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

Produção de plantas transgênicas de citros expressando toxina de *Bacillus thuringiensis* visando ao controle de *Diaphorina citri*, inseto vetor do agente causal do *huanglongbing* (HLB)

Sílvia de Oliveira Dorta

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

**Piracicaba
2018**

Sílvia de Oliveira Dorta
Bacharel em Ciências Biológicas e Licenciada em Ciências Biológicas

**Produção de plantas transgênicas de citros expressando toxina de *Bacillus thuringiensis*
visando ao controle de *Diaphorina citri*, inseto vetor do agente causal do *huanglongbing*
(HLB)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **JULIANA DE FREITAS ASTÚA**

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

Piracicaba
2018

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

Dorta, Sílvia de Oliveira

Produção de plantas transgênicas de citros expressando toxina de *Bacillus thuringiensis* visando ao controle de *Diaphorina citri*, inseto vetor do agente causal do *huanglongbing* (HLB) / Sílvia de Oliveira Dorta. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2018.

93 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. HLB 2. Psílídeo 3. Cry 4. Entomopatogênica I. Título

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de certa forma, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

A Deus pelo dom da vida, por ser minha luz e minha força.

Aos meus pais pelos ensinamentos, os valores, por todo apoio, incentivo, principalmente pelas orações e por terem me acompanhando em todas as fases da vida, ensinando que nunca devo desistir dos meus sonhos, que devo lutar e nunca me esquecer de minhas origens.

Aos meus irmãos José Leandro, Silmara e Fernando por todo apoio e carinho durante toda a jornada e minha cunhada Elaine por sempre me incentivar a nunca desistir.

À ESALQ/USP, instituição a qual me sinto honrada em ter feito parte e a todos os professores que contribuíram com meu aprendizado e enriqueceram meus conhecimentos.

À Coordenação do PPG de Microbiologia Agrícola, à Secretaria da Pós-Graduação deste programa e à Pós-Geral por todo apoio e assessoria.

À Agência de Fomento Capes, juntamente com a Embrapa, por financiarem meu trabalho e ao Prof. Dr. Kitajima pelo auxílio financeiro.

À Dra. Juliana de Freitas Astúa pela orientação e o apoio, por sempre ter exaltado o que tenho de melhor e por me fazer enxergar que sempre posso mais, fazendo com que me tornasse uma pessoa melhor e acrescentando a minha carreira profissional e, principalmente, por ter compreendido que nos momentos em que a jornada se tornara difícil, nunca deixou de acreditar em meu potencial. Serei eternamente grata.

À Dra. Lísia Borges Attílio, agradeço imensamente por todos os ensinamentos, orientação, paciência, por ter me mostrado que é necessário acreditar, por me apoiar e me direcionar durante todo o trabalho, pela companhia, amizade e carinho, os conselhos, enfim obrigada por tudo de coração!

À Dra. Rose Monnerat da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por ter cedido gentilmente a estirpe de Bt utilizada neste trabalho e ao Dr. João R. S. Lopes do Dep. de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela colaboração desde o início deste projeto.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho do Dep. de Produção Vegetal da ESALQ/USP em ceder gentilmente os plasmídeos contendo os promotores utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Pedro Luiz Ramos Gonzalez do Instituto Biológico em São Paulo, pelo auxílio no desenho dos primers para a confirmação da sequência do gene *cry11* e ao Dr. Orlene Guerra-Peraza pelo auxílio na otimização do uso dos códons.

Ao Dr. Mikhahil Oliveira Leastro do Instituto Biológico em São Paulo, ao Mestre Reinaldo Rodrigues e à mestrandia Ísis G. B. de Carvalho do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” em Cordeirópolis pelo auxílio na detecção de proteínas.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC em Cordeirópolis e ao diretor Dr. Marcos Antonio Machado por toda a infraestrutura e o apoio cedido durante o desenvolvimento desta pesquisa; aos funcionários de apoio: Vanderley, Everaldo, Dérik, Luis Fernando, Franciel, Hugo pela manutenção das plantas em casa de vegetação e produção de porta-enxertos; à equipe de apoio do Laboratório de Biotecnologia: Rose, Anita e Kleber pela grande prontidão e colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Acarologia, Dra. Valdenice M. Novelli, Graziela, Jeniffer, Thaís e Luana por todo apoio durante o trabalho, e aos demais pelos nossos cafés e momentos de descontração.

À Tatiane da Cunha pela ajuda na análise estatística dos bioensaios, discussões do nosso trabalho, pelo companheirismo, amizade, pelos conselhos, e por toda a parceria.

Aos meus caros colegas e companheiros de sala conhecida por “Estábulo”, Diogo, Laís, Tiago, Inaiara, Laura, Emilyn, Tatiane, Paulo, Francisco, Eduardo, muito obrigada pelos momentos de descontração, troca de informações, sugestões, auxílio, pela nossa amizade, nossos encontros e por tornarem os meus dias mais alegres e pelo apoio durante essa nossa caminhada.

Agradeço as amigas Adriana, Fabiana, Márcia, Karina, Amélia, Patrícia, Fernanda e Kely por todo apoio e carinho e em especial à Graziela e Thaís por me fazerem acreditar que posso ser forte e chegar ao meu objetivo, obrigada por tudo e pelas vezes que vocês me enxergaram melhor do que eu sou.

Eterna gratidão a todos os que enriqueceram meus conhecimentos e que proporcionaram a realização e finalização deste trabalho. Deus vos abençoe.

Muitíssimo obrigada!

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu
tamanho original"*
Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Estratégias biotecnológicas para o manejo do HLB.....	13
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> e suas aplicações	17
2.3. Citros Bt para o manejo do HLB	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Seleção, clonagem e otimização da expressão do gene selecionado	27
4.1.1. Otimização do <i>Codon Usage</i> para a expressão do gene selecionado.....	29
4.2. Síntese das construções gênicas	30
4.2.1. Confirmação dos promotores AtSUC2 e CaMV 35S nas construções gênicas.....	31
4.3. Obtenção do material vegetal	31
4.4. Introduções de sementes para a germinação na ausência de luz	32
4.5. Preparo do inóculo bacteriano para a transformação genética	32
4.6. Transformação genética de citros, seleção e regeneração das brotações.....	33
4.7. Seleção <i>in vitro</i> da transgenia através da PCR	34
4.8. Aclimação das plantas em casa de vegetação e confirmação da transgenia	35
4.9. Extração de RNA total e síntese de cDNA	36
4.10. Análise da expressão gênica do transcrito.....	37
4.11. Análise de <i>Southern blot</i>	38
4.12. Detecção da proteína por <i>Western Blot</i>	39
4.13. Propagação das plantas	40
4.14. Desafio das plantas citros transgênicas com ninfas de <i>D. citri</i>	40
4.15. Análise e interpretação dos resultados dos biosensaio	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Confirmação do gene <i>cry11</i>	43
5.1.1. Otimização de <i>códons</i> e síntese do gene sintético.....	45
5.2. Confirmação das construções gênicas e seus respectivos promotores	47
5.3. Transformação genética, seleção e regeneração	50
5.4. Identificação da transgenia <i>in vitro</i> e aclimação das plantas em casa de vegetação	56
5.5. Análise da expressão do transcrito	58
5.6. Análise de <i>Southern blot</i>	62
5.7. Detecção da proteína por <i>Western blot</i>	64
5.8. Desafio das plantas de citros transgênicas a ninfas de <i>D. citri</i>	65
6. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

Produção de plantas transgênicas de citros expressando toxina de *Bacillus thuringiensis* visando ao controle de *Diaphorina citri*, inseto vetor do agente causal do *huanglongbing* (HLB)

Diaphorina citri é o inseto vetor das bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., causadoras do *huanglongbing* (HLB), doença que tem causado sérios danos e grandes perdas econômicas à citricultura mundial, pois acomete todas as variedades comerciais de citros e não existem genótipos comerciais resistentes. Por esta razão, têm-se buscado estratégias que auxiliem no controle do inseto vetor, hoje feito quase que exclusivamente com o uso de excessivas aplicações de agroquímicos que aumentam o custo de produção e potencializam a agressão ao meio ambiente. Tem-se vislumbrado o desenvolvimento de plantas transgênicas que aumentem a resposta de defesa da planta contra *Ca. Liberibacter* spp. ou o vetor de forma mais efetiva, pelo direcionamento da expressão de genes alvo em tecidos específico, controlados por promotores de floema ou constitutivo. Nosso grupo tem buscado estratégias ainda não utilizadas em citros, mas efetivas para outras culturas, como o uso da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) para o controle de *D. citri*. Essa bactéria se destaca devido à produção de proteínas com atividades inseticidas contra diversas fases imaturas de insetos, por isso tem sido amplamente utilizada tanto na produção de bioinseticidas quanto, principalmente, na produção de plantas transgênicas em culturas como algodão, milho e soja. Em trabalhos anteriores, identificamos que o gene *cry11* codifica uma toxina capaz de causar elevada mortalidade em ninfas do psílídeo dos citros 120 horas após sua inoculação em *seedlings* de citros. Este gene foi clonado para a expressão em tecido de plantas de laranja doce sob o direcionamento de dois promotores, um específico de floema e o outro constitutivo. Foram obtidas 19 plantas transgênicas, com a inserção de uma a três cópias do transgene em seus genomas. Algumas delas apresentaram elevados níveis de expressão do transcrito. Todas essas plantas foram propagadas via enxertia em limoeiro Cravo e estão praticamente prontas para serem desafiadas com ninfas de *D. citri*. Esse é o primeiro esforço para a produção de citrus Bt visando ao manejo do HLB dos citros.

Palavras-chave: Transgenia; Cry; Psílídeo; Citros

ABSTRACT

Transgenic citrus plants expressing *Bacillus thuringiensis* toxin aiming at the control of *Diaphorina citri*, insect vector of the *huanglongbing* (HLB) causal agents

Diaphorina citri is the insect vector of *Candidatus Liberibacter* spp., the causal agents of *huanglongbing* (HLB), the most devastating disease of citrus worldwide, due to the severe losses it induces and the lack of commercial resistant genotypes. For this reason, strategies have been sought to assist in the control of the insect vector, nowadays done almost exclusively with the use of excessive applications of agrochemicals that increase the cost of production and potentiate the aggression to the environment. It has been envisioned the development of transgenic plants that increase the defense response of the plant against *Ca. Liberibacter* spp. or the vector more effectively, by targeting the expression of target genes in specific tissues, controlled by phloem or constitutive promoters. Our group has sought strategies not yet used in citrus, but effective for other crops, such as the use of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) for the control of *D. citri*. This bacterium stands out due to the production of proteins with insecticidal activity against several immature phases of insects, so it has been widely used both in the production of bioinsecticides and mainly in the production of transgenic plants in crops such as cotton, corn and soybean. In previous work, we have identified that the *cry11* gene encodes a toxin capable of causing high mortality of citrus psyllid nymphs 120 hours after inoculation in citrus seedlings. This gene was cloned for expression in sweet orange plant tissue under the guidance of two promoters, one phloem specific and the other constitutive. Nineteen transgenic plants were obtained, with the insertion of one to three copies of the transgene into their genomes. Some of them had high levels of transcript expression. All these plants were propagated via grafting in Clove lemon tree and are practically ready to be challenged with *D. citri* nymphs. This is the first effort to produce citrus Bt for the management of citrus HLB.

