 2004; JIANG et al., 1999).

Diversos promotores têm sido identificados em plantas. Alguns destes promotores estão sendo utilizados na transformação genética, visando a expressão preferencial em algum tecido específico. No caso de promotores de floema, são utilizados os promotores de genes de plantas que se expressam preferencialmente no floema, como o *Citrus sinensis sucrose synthase-1 promoter, CsSUS1p* (SINGER et al., 2011), *Arabidopsis thaliana phloem protein* 2 (*AtPP2*), *Citrus phloem protein* 2

(CsPP2), Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2 (AtSUC2) (MIYATA et al., 2012), rice sucrose synthase-1, RSs-1 (RAO, et. al 1998; WANG et al., 2005; DUTT et al., 2012), yellow stripe 1, (OsYSLs) (KOIKE et. al., 2004). Para a expressão preferencial no floema, também são utilizados promotores de genes de vírus limitados ao floema, como o coconut foliar decay virus (CFDV) (HEHN; ROHDE, 1998) e o rice tungro bacilliform virus (RTBV) com forte expressão como promotor em plantas de citros (DUTT et al., 2012).

Em citros transgênicos contendo gene *uid*A dirigido pelos promotores *AtPP2*, *CsPP2*, *AtSUC2*, RSs-1 e RTVB foi comprovada a expressão da enzima β – glucuronidase preferenciamente expressa no floema (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012).

2.6 Peptídeo antimicrobiano D4E1

Pequenos peptídeos antimicrobianos vêm sendo identificados em vários organismos, desde bactérias até humanos e são reconhecidos como importantes componentes do sistema de defesa e imunidade inata em insetos, anfíbios, plantas e mamíferos (HANCOCK; LEHRER, 1998). Existem vários tipos de estruturas e atividades contra bactérias, fungos, vírus e protozoários, sendo que todos agem na destruição da integridade de membranas celulares (NIIDOME et al., 1999). Em plantas, esses peptídeos podem ser produzidos constitutivamente ou somente quando a mesma sofre algum tipo de injúria ou infecção (GABAY, 1994).

Entre os vários peptídeos antimicrobianos, cita-se o D4E1, originário de uma cecropina. As cecropinas podem ser nativas (Cecropina B), mutantes (SB37 e MB39) ou sintéticas (Shiva-1 e D4E1) (TRIPATHI; TRIPATHI; TUSHEMEREIRWE, 2004). As três principais cecropinas são A, B e D, as quais foram isoladas da hemolinfa de pupas de *Hyalophora cecropia* (VAN HOFSTEN et al., 1985). O modo de ação das cecropinas é pela formação de poros ou canais através da membrana bacteriana (BECHINGER, 1997) atuando contra bactérias Gram-positivas e Gramnegativas, mas, aparentemente são inativas em células eucarióticas (COCIANCICH et al., 1994).

O uso de peptídeos antimicrobianos sintéticos em aplicação direta tem alto custo, o que impossibilita este tipo de utilização, apesar do grande potencial contra fitopatógenos. No entanto, a transgenia possibilita a expressão desses peptídeos

sintéticos em plantas, resultando em economia no que se refere a gastos com a aplicação do peptídeo (RAJASEKARAN et al., 2001).

O modo de atuação do peptídeo sintético D4E1, assim como de outros peptídeos sintéticos, está provavelmente relacionado à interação com membranas baseadas na posição das cargas de seus aminoácidos (RAJASEKARAN et al., 2001). A interação anfipática de peptídeos, entre eles e com membranas biológicas, é um fenômeno complexo que não é bem entendido, não sendo totalmente esclarecido o modo de ação destes peptídeos antimicrobianos em plantas transgênicas (CARY et al., 2000).

Os peptídeos antimicrobianos possuem carga positiva e são atraídos pelas membranas celulares e nelas podem se ligar à bicamada lipídica, dependendo de sua composição e se inserir na membrana provocando a permeabilidade celular. Além disso, podem penetrar no citosol onde podem se ligar ao DNA ou RNA e/ou proteínas e interromper a replicação do DNA, síntese de RNA ou atividade das enzimas. Dependendo do peptídeo a ação intracelular podem levar a morte da celula. Outros modos de ação dos peptídeos antimicrobianos são a interrupção da síntese da parede celular, arquitetura, ou má formação celular (MARCOS et al., 2008). Cada peptídeo tem um modo de ação diferente variando entre estas interações descritas, porém esta deve ser determinada para cada peptídeo em particular. No caso do D4E1, sabe-se que ele interage com o ergosterol, que é um lipídio específico de membranas de fungos (DE LUCCA et al., 1998), porém, este não deve ser o único modo de ação deste peptídeo, visto que já foi comprovada a sua eficiência tanto no controle de fungos quanto no controle de bactérias fitopatogênicas (RAJASEKARAN et al., 2001).

O D4E1 possui 17 aminoácidos em conformação de folha beta quando em solução, sem alterar-se quando interage com membranas celulares (DE LUCCA et al., 1998). A toxicidade de cecropinas para células de mamíferos é baixa. Testes com cecropinas A e B demonstraram que, mesmo utilizando-se 300 vezes mais que a quantidade necessária para eliminar bactérias, não houve lise euritrocitos e células de insetos (STEINER et al., 1981). Testes de atividade hemolítica do D4E1 em células de mamíferos confirmaram a baixa toxicidade do peptídeo, nas concentrações utilizadas com sucesso na eliminação de fitopatógenos (J.M.JAYNES, dados não publicados, apud CARY et al., 2000).

Plantas de laranja doce transgênicas expressando cecropina B e Shiva A na mesma planta indicaram significativo aumento da resistência a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* quando comparadas às plantas não transgênicas (HE et al., 2011). Testes de inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas destacadas de laranja 'Valência' contendo o gene da cecropina apresentaram maior tolerância a incidência e severidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (AZEVEDO, 2005). Plantas de citrus contendo esta mesma construção gênica, também foram avaliadas em casa de vegetação quanto à resistência a *Xylella fastidiosa*, e um dos eventos apresentou inibição do crescimento desta bactéria (PAOLI, 2007).

A expressão de peptídeos sintéticos em plantas transgênicas apresenta vantagens em relação aos seus análogos naturais, tais como maior especificidade e maior eficácia em baixas concentrações, além de apresentar a metade do tamanho de peptídeos naturais, sem contaminação ou toxicidade para o tecido da planta transgênica (CARY et al., 2000), além de apresentar maior resistência a degradação, comparado à cecropina natural (BALLWEBER et al., 2002). Esses peptídeos podem ser sintetizados de forma automatizada, sendo possível a realização de testes de uma ampla quantidade deles (CARY et al., 2000). Trabalhos demonstram a eficiência do peptídeo D4E1 na inibição do crescimento de fitopatógenos. Para controle desses organismos a aplicação de concentrações mínimas de 25 µM, 4,67 µM e 1,25 µM foram suficientes para completa inibição e controle dos patógenos *Alternaria alternata*, *Phytophthora parasitica* e *Xanthomonas campestres* pv. *malvacearum* estirpe 18, respectivamente (RAJASEKARAN et al., 2001).

Estudo pioneiro de transformação genética de tabaco com o gene que codifica o peptídeo antimicrobiano sintético D4E1 apresentou sucesso no controle de crescimento dos fungos *Aspergilus flavus* e *Verticilium dahlie*, os quais apresentam importância econômica para culturas como algodão, amendoim, milho e nozes (CARY et al., 2000). Foram testados com êxito, tanto a ação antifúngica de plantas transgênicas, quanto o D4E1 purificado contra vários fitopatógenos (RAJASEKARAN et al., 2001), e estes conferiram resistência a um amplo espectro de bactérias e fungos fitopatogênicos (CARY et al., 2000).

Testes deste peptídeo na eliminação de *Rhizoctonia solani* resultaram em crescimento anormal das hifas, e em *Aspergilus flavus* houve redução da germinação de esporos (RAJASEKARAN et al., 2005).

Em tabaco transgênico a expressão do peptídeo D4E1 constitutivamente promoveu diminuição dos sintomas causados por *Colletotrichum destructivum*, e o extrato das folhas de tabaco transgênico promoveu diminuição da germinação dos conídios dos fungos *Aspergillus flavus* e *Verticillium dahliae* (CARY et al., 2000). Híbridos de populus transgênicos, (*Populus tremula L. x Populus alba L.*) contendo o gene *D4E1* apresentaram diminuição da severidade dos sintomas causados por *Xanthomonas populis* pv. *populi* e *Agrobacterium tumefaciens* (MENTAG et al., 2003) e em sementes de algodão transgênico contendo o gene *D4E1* promoveu a diminuição da colonização de *Aspergillus flavus* (RAJASEKARAN et al., 2005).

Visando determinar concentrações mínimas para eliminar as bactérias associadas ao HLB, devido a impossibilidade do cultivo destas bactérias *in vitro*, alguns pesquisadores estão utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, em substituição às bacterias associadas ao HLB, visto que as duas são classificadas como alfaproteobactérias e existe semelhança entre proteínas de membrana destas bactérias (STOVER et al, 2010).

Portanto, acredita-se que, o D4E1, tendo sido eficiente no controle de *Xanthomonas populis* pv. *populi* e *Agrobacterium tumefaciens*, possa ser eficiente no controle de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e das bactérias associadas ao HLB em citros transgênicos.

Tendo em vista a ausência de resistência de citros às principais doenças bacterianas e os resultados apresentado pelo peptídeo D4E1 no controle de fitopatógenos em outras culturas, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de obter plantas de laranja doce transgênicas expressando o peptídeo *D4E1*. As transformações genéticas das cultivares 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' foram realizada via *Agrobacterium tumefaciens*. Visando expressar o gene *D4E1* preferencialmente no floema, utilizou-se a construção gênica contendo o promotor *AtPP2* (*AtPP2/D4E1*), objetivando promover resistência a fitopatógenos restritos a este tecido. Para expressar o peptídeo D4E1 constitutivamente, utilizou-se a construção gênica contendo o promotor *CaMV35S* (*CaMV35S/D4E1*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) das cultivares 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' foram extraídas de frutos maduros fornecidos pelo Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira- IAC, localizado em Cordeirópolis, SP.