Keywords: Transgenic ; Cry; Psyllid; Citrus

1. INTRODUÇÃO

A citricultura possui grande relevância dentro do agronegócio brasileiro e se destaca pela movimentação anual de mais de US\$ 6,5 bilhões (NEVES; TROMBIN, 2017). O Brasil é responsável por 61% da produção de suco e 34% da produção mundial de laranja (CITRUSBR, 2017; NEVES; TROMBIN, 2017), sendo o maior exportador global de suco desta fruta (OCDE-FAO, 2015). Grande parte do que é exportado tem como destino a União Europeia (66,7%) e os EUA (20,7%), seguidos de países como Japão e China (CITRUSBR, 2017).

De acordo com o Fundo de Defesa de Citricultura, a safra de laranja 2017/18 no cinturão citrícola (São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro) fechou com 398,35 milhões de caixas de 40,8 kg (CITRUSBR, 2018 a). A Flórida, nos Estados Unidos da América (EUA), que já foi o maior produtor de laranjas do mundo, está em ritmo contrário, e de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a estimativa da safra de laranjas 2017/2018 será de apenas 45 milhões de caixas de 40,8 kg), (USDA; CITRUSBR, 2018 b).

A área de produção no cinturão citrícola brasileiro em 2015 era de 430.633 ha e em 2017 passou para 402.566 ha, esta queda vem ocorrendo em virtude do alto custo para manter um pomar em produção, fatores climáticos e, principalmente, pragas e doenças que na citricultura brasileira são inúmeras (FUNDECITRUS, 2017 a). A principal delas é, sem dúvida, o *Huanglongbing* também conhecida como HLB ou *greening*, considerada a doença mais devastadora da citricultura mundial devido à sua crescente e rápida dispersão nos pomares citrícolas, acarretando no aumento do custo de investimento e manejo dos pomares (GOTTWALD, 2010; DA GRAÇA, et al., 2016). No Brasil, desde o primeiro relato da doença, em 2004, já foram erradicadas 46 milhões de plantas, o que corresponde a 100 mil ha (FUNDECITRUS, 2017 b). A incidência da doença nos pomares paulistas em 2017 foi de 16,73% e, embora permaneça no mesmo patamar dos últimos anos (17,89% em 2015 e 16,92% em 2016), o índice de plantas doentes ainda é alto (FUNDECITRUS, 2017 b).

Na Flórida a doença se tornou endêmica, e estima-se que a incidência já tenha atingido 90% das plantas, levando à redução significativa da área plantada (de 200 mil ha em 2004/05 para 155 mil ha em 2015/16). Isso tem levado à já mencionada significativa redução da produção, além de aumento de 85% nos custos de produção, entre 2004 e 2016 (FUNDECITRUS, 2017 b).

O HLB se caracteriza por induzir sintomas sistêmicos severos e ser de rápida disseminação, causando fortes impactos na produção mundial de citros. Por este motivo, associado à ausência de ferramentas disponíveis para o controle curativo da doença, ao tipo de interação entre patógeno e hospedeiro e à ausência de variedades comerciais resistentes (STOVER et al., 2016), a comunidade científica tem concentrado seus esforços na busca por estratégias de longo prazo, abordando diferentes linhas de pesquisa que visem ao controle da doença.

O controle do inseto vetor, o psíldeo *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), tem se intensificado principalmente com excessivas aplicações de inseticidas, que inviabilizam o custo e potencializam a agressão ao meio ambiente. Neste sentido, têm-se buscado alternativas de controle ao psíldeo seja através da busca de novas moléculas mais seletivas (BRAR; MARTINI; STELINSKI, 2017; CHEN; SEO; STELINSKI, 2017) ou da combinação de produtos naturais/inseticidas que atuem diretamente no psíldeo, de modo a não afetar os inimigos naturais (KHAN et al., 2014; BELOTI et al., 2015). Têm-se buscado, ainda, estratégias de controle biológico com o uso de parasitóides como *Tamarixia radiata* (PARRA et al., 2010; PARRA et al., 2016; FLORES; CIOMPERLIK, 2017) e *Diaphorencyrtus aligarhensis* (PORTALANZA et al., 2017) ou de micro-organismos entomopatogênicos como fungos (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2012; AUSIQUE et al., 2017) e bactérias (BALBINOTTE, 2012; DORTA, 2014; FERNANDEZ-LUNA, 2016).

Dentre as bactérias entomopatogênicas, *Bacillus thuringiensis* (Bt) se destaca por produzir proteínas que causam mortalidade de vários insetos em fases imaturas (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2012). Por isso, tem sido amplamente utilizada tanto na produção de bioinseticidas quanto, principalmente, na produção de plantas transgênicas em culturas como algodão, milho e soja (BRAVO et al., 2017).

Balbinotte (2012) testou pela primeira vez a toxicidade de Bt contra ninfas de *Diaphorina citri* e verificou mortalidade das mesmas. Por outro lado, Fernandez-Luna (2016) testando a atividade de toxinas Bt também no controle de *Diaphorina citri*, porém em fase adulta, verificou que para esta fase do inseto as proteínas não foram eficientes para promover o controle. No entanto, nosso grupo ampliou essa linha de pesquisa ao avaliar 10 estipes de Bt geneticamente modificadas, recombinantes com gene único *cry* ou *cyt*, testando-as individualmente contra ninfas de 3º ínstar de *D. citri* para avaliar a atividade inseticida de cada uma das toxinas isoladamente. Uma das estirpes, contendo o gene *cry11*,

se destacou por apresentar alta taxa de mortalidade (DORTA, 2014). Devido à atividade desta proteína contra ninfas de *Diaphorina citri*, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' e 'Valência' expressando esta proteína dirigida por um promotor constitutivo e outro específico de floema e avaliar o nível de expressão do transgene e da proteína de Bt. Este é o primeiro esforço para a produção de plantas de citros Bt visando ao controle do HLB.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estratégias biotecnológicas para o manejo do HLB

O HLB é considerado a doença de maior importância na citricultura mundial (BOVÉ, 2006; DA GRAÇA et al., 2016), devido aos sérios danos causados e ao alto custo financeiro e ambiental para a produção de citros. A doença originou-se na Ásia no início do século XX (BOVÉ, 2006). Nas Américas, o primeiro relato da doença se deu em 2004 no Brasil, na região de Araraquara, SP (COLETTA FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), sendo que hoje também ocorre no Paraná e em Minas Gerais (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009; BASSANEZI et al., 2013). Em 2012 foram detectados psílídeos infectivos na Bahia (BARBOZA et al., 2014), e o monitoramento desses insetos tem sido intensificado (SULZBACH et al., 2017). Um ano após o relato da doença em São Paulo, ela foi encontrada na Flórida, EUA (HALBERT 2005; SUTTON et al., 2005) e nos anos seguintes em outros Estados americanos, apesar da intensa fiscalização daquele país (HALBERT et al., 2010; KUMAGAI et al., 2013; DA GRAÇA et al., 2015). Desde então, o HLB se espalhou de forma rápida para o México, diversos países da América Central e do Caribe (Cuba, Belize, República Dominicana, Guatemala, Nicarágua, Jamaica, Honduras e Costa Rica) (FAO, 2014), além da Argentina (AGOSTINI Et al., 2015; BADARACCO et al., 2017), Paraguai (SENAVE, 2013) e Colômbia (ICA, 2012) na América do Sul.

A doença é provocada por três bactérias: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. L. americanus* (Lam) e *Ca. L. africanus* (Laf), as quais são Gram-negativas, restritas ao floema (JAGOEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010; ZHANG et al., 2016) e não cultiváveis *in vitro*. Dentre as três espécies, Las é a que predomina e está presente na maioria dos continentes; Laf é restrita ao continente Africano, e Lam limitada ao Brasil (BOVÉ, 2006). As três espécies podem ser adquiridas e transmitidas de maneira natural e eficiente para outras plantas através dos psílídeos sugadores *Trioza erytreae* presente na África e/ou *Diaphorina citri* presente nas Américas, Ásia e África (AUBERT, 1987; TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006; TABACHNICK, 2015; DA GRAÇA et al., 2016).

As bactérias são adquiridas pelos psílídeos ao se alimentarem no floema das plantas de citros contaminadas, passam por um período de latência (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1974; XU et al. 1988; DA GRAÇA 1991; CANALE et al., 2016), multiplicam em tecidos internos

do vetor (INOUE et al., 2009; PELZ-STELINSKI et al., 2010; AMMAR et al., 2011; 2016) e são novamente inoculadas em novas plantas, se espalhando de forma sistêmica (TATINENI et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008, FOLIMONOVA et al., 2009, RAIOL JÚNIOR, 2017), o que dificulta o manejo da doença (GOTTWALD, 2010). Além desta forma de transmissão, os agentes causais do HLB podem ser transmitidos para plantas por borbulhas infectadas e experimentalmente por *Cuscuta* sp. A transmissão da bactéria entre insetos pode ocorrer verticalmente para a progênie (PELZ-STELINSKI et al., 2010) e horizontalmente do macho para a fêmea (MANN et al., 2011).

Em plantas doentes, um dos principais sintomas é o mosqueamento das folhas, que ocorre devido ao bloqueio da translocação de seiva elaborada, impedindo o fluxo de nutrientes e promovendo o acúmulo de amido nas folhas (ACHOR et al., 2010). Além disso, são sintomas característicos nervuras espessas, manchas cloróticas, deficiência nutricional; em frutos ocorre a redução do tamanho, distorção da columela central, queda de folhas e frutos, abortamento de sementes e redução do número de radículas, comprometendo a planta e promovendo diminuição da produção (BOVÉ, 2006).

O bloqueio dos vasos floemáticos ocorre devido à deposição de calose (FOLIMONOVA; ACHOR 2010; FAN et al., 2013; BOAVA; CRISTOFANI-YALY; MACHADO, 2017), que é desencadeada pela planta após a ativação de genes de defesa a doença, os quais tem a expressão ativada na tentativa de impedir a disseminação da bactéria para outras partes da planta (KIM et al., 2009; FOLIMONOVA; ACHOR 2010).