Após a extração manual, as sementes foram secas por 16 horas a temperatura ambiente e armazenadas a 10 °C por uma semana. Na ocasião da semeadura, as sementes tiveram o tegumento externo retirado e realizou-se a assepsia por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,0%, durante 15 minutos, sob agitação, seguida de tríplice lavagem em água destilada e esterilizada, em condições assépticas. As sementes foram introduzidas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g de sacarose e phytagel a 2 g L⁻¹, permanecendo por 30 dias a 27 °C, na ausência de luz. Após o processo de germinação e alongamento do epicótilo, as plântulas permaneceram em sala de crescimento, a 27 °C sob fotoperíodo de 16h, durante 15 dias (Figura 1A). Após este período, os epicótilos das plântulas foram utilizados como fonte de explantes para os experimentos de transformação genética (Figura 1B).

Além dos epicótilos utilizados como fonte de explantes, para a laranja 'Pêra', devido à dificuldade de regeneração de brotos apresentada por este cultivar nos experimentos de transformação genética, foi realizada uma transformação utilizandose como fonte de explantes os hipocótilos ligados ao cotilédone, extraídos de sementes que emitiram a radícula. Utilizou-se o protocolo semelhante ao utilizado por Tavano et al. (2009). Para tanto, procederam-se todas as etapas de retirada do tegumento e assepsia, semelhantes às realizadas para as outras sementes e foram transferidas cinco sementes por frasco tipo Magenta (6,5 x 6,5 x 10 cm), contendo 50 mL de meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g de sacarose, permanecendo por 10 dias a 27 °C, na ausência de luz. Após este período, as radículas estavam com aproximadamente 1 cm, prontas para serem utilizadas como fonte de explantes para transformação (Figura 1C). No momento da transformação, com auxílio de bisturi, os cotilédones foram separados, e o hipocótilo

foi cortado no sentido longitudinal. Além disso, foram removidos o embrião e parte da radícula. Os cotilédones foram cortados ao meio no sentido transversal, contendo o cotilédone ligado ao hipocótilo e utilizados como fonte de explantes (Figura 1D).

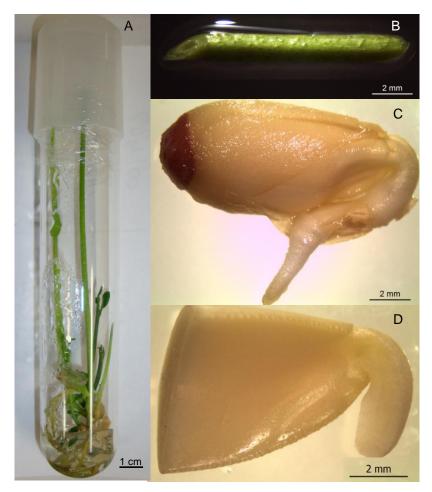


Figura 1 - Fontes e tipos de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética. A: Plântulas utilizadas como fonte de explante de epicótilo. B: Segmento de epicótilo utilizado como explante nos experimentos de transformação genética. C: semente de laranja 'Pêra' com a radícula emitida. D: segmento de hipocótilo ligado ao cotilédone utilizado como explante

3.2 Construções gênicas

A síntese do gene *D4E1*, clonagem do mesmo, clonagem dos vetores e transformação das *Agrobacterium tumefaciens* foram realizadas pelo Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo e cedidas para a realização deste trabalho. A seguir, são descritas as principais etapas realizadas para síntese,

clonagem e transformação das bactérias utilizadas neste experimento. O gene D4E1 tem o tamanho de 69 pb e sua sequência de nucleotídeos é a seguinte:

CCATGGGATTTAAGTTGAGAGCTAAGATTAAGGTTAGATTGAGAGCTAAGATTAA GTTGTAAGGTGACC

Inicialmente, o gene *D4E1* foi amplificado por PCR, utilizando oligos que se anelam nas suas extremidades 3' e que possuem os sítios de restrição *Ncol* e *BstEII*. Nas sequências de oligos utilizadas, descritas a seguir, os nucleotídeos destacados em negrito correspondem a região em que os oligos se anelam e os nucleotídeos sublinhados correspondem aos sítios *Ncol* (CCATGG) e *BstEII* (GGTCACC) utilizados para a posterior clonagem do gene:

D4E1-F: 5' – <u>CCATGG</u>GATTTAAGTTGAGAGCTAAGATTAAGGTTAGATTGAG – 3'
D4E1-R: 5' – <u>GGTCACC</u>TTACAACTTAATCTTAGCT**CTCAATCTAACCTTAATC** – 3'

O produto amplificado (69 pb), correspondente a sequência do gene *D4E1*, foi clonado no plasmidio pGEM®-T (Promega) e sequenciado. Em seguida, foram realizadas clonagens para obtenção do cassete de expressão nos plasmídeos pCAMBIA1201/*CaMV35S* ou pCAMBIA1201/*AtPP2* que contêm o gene *uidA*, sob controle do promotor *CaMV35S* ou *AtPP2*. O gene *D4E1* clonado no vetor pGEM®-T foi transferido, separadamente, para esses plasmídeos, em substituição ao gene *uidA*, nos sítios de restrição *Ncol* e *BstE*II. Esta etapa foi realizada para facilitar a inserção do gene *D4E1*, uma vez que a enzima de restrição *Ncol* cliva duas vezes o plasmídeo pCAMBIA 2201 (Figura 2). Isto dificultaria a clonagem direta do gene nesse vetor de expressão.

Posteriormente, o conjunto formado pelo promotor (*CaMV35S* ou *AtPP2*) e gene *D4E1* foi transferido do plasmídeo pCAMBIA 1201 ou pCAMBIA1201/AtPP2, separadamente, para o pCAMBIA 2201, também em substituição ao gene *uid*A, nos sítios de restrição *Eco*RI e *BstE*II (Figuras 3 e 4). Os plasmídeos pCAMBIA 2201*CaMV35S/D4E1* e pCAMBIA 2201*AtPP2/D4E1* foram transferidos para a estirpe EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

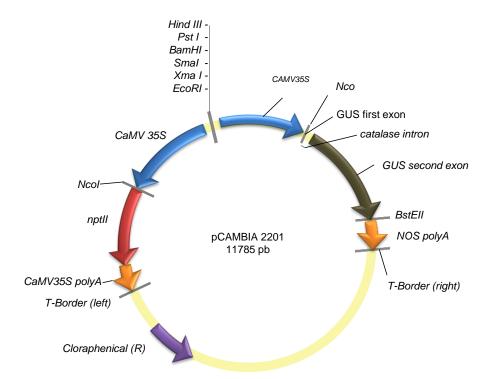


Figura 2 – Representação esquemática do vetor pCAMBIA 2201 (Cambia), contendo o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *uid*A

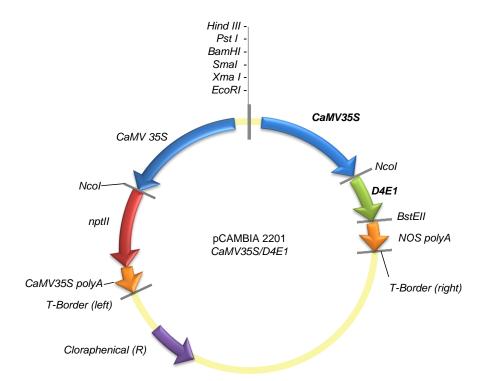


Figura 3 – Representação esquemática do vetor pCAMBIA /D4E1, contendo o gene D4E1 e o gene de seleção nptll, ambos sob controle do promotor constitutivo CaMV35S

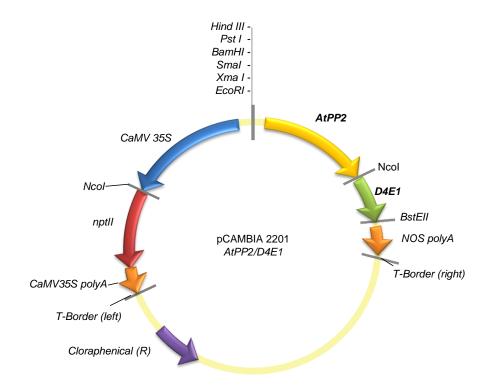


Figura 4 - Representação esquemática do vetor pCAMBIA AtPP2/D4E1, contendo o gene D4E1, sob controle do promotor de expressão preferencial no floema AtPP2, e o gene de seleção nptII, sob controle do promotor CaMV35S

3.3 Manutenção dos isolados de Agrobacterium

As colônias da bactéria EHA 105 contendo plasmídeo pCAMBIA 2201, com as construções gênicas *CaMV35S/D4E1* e a construção gênica *AtPP2/D4E1*, foram conservadas em solução 1:1 v/v contendo glicerol e meio YEP líquido (extrato de levedura 10 g L⁻¹, cloreto de sódio 5 g L⁻¹ e peptona 10 g L⁻¹) suplementado com canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹), mantidas a -80 °C.

3.4 Preparo do inóculo para transformação genética

A partir das culturas permanentes de *Agrobacterium*, a solução bacteriana foi plaqueada em meio de cultura YEP sólido (extrato de levedura 10 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, peptona 10 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹ de ágar bacteriológico), suplementado com canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹), e cultivada a 27 °C, por 72 h. Para o preparo do inóculo, uma colônia isolada foi transferida para erlenmeyer (250 mL), contendo

50 mL do meio de cultura YEP líquido, tendo este a mesma formulação do YEP sólido, porém, não acrescido do ágar bacteriológico. O YEP líquido também foi suplementado com os mesmos antibióticos do YEP sólido, e incubado por 16 h, em agitador orbital a uma rotação de 180 rpm a 28 °C.

A absorbância foi mensurada em espectofotômetro a λ = 600 nm e, ao atingir 0,5 de absorbância, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.800 rpm durante 15 min, a 15 °C. O precipitado formado foi então ressuspendido em meio de cultura MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), na concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹.