Não existem medidas curativas para a doença e todas as variedades comerciais de citros são suscetíveis. Porém, são observadas diferenças de resposta de alguns genótipos (FOLIMONOVA et al., 2009; BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010). Particularmente os porta-enxertos *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos apresentam algum nível de resistência ou tolerância (BOWMAN; ALBRECHT, 2015; BOWMAN; STOVER et al., 2016; 2017; McCOLLUM; ALBRECHT, 2017; HATCHER, 2017; BOAVA; CRISTOFANI-YALI; MACHADO, 2017). Além disso, recentemente, em plantas cultivadas na Flórida, com alta pressão de seleção, foi verificada a existência de genes dominantes relacionados à tolerância ao HLB (ALLEN; ROGERS; CHAPARRO, 2017).

No Brasil, para a contenção da doença, foram tomadas medidas imediatas descritas na instrução normativa (IN) 53 de 2008, que determina a eliminação mandatória de árvores sintomáticas, o plantio de mudas sadias produzidas sob telado e o controle químico do vetor

(INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA - 53, 2008). O Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) vem promovendo a conscientização dos citricultores para a realização de pulverizações combinadas entre os produtores de cada região, com intuito de realizar o manejo regional, prática importante para diminuir o efeito de borda, local aonde os psíldeos chegam à propriedade (BASSANEZI et al., 2010). No entanto, estas estratégias são de alto custo e para que sejam eficientes devem ser executadas de maneira correta, pois só as aplicações com inseticidas representam de 12,65% a 38,73% do custo total da produção de laranja (BELASQUE JR et al., 2010).

Alguns pesquisadores têm buscado alternativas para o controle da bactéria através do uso de antibióticos (ZHANG et al., 2014) e termoterapia (DOUD et al., 2015). No entanto, a primeira é inviável devido ao alto custo, além de promover a seleção de bactérias resistentes, enquanto a segunda alternativa, apesar de promover redução das bactérias (HOFFMAN et al., 2013; YANG et al., 2016; DOUD et al., 2017), não as eliminam por definitivo, sendo que elas frequentemente servem como fonte de inóculo.

Outra linha de pesquisa para controle da doença é através de melhoramento genético, visando ao desenvolvimento de variedades resistentes/tolerantes, seja por meio de melhoramento convencional ou transgenia (RICHARDSON; HALL, 2014; BOAVA et al., 2015; BOWMAN; ALBRECHT, 2015; STOVER et al., 2016; 2017; ALLEN; ROGERS; CHAPARRO, 2017; BOWMAN; MCCOLLUM; ALBRECHT, 2017; DUTT; GROSSER, 2017; HATCHER, 2017; BOAVA; CRISTOFANI-YALY; MACHADO, 2017). Na tentativa de controlar o HLB vários grupos têm usado a transgenia para o desenvolvimento de plantas que aumentem a resposta de defesa da planta contra *Candidatus Liberibacter* spp. de forma mais efetiva (FEBRES; REZENDE-MUNIZ; MOORE, 2013; IFTIKHAR et al., 2016), pelo direcionamento da expressão de genes alvo em tecidos específicos, controlados por promotores de floema ou constitutivos (MIYATA et al., 2012; 2017; ATTÍLIO et al., 2013; DUTT et al., 2015; TAVANO et al., 2015;). Outra linha seguida tem sido o uso de peptídeos antimicrobianos com forte expressão no floema ou constitutivamente (ATTÍLIO et al., 2013; HAO; STOVER; GUPTA, 2016; IFTIKHAR et al., 2016; ZOU et al., 2017; DUTT; GROSSER, 2017). Shatters Jr et al. (2017) verificaram que o movimento de Las nas glândulas salivares de *D. citri* pode ser impedido através de peptídeos de ligação epitelial intestinal e sugerem que eles deverão ser testados para verificar a possibilidade de uso como inibidores da propagação da bactéria, consequentemente mitigando a doença. Recentemente, outros grupos têm empregado

novas abordagens para desenvolver plantas transgênicas visando o silenciamento gênico em locais específicos, via edição de genoma (LI, 2017; WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Nos EUA, foi implementado um programa conjunto entre a Universidade da Flórida e o USDA-ARS para a produção de plantas visando à resistência ao HLB (LAVAGI et al., 2017). Num esforço colaborativo entre pesquisadores da Universidade do Texas e a empresa Southern Gardens foram produzidas plantas expressando uma defensina de espinafre para combater a bactéria causadora do HLB (ISAAA, 2016). Já no Brasil, os pesquisadores do Fundecitrus, em colaboração com a ESALQ/USP e a EMBRAPA/CENARGEN, vêm realizando pesquisas visando a expressão de genes de compostos voláteis em plantas transgênicas de citros e soja para a repelência de *D. citri* (FUNDECITRUS, 2016). Recentemente, pesquisadores do grupo isolaram o gene do β -cariofileno, um composto volátil produzido pela goiabeira, e transformaram geneticamente *Arabidopsis thaliana* visando ao aumento da produção deste composto. Como resultado, as plantas que tinham maior quantidade deste composto sendo produzido apresentaram maior repelência ao psílídeo (ALQUÉZAR et al., 2017).

A transgenia também tem sido útil para implementar a tecnologia RNAi para silenciar genes que atuem no desenvolvimento do inseto através da transformação de *Murraya* sp. (FUNDECITRUS, 2016). A alternativa biotecnológica de silenciamento gênico em *D. citri* através do RNAi é promissora, pois resulta na redução da população ou na prevenção de sua capacidade de transmissão (EL-SHESHENY et al., 2013; KILLINY et al., 2014; ANDRADE & HUNTER, 2015; GALDEANO et al., 2017; KILLINY; KISHK, 2017).

Nosso grupo tem buscado estratégias ainda não utilizadas em citros, mas sim em outras culturas, como o uso da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* para o controle de *D. citri*. A motivação do seu uso se deu pelo relato de Bt endofítico em plântulas de algodão (MONNERAT et al., 2003; 2009), e posteriormente em outras culturas: cafeeiro (MIGUEL et al., 2013), trigo (TAO et al., 2014) e em estudos de colonização e translocação em feijoeiro (MADUELL et al., 2007; GARCÍA-SUÁREZ et al., 2017), repolho (PRAÇA et al., 2012), leguminosas: arroz, soja, lentilha, gahat, feijão francês e ervilha (TANUAJA, BISHT; MISHRA, 2013; MIRSHA et al., 2017).

Em trabalho anterior, Balbinotte (2012) relatou a possibilidade de uso de Bt em citros para o controle do psílídeo, ao inocular a bactéria via substrato em plântulas de laranja doce mantidas em tubetes. Três estirpes de Bt foram selecionadas como potencialmente

interessantes para o controle de ninfas de *D. citri*. Estas estirpes contêm mais de um gene *cry/cyt* em seu genoma, totalizando 13 genes, dos quais 10 foram testados individualmente por Dorta (2014) em estirpes recombinantes de Bt. Uma delas, contendo o gene único *cry11*, se destacou por promover mortalidade de até 93% em ninfas de *D. citri* 120 horas após a inoculação em *seedlings* de citros.

2.2. *Bacillus thuringiensis* e suas aplicações

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram positiva, com forma de bastonete, aeróbia, podendo crescer facultativamente em anaerobiose dentro da faixa de 10 a 40° C (MONNERAT; BRAVO, 2000). Possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em diversos lugares como solo, filoplano, água, insetos mortos, grãos armazenados, rizosfera (MULETA et al., 2009) e em plantas, tanto na superfície quanto endofiticamente (MONNERAT et al., 2009; TANUJA; BISHT; MISHRA, 2013;).

Bt tem sido o agente entomopatogênico mais utilizado na produção de bioinseticidas (YADAV; KEVAL; CHOUDHARY, 2015; OSMAN et al., 2015), o qual equivale a 90% da produção destes produtos (KUMAR; SINGH, 2016). O potencial uso do Bt como bioinseticida foi primeiro reconhecido por Mattes, em 1927, o que resultou no desenvolvimento da “Sporeine”, um bioinseticida de Bt comercial, usado pela primeira vez em 1938, na França (SANAHUJA et al., 2011). O primeiro registro de Bt como pesticida foi em 1961 nos EUA e foram registrados pelo United States Environmental Protection Agency (EPA) cerca de 180 produtos Bt (EPA, 1998).

De acordo com a busca realizada no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) em 2017, existem 22 produtos formulados registrados no Brasil à base de Bt, dentre eles Agree, Dipel, Xentari e Thuricide. Além disso, dos produtos comerciais de Bt para o controle de pragas agrícolas listados por Fiúza; Berlitz (2009), 17 eram para Lepidoptera e apenas seis para Coleoptera. Tem se observado um aumento na produção global de biopesticidas de 10% ao ano e 90% dos produtos são à base de Bt (KUMAR; SINGH, 2015). A maioria dos biopesticidas baseia-se em preparações de esporos-cristais derivados de isolados do tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD1, *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, *B. thuringiensis* var. *san diego*, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) e *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) (BRAVO et al., 2011).

Bt possui grande potencial para o controle de pragas na agricultura, devido à versatilidade deste organismo em produzir cristais durante a fase estacionária de seu ciclo com diferentes ações inseticidas, que atuam em diversas fases imaturas de insetos. Esses cristais são compostos por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry e Cyt (SCHNEPF et al., 1998; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; PALMA; BERRY, 2016; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016). Já na fase vegetativa, estirpes de Bt podem produzir proteínas inseticidas secretadas (Sip) (DONOVAN et al., 2006; PALMA; BERRY, 2016) e proteínas vegetais inseticidas ou vípteras (ViPs) (ESTRUCH et al., 1996; WARREN et al., 1998; PALMA; BERRY, 2016).

Os cristais podem ser formados por uma ou mais proteínas Cry e uma mesma estirpe pode sintetizar mais de um tipo de cristal, que pode apresentar as formas cubóide ou chata, esférica, retangular, bipiramidal, piramidal e rombóide (LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993; RABINOVITCH et al., 2017). Esses cristais são formados a partir do segundo estágio de esporulação e liberados no momento em que as células são lisadas (MONNERAT; BRAVO, 2000). Uma espécie de inseto pode ser afetada por mais de um isolado da bactéria, pois estes frequentemente produzem diferentes proteínas inseticidas (FIÚZA; BERLITZ, 2009).