3.5 Transformação genética, seleção e regeneração

Em cada transformação genética, os explantes previamente preparados foram mantidos em placa de Petri contendo meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) até o momento da inoculação. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi retirado o meio MS líquido e acrescentada a suspensão bacteriana previamente preparada, conforme descrito no item 3.4, após 15 minutos. A solução bacteriana foi removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Os explantes foram secos em papel de filtro estéril para retirar o excesso da suspensão bacteriana e incubados em meio de cultura para co-cultivo, composto de meio MT sólido (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com sacarose 30 g L⁻¹, ágar 8 g L⁻¹ e benzilaminopurina (BAP) 1,0 mg L⁻¹, pH 5,8. Os explantes foram co-cultivados com *Agrobacterium* durante dois dias, na ausência de luz, a 24 °C.

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de seleção e regeneração, que consiste do meio MT sólido (MURASHIGE; TUCKER, 1969), pH 5,8, suplementado com BAP (1,0 mg L⁻¹⁾, o antibiótico de seleção canamicina (100 mg L⁻¹) e cefotaxima sódica (500 mg L⁻¹) para controle do crescimento de *A. tumefaciens*. O material foi incubado a 27 °C, na ausência de luz, sendo sub-cultivado a cada 15 dias. Após a formação das gemas adventícias, o material foi transferido para sala de luz, com fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C.

3.6 Enxertia in vitro

Os brotos provenientes da regeneração de explantes transformados de laranja 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo', germinadas *in vitro* na ausência de luz, por 30 dias e cultivado em fotoperíodo de 16 h por 15 dias. Para enxertia, foram removidos das plântulas, os cotilédones, a gema apical e o excesso da raiz quando esta apresentava-se com tamanho maior que 4 cm. Os brotos foram enxertadas na região terminal superior dos porta-enxertos, e foram mantidos em tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo meio MS sólido, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹).

Quando os brotos enxertados apresentaram aproximadamente quatro folhas com 2 cm de comprimento, as plantas foram retiradas do meio de cultura, as raízes foram lavadas em água corrente e transferidas para um vaso de 0,5 L de capacidade, contendo substrato Multiplant 1075 (Terra do Paraíso), previamente autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Após o transplantio, foi adicionado aproximadamente 0,5 g de adubo de liberação lenta, 19-06-10 Osmocote (Scotts), sobre o substrato em cada vaso. As plantas transplantadas permaneceram com um saco plástico recobrindo o vaso individualmente.

Após sete dias do transplantio, iniciou-se o processo de aclimatização, realizando-se a retirada do plástico que as recobriam, diariamente. Inicialmente, as mesmas ficaram por 10 minutos sem a cobertura plástica, e ao longo dos dias foram realizados aumentos graduais deste tempo, e permaneceram sem a cobertura enquanto não apresentaram sintomas iniciais de murcha das folhas. Quando as plantas não exibiram sintoma de murcha após 10 horas sem a cobertura plástica, permaneceram definitivamente sem a mesma. As plantas após terem comprovada a transgenia pela PCR continuaram em sala de luz até que atingissem tamanho adequado para serem transferidas para casa de vegetação.

3.7 Análises moleculares

Para identificar possíveis plantas transgênicas, foi realizada a análise de PCR, quando as plantas estavam finalizando o período de aclimatização. Para confirmar a inserção do transgene no genoma das plantas transgênicas foi realizada

a análise de Southern blot, e para quantificar o nível de expressão do transgene nas plantas transgênicas, realizou-se a análise de PCR quantitativo em tempo real.

3.7.1 Detecção do transgene por PCR

Para a análise de PCR, extraiu-se o DNA de folhas jovens das plantas. A extração foi realizada pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990).

Os amplicons de interesse para os genes CaMV35S/D4E1 e AtPP2/D4E1, foram obtidos através da PCR. As reações foram padronizadas para um volume final de 20 µL, contendo 2 µL de DNA total (50 - 100 ng), 0,50 µL dos *primers foward e reverse*, 1µL de dNTPs (10 µM), 0,8 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de tampão 10X (Invitrogen), 0,25 µL (0,5 U µL⁻¹) de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 12,95 µL de água ultra pura.

Os *primers* utilizados foram desenhados pelo, Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo e sintetizados pela empresa Invitrogen.

A obtenção dos amplicons foi realizada utilizando as seguintes sequências de *primers*:

CaMV35S-F: 5' - CTACAAATGCCATCATTGC - 3'

D4E1-R: 5' - GGTCACCTTACAACTTAATCTTAGC - 3'

Tamanho do produto amplificado = 327 pb

AtPP2-F: 5' - CGATAGTTGCTGCCAAAAC - 3'

D4E1-R: 5' - GGTCACCTTACAACTTAATCTTAGC - 3'

Tamanho do produto amplificado = 353 pb

A amplificação foi realizada em termociclador programado para as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos para a extensão e após os 40 ciclos, finalizando a reação de PCR a 72 °C por 4 minutos .

O produto da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,03 µg mL⁻¹) e fotografado em fotodocumentador acoplado ao transiluminador de luz UV.

3.7.2 Análise de Southern blot

A técnica de *Southern blot* foi utilizada para confirmar a inserção do transgene no genoma das plantas. Para realizar esta análise foi extraído o DNA utilizando-se o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990).

Utilizou-se 1,4 g de folhas recém expandidas, maceradas em almofariz, utilizando-se nitrogênio líquido. Ao final da extração, o DNA extraído permaneceu por 16 horas em solução contendo RNAse. Posteriormente, realizou-se uma etapa de extração com fenol, seguida da adição de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para uma melhor purificação do DNA. Em seguida, o DNA foi precipitado utilizando-se acetato de amônio e álcool e ressuspendido em água acrescida de RNAse. Após a extração, o DNA total foi quantificado por fluorimetria utilizando-se o aparelho "QubitTM" Fluorometer (Invitrogen) e o reagente "QuantiTTM dsDNA BR assay kit", conforme orientações do fabricante.

Depois de quantificado, uma alíquota contendo 30 μg de DNA total foi submetido à reação de digestão com 300U a enzima de restrição *EcoR*I (Invitrogen), 15 μL do tampão da enzima e água ultra pura autoclavada, para completar o volume de 150 μL, e permanecendo por 16 horas a 37 °C. A enzima utilizada digere o T-DNA em um único local, fora da sequência do gene. O DNA genômico digerido foi precipitado utilizando-se acetato de amônio com álcool, seguido de ressuspensão e aplicação em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo a 0,03 μg mL⁻¹. Esta etapa de eletroforese foi realizada a 24 V por 16 horas, para separação dos fragmentos de DNA. Realizaram-se todas as etapas de lavagem do gel de acordo com o protocolo de *Southern blot* (SOUTHERN, 2006) e, posteriormente, realizou-se a transferência do DNA para membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences), por capilaridade durante 16 horas.

As sondas foram preparadas por PCR, utilizando-se reação e materiais semelhantes aos utilizados no item 3.7.1, porém substituindo-se o DNA por plasmídio. O fragmento amplificado foi purificado utilizando-se o kit "QIAEX® II Gel Extraction" (Qiagen).

Nas análises iniciais de Southern blot, foi utilizada a sonda contendo um fragmento purificado do gene D4E1 e o terminador NOS amplificados por PCR,

tendo este amplicon 275 pb. Na amplificação por PCR foram utilizadas as seguintes sequências de primers:

F:5'CCATGGGATTTAAGTTGAGAG3' R:5'TTTGCGCGCTATATTTTGTTT3'

A sonda, depois de purificada, foi submetida à marcação com o kit "AlkPhos Direct Labelling Reagents" (Amershan Biosciences). A hibridização foi realizada a 62 °C, em forno de hibridização, por 16 horas, sob rotação, e a reação de detecção foi realizada utilizando-se "CDP-StarTM Detection Reagent" (Amersham Biosciences), conforme orientações do fabricante.

O excesso do "CDP-Star[™] Detection Reagent" foi retirado por evaporação e a membrana, envolvida em plástico transparente, foi colocada no cassete (Amersham Lifescience, USA) em contato com uma chapa fotográfica (50 min). A revelação da chapa foi realizada em solução reveladora (Kodak) (5 minutos), e após enxágue em água, foi mantida por 15 min em solução fixadora e enxágue novamente em água corrente.

3.7.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA, foi realizada com TRIzol (Invitrogen), utilizando-se o protocolo de extração recomendado pelo fabricante. Posteriormente, procedeu-se a purificação do RNA, utilizando-se o kit de purificação RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), acrescido do tratamento com DNase, utilizando-se o RNase-Free DNase Set (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Para quantificar e verificar a qualidade do RNA utilizou-se espectrofotômetro Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific), sendo mensurada a razão entre o valor da absorbância a λ = 260 nm pelo valor da absorbância a λ = 280 nm, obtendo valores ótimos entre 1,8 a 2,2. Para determinar a integridade do RNA, este foi analisado em gel de agarose (1,5%), a 60 V, por 40 minutos.

Para a síntese do cDNA, utilizou-se a enzima M-MLV (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante, sendo utilizados 1μg de RNA, 1μL de *primer* oligo dT, 1 μL de dNTP mix a 10 mM e água destilada livre de RNAse para completar o volume de 12 μL, sendo esta mistura incubada a 65°C por 5 minutos, e depois colocada em gelo. Para inibir a ação de RNAses, foi utilizado o RNase OUT

(Invitrogen), sendo adicionado 4 μ L de 5X Fisrt-Strand Buffer, 2 μ L de DTT a 0,1M e 1 μ L de RNaseOUT (40U μ L⁻¹).

Esta mistura foi incubada a 37 °C por 2 minutos, e acrescida de 1 μL da enzima M-MLV RT (Invitrogen), totalizando um volume de 20 μL, e permanecendo a 37 °C, por 50 minutos, e, posteriormente, foi realizada a inativação da enzima a 70 °C, por 15 minutos. A concentração de cDNA de cada amostra foi considerada como se todo RNA fosse convertido em cDNA (1 μg de RNA em 20 μL de reação). Após o término da reação, as amostras de cDNA foram padronizadas para 6,6 ng μL⁻¹ e estocadas a -20 °C. Ao final da síntese de cDNA, realizou-se a quantificação da expressão relativa através da análise de PCR quantitativo em tempo real.

3.7.4 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real é uma ferramenta importante para a quantificação da expressão gênica (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) 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 no artigo MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (BUSTIN et al., 2009).

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

A normalização é necessária para garantir a reprodutibilidade e precisão da expressão quantitativa. Neste trabalho foram utilizados como genes de referência para normalização dos níveis de expressão do gene *D4E1*, os genes da Ciclofilina e Ubiquitina (BOAVA et al., 2011), de acordo com os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Sequência dos *primers* utilizados para amplificação dos genes de referência *ciclofilina* e *ubiquitina*, e do gene *D4E1* utilizados na análise de qPCR

		·	Amplicon
Gene	Sequência 5'-3'F	Sequência 5'-3'R	(pb)
Ciclofilina	AGAGTATGCAGAGGAATGG	GTCCTTAACAGAAGTCCGT	107
Ubiquitina	TTCGTCAGTTGACTAATCCT	GTTGCTGTGTTGACTGTG	95
D4E1	CCATGGGATTTAAGTTGAGAG	GGTCACCTTACAACTTAATCTTAGC	69

As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas em 15 μ L de solução contendo 5 μ L de cDNA o que corresponde a 30 ng de cDNA, 0,3 μ L de primer foward e reverse, 7,5 μ L de Fast SYBR Green Master Mix e 1,9 μ L de água livre de nucleases.

As amplificações foram realizadas em duas réplicas biológicas e três réplicas técnicas de cada planta incluindo as amostras de plantas não transgênicas, e amostra controle sem DNA para verificar possíveis contaminações dos reagentes utilizados. As análises de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas no equipamento 7500 Fast (Applied Biosystems), utilizando se o Fast SYBR Green Master Mix (4385612). O método utilizado no aparelho foi o comparativo no modo FAST, no programa padrão do equipamento, que atua nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95 °C por 20 segundos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos. Ao final da reação, foi realizada a verificação do produto amplificado através da análise de Melting (RIRIE et al., 1997), que determina o ponto de fusão médio dos amplicons formados durante a reação. Durante esta análise, as amostras foram submetidas a um ciclo a 95 °C por 15 s, para a desnaturação das duplas fitas amplificadas e aquecidas de 60 a 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,3 °C s⁻¹, sendo realizadas medidas de fluorescência continuamente e finalmente submetidas a 60 °C por 15 segundos. Para cada planta transgênica foi detectado o valor de Cq tanto para o gene alvo quanto para os dois genes de referência. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado.

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

Após este cálculo, os dados de C_q obtidos na análise de qPCR foram inseridos no software GenEx versão 5.3.6.170, no qual foi utilizada a eficiência média calculada no LinReg PCR, para corrigir o valor de Cq de cada amostra. Após a correção da eficiência o Software realizou a comparação dos dados utilizando-se a fórmula de quantificação Relativa RQ= $2^{-(\Delta Cq)}$ da amostra - ΔCq calibrador), que corresponde a RQ= $2^{-\Delta\Delta Cq}$. O valor do C_q do gene alvo é subtraído do valor do C_q do gene de referência e resulta no valor de ΔC_q ; o valor de ΔC_q do gene alvo é, então, subtraído do valor do ΔC_q do calibrador (planta não transgênica), e é encontrado o valor de $\Delta\Delta C_q$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2008).

Esta quantificação relativa foi realizada em conjunto para as duas construções gênicas, sendo utilizada como calibrador a amostra de uma planta de laranja 'Hamlin' não transgênica, obtida de cultura de tecidos tendo a mesma idade e origem das plantas transgênicas. Este cálculo possibilita mensurar a expressão do gene *D4E1* quando dirigido pelo promotor de expressão constitutiva e de expressão preferencial no floema.

4 RESULTADOS

4.1 Transformação genética e aclimatização das plantas

Na Tabela 2 são presentados dados dos experimentos de transformação genética realizados com as três cultivares em estudo com a construção gênica CaMV35S/D4E1. Foram realizados 10 experimentos, sendo dois com a cultivar 'Hamlin', cinco com a cultivar 'Pêra' e três com a cultivar 'Valência'. Para a cultivar 'Hamlin', dos 717 explantes introduzidos, permitiu a identificação de 13 plantas contendo o transgene, o que corresponde a uma eficiência média de transformação genética de 1,81%. Para a cultivar 'Pêra', foram utilizados 1.012 explantes, de epicótilos e 68 de hipocótilos ligado ao cotilédone. Dos cinco experimentos, dois não regeneraram brotos. Dos experimentos de 'Pêra' com a construção gênica CaMV35S/D4E1, foi possível a identificação de 10 plantas contendo o transgene, o que corresponde a uma eficiência média de transformação genética para explantes de epicótilo de 1,09 %, e para a transformação utilizando hipocótilos como explante, a eficiência média de tranformação foi de 4,04 %. Para a cultivar 'Valência', dos 544 explantes introduzidos, considerando os três experimentos, destes, foram regeneradas plantas a partir de dois experimentos, tendo sido identificadas 8 plantas contendo o transgene, o que corresponde a uma eficiência média de transformação genética de 2,43% (Tabela 2).

Tabela 2 - Número e tipo de explantes introduzidos, explantes responsivos, plantas PCR positivas e eficiência de transformação genética de três cultivares de laranja doce, com a construção gênica CaMV35S/D4E1

Cultivar	Experimento	Explantes introduzidos	Explantes responsivos	Plantas PCR positivas/plantas avaliadas	Eficiência de transformação ^a (%)
'Hamlin'	1	351	57	8/13	2,27
	2	366	63	5/26	1,36
'Pêra'	1	323	17	1/2	0,3
	2	315	47	6/7	1,9
	3	68 ^b	19	3/8	4,41
	4	191	2	0/0	0
	5	183	1	0/0	0
'Valência'	1	172	16	3/4	1,74
	2	157	46	5/16	3,18
	3	215	0	0/0	0

^aPorcentagem do número de plantas PCR positivas em relação ao total de explantes introduzidos ^bExplantes de hipocótilo ligado ao cotilédone

Na Tabela 3 são apresentados dados dos experimentos de transformação genética realizados com as três cultivares em estudo com a construção gênica *AtPP2/D4E1*. Foram realizados 10 experimentos de transformação, sendo dois com a cultivar 'Hamlin', quatro com a cultivar 'Pêra' e quatro com a cultivar 'Valência'. Para a cultivar 'Hamlin', um total de 881 explantes foram introduzidos, permitindo a identificação de 19 plantas contendo o transgene, o que corresponde a uma eficiência média de transformação genética de 2,15%. Para a cultivar 'Pêra' um total de 1.173 explantes foram introduzidos, considerando os quatro experimentos realizados, foram regeneradas plantas em apenas dois dos experimentos, tendo sido identificadas 6 plantas contendo o transgene, sendo a eficiência média de transformação genética de 0,63%. Para a cultivar 'Valência' um total de 939 explantes introduzidos dos quatro experimentos, apenas dois regeneraram brotos, um foi perdido por contaminação por fungos e o outro não regenerou brotos, foram identificadas 15 plantas contendo o transgene, o que corresponde a uma eficiência média de transformação genética de 2,65% (Tabela 3).

Tabela 3- Número de explantes introduzidos, explantes responsivos, plantas PCR positivas e eficiência de transformação genética de três cultivares de laranja doce, com a construção gênica *AtPP2/D4E1*

Cultivar	Experimento	Explantes introduzidos	Explantes responsivos	Plantas PCR positivas/plantas avaliadas	Eficiência de transformação ^a (%)
'Hamlin'	1	231	88	7/12	3,03
	2	650	174	12/19	1,84
'Pêra'	1	464	28	3/4	0,64
	2	475	45	3/5	0,63
	3	120	2	0/0	0
	4	114	1	0/0	0
'Valência'	1	343	44	6/8	1,74
	2	223	64	9/13	4,03
	3	123	0	0/0	0
	4	250	O_p	_b	_b

^aPorcentagem do número de plantas PCR positivas em relação ao total de explantes introduzidos ^bExperimento perdido por contaminação.

Durante a fase de regeneração, alguns explantes regeneraram brotos de tamanho reduzido, impossibilitando realizar a enxertia. Os brotos regenerados e que atingiram tamanho suficiente para realizar enxertia *in vitro* foram enxertados em plântulas de citrange 'Carrizo', porém nem todos sobreviveram.

As coletas das folhas para análise de PCR foram realizada após o período de aclimatização (Figura 5B). Na Figura 5A pode ser observada uma planta em fase de aclimatização em vasos de 0,5 L. As plantas após serem aclimatizadas e estarem

com folhas expandidas com aproximadamente 5 cm (Figura 5C) foram transplantadas para vasos de 5L e mantidas em casa de vegetação (Figura 5D).



Figura 5 - Aclimatização das plantas. A e B: Plantas transgênicas em aclimatização em vasos de 0,5 L. C: Plantas PCR positivas para o gene *D4E1* aclimatizadas, em vaso de 0,5L, transferidas para casa de vegetação. D: Plantas PCR positivas para o gene *D4E1* cultivadas em casa de vegetação em vasos de 5 L

das Na análise da PCR plantas obtidas das transformações Agrobacterium tumefaciens vetor contendo construção com а gênica CaMV35S/D4E1, quando comprovada a transgenia, obtiveram-se fragmentos de 327 pb, correspondente ao amplicon de parte do promotor CaMV35S e do gene D4E1 (Figura 6A). Da mesma forma, na análise de PCR das plantas obtidas por transformação genética com a construção gênica AtPP2/D4E1, quando comprovada a transgenia, obtiveram-se fragmentos de 353 pb, correspondente ao amplicon de parte do promotor AtPP2 e o gene D4E1 (Figura 6B). As plantas PCR positivas de ambas construções gênicas foram aclimatizadas e mantidas em casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas, apresentando desenvolvimento normal.