O espectro de ação destas proteínas é amplo e existem mais de 950 sequências de genes *cry* descritas em 74 grupos, três para os genes *cyt*, quatro para os *vips* e uma SIP (CRICKMORE et al., 2016; BERRY; CRICKMORE 2017; BRAVO et al., 2017). Elas são classificadas pela sequência primária de aminoácidos, e os genes que codificam essas toxinas parecem estar presentes em grandes plasmídeos (PALMA et al., 2014). Estirpes de Bt são capazes de produzir outras proteínas com ação inseticida, como hemolisina α -exotoxinas, β -exotoxinas, enterotoxinas, fosfolipases e quitinases (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

Dentre as proteínas Cry, existem três diferentes famílias: as toxinas Cry dos três domínios, (3d-Cry), Cry tipo binário (Bin-like Cry) e Cry mosquitocida (Mtx-like Cry), e estas são referenciadas como grupos de diferentes proteínas inseticidas não relacionadas filogeneticamente (PARDO-LOPEZ; SOBERÓN; BRAVO et al., 2013; CRICKMORE et al., 2016; BRAVO et al., 2017; BERRY; CRICKMORE 2017). Dentre as famílias de proteínas, a mais bem caracterizada se refere às proteínas Cry dos três domínios (3d-Cry) (PALMA; BERRY, 2016; BERRY; CRICKMORE 2017), pois de modo geral possuem semelhança em sua estrutura terciária (ZHANG; HUA; ADANG, 2017), sendo que algumas destas proteínas foram cristalizadas e tiveram suas estruturas tridimensionais caracterizadas (ADANG; CRICKMORE;

JURAT-FUENTES, 2014; BRAVO et al., 2017). Foi sugerido que, embora ocorram diferenças na atividade biológica e nas sequências de aminoácidos destas toxinas, por terem estruturas parecidas (de MAAGD et al., 2003; BRAVO et al., 2007; PALMA; BERRY, 2016; ZHANG; HUA; ADANG, 2017) é possível que ocorra modo de ação semelhante entre elas (ZHANG; HUA; ADANG, 2017; BRAVO et al., 2017).

Foram relatados três modos de ação das proteínas Cry, sendo conhecidos como modelo de ligação sequencial das toxinas, modelo via sinalização e o modelo “clássico” (ZHANG et al., 2006; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012; BRAVO et al., 2015; SOBERÓN, MONNERAT, BRAVO, 2016). Em dois deles, ocorre a formação de poros na membrana, seguida de morte pelo choque osmótico nas células intestinais, e estes se diferem pelas interações com os receptores e a inserção na membrana. Já o terceiro modelo se caracteriza pela transdução de sinal presente em receptores de caderina, levando à morte das células do intestino médio (BRAVO et al., 2015).

Aqui descreveremos o modo de ação proposto para o grupo das proteínas Cry dos três domínios, que se iniciam com a ingestão de protoxinas pelos insetos durante a alimentação e devem ser ativadas pela ação de proteases intestinais e pH alcalino, tornando-se toxinas (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016). Dois tipos de protoxinas foram identificados: as curtas e as longas. No primeiro caso, ao serem processadas, são removidos da extremidade C-terminal 40 aminoácidos, enquanto no segundo 500 aminoácidos são removidos da extremidade N-terminal. Em ambos os casos, ocorre solubilização, ativação da toxina (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016) e ligação aos receptores específicos localizados nas microvilosidades da membrana no epitélio intestinal do inseto (WOLFERSBERGER, 1990; JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017). De fato, é muito importante conhecer a fundo as estruturas das proteínas assim como seu modo de ação e a interação das toxinas aos receptores de membrana, sendo uma das maneiras para evitar a seleção de insetos resistentes (PALMA; BERRY, 2016).

Os receptores de membrana mais comumente encontrados no intestino de insetos são os de caderina (CADR), aminopeptidase-N (APN) e fosfatase alcalina (ALP), sendo que receptores semelhantes foram descritos em Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; BRAVO et al., 2017). Após a ligação da toxina ativa aos receptores na membrana do intestino do inseto, ocorre a inserção e formação de poros que

acarreta no aumento da permeabilidade da membrana e extravasamento do conteúdo do intestino internamente ao corpo, levando à septicemia e morte das larvas (Figura 1) (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; BRAVO et al., 2015; 2017). O processo como um todo envolve diversos eventos que devem ser concluídos várias horas após a ingestão, a fim de levar à morte do inseto (JISHA; SMITHA; BENJAMIN, 2013).

Figura 1. Representação dos modelos atuais da ação de toxina Cry no epitélio do intestino médio dos insetos (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

No entanto, foi verificado que, além do modo de ação baseado na formação de poros da membrana do intestino do inseto, existe outro modelo denominado duplo modo de ação (TABASHNIK et al., 2015; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016). De acordo com os autores, além das toxinas ativas conseguirem se ligar aos receptores presentes na membrana do epitélio intestinal, sugere-se que protoxinas (Cry1A) também façam estas ligações (TABASHNIK et al., 2015; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016). Então se formam dois pré-poros na membrana, sugerindo que ambos possam ter diferentes papéis na toxicidade, o que favoreceria o aumento de sua ação. Além disso, foi observado que a estrutura tridimensional completa da protoxina Cry1Ac caracterizada possui quatro domínios diferentes na região C-terminal, mostrando que esta pode ter diferentes modos de ação, o que para o uso no controle de insetos é ideal, pois promoveria uma menor pressão de seleção e acarretaria no retardamento da resistência de insetos à proteína Bt (GÓMEZ et al., 2014; TABASHNIK et al., 2015; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016).

Além da ação isolada das proteínas de Bt também pode ocorrer a ação sinérgica entre proteínas de diferentes classes, e esta já foi relatada em vários trabalhos para as proteínas Cry e Cyt (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013; BEN-DOV, 2014; PALMA et al., 2014) presentes em *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (Bti). Por outro lado, não há provas desta ação sinérgica entre as demais proteínas de Bt (DE SCHRIJVER et al., 2015). Sugere-se que a proteína Cyt funciona como um receptor ligado à membrana das toxinas Cry11 e Cry4A (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013) e que em larvas de *Culex quinquefasciatus* Cyt1Aa facilita a ligação de Cry2Aa no intestino do inseto (BIDESHI et al., 2013). Há relatos de que outras proteínas adicionais produzidas por Bt, como as proteínas auxiliares P19 e P20 são requeridas para a produção estável de cristais parasporais (PALMA et al., 2014).

As proteínas de Bt possuem alta especificidade (PALMA; BERRY, 2016; JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017) e por isso o Bt tem sido o agente entomopatogênico mais utilizado na produção de bioinseticidas (YADAV; KEVAL; CHOUDHARY, 2015; OSMAR et al., 2015) e também em plantas transgênicas visando ao controle de insetos e consequente redução do uso de inseticidas químicos (KOCH et al., 2015; ISAAA, 2016).

Dentre as culturas transgênicas expressando toxinas de Bt plantadas globalmente em 2015 se destacam algodão, soja e milho, que correspondem a 84 milhões de ha (JAMES, 2016; NI et al., 2017). No Brasil a taxa de adoção para o plantio de culturas com a tecnologia Bt vem aumentando significativamente, desde a liberação da primeira tecnologia de algodão transgênico em 2005. No ano de 2015 foram plantadas 39,1% das culturas Bt: milho, algodão e soja com área total de 18,6 milhões de hectares, a liderança de cultivo foi de 11,9 milhões de ha para a cultura do milho, seguida da cultura da soja e algodão com 6,3 e 0,39% milhões de ha respectivamente (CÉLERES, 2015; BERNARDI et al., 2016).

A adoção de tecnologia Bt em culturas transgênicas é elevada não apenas no Brasil, mas também em outros países em desenvolvimento, sendo 32,7 milhões de ha de soja, seguidos de 15,7 milhões de ha de milho e aproximadamente 0,8 milhões de ha de algodão plantados (ISAAA, 2016).

Para garantir a estabilidade da população alvo como suscetível à toxina de Bt, é necessário o uso de áreas de refúgio, que consistem no plantio de plantas não transgênicas na bordadura ou misturadas a plantas transgênicas, com consequente aumento na variabilidade e heterozigose do inseto alvo, diminuindo a pressão de seleção de insetos

resistentes (CARRIÈRE; FABRICK; TABASHNIK, 2016; DAR et al., 2017). Essa estratégia tem impedido o aumento de insetos resistentes a toxinas Bt (DAR; WANI; KANDOO, 2017).

No entanto, há relatos do aumento da proporção de insetos resistentes em áreas de plantio Bt (CRICKMORE 2016; HERRERO et al., 2016). No Brasil, isso tem ocorrido em milho Bt expressando toxina Cry1Ab para o controle de *Spodoptera frugiperda* (OMOTO et al., 2016). Esse aumento da frequência de indivíduos resistentes nas populações tem ocorrido devido ao manejo incorreto por parte dos produtores, à forte pressão de seleção e a alterações conformacionais nos receptores de membrana dos insetos. Na tentativa de reduzir a pressão de seleção a insetos resistentes a proteínas Bt, tem sido utilizada piramidação de genes, que consiste na combinação de mais de um gene de Bt, com modos de ação distintos, visando atingir o mesmo inseto alvo (ISAAA, 2015, BERNARDI et al., 2016; CARRIÈRE; FABRICK; TABASHNIK, 2016).

Outras pesquisas que vêm sendo realizadas na tentativa de retardar a seleção de insetos resistentes a toxinas de Bt remetem à combinação dos genes de Bt aliada à tecnologia RNA de interferência (RNAi) (NI et al., 2017).

2.3. Citros Bt para o manejo do HLB

O maior avanço no uso do Bt na agricultura sem dúvida alguma foi o desenvolvimento de plantas transgênicas expressando toxinas Cry. A produção e comercialização de plantas com a tecnologia Bt vêm crescendo constantemente, pois a grande vantagem é que, como a proteína é produzida no interior da planta, a proteína Cry pode ser produzida continuamente, protegida contra a radiação solar e consequente degradação da mesma (SANAHUJA et al., 2011), favorecendo o controle de diversas pragas da agricultura.

A primeira espécie transgênica liberada para cultivo de Bt comercialmente ocorreu nos Estados Unidos em 1995; eram batatas contendo o gene *cry3A*, pertencente à empresa Monsanto. Em seguida, foram liberadas diversas variedades transgênicas de milho e algodão, desenvolvidas por empresas como Monsanto, Syngenta e outras (BRAVO et al., 2011). No Brasil, a primeira liberação para o cultivo usando a tecnologia Bt ocorreu em 2005 com a toxina Cry1Ab na cultura do algodão (TABASHNIK et al., 2013). Posteriormente, outros eventos com a cultura do milho (2007) e soja (2010) foram liberados (CTNBio, 2016).