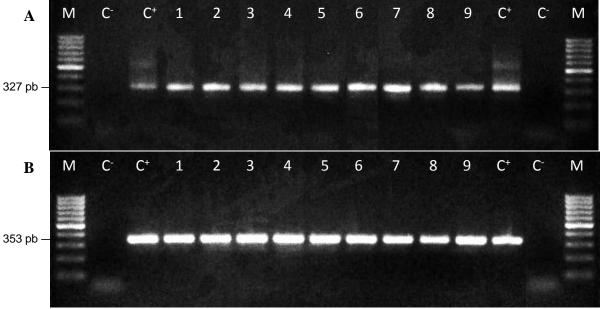
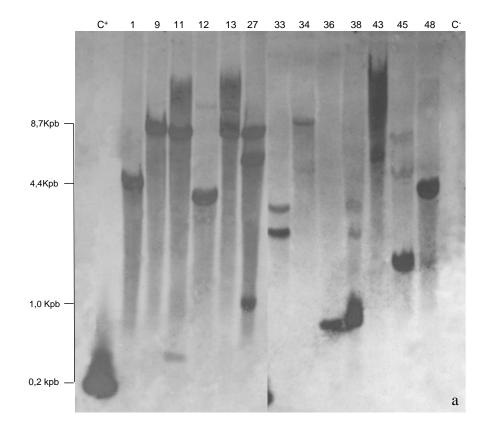


Figura 6 – Análise de PCR de plantas de laranja doce transgênicas contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* (A) e *AtPP2/D4E1* (B). M: marcador de 100 pb (Fermentas); C : controle negativo (DNA de planta não transgênica); C⁺: controle positivo (reação com plasmídeo); 1 a 3: laranja 'Hamlin'; 4 a 6: laranja 'Valência'; 7 a 9: laranja 'Pêra'.

4.2.1 Análise de Southern blot

Para esta análise, utilizou-se sonda contendo o amplicon *D4E1-NOS* de 275pb. Foi possível detectar o número de cópias do transgene inserido no genoma de cada planta. Não foram observadas hibridizações nas amostras de DNA das plantas não transgênicas, de nenhuma das três cultivares analisadas.

Na análise de *Southern blot*, foram confirmadas a inserção do transgene em 13 plantas da cultivar 'Hamlin'; 10 plantas da cultivar 'Pêra' e 8 plantas da cultivar 'Valência' contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* (Figura 7). Para as plantas transgênicas contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1*, foi verificada a inserção do transgene em 15 plantas da cultivar 'Hamlin'; 6 plantas da cultivar 'Pêra' e 8 plantas da cultivar 'Valência' contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1* (Figura 8). O número de cópias do transgene variou de uma a três, sendo que, a maioria das plantas transgênicas apresentou uma única inserção do transgene.



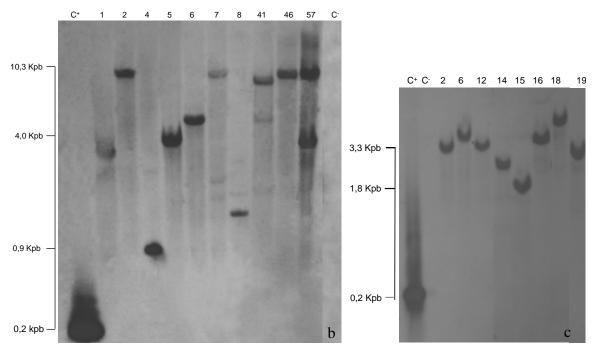


Figura 7 - Análise de Southern blot de plantas de laranja doce das cultivares 'Hamlin' (a), 'Pêra' (b) e 'Valência' (c) contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1*. O DNA foi digerido com a enzima *Eco*RI e hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene *D4E1* e terminador *NOS*. C⁺: controle positivo contendo amplicon *D4E1-NOS* de 275 pb. C⁻: controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA digerido com a enzima *Eco*RI de laranja 'Hamlin' (a); laranja 'Pêra' (b) e laranja 'Valência' (c)

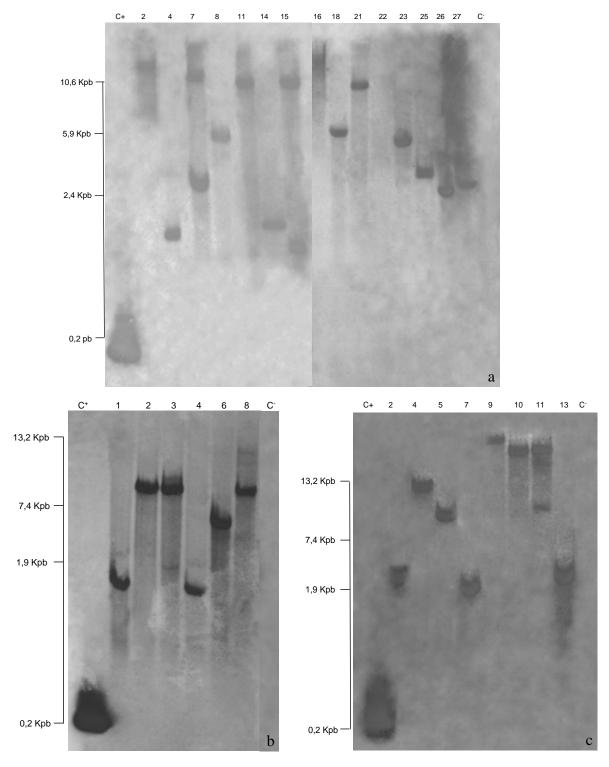


Figura 8 – Análise de Southern blot de plantas de laranja doce das cultivares 'Hamlin' (a), 'Pêra' (b) e 'Valência' (c) contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1*. O DNA foi digerido com a enzima *Eco*RI e hibridizado com sonda contendo o amplicon do gene *D4E1* e terminador *NOS*. C⁺: controle positivo contendo amplicon *D4E1-NOS* de 275 pb. C⁻: controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA digerido com a enzima *Eco*RI de laranja 'Hamlin' (a); laranja 'Pêra' (b) e laranja 'Valência' (c)

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

Quando realizou-se a curva de eficiência de amplificação dos genes, o valor ficou próximo de 90%, porém quando os dados das reações de qPCR foram analisados no software LinregPCR, o valor real da eficiência de amplificação foi um pouco menor, próximo de 80% para os três genes. Isto já era esperado, pois a curva padrão não representa a eficiência real das amostras biológicas (KUBISTA et al., 2006).

Com o valor real da eficiência de cada gene, realizou-se a comparação da expressão utilizando-se o software GeneX, no qual foi utilizada a eficiência média calculada no LinReg PCR, para corrigir o valor de Cq de cada amostra.

A análise da expressão comparativa em relação à planta não transgênica obtida através da análise de PCR quantitativo em tempo real, apresentou diferentes valores de expressão para as plantas transgênicas, para cada construção gênica, independente da cultivar. Comparando-se o nível de expressão do transgene para cada uma das construções gênicas, observou-se que para plantas contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* a variação da expressão foi de Log₁₀ ^{1,76} (PS 57) a Log₁₀ ^{4,87} (PS 6), enquanto que a expressão do gene *D4E1* nas plantas transgênicas contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1*, a variação foi de Log₁₀ ^{0,89} (VA11) a Log₁₀ ^{2,77} (HA 15). Observou-se, que, em algumas plantas transgênicas contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1* o nível de expressão do transgene foi semelhante ao apresentado por algumas plantas transgênicas contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* (Figura 9).

Para plantas contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1*, o nível de expressão do transgene foi em média de Log₁₀ ^{2,15} enquanto que a média da expressão das plantas contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* foi de Log₁₀ ^{4,0}. A expressão do transgene nas plantas transgênicas variou bastante para as plantas de mesma construção gênica e não teve correlação com o número de cópias do transgene.

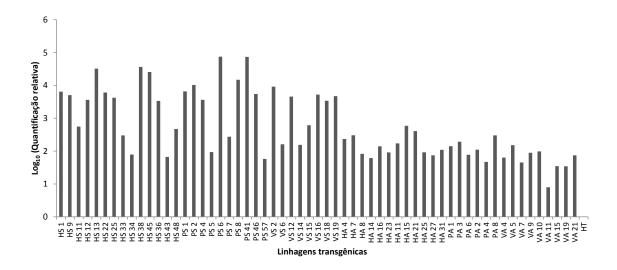


Figura 9 - Quantificação relativa da expressão do transgene *D4E1* dirigido pelo promotor *CaMV35S* ou *AtPP2* em laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência'. As colunas correspondem ao valor médio da expressão relativa, HS, PS e VS: plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' contendo a construção gênica *AtPP2/D4E1*; HA, PA e VA: plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' com a construção gênica *CaMV35S/D4E1*; HT: controle negativo (planta não transgênica)

5 DISCUSSÃO

Devido à inexistência de genótipos de citros resistentes às principais doenças bacterianas, a engenharia genética é uma ferramenta com potencial para a obtenção de plantas com características de resistência. Em citros, têm-se obtido com êxito plantas transgênicas de laranja doce e outras espécies comerciais de citros, pelo método de transformação via *A. tumefaciens*.

O peptídeo D4E1, sintético, derivado de uma cecropina em testes *in vitro*, foi eficiente no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18 e vários fungos fitopatogênicos, em baixas doses e in vivo no controle de *Agrobacterium tumefasciens*, causadora da galha da coroa (RAJASEKARAN et al., 2001). Portanto, em citros transformados com o gene que codifica este peptídeo, existe a possibilidade dele ser eficiente no controle da *Xcc* e das bactérias associadas ao HLB.

Sendo assim, plantas de citros expressando o peptídeo constitutivamente podem apresentar maior resistência a doenças tanto bacterianas quanto fúngicas, causadas por patógenos de ocorrência sistêmica ou de ocorrência localizada independente do local, já que o peptídeo será produzido em todos os tecidos da planta o tempo todo.

Porém, em plantas que expressam o peptídeo somente no floema existe a possibilidade de promover o controle das bactérias associadas ao HLB, restritas ao floema, com a vantagem de ter a produção do peptídeo apenas no local de ocorrência das bactérias associadas ao HLB, diminuindo os gastos energéticos que a planta teria para produzí-lo constitutivamente, além da vantagem de não haver a presença do peptídeo nos frutos (ZHAO et al., 2004).