Na cultura dos citros, parece haver um único estudo de plantas expressando *cyt2Ca1* de Bt nas raízes com o controle de 43% em larvas do coleóptero *Diaprepes abbreviatus* (MAHMOUD et al., 2016). Ainda assim, essas plantas não são utilizadas comercialmente.

Na agricultura, apesar de toxinas Bt serem amplamente utilizadas para o manejo de lepidópteros, e em menor escala, coleópteros, há algumas que controlam hemípteros. Isso é relevante, porque esses insetos podem causar sérios danos diretos ou indiretos a diferentes culturas, seja em função de sua alimentação em vasos condutores de seiva ou como vetores de fitopatógenos (CHOUGULE; BONNING, 2012; KOCH et al., 2016; AMMAR; HALL; SHATTERS JR, 2017). Por outro lado, apesar de existirem poucas pesquisas para a obtenção de plantas transgênicas expressando toxina Bt visando resistência a insetos sugadores, alguns estudos apresentam resultados promissores nesse sentido (SAMPURNA; MAITI, 2011; BAUM et al., 2012; CHOUGULE et al., 2013; JAVAID et al., 2016).

Embora não existam citros transgênicos sendo comercializado atualmente, há eventos de transformação em processo de regulamentação nas agências reguladoras dos EUA (LAVAGI et al., 2017). No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) já liberou o plantio de citros transgênicos em campo para o mesmo fim segundo as instruções da Normativa N° 10, 2013 (CTNBio, 2013; Fundecitrus, 2013). Em função da importância do HLB, a principal doença da citricultura mundial, diversos grupos de pesquisa, incluindo o do Fundecitrus, tem apostado na produção de citros transgênicos visando a resistência à bactéria ou, ao vetor e ainda a produção plantas transgênicas de culturas como a soja e murta (*Murraya Paniculata*) preferencialmente para o controle do vetor (FEBRES et al., 2013; HAO et al., 2016; MIYATA et al., 2017;; ALQUÉZAR et al., 2017; DUTT; GROSSER, 2017; FUNDECITRUS, 2017c). Em consonância com essa tendência, nosso grupo vislumbrou a possibilidade do uso de tecnologia Bt tendo como alvo a *Diaphorina citri*, inseto vetor da doença.

Levando-se em conta que boa parte das variedades transgênicas comerciais cultivadas em todo o mundo é transformada com genes de Bt, o desenvolvimento de citros Bt poderá ter melhor aceitação por parte das agências reguladoras e dos consumidores.

Desta forma, em trabalho pioneiro, Balbinotte (2012) testou 21 cepas de Bt inoculadas em suspensão diretamente no substrato em plântulas de laranja doce mantidas em tubetes e selecionou três delas como potencialmente interessantes para o controle de ninfas de *D. citri*. Posteriormente, Dorta (2014), utilizando estirpes

recombinantes contendo gene único *cry* ou *cyt*, avaliou o efeito individual de 10 dos 13 genes presentes nas três estirpes previamente selecionadas em bioensaios com *seedlings* de laranja doce.

Das dez estirpes recombinantes, uma, contendo o gene codificador para a toxina *cry11*, se destacou por proporcionar elevada mortalidade a *D. citri* (DORTA, 2014). Sendo assim, esta toxina foi selecionada para as construções gênicas sob o controle de dois promotores: um constitutivo, *Cauliflower mosaic virus 35S promoter* (CaMV 35S), e outro floema-específico, *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2 promoter* (AtSUC2). Este é o primeiro esforço em produzir e avaliar plantas de citros Bt visando ao controle de *D. citri*. O primeiro passo nesse caso é confirmar se este gene codificador para a *cry11* terá a mesma ação efetiva encontrada anteriormente durante os bioensaios utilizando estirpes recombinantes de Bt. Caso esta efetividade seja confirmada, abre-se a possibilidade para posteriormente utilizá-lo em associação com outros genes potenciais de Bt para produzir plantas com diferentes combinações gênicas (piramidação) e, se for considerado interessante, até somar a ação sinérgica do Bt com outra tecnologia como o RNAi, que pode aumentar a efetividade de controle de pragas (KOURTI et al., 2017).

Devido à importância mundial do HLB e por já existir número considerável de espécies vegetais transgênicas expressando proteínas de Bt, consideramos essa estratégia promissora. Além disso, o uso de promotor floema-específico irá direcionar a produção de toxinas para o floema, aumentando a efetividade da ação das toxinas nos tecidos vasculares em todas as partes da planta.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir plantas de citros transgênicas superexpressando gene *cry* visando ao controle de *Diaphorina citri*, inseto vetor do agente causal do HLB.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Clonar o gene *cry11* previamente selecionado e construir cassetes para a expressão do mesmo sob controle do promotor constitutivo *Cauliflower mosaic virus 35S promoter* (CaMV 35S) e floema-específico *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2 promoter* (AtSUC2);
- 2) Obter plantas transgênicas de laranja doce transformadas com o gene *cry11*;
- 3) Avaliar a expressão e o número de inserções do transgene no genoma dos eventos de citros;
- 4) Detectar, indiretamente, a proteína Cry por *Western blot*;
- 5) Desafiar e avaliar alguns eventos transgênicos submetidos à colonização por ninfas de *D. citri*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM), do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis/SP.

4.1. Seleção, clonagem e otimização da expressão do gene selecionado

Em função da alta mortalidade encontrada nos ensaios biológicos (DORTA, 2014), o gene *cry11* foi selecionado para ser utilizado na construção dos cassetes de expressão contendo o promotor constitutivo *Cauliflower mosaic virus 35S promoter* (CaMV 35S) ou o floema-específico *Arabidopsis thaliana sucrose transporter 2 promoter* (AtSUC2) visando a transformação genética de citros. A sequência de nucleotídeos da *cry11* nos foi enviada pela nossa colaboradora Dra. Rose Monnerat da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A sequência de nucleotídeos foi confirmada através de BlastN e BlastX por similaridade no Banco do “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” e o alinhamento múltiplo das sequências foi feito no Clustal W2, confirmando a sequência do gene em questão. Em seguida, visando a confirmar a sequência da *cry11* na bactéria utilizada anteriormente nos bioensaios de Dorta (2014), foram desenhados cinco pares de primers, que amplificavam fragmentos entre 484 a 594 pb com bordas sobrepostas, a fim de amplificar a sequência completa do gene (Figura 2 e Tabela 1). Além destes, foi utilizado outro conjunto de primers *gal-cry11F/R* (Tabela 1) para a detecção deste mesmo gene que gera o amplicon de 305 pb (Bravo et al., 1998).

Figura 2. Representação esquemática da sequência do gene *cry11* e localização dos primers.

Todos os primers foram desenhados com o auxílio do Dr. Pedro Luiz Ramos Gonzalez, do Instituto Biológico, através dos programas Primer 3 Web e Promega Biomatch para a

amplificação da ORF completa (1932 pb), e foi feita a PCR e um novo sequenciamento para confirmação da identidade da bactéria, de acordo com a descrição a seguir.

Com o auxílio de uma ponteira, uma camada de uma colônia proveniente do isolamento e plaqueamento de Bt em placas de petri contendo meio sólido, foi raspada e diluída em 100 µL de água Milli-Q autoclavada. Em seguida, foi dado o choque térmico a 95-100°C durante cinco minutos e a suspensão bacteriana foi colocada em gelo. Uma alíquota de 3 µL foi usada como molde para a PCR. As amostras foram amplificadas em aparelho Veriti Cyclor® 96-Well Thermal da Applied Biosystems® com 2,5 µL do Tampão 10x (Invitrogen), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo (0,2 µM), 0,8 µL de dNTPs (2,5 µM), 0,8 µL de MgCl₂ (50 µM), 0,15 µL de Taq DNA Polimerase (5U.µL⁻¹) (Invitrogen) e água para um volume final de 25 µL. Em seguida, foram amplificados fragmentos entre 484 e 595 pb com as condições de ciclagem: desnaturação inicial por 3 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento de 50°C, por 40 s, extensão a 72°C por 50 s e extensão final de 5 min a 72°C, correspondentes aos tamanhos esperados para cada par de primer. Estes fragmentos foram gerados a partir de duas estirpes que contém a *cry11*: a estirpe original S1989 (contendo cinco genes *cry/cyt*) e a recombinante contendo apenas a *cry11*.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para confirmação da sequência original do gene *cry11*

Nome da Sequência	*Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento esperado	Fonte
Cry11F1A	ATGGAAGATAGTTCTTTAGATACTTTAAGTA	594 pb	Este trabalho
Cry11R1	TCTGGTCCTGTAATCTAATACT		
Cry11F1	ATACCGAACCTACTATTGCG	527 pb	Este trabalho
Cry11R1	TCTGGTCCTGTAATCTAATACT		
Cry11F2	ATGGGGATTACTCAAGCTG	593 pb	Este trabalho
Cry11R2	CTGGCGCAGTTAAAATTTGA		
Cry11F3	TGGCAATGAAATTATGGAAGT	552 pb	Este trabalho
Cry11R3	GCAAATTTAATACTGCCGTCT		
Cry11F4	AGTGAAACGAATGATAGTTATGT	484 pb	Este trabalho
Cry11R4	ACTTTAGTAACGGATTAATTTGC		
<i>gral-cry11F</i>	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC	305 pb	Bravo et al. (1998)
<i>gral-cry11R</i>	CATTTGTTACTTGAAGTTGTAATCCC		

* 1^a linha de cada primer: iniciador direto ou *forward*; 2^a linha: iniciador reverso

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo (0,5 ng.µL⁻¹) e visualizados em luz ultravioleta em aparelho fotodocumentador ImageQuant 300 Imager da GE Healthcare. Em seguida, foi feita

a purificação com Kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System da Promega e ligação ao vetor pGEM-T (Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes.

A transformação foi feita por choque térmico com cepas de *Escherichia coli* DH5α conforme Sambrook et al. (1989) e a seleção de colônias brancas transformadas foi realizada em placas de Petri contendo o meio Luria-Bertani (LB) (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, cloreto de sódio 10 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹ pH 7,0) acrescido de 50 mg.mL⁻¹ de X-Gal, 100 mg.mL⁻¹ de IPTG e 100 mg.mL⁻¹ de ampicilina.

Foram selecionados quatro clones/cada par de primer/estirpe para a extração plasmidial, que foi realizada através da miniprep alcalina descrita por Birnbaum (1983). A confirmação se deu através da digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, seguida da visualização dos fragmentos esperados sob a luz ultravioleta em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. Feita a confirmação, foram selecionadas duas colônias/primer/estirpe para o cultivo a 37°C sob agitação de 180 rpm por 16 horas e uma nova extração plasmidial foi feita com o Kit Wizard Plus minipreps DNA Purification System (Promega).