Com relação aos valores de eficiência de transformação obtidas neste trabalho, utilizando-se a construção gênica *CaMV35S/D4E1*, as cultivares 'Hamlin' e 'Pêra' apresentaram maiores valores quando comparados aos valores de eficiência utilizando-se a construção gênica *AtPP2/D4E1* (Tabelas 2 e 3). Estes resultados de eficiência estão de acordo com os resultados de outros trabalhos, em que a eficiência de transformação utilizando-se epicótilos de laranja 'Pêra' foi menor independente da construção gênica utilizada na transformação (AZEVEDO, 2005; BARBOSA-MENDES, 2007; BOSCARIOL, 2004), comprovando que a eficiência de

transformação varia com o genótipo e também é influenciada pela construção gênica utilizada, pela habilidade morfogênica e pela afinidade do genótipo com a *Agrobacterium tumefaciens* (ALMEIDA et al., 2003; GHORBEL et al., 2000; MIYATA et al., 2011).

Quando utilizam-se construções gênicas que não possuem gene repórter, a eficiência de transformação é menor, devido a maneira que o calculo é obtido, sendo que quando se utiliza gene repórter, o cálculo da eficiência é feito antes de realizar a enxertia, com os brotos ainda ligados ao explante. Porém, quando não se utiliza gene repórter, normalmente a eficiência é calculada a partir dos valores de plantas PCR positivas, que só são obtidos após a obtenção das plantas pela enxertia dos brotos regenerados. Na etapa de enxertia, ocorrem perdas de brotos que não são avaliados por PCR, o que diminui a eficiência comparado a plantas que possuem gene repórter na construção gênica utilizada para transformação.

Neste trabalho, foram obtidos valores de eficiência abaixo dos obtidos em outros que utilizaram antibiótico canamicina como agente de seleção e não utilizaram gene repórter (BARBOSA-MENDES, 2007; BOSCARIOL, 2004), porém os valores de eficiência obtidos neste trabalho estão próximos dos obtidos por Azevedo (2005), de 2,5 a 3% para laranja 'Hamlin', 0,5% para laranja doce 'Pêra' e 3,3 a 4,5% para laranja 'Valência'. A eficiência de transformação sem gene repórter no trabalho realizado por Barbosa-Mendes (2007), utilizando-se como explantes epicótilos de laranja doce foi de 6,2% para laranja 'Hamlin', 2,7% para laranja 'Pêra' e 5,6% para laranja 'Valência'. Boscariol (2004) obteve resultados de eficiência de transformação de epicótilos de laranja doce com os genes *Xa21* e *atacina* A, variando entre 14% e 18,6% para laranja 'Hamlin', 11,7 a 13,7 % para laranja 'Valência' e de 1,4 a 4,3% para laranja 'Pêra'.

Em trabalhos que utilizam gene repórter, a eficiência de transformação é bem maior. Ghorbel et al. (1999) obtiveram 43% de eficiência de transformação quando utilizaram-se o gene repórter *gfp* aliado ao uso do gene de seleção a canamicina e ao transformar laranja azeda utilizando-se o gene de seleção *GUS* aliado ao gene da canamicina e testando diferentes tipos de condições para melhor eficiência de transformação, obteve 82 % de eficiência de transformação (GHORBEL et al., 2000).

Em plantas de citros transgênicas normalmente se faz a enxertia, pois as plântulas obtidas não produzem raízes, ou as produzem muito lentamente (PEÑA et al., 1995; YANG et al., 2011). Esta dificuldade de enraizamento também é relatada

na transformação genética de outras espécies lenhosas como macieira e ameixeira (JAMES et al., 1989).

Para verificar inserção do transgene são realizadas as análises de *Southern blot*. Neste trabalho, cada planta transgênica apresentou diferentes padrões de integração e diferentes números de inserções do transgene no genoma, variando de uma a três cópias. Este valor está dentro do observado por outros autores em plantas de citros transgênicas de uma a quatro inserções (DUTT et al., 2012; REYES et al., 2011; ZANEK et al., 2008).

A expressão do transgene de algumas plantas transgênicas contendo o promotor *CaMV35S* apresentaram valores próximos aos maiores valores encontrados para plantas contendo o promotor *AtPP2* até valores 1000 vezes maiores que este. Isto demonstra como esperado, que a expressão do transgene *D4E1* em plantas contendo este gene dirigido pelo promotor *AtPP2* que promove a expressão preferencial no floema, foi muito menor que a expressão deste gene constitutivamente. Semelhante aos resultados observados para expressão do gene *uid*A utilizando-se promotores de expressão preferencial de floema e promotor constitutivo Dutt et al. (2012) porém as plantas contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1* apresentaram valores de expressão com uma variação maior que a apresentada por este autor.

A variação dos níveis de expressão não indicaram associação com o número de inserções de cópias do transgene. Estas variações de expressão do transgene em plantas contendo a mesma construção gênica estão relacionadas com a posição em que foi inserido o transgene no genoma (ELMAYAN; VAUCHERET, 1996).

Acredita-se que quanto maior o nível de expressão do transgene, maior seja a expressão do peptídeo antimicrobiano. Com os dados de expressão do transgene *D4E1*, será possível realizar uma seleção das plantas com maior expressão. Futuramente, estas plantas serão multiplicadas e avaliadas quanto à resistência ao cancro cítrico e ao HLB.

Durante a realização deste trabalho, cogitou-se a possibilidade de realizar ensaios para verificar a presença do peptídeo nas plantas utilizando técnicas para quantificar proteínas como o Western blot. Porém, levando em conta a dificuldade de quantificar pequenos peptídeos relatados em outros trabalhos, a tentativa de realizar este tipo de análise foi descartada. Segundo alguns autores esta dificuldade está associada à característica anfipática do peptídeo D4E1, que leva a agregação e

incapacidade do peptídeo migrar pelo gel de SDS-PAGE (RAJAZEKARAN et al., 2005). A mesma dificuldade foi relatada em outros trabalhos com pequenos peptídeos, como o D4E1 que tem peso molecular aproximado de 2kDa (LI et al., 2001).

Visando fazer uma seleção preliminar da resistência das plantas ao cancro cítrico foram realizados nove bioensaios de inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas destacadas de laranja 'Hamlin' contendo a construção gênica *CaMV35S/D4E1*, porém os resultados não apresentaram repetibilidade. O motivo para esta desuniformidade de resultados provavelmente seja o método de inoculação utilizado (ferimento com agulha), que por ser muito agressivo não detecta pequenas diferenças de resistência, visto que em plantas transgênicas não se consegue imunidade mas apenas diferentes níveis de resistência.

6 CONCLUSÕES

Foi possível obter plantas transgênicas de laranja doce das cultivares 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' com o gene *D4E1*, dirigido pelos promotores *AtPP2* e *CaMV35S*, confirmadas por PCR.

Foi confirmada a inserção estável do gene *D4E1* dirigido pelos promotores *AtPP2* e *CaMV35S* através da análise de *Southern blot*, tendo observado a integração de uma a três cópias do transgene no genoma das plantas transgênicas analisadas.

Com os valores de expressão do transgene é possível fazer uma seleção das plantas que apresentaram maior expressão do transgene para as duas construções gênicas utilizadas, para que, posteriormente, estas plantas sejam multiplicadas e avaliadas quanto à resistência a fitopatógenos bacterianos.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2012: Anuário da Agricultura Brasileira: Citros. São Paulo: FNP, Consultoria e Agroinformativos, 2012.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' and Huanglongbing Effects on Citrus Seeds and Seedlings. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 7, p. 1967-1973, 2009.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Plant Science**, Limerick, v. 185-186, p. 118-130, 2012a.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D.Tolerance of trifoliate citrus rootstock hybrids to *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 147, p. 71-80, 2012b.

ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; AZEVEDO, F.A. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerick, v. 164 n. 2, p. 203-211, 2003.

AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes** *bacteriopsina (bO), cecropina* e *gus.* 2005. 76p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BALLWEBER, L.M.; JAYNES, J.E.; STAMM, W.E.; LAMPE, M.F. In Vitro Microbicidal Activities of Cecropin Peptides D2A21 and D4E1 and Gel Formulations Containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 1, p. 34-41, 2002.

BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (***Citrus sinensis* **L. Osbeck) com o gene hrpN (harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico (***Xanthomonas axonopodis* **pv.** *citri***)**. 2007. 78p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

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

BASSANEZI, R.B.; BELASQUE JÚNIOR, J; MASSARI, C.A. Current situation, management and economic impact of citrus canker in São Paulo and Minas Gerais, Brazil. Disponível em: http://www.calcitrusquality.org/wp-

content/uploads/2009/05/current-situation-management-and-economic-impact-of-citrus1.pdf. Acesso em: 9 out 2012.

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

BECHINGER, B. Structure and functions of channel-forming peptides: Magainins, cecropins, melittin and alamethicin. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 156, n. 3, p. 197-211, 1997.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BEHLAU, F. Current status of citrus canker control in São Paulo state, Brazil: A new chapter in a 50-year book? Session 1 – Citrus canker current status and Economical importance. In: WORKSHOP ON XANTHOMONAS CITRI/CITRUS CANKER, 2011. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2011. 17-18 Nov. 2011.

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

BELASQUE JÜNIOR, J.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; RODRIGUES NETO, J. YAMAMOTO, P.T.; CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P. VINYARD, B.T.; HARTUNG, J. S. adult citrus leafminers (*Phyllocnistis citrella*) are not efficient vectors for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri.* **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 590-594, 2005.

BELASQUE JÚNIOR, J.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. Controle do huanglongbing no Estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 53-64, 2010.

BERGEY, D.H.; HARRISON, F.C.; BREED, R.S.; HAMMER, B.W.; HUNTOON, F.M. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1923. 442p.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, São Paulo, v.23, n. 6, p. 101-111 1957.

BOAVA, L.P.; CRISTOFANI-YALY, M.; MAFRA, V.S.; KUBO, K.; KISHI, L.T.; TAKITA, M.T.; RIBEIRO-ALVES, M.; MACHADO, M.A. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. **BMC Genomics**, London, v. 12, p.39-51, 2011.

BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com genes manA, atacina A e Xa21**. 2004. 87p. Tese (Doutorado em Ciências) — Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

- BOSCARIOL, R.L.; ALMEIDA, W.A.B.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A; MENDES, B.M.J. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 2, p. 122-128, 2003.
- BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M., VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E; PEREIRA, L.F.P.; MOURAO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C. Attacin A gene from Tricloplusia ni reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis pv. citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, 131, 530–536, 2006.
- BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M; POMPEU JUNIOR, J (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. p.19-36.
- BOVÉ, J.M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, Washington, v. 292, p. 2275-2278, 2001.
- BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, London, v.4 n.3, p. 141-157, 2003.
- 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.; WITTWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, p. 611-622, 2009.
- CARY, J.W.; RAJASEKARAN, K.; JAYNES, J.M.; CLEVELAND, T.E. Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth *in vitro* and in planta. **Plant Science**, Limerick, v. 154, n. 2, p. 171-181, 2000.
- CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 1, p. 26-30, 2000.
- CERVERA M. Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. In: PEÑA, L. (Ed.) **Transgenic plants.** Methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2005. p. 203–214.
- CHAGAS, M.C.M.; PARRA, J.R.P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J.S.; YAMAMOTO, P.T. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidóptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Enthomology**, Londrina, v. 30, n.1, p. 55–59, 2001.

- CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLINGER, E. (Ed.) **Citrus**: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY, 1975. p. 14-20.
- CIVEROLO, E.L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: **Citrus Canker**: an International Perspective. 1985. Lake Alfred: Citrus Research and Education Center, University of Florida, 1985. p.11-17.
- COCIANCICH, S. BULET, P.; HETRU, C.; HOFFMAN, J.A. The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasitology Today**, London, v. 10, p. 132–139, 1994.
- COLETTA FILHO, H.D.; CARLOS, E.F. Ferramentas para diagnóstico de huanglongbing e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.2, p.129-143, 2010.
- COLETTA FILHO, H.D.; TAKITA, M.L.P.; CARLOS, E.F.; MACHADO, M.A.A bacteria 'Candidatus Liberibacter em plantas com huanglongbing (ex-greening) no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, p. 367-374, 2004.
- CONAB COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: http://www.conab.gov.br. Acesso em: set. 2011.
- COSTA. M.; OTONI, W.; MOORE, G. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 4, p. 365-373, 2002.
- CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Maryland: American Society of Plants Physiologists, 2001. p. 850-829.
- DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 109-136, 1991.
- DAGULO, L.; DANYLUK, M.D.; SPANN, T.; FILOMENA VALIM, M.; GOODRICH, R.; SIMS, C.; ROUSEFF, R. Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus greening (huanglongbing). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, p.C199-C207, 2009.
- DATLA, R.S.S.; HAMMERLINDL, J.K.; PANCHUK, B.; PELCHER, L.E.; KELLER, W. Modified binary plant transformation vectors with the wild-type gene encoding *nptll*. **Gene**, Maryland Heights, v. 122, n. 2, p. 383-384, 1992.
- DE LUCCA, A.J.; BLAND, J.M.; GRIMM, C.; JACKS, T.J.; CARY, J.W.; JAYNE, J. M.; CLEVELAND, T.E.; WALSH, T.J. Fungicidal properties, sterol binding, and proteolytic resistance of the synthetic peptide *D4E1*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ontario, v. 44, n. 6, p. 514-520, 1998.

- DOMÍNGUEZ, A; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMEO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterization of regenerants obtained under selective condictions 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.
- DOMÍNGUEZ A.; DE MENDOZA A.H.; GUERRI J.; CAMBRA M.; NAVARRO L.; MORENO P.; PEÑA L.Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its *p25* coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dorcrecht, v. 10, n. 1/2, p. 1-10, 2002.
- 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.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Org.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico/FUNDAG, p. 3-18, 2005.
- DOWSON, W.J. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. **Zentralblatt für Bakteriologie**, Stuttgart, v. 100, p. 177–193, 1939.
- 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.; BARTHE, G.; GROSSER, J.W. Progress Using *Agrobacterium*-Mediated Transformation to Develop HLB (Huanglongbing) and Canker Resistance in Commercial Citrus. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL CITRICOLA, 6., 2010. Tecoman. **Anais...**Tecoman, 2010. p. 217-230.
- DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of citrus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 98, p. 331- 340, 2009.
- DUTT, M.; LEE, D.H.; GROSSER, J.W. Bifunctional selection-reporter systems for genetic transformation of citrus: mannose and kanamycin-based systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 46, n. 6, p. 467-476, 2010.
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, R.A.; SCHROTH, M. N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, n. 59, p. 153–168, 1980.
- ELMAYAN, T.; VAUCHERET, H. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, **p.**787–797, 1996.

- ETXEBERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.74, n. 1,p. 76-83 2009.
- EZQUER I.; LI, J.; OVECKA, M.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, F. J.; MONTERO, M.; CERIO, J.D.; HIDALGO, M.; SESMA, M.T.; BAHAJI, A.; ETXEBERRIA, E.; POZUETA-ROMERO. Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono- and dicotyledonous plants, J. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 10, p. 1674–1693, 2010.
- FAGOAGA C,; LÓPEZ, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES,R.; PEÑA, L. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of Citrus tristeza virus are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 5, p. 435-445, 2005.
- FAGOAGA C.; RODRIGO I.; CONEJERO V.; HINAREJOS C.; TUSET J.J.; ARNAU J.; PINA J.A.; NAVARRO L.; PEÑA L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 175-185, 2001.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT**. Disponível em: http://apps.fao.org. Acesso em: 16 jun.2012.
- FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005. v. 2, p. 239-269.
- FELIPE, R.T. A. Avaliação da resistência à *Candidatus* Liberibacter asiaticus em laranjas doce expressando o gene *attA* ou *hrpN*. 2011. 85p. Tese (Doutorado em Ciências Área de concentração Fisiologia e Bioquímica de Plantas) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- FIGUEIREDO, M.G.; BARROS, A.L.M.; FRIZZONE, J.A.; BELASQUE JÚNIOR, J. **Dano econômico evitado pelo controle de doenças na citricultura paulista.** Porto Alegre:Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009. p. 1-12
- GABAY, J.E. Ubiquitous natural antibiotics. **Science**, Washington,v. 264, p. 373–374, 1994.
- GARCÍA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA J.L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic

- response of epicotyl segments *Troyer citrange*. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 715-723, 1999.
- GHORBEL, R.; DOMÍNGUEZ, A., NAVARRO, L.; PEÑA, L. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Tree Physiology**, Oxford, v. 20, p. 1183–1189, 2000.
- GHORBEL, R.; JUAREZ, 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**, Heidelberg, v. 99, p. 350–358, 1999.
- GOTO, M.; YAGUCHI, Y.;HYODO, H. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. **Physiological Plant Pathology**, London, v.16, n.3, p. 343-350, 1980.
- GOTTWALD, T.R; GRAHAM, J.H. Citrus canker. *The Plant Health Instructor*. 2000. **Plant Diseases Lessons**, Saint Paul. Disponível em: http://apsnet.org/education/lessonsplantpath/citruscanker>. Acesso em: 15 jun. 2012.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews,** Hoboken, v. 8, p. 339–374, 1990.
- GUO, H.; CHEN, X.; ZHANG, H.; FANG, R.; YUAN, Z.; ZHANG, Z.; TIAN, Y. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin PP2 gene promoter. **Transgenic Research**, New York, v. 13, n. 6, p. 559-566, 2004.
- HANCOCK, R.E.W.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 82-88,1998.
- HARTUNG, J.S.; HALBERT, S.E.; PELZ-STELINSKI, K.; BRLANSKY, R.H.; CHEN, C.; GMITTER, F.G. Lack of evidence for transmission of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' through *Citrus* seed taken from affected fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 10, p. 1200-1205, 2010.
- HASSE, C.H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, p. 97-100, 1915.
- HE, Y.; CHEN, S.; PENGA, A.; ZOU, X.; XUA, L.; LEI, T.; LIUA, X.; YAO, L. Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (*Shiva A* and *Cecropin B*) via a novel *Agrobacterium*-mediated transformation of mature axillary buds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, p. 99-107, 2011.
- HEHN, A.; ROHDE, W. Characterization of cis-acting elements affecting strength and phloem specificity of the coconut foliar decay virus promoter. **Journal of General Virology**, Spencers Wood, v. 79, p. 1495–1499, 1998.

- HOLLAND, D.F. Generic index of the commoner forms of bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 5, p. 191–229, 1920.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Levantamento Sistemático da produção agrícola**, **junho de 2012**. Disponível em:
- http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm. Acesso em: 26 jun.2012.
- INOUE, H.; OHNISH, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus* Liberibacter asiaticus by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.
- JAGOUEIX, S.; BOVE, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha-subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.
- JAMES, J.D., A.J. PASSEY, D.J. BARBARA, AND M. BEVAN. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed Ti-binary vector. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 658-661, 1989.
- JESUS JR., W.C.; BELASQUE JR., J.; AMORIM, L.; CHRISTIANO, R.S.C.; PARRA, J.R.P.; BERGAMIN FILHO, A. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 277–283, 2006.
- JIANG, H.; QIN, H.M.; YU, H.M; Cloning and function of phloem protein gene promoter from Cucurbita maxima. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v. 7 p. 63–68, 1999.
- KHAWALE, R.N.; SINGH, S.K.; GARG, G.; BARANWAL, V.K.; ALIZADEH, S.A. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Nagpur mandarin (Citrus reticulata Blanco). **Current Science**, New York, v. 91, n. 12, p. 1700-1705, 2006.
- KIM, J.S.; SAGARAUM, U.S.; BURNS, J.K.; LI, J.L.; WANG, N. Response of sweet orange (Citrus sinensis) to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 50-57, 2009.
- KOIZUMI, M. Citrus canker: The world situation. In: TIMMER, L.W. (Ed.). **Citrus canker**: A international perspective. University of Florida/Institute of food and agricultural Science, Gainesville: University of Florida, 1985. p. 2-7.
- KOIZUMI, M.M.; PROMMINTARA, G.; LINWATTANA,; KAISUWAN, T. Field evaluation of citrus cultivars for greening resistance in Thailand. In: MORENO, P.; J. V. DA GRAÇA,; TIMMER, L.W. (Ed.). CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 1993. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1993. p. 274-279.

- KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONA'K.J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, n. 27, p. 95–125, 2006.
- LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Org.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico/FUNDAG, 2005. p. 509-566.
- LEACH, J.G.; LILLY, V.G.; WILSON, H.A.; PURVIS JUNIOR, M.R. Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, n. 47, p 113-120, 1957.
- LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*.**The Botanical Review**, New York, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.
- LI, D. d.; SHI, W.; DENG, X.X. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing *thepTA29-barnase* gene. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, n. 17, p. 1209-1215, 2003.
- LI, Q.; LAWRENCE, C.B.; XING, H.; BABBIT, R.A.; BASS, W.T.; MAITI, I.B.; EVERETT, N. P.Enhanced disease resistence conferred by expression of an antimicrobial magainin analog in transgenic tabacco. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 635-639, 2001.
- LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A. Inefficacy of pruning to control citrus huanglongbing in Brazil. In:HUANGLONGBING—GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP,2006. Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto, 2006. p. 49.
- LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J M. Liberibacters Associated with Citrus Huanglongbing in Brazil: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Is Heat Tolerant, 'Ca. L. americanus' Is Heat Sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 257-262, 2009a.
- LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F., MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. 2009. Graft Transmission Efficiencies and Multiplication of 'Candidatus Liberibacter americanus' and Ca. Liberibacter asiaticus in Citrus Plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009b.
- 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, 2011.

- MARCOS, J.F.; MUÑOZ, A.; PÉREZ-PAYÁ, E.; MISRA, S.; LÓPEZ-GARCÍA, B. Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p.273-301, 2008.
- MARENGO, S. Mapeamento genético de tangerina sunki e Poncirus trifoliata para resistência ao huanglongbing (greening) dos citros.2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009.
- MCELROY, D.; BRETTELL, R.I.S. Foreign gene expression in transgenic cereals. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, 12, p. 62–68, 1994.
- MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. Plant Pathology, **Oxford**, v. 59, n. 1, p. 68-75, 2009.
- MENTAG, R.; LUCKEVICH, M.; MORENCY, M.J., SÉGUIN, A. Bacterial disease resistance of transgenic hybrid poplar expressing the synthetic antimicrobial peptide D4E1. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 405-411, 2003.
- MEYER, D.F.; BOGDANOVE, A. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: JACKSON, R.W. (Ed.) **Plant Pathogenic Bacteria:** Genomics and Molecular Biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. p. 147–1161.
- 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**, v. 31, n. 11, p. 2005-2013, 2012.
- 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.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, p. 238-242, 1992.
- MOURÃO FILHO, F. A. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. Perspectivas da produção e utilização de transgênicos para o controle do huanglongbing **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 91-100, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised médium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1169.
- NIIDOME, T.; ANZAI, S.; SONODA, J.; TOKUNAGA, Y.; NAKAHARA, M.; HATAKEYAMA, T.; AOYAGI, H. Effect of amino acid substitution in amphiphilic α-helical peptides on peptide–phospholipid membrane interaction. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v. 5, n. 7, p. 298-305, 1999.
- NIEDZ, R.P.; MCKENDREE, W.L.; SHATTERS JUNIOR, R.G. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and regeneration of transformed plants. *In Vitro* Cellular Developmental Biology-Plant, Columbia, v. 39, p. 586-594, 2003.
- PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C.K. . Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in Xanthomonas citri infected citrus leaves. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 26, n. 2, p. 215–217, 1974.
- PALM, M.E.; CIVEROLO, E.L. Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of *mancha foliar de los citricos* in México. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 9, p. 879–883, 1994.
- PAOLI, L.G. Transformação Genética de Iaranja doce (Citrus sinensis L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com Xylella fastidiosa Wells et al. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *huanglongbing* **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.37-51, 2010.
- PEÑA, L.; CERVERA,; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v.104, p.183-191, 1995.
- PEÑA, L.;CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; ROMERO, J.; BALLESTER, A.; SOLER, N.; PONS, E.; RODRIGUEZ, A.; PERIS, J.; JUÁREZ, J.;NAVARRO, L. Citrus. In: KOLE, C.; HALL, T.C. (Org.) **Compendium of Transgenic Crop Plants:** Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts. Oxford; Wiley-Blackwell Publishing, 2008. v 5, p.1-62.
- PEÑA, L.; CERVERA, N.; GHORBEL, R.; DOMÍNGUEZ, A.; FAGOAGA, C.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Transgenic citrus. In: JAIWAL, P.K.; SINGH, R.P. (Ed.) **Plant genetic engineering**. Houston: Sci-Tech Publish, 2003. p. 261-282.
- PEÑA, L.; MARTÍN-TRILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1

- genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, London, v.19, p.263–267, 2001.
- QUECINI, V.M.; VIEIRA, M.L.C. Plantas transgênicas. In: SERAFINI, L.A.; NEIVA MONTEIRO DE BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, p. 278-331, 2001.
- RAJASEKARAN, K. CARY, J.W.; JAYNES, J.M.; CLEVELAND, T.E. Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 3, n. 6, p. 545-554, 2005.
- RAJASEKARAN, K.; STROMBERG, K.D.; CARY, J.W.; CLEVELAND, T.E. Broad-spectrum antimicrobial activity *in vitro* of the synthetic peptide D4E1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 49, n. 6, p. 2799-2803, 2001.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). **Neuroscience Letters**, Limerik, v. 339, p. 62-66, 2003.
- RAO, K.V.; RATHORE, K.S.; HODGES, T.K.; FU, X.; STOGER, E.; SUDAHAKAR, D.; WILLIAMS, S.; CHISTOU, P.; BHARATHI, M.; BROWN, D.P.; POWELL, K.S.; SPENCE, J.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. **The Plant Journal**, Malden, v. 15, n. 4, p. 469-477, 1998.
- REYES, C.A.; ZANEK, M.C.; VELAZQUES, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GARCIA, M. L. Generation of Sweet Orange Transgenic Lines and Evaluation of Citrus psorosis virus-derived Resistance against Psorosis A and Psorosis B. **Journal of Phytopathology**, Hoboken, v. 159, n. 7/8 p. 531-537, 2011.
- RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTWER, C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 245, p.154–160, 1997.
- RODRÍGUEZ, A.; CERVERA, M.; PERIS, J.E.; PEÑA, L. The same treatment for transgenic shoot regeneration elicits the opposite effect in mature explants from two closely related sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n.1, p. 97-106, 2008.
- RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO,E. L. (Ed.) *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. p. 193–264.
- SANDERS, P.R.; WINTER, J.A.; BARNASON, A.R.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R. T. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.15, n. 4, p.1543–1558, 1987
- SANGER, M.; DAUBERT, S.; GOODMAN, R.M. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from

cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter **Plant Molecular Biology**, Dordrecht,, v. 14, p.433-443, 1990.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K.Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones,1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *Phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Maryland Height, v. 28, p.494–518, 2005.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. (Erratum) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Maryland Height, v.29, n. p. 690–695, 2006.

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

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

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

SINGER, S.D.; HILY, J.; COX, K.D. The sucrose synthase-1 promoter from Citrus sinensis directs expression of the b-glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants. **Planta**, Berlin, v. 234, n. 3, p. 623–637, 2011.

SOUTHERN, E. Southern blotting. Protocol. **Nature**, London, v. 1, n. 2, p.518-525, 2006.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICH,H.; BOMAN, H.G.Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, London, v. 292, n. 5820, p. 246-248, 1981.

STOVER, E.; BOWMAN, K.; McCOLLUM, G.; NIEDZ, R.; SHATTERS JUNIOR, R.; HALL, D. Breeding citrus for hlb resistance at the USDA/ARS U.S. Horticultural

Research Laboratory, Fort Pierce, Florida. **Second Annual Workshop on Huanglongbing and the Asian Citrus Psyllid (HLB/ACP)**, Merida, Mexico, 2010. Disponível em: http://www.calcitrusquality.org. Acesso em 10 dezembro 2012.

SUN, X.; STALL, R.E.; JONES, J.B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM J. H.; DIXON, W.D.; SCHUBERT, T.S.; CHALOUX, P.H.; STROMBERG, V.K.; LACY, G.H.; SUTTON, B.D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/Mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n.11, p. 1179–1188, 2004.

SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.) **The Citrus industry**. 2ed. Berckley: University of California, v.1, n.3, p.190-430, 1967.

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

TAVANO, E.C.R.; STIPP, L.C.L.; MUNIZ, F.R.; MOURÃO FILHO, F. A.A.; MENDES, B.M. In vitro organogenesis of *Citrus volkameriano* and *Citrus aurantium*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, n. 2, p. 395-399, 2009.

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

TRIPATHI, L.; TRIPATHI, J.N.; TUSHEMEREIRWE, W.K. Strategies for resistance to bacterial wilt disease of bananas through genetic engineering. **African Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 3, n. 12, p. 688-692, 2004.

VAN HOFSTEN, P. FAYE, I.; KOCKUM, Z. LEE, J.Y.; XANTHOPOULOS, K.G.; BOMAN, H.G.; ENGSTRÖM, A.; ANDREU, D.; MERRIFIELD, R.B. Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical syntesis of cecropin B from Hyalophora cecropia. **Proceedings of National Academic Sciences of the United State of America**, cidade, v. 82, n. 8, p. 2240-2243, 1985.

VAN VUUREN, S.P. van; COOK, G.; PIETERSEN, G. Lack of Evidence for Seed Transmission of '*Candidatus* Liberibacter africanus' Associated with Greening (Huanglongbing) in Citrus in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 8, p. 1026-1026, 2011.

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

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K; SWINGS, J. Reclassification of Xanthomonas. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Woodv, 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VERNIÈRE, C.J.; HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E.L.; ALVAREZ, A.

- M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 5, p. 477–487, 1998.
- WANG, Z.; ZHANG, K.; SUN, X.; TANG, K.; ZHANG, J. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene gna into maize plants. **Journal of Bioscience**, New Delhi, v. 30, n.5, p. 627–638, 2005.
- WHITE, J.; CHANG, S.Y.; BIBB, M.J.; A cassete containing the *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus* a selectable marker for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 1062, 1990.
- YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, D. Transformation of sweet orange [Citrus sinensis (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 75, p. 11–23, 2011.
- ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELA'ZQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PEÑA, L;.GARCIA, M.L. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 57-66, 2008.
- ZHAO, X.Y. Citrus yellowshoot (Huanglungbin) in China. A review. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tokyo, v. 1, p. 466 469, 1982.
- 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.