Foi feito o sequenciamento automático em ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) com o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism” 3.0. A qualidade das sequências foi analisada no programa Chromas versão 2.13 e os contigs e alinhamentos foram montados no Vector NTI Advance 11 e ClustalW2. As sequências obtidas, mais a sequência de referência enviada pela nossa colaboradora, foram comparadas através da análise por similaridade realizada no NCBI (Blastx, Blastp), confirmando que a bactéria utilizada nos bioensaios anteriores realmente continha a sequência *cry11*.

4.1.1. Otimização do *Codon Usage* para a expressão do gene selecionado

A otimização do uso de códons é importante, pois para a produção de plantas transgênicas, se faz necessário aumentar o nível de expressão dos genes *cry* em quantidades suficientes para controlar o inseto. Isso é feito de diversas formas, mas umas das alterações mais importantes é a otimização do uso de códons, que conduz a um conteúdo de C+G semelhante ao da planta, enquanto genes bacterianos normalmente possuem baixo conteúdo de C+G (CARNEIRO et al., 2009).

A otimização foi realizada com o programa disponível on-line, Optimizer (PUIGBÒ et al., 2007), o qual não permite comparar com dados de citros e sim com plantas modelos

como *Arabidopsis thaliana*. O resultado da análise da utilização de códons foi verificado com o pacote 'GeneGA' no programa R (LI; HUANG, 2013).

4.2. Síntese das construções gênicas

Após a otimização do uso de códons do gene, foi acrescentada à posição C-terminal do gene *cry11* uma sequência de nucleotídeos de Hemaglutinina HA-tag com o intuito de facilitar a detecção da proteína por *Western Blot*. Procedimento semelhante foi utilizado com sucesso para a detecção do Citrus tristeza virus expresso em *E. coli* por ČÉVIK (2013).

As etapas de síntese do gene sintético, com os códons otimizados para expressão em plantas de citros, e as clonagens foram realizadas pela empresa Epoch Life Science Inc., EUA com os vetores mencionados a seguir.

Quatro construções gênicas foram sintetizadas para os experimentos de transformação genética de laranja doce, sendo que duas delas correspondem a vetores vazios pCAMBIA 2201, ou seja, ao vetor pCAMBIA 2201 com o promotor constitutivo CaMV 35S ou o específico de floema AtSUC2, sem o gene *uidA* e sem qualquer inserto adicional, para servir como controle (“mock”). Outras duas são os mesmos vetores, porém contendo o gene *cry11* da bactéria Bt em substituição ao gene *uidA* original do vetor, sob o controle dos dois promotores CaMV 35S ou AtSUC2 (Figura 3). Ambos os plasmídeos foram cedidos pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho (ESALQ/USP), sendo que o promotor AtSUC2 havia sido clonado pelo Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico de São Paulo) (MIYATA et al., 2012).

Figura 3. Representação esquemática dos vetores binários série pCAMBIA 2201 utilizados nas transformações genéticas. 1. Vetor binário AtSUC2_ *cry11*, contendo o gene *cry11*, sob controle do promotor floema específico AtSUC2, e o gene de seleção *nptII*, sob o controle do promotor CaMV 35S. 2. Vetor binário CaMV 35S_ *cry11*, contendo o gene *cry11*, sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S, e o gene de seleção *nptII*, sob o controle do promotor CaMV 35S, 3 e 4. Vetores binários pCAMBIA 2201 contendo os promotores AtSUC2 e CaMV 35S, respectivamente, porém sem o gene *cry11* (vetores vazios).

4.2.1. Confirmação dos promotores AtSUC2 e CaMV 35S nas construções gênicas

Após a síntese dos cassetes de expressão pela empresa Epoch, os plasmídeos enviados pela empresa foram inseridos por transformação via choque térmico em cepas de *E. coli* DH5 α conforme Sambrook et al. (1989) e cultivadas em placas em meio LB acrescido do antibiótico cloranfenicol 25 mg L⁻¹ e incubadas a 37°C por 16 horas. Foi selecionada uma colônia por construção gênica para o cultivo em 8 mL do meio LB (acrescido do antibiótico) nas mesmas condições descritas anteriormente em agitador orbital a 150-180 rpm. Após o cultivo, foi retirada uma alíquota de 600 μ L da suspensão bacteriana, à qual foi acrescida do volume de 400 μ L de glicerol a 100% (concentração final de 40%) para a estocagem da cultura permanente em ultrafreezer -80°C. Foi feita a extração plasmidial dos cultivos bacterianos contendo as quatro construções gênicas, com o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) segundo as instruções do fabricante.

Para confirmar que os vetores continham os promotores e o gene de interesse foi feita a digestão com as enzimas *Hind*III e *Bst*EII segundo as instruções do fabricante (Thermo Fischer Scientific). Após as confirmações, as construções foram transferidas para cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 por choque térmico e selecionadas em placas contendo o meio LB acrescido dos antibióticos canamicina 100 mg L⁻¹ e rifampicina a 50 mg L⁻¹. As placas foram incubadas a 28°C por 2-3 dias. Uma colônia foi selecionada para o cultivo em meio LB líquido a 28°C com agitação de 150-180 rpm durante 16 horas. Posteriormente foi feita a extração de DNA plasmidial deste cultivo para ser usado como molde da PCR com primers específicos para a detecção do gene *cry11*. O fragmento foi visualizado em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo (0,5 ng. μ L⁻¹) em luz UV em aparelho fotodocumentador ImageQuant 300 Imager da GE Healthcare. Uma cultura permanente contendo uma alíquota do cultivo bacteriano foi estocada em ultrafreezer a - 80°C.

4.3. Obtenção do material vegetal

Para a transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram selecionadas as variedades Hamlin, devido à importância econômica e facilidade de transformação genética desta cultivar, e Valência, pela relevância mundial. Os frutos de Hamlin foram cedidos gentilmente pelo Dr. Leandro Peña do Fundecitrus e os de Valência foram obtidos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, em Cordeirópolis/SP. A

extração de sementes dos frutos das duas cultivares foi feita utilizando-se máquina extratora de sementes do Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira'.

Após a extração, as sementes foram colocadas em um Becker, contendo um litro de H₂O destilada acrescido de cal virgem (10 g L⁻¹) para a remoção da mucilagem. As sementes foram então lavadas em água corrente para remoção da solução de cal e submetidas a pré-desinfestação superficial com hipoclorito de sódio comercial 1,25% acrescido de algumas gotas de detergente comercial ou Tween 20, sob agitação por 40 minutos. Três novas lavagens com água corrente foram realizadas para a retirada da solução de hipoclorito de sódio. Posteriormente, o tegumento externo das sementes foi extraído com o auxílio de uma pinça. Em seguida, foram levadas para a câmara de fluxo laminar, para nova desinfestação com hipoclorito de sódio 1,25 % preparado com H₂O destilada autoclavada de modo a deixá-las submersas durante 15 minutos. Após três enxágues com H₂O destilada autoclavada, as sementes foram utilizadas para obtenção de explantes para a transformação genética.

4.4. Introduções de sementes para a germinação na ausência de luz

A introdução de sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar com o auxílio de uma pinça esterilizada em esterilizador elétrico, sendo introduzidas de duas a três sementes/tubos de ensaio contendo aproximadamente 20 mL do meio Murashige & Skoog Basal Medium with Vitamins (PhytoTechnology Laboratories), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e phytigel (2,5 g L⁻¹), pH 6,0. Os tubos de ensaio foram fechados com tampas plásticas, vedados com filme plástico e acondicionados na ausência de luz à temperatura ambiente (~28°C), para a elongação do epicótilo, por aproximadamente um a dois meses. Para todos os experimentos de transformação genética, estima-se que tenham sido introduzidas 1500 sementes da cultivar Hamlin e 2000 sementes da cultivar Valência.

4.5. Preparo do inóculo bacteriano para a transformação genética

O preparo do inóculo foi realizado a partir de suspensão bacteriana das construções gênicas estocadas em ultrafreezer a -80°C (descrito no item 4.2.1.). Com o auxílio de alças de platina estéreis, pequenas alíquotas das suspensões bacterianas foram riscadas em placas de Petri contendo meio LB sólido pH 7,0 (acrescido dos antibióticos: canamicina 100 mg L⁻¹ para seleção do gene de interesse e rifampicina 50 mg L⁻¹ para seleção de *A. tumefaciens*). Em seguida, as placas foram incubadas a 28°C em BOD por dois dias para a obtenção de colônias

isoladas. A partir disso, foi feito um pré-inóculo em 5 mL de LB acrescido dos mesmos antibióticos e cultivados a 28°C por 16 horas em agitador orbital a uma rotação entre 150-180 rpm. Em seguida, foi retirado o volume de aproximadamente dois a três mL da suspensão bacteriana para o aumento do cultivo no volume de 50 mL em LB (acrescidos dos mesmos antibióticos e concentrações descritas anteriormente) por aproximadamente três horas, com a agitação de 180 rpm a 28°C. O cultivo bacteriano foi acompanhado através da leitura da OD da bactéria em espectrofotômetro Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio a $\lambda = 600$ nm, e a transformação foi realizada ao atingir entre 0,3 e 0,5 de absorbância. A suspensão bacteriana foi centrifugada a $4147 \times g$ (~4800 rpm) durante 15 minutos a 28°C e o precipitado de bactérias no fundo do tubo foi ressuspensionado em meio MS líquido, sem antibiótico.

4.6. Transformação genética de citros, seleção e regeneração das brotações

A transformação genética foi realizada utilizando-se segmentos de epicótilos de laranjeira Hamlin e Valência. Após a germinação das sementes e o período de alongação do epicótilo, as plântulas foram transferidas para condição de luz por 10-15 dias. Os epicótilos foram cortados no sentido diagonal entre 1-1,5 cm de comprimento e mantidos em MS líquido até o momento da transformação propriamente dita (2 a 4 horas). Foi feita a remoção dos cotilédones e das radículas. Em seguida, os epicótilos foram transferidos para um recipiente contendo o precipitado bacteriano previamente ressuspensionado em meio MS líquido (descrito no item 4.5 anteriormente) e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente para o processo de infecção. Os explantes foram secos em uma placa de Petri (estéril), contendo duas folhas de papel filtro (autoclavado) e este procedimento foi repetido até que os mesmos ficassem bem secos.

Os explantes foram transferidos para o co-cultivo em placas, contendo o meio MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) ($MS 4,4 \text{ g L}^{-1}$, sacarose 30 g L^{-1} , ágar 8 g L^{-1} e benzilaminopurina - BAP 1 mg L^{-1}) pH 5,8 e incubados por dois dias no escuro a 24°C em câmara de crescimento. Após este período, os explantes foram transferidos para o meio de seleção MT (contendo BAP 1 mg L^{-1} , cefotaxima sódica 500 mg L^{-1} para o controle do crescimento de *A. tumefaciens* e canamicina 100 mg L^{-1}) pH 6,0 e incubados a 28°C no escuro. Os sub-cultivos foram realizados a cada 15-20 dias e após a formação dos brotos, os mesmos foram transferidos

para a luz em meio de regeneração MT (contendo cefotaxima sódica 500mg L⁻¹) para favorecer a elongação dos mesmos.

4.7. Seleção *in vitro* da transgenia através da PCR

A identificação dos brotos transgênicos de cada construção foi feita através da coleta de um pedaço da folha recém-expandida de cada broto (Figura 4) com o auxílio de tesoura e pinça esterilizadas. Essas folhas foram colocadas em tubos de 1,5 mL e armazenadas a -20°C para a posterior extração de DNA total (DOYLE; DOYLE, 1990) seguida da PCR com quatro pares de primers específicos por construção. Estes foram desenhados utilizando os programas Primer3Plus e Premier Biosoft (UNTERGASSER et al., 2007; http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html).

Figura 4. Foto seleção *in vitro*. (A) Placa com brotos em meio de regeneração, (B) Foto ampliada do broto regenerado com folhas expandidas.

Os primers F135S (5'-TCAGAAGACCAAAGGGCAAT-3') e R1T-NOS (5'-AAGACCGGCAACAGGATTC-3') e F2AtSUC2 (5'-TGTCACGAAGATACCCTACGC-3') e R1T-NOS flanqueiam a região promotora e terminadora para os cassetes vazios, sendo que amplificam a construção contendo o promotor constitutivo e o promotor de floema, respectivamente (Figura 5, esquemas 1 e 3). Os pares de primers F135S e R2*cry11* (5'-CAGCAATAAGAGCAGGAGCA-3') e F2AtSUC2 e R2*cry11* foram utilizados para amplificar as sequências de interesse nas duas construções (figura 5, esquemas 2 e 4), enquanto os primers F: 5'-GCCGAGAAAGTATCCATCAT -3' e R: 5'-AGAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3' (ANSANTE, 2015) foram utilizados para amplificar 466 pb do gene codificador da neomicina fosfotransferase II (*nptII*) em plantas transformadas com a construção contendo o gene de interesse dirigido pelo promotor constitutivo.

Figura 5. Desenho dos primers para a validação das quatro construções gênicas. Duas delas correspondem a vetores vazios pCAMBIA 2201 contendo os promotores constitutivo CaMV 35S ou específico de floema AtSUC2, mas sem qualquer inserto adicional (esquemas 1 e 3). As outras duas (esquemas 2 e 4) correspondem ao esquema de validação das construções contendo o gene *cry11*.

Os primers foram validados e a PCR para a confirmação da transgenia em cada uma das construções gênicas foi realizada em aparelho Veriti Cyclor® 96-Well Thermal da Applied Biosystems® com 1-5 µL de DNA molde (10-200 ng.µL⁻¹), 6,25 µL de MyTaq Red Mix 2x (Bioline), 0,25 µL de cada primer (concentração de 0,33 µM) e H₂O para um volume final de 12,5 µL. Em seguida, foram gerados fragmentos entre 250 a 476 pb com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial por 1 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento de 55 - 60°C, por 15 s, e extensão a 72°C por 10 s e extensão final de 1 min a 72°C, correspondentes aos tamanhos dos fragmentos esperados para cada par de primer por construção, os quais foram aplicados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados em aparelho fotodocumentador sob luz UV.

4.8. Aclimação das plantas em casa de vegetação e confirmação da transgenia

Após atingirem crescimento satisfatório (0,5 a 1 cm), as plântulas *in vitro* regeneradas da transformação genética e que foram positivas por PCR foram enxertadas em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osb.) em casa de vegetação certificada para cultivo de citros transgênicos (Figura 6B). Estas plantas enxertadas foram mantidas com a diminuição de luz direta, utilizando-se tela aluminet. Os brotos enxertados ficaram protegidos por saquinhos plásticos totalmente fechados, e após sete dias foi iniciado o processo de aclimação (Figura 6C). Inicialmente, cortou-se uma das extremidades do saquinho, aos 14 dias do início do processo foi cortada a outra extremidade, e por fim, não ocorrendo a murcha, com 21 dias foi retirado o saquinho por completo (Figura 6D).

Após a aclimação das plantas, foi retirada a tela refletora aluminet e quando a brotação do enxerto alcançou por volta de 15 centímetros de altura com folhas expandidas, a planta foi setorizada em três diferentes pontos para a coleta de um disco foliar/setor/planta (Figura 6D) para a realização de nova extração de DNA total (DOYLE; DOYLE, 1990) seguida da análise da PCR com os primers específicos/construção para verificar se não eram quiméricas (descrito no item 4.7).

Figura 6. Procedimento para a realização da garfagem e aclimação das plântulas em casa de vegetação. (A) Muda de limão cravo utilizado na enxertia. (B) Broto recém-enxertado (C) Plantas aclimatadas sob aluminet (D) Planta aclimatada e seleção de três discos foliares/setor/planta para a extração de DNA total.

4.9. Extração de RNA total e síntese de cDNA

As plantas transgênicas matrizes confirmadas por PCR foram submetidas à análise de expressão do transcrito através de RT-qPCR. Para este procedimento, foi realizada a coleta de duas amostras biológicas contendo duas brotações jovens cada (com aproximadamente 2 a 3 cm de tamanho), armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente a -80°C até seu processamento. A extração de RNA total dessas brotações novas (folhas inteiras do tecido próximo ao floema) foi feita utilizando-se Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus Kit (Zymo Research), acrescido do tratamento com a DNase I, segundo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop® 8000 (Thermo Scientific) e após a desnaturação de 65°C por 5 minutos foi verificada a integridade do mesmo em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo ($0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), sob luz ultravioleta, em aparelho fotodocumentador ImageQuant 300 Imager, da GE Healthcare. Para a síntese de cDNA, foi utilizado $1 \mu\text{g}$ de RNA e o kit Platus Transcriber RNase H - cDNA

First Strand (Sinapse), segundo as instruções do fabricante. Foi considerado que a concentração de cDNA no volume final da reação de 20 µL é a mesma do RNA original (1µg).

4.10. Análise da expressão gênica do transcrito

A análise da expressão do transcrito foi feita através de qPCR, a qual apresenta extrema sensibilidade e robustez. A corrida foi realizada em aparelho 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems) utilizando-se curva padrão com método FAST, sob as condições de ciclagem inicial a 95°C por 20", seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3' e anelamento e extensão a 60°C por 30". A curva de dissociação foi feita com desnaturação a 95°C por 15" seguida da temperatura de 60°C por 1', 95°C por 15" e novamente 60°C por 15".

As amostras de cDNA foram padronizadas a 1ng. µL⁻¹ e foram utilizados 3 ng de cDNA na qPCR, corridas em triplicata para cada uma das réplicas biológicas (duas repetições por planta) e também para os controles, acrescidos de 7,5 µL de GoTaq®qPCR Master Mix (Promega), 0,5 µL de cada primer (10 µM), e água livre de RNase q.s.q. 15 µL. Os primers Forward: 5'-CTCTTATTGCTGTTGCTCCTATT-3' e Reverse: 5'- AACCTCAGTCCTAACCTTCTC-3' foram desenhados para o transcrito do transgene (*cry11*) através dos programas OligoArchitect™ Online (Sigma-Aldrich) e sua qualidade foi verificada no programa online Netprimer Premier Biosoft. Os primers foram ainda avaliados pelo BLAST do Phytozome v12.1 para verificar se eles não alinhavam ao genoma de citros (*Citrus clementina* e *Citrus sinensis*).

A normalização dos níveis de expressão do gene *cry11* foi realizada utilizando-se dois genes de referência já validados em citros, o *FBOX* (F: 5'-TTGGAAACTCTTTCGCCACT-3' e R: 5'-CAGCAACAAAATACCCGTCT-3' =112 pb) e *EF-1α* (F: 5'-TCAGGCAAGGAGCTTGAGAAG-3' e R: 5'-GGCTTGGTGGGAATCATCTTAA-3' = 80 pb) (MAFRA et al., 2012).

A eficiência de amplificação e o valor de Ct foram calculados individualmente através do Software Real-Time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005) e a expressão relativa pelo programa GenEx (versão 6). A partir da eficiência média calculada no Real-Time PCR Miner, o valor de Cq de cada amostra foi corrigido e comparado com a Quantificação Relativa $RQ = 2^{-(\Delta Cq \text{ da amostra} - \Delta Cq \text{ calibrador})}$, onde $RQ = 2^{-\Delta \Delta Cq}$.

4.11. Análise de *Southern blot*

A determinação do número de cópias foi realizada através da metodologia *Southern blot*, de acordo com protocolo padrão (SOUTHERN, 2006). A extração de DNA total foi realizada a partir do tecido de folhas expandidas (~1,4 g) pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), e sua quantificação foi feita em espectrofotômetro (220 a 750 nm) no aparelho NanoDrop® 8000 (Thermo Scientific). A partir da concentração de 270 µg de DNA por amostra, foi feita a digestão com 0,22U.µg⁻¹ da enzima de restrição *EcoRI* (Thermo Scientific) (=2U.10µg⁻¹) por 16 horas a 37°C e a corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose a 0,8 % por 16 horas. A transferência do DNA do gel foi feita por capilaridade para membrana de Nylon Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare Life Sciences) para cada uma das construções (*AtSUC2_cry11*, *CaMV 35S_cry11*, *AtSUC2_vazio* e *CaMV 35S_vazio*). As sondas foram marcadas com o Kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling (GE Healthcare) segundo as instruções do fabricante, e as mesmas foram obtidas a partir da PCR dos DNAs amplificados com primers específicos descritos no item 4.7 (Figura 5) correspondentes às construções gênicas (*CaMV 35S_cry11*, *AtSUC2_cry11*) a partir dos plasmídeos transformados em *E. coli* para cada construção (descritos no item 4.2.1). Para as construções vazias *CaMV 35S_vazio* e *AtSUC2_vazio* foram utilizados os primers para a detecção do gene *nptII*. O DNA transferido para a membrana foi hibridizado com as respectivas sondas (970 ng) por construção a 60°C por 16 horas.

A revelação foi feita através do sistema de marcação do kit 'CDP Star™ Detection Reagent' (Amersham Biosciences) (30-40 µL.cm²), e a membrana foi exposta durante 1-3 horas em contato com filme Raio X (Amersham Hyperfilm MP - GE Healthcare) dentro de um hipercassete de autorradiografia (Amersham - GE Healthcare) no escuro. Em seguida, o filme foi submerso em solução reveladora (Carestream Kodak autoradiography GBX/developer/replenisher), enxaguado em água destilada e submerso em solução fixadora (Carestream Kodak autoradiography GBX/fixer/replenisher), por 30-40 segundos em cada etapa. Em seguida, foi realizado um enxágue final em água destilada e o filme foi secado em temperatura ambiente.

As plantas que obtiveram uma cópia do transgene e as que se destacaram na análise da expressão gênica foram selecionadas para propagação de 10-15 borbulhas visando à montagem do experimento de desafio a ninfas de *D. citri* (descrito no item 4.13).

4.12. Detecção da proteína por *Western Blot*

A detecção da proteína Cry11 *in planta* foi feita utilizando-se antissoro comercial contra a cauda HA inserida na porção C-terminal do gene *cry11*. Para esta análise, foi feito um extrato proteico total a partir do tecido de brotações jovens e folhas recém-expandidas utilizando a nervura central e pecíolo para os eventos correspondentes a construção AtSUC2_*cry11* e limbo total para CaMV 35S_*cry11* (MARCELLINO; SÁ, 1998) de pelo menos dois eventos transgênicos de cada construção/promotor. A separação das proteínas se deu pela eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% ("Resolving") e 5% ("Stacking"). As amostras foram incubadas a 95-100°C por 5 minutos, e 20 µL das amostras acrescidas de 20 µL de Loading Buffer –β Laemmli 2x foram aplicadas no gel, que contou ainda com 15 µL do PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific). A corrida eletroforética espelhada (dois géis) foi realizada entre 100 – 120 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos com tampão de corrida Tris-Glicina (1x). Posteriormente, um dos géis foi corado com solução contendo Coomassie-Blue sob agitação lenta em aparelho de rotação Orbitol por 45 minutos e descorado com solução forte (45% de metanol e 10% ácido acético) com duas lavagens de 40 minutos.

O segundo gel foi incubado 15 minutos em tampão Tris Glicina (1x) sob agitação lenta no Orbitol (duas vezes), seguido da transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C da GE Healthcare Life Sciences de 0,45 Micron) por 10 minutos a 1,3 Amperes – 25 V, pelo sistema semi-dry, em cassete do sistema Trans-Blot Turbo Blotting System (Bio Rad). O bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos na membrana foi feito com o tampão de bloqueio PBST (PBST 1x, 0,1% - Tween 20, 0,1% de leite) overnight. Posteriormente, foram realizadas lavagens com tampão PBST seguidas da incubação a 37° C durante 1 hora com o anticorpo primário monoclonal Anti-HA (SIGMA H3663) purificado em imunoglobulina (IgG1), ~1 mg/mL monoclonal HA-7 (0,25-1µg.mL⁻¹ de PBST) usado na proporção 1:4000 sob agitação leve. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 3 minutos com o tampão PBST. Posteriormente, procedeu-se com a incubação com anticorpo secundário anti-Mouse IgG conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA Imuno Chemicals A-1682) produzido em cabra diluído na proporção de 1:10.000 em tampão PBST e incubado nas mesmas condições que o antissoro primário. Após as três lavagens com tampão PBST, a revelação foi feita com o tampão de revelação fosfatase alcalina (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M,

MgCl₂ 50mM, pH 9,5) acrescido de BCIP (5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate - 1mg) e NBT (nitro blue tetrazolium – 2mg) em membrana até o aparecimento das bandas.

4.13. Propagação das plantas

As plantas transgênicas obtidas foram submetidas a análises moleculares e os eventos que se destacaram foram selecionados para o desafio com *D. citri*. Desta forma, foram propagadas, via enxertia de 10 a 15 borbulhas, dos 19 eventos transgênicos contendo o gene *cry11* e dos seis eventos transgênicos controle (sem o gene *cry11*), ambos sobre porta enxerto de limão ‘Cravo’. Estas plantas permanecem em casa de vegetação certificadas para cultivo de plantas transgênicas.

4.14. Desafio das plantas citros transgênicas com ninfas de *D. citri*

As plantas transgênicas foram desafiadas com ninfas de 3º ínstar do psílídeo dos citros, *D. citri*, criadas em *Murraya paniculata* e fornecidas pelo Dr. João Lopes, do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia (LEA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

Foram montados dois bioensaios e os eventos transgênicos foram mantidos no Centro de Citricultura Sylvio Moreira em casa de vegetação (temperatura ao redor de 28 ± 5°C) com todas as exigências regidas pelas Normas da CTNBio/CIBio. Foram utilizadas cinco plantas para cada um dos seis tratamentos, sendo eles: 1 a 3 - três eventos transgênicos que se destacaram por apresentar elevada expressão gênica, 4 - um evento transgênico que apresentou baixa expressão gênica, 5 - uma planta controle (“mock”) transgênica contendo o vetor vazio e 6) uma planta que passou pelo processo *in vitro*, mas não foi transformada.

Figura 7. Evento transgênico propagado por borbulhas com brotações jovens utilizadas para o confinamento das ninfas de *D.citri* em citros Bt.

Foi feita a transferência das 10 ninfas de 3° ínstar de *D. citri* das plantas de murta para citros Bt (Figura 7) com o auxílio de um pincel macio e molhado, com muito cuidado para não danificar seus estiletes. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e a contagem das ninfas vivas foi feita até o 5° dia após a transferência, quando elas atingiram o 5° ínstar no controle negativo e “mock”. Dessa forma, foi evitada a presença de adultos alados nas plantas. Durante a avaliação da mortalidade de *D. citri* em citros Bt foram coletadas as ninfas mortas e foi feito um pool de folhas de brotações jovens onde as ninfas se alimentaram para o isolamento e detecção de Bt (Figura 7).

4.15. Análise e interpretação dos resultados dos biosensaio

Foi utilizado o software “R” versão 3.4.2 (R Development Core Team, 2016) para a análise dos biosensaio. O desenho experimental foi inteiramente casualizado utilizando-se cinco plantas de cada evento de transformação. A porcentagem de ninfas mortas provenientes da avaliação foi, transformada através do ARC SEN ($\sqrt{\% \text{ mortalidade}/100}$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram analisados os dados de proporção de mortalidade por meio de modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972) com distribuição quase-binomial e para a qualidade do ajuste foi utilizado o gráfico meio – normal de probabilidade por Hinde; Demétrio (1998) com um envelope de simulação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Confirmação do gene *cry11*

Os cinco pares de primers desenhados para a amplificação da ORF de interesse foram validados. Cada um amplificou o tamanho de fragmento esperado, apresentando banda única, variando entre 305 pb a 594 pb, como pode ser visualizado na Figura 8. A amplificação foi realizada a partir do DNA molde proveniente da bactéria obtida do isolamento de folhas, tanto para a estirpe S1989 original (com mais de um gene *cry/cyt*) quanto para a recombinante com único gene *cry11*.

Figura 8. Gel de agarose 1% evidenciando a validação dos primers que amplificam os genes que codificam as proteínas presentes em *Bacillus thuringiensis* estirpe S1989, e na recombinante com gene único *cry11*. L: Ladder 1kbp Plus Invitrogen, H₂O: água, NI: controle negativo de ninfa morta que se alimentou em folhas de planta controle (sem Bt), Est. 1 e 2: DNA de Bt proveniente da suspensão bacteriana em meio líquido; Cry11F1 e F2: DNA de Bt proveniente do isolamento de folhas das plantas inoculadas com a suspensão bacteriana. Cry11 1A ao *gral-cry11* se referem aos cinco conjuntos de primers descritos na Tabela 1.

Após a validação dos conjuntos de pares de primers, foi feita a clonagem do gene *cry11* em pGEMT-Easy (Promega) para os fragmentos de interesse. O resultado positivo foi confirmado através da digestão do fragmento correspondente com a enzima de restrição *EcoRI*, visualizados em gel de agarose 1,2%. Foram feitos dois sequenciamentos utilizando a estirpe recombinante com único gene *cry11* e a estirpe S1989 original, a qual contém o gene de interesse. A partir da amplificação das sequências do gene *cry11* nessas estirpes, foi feita a comparação e confirmação da identidade do gene, utilizando como sequência de

referência aquela enviada por nossa colaboradora Dra. Rose Monnerat, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Através da análise dos cromatogramas e da montagem dos *contigs*, foi confirmada a identidade de Bt através do Blastx e Blastp por similaridade com a sequência depositada no NCBI, confirmando a identidade do gene *cry11* nas duas estirpes que causaram elevada mortalidade de ninfas de *D. citri* nos bioensaios preliminares de Dorta (2014) (Figura 9).

Figura 9. Cabeçalho do resultado da montagem dos esfrogramas obtidos por Blastx e Blastp, confirmando a identidade do gene *cry11* de *Bacillus thuringiensis* a partir de comparação de sequências com aquelas depositadas no banco de dados do NCBI.

A identidade de nucleotídeos e aminoácidos foi de 100% em ambas as estirpes contendo o gene *cry11*. Também foi feito o alinhamento múltiplo das sequências para ambos os sequenciamentos e foi observado que ocorreram mudanças de nucleotídeos em quatro posições ao longo da sequência. Contudo, apesar do ocorrido, não houve alteração quando a sequência foi traduzida para aminoácidos deduzidos (Figura 10). Desta forma, a sequência *cry11* foi considerada validada para a construção dos cassetes de expressão.

Figura 10. Confirmação da sequência do gene de Bt codificante para a toxina Cry11, através do alinhamento entre as sequências da estirpe S1989 (selvagem) e estirpe recombinante com gene único *cry11* comparadas com a sequência referência (Estirpe Rose *cry11*) enviada pela colaboradora Dr. Rose Monnerat (EMBRAPA/CENARGEN).

5.1.1. Otimização de códons e síntese do gene sintético

A sequência do gene *cry11* não otimizada possui 1.932 nucleotídeos e os resultados dos critérios de otimização utilizados no programa Optimizer, via "Um aa - um códon" foi de 1.529 nucleotídeos correspondentes (sem alteração), com a troca de 179 bases (purinas por purinas ou pirimidinas por pirimidinas) e a troca de 224 bases purina por pirimidina entre a sequência de referência para a otimizada. Além disso, o conteúdo GC na sequência otimizada foi 33,6%, o conteúdo AT de 66,4%, CAI 0,827 e o ENC de 41. Após a otimização fizemos o Blast com a sequência de aminoácidos deduzida das sequências de nucleotídeos otimizados e os resultados foram 100% idênticos (Figura 11). Valores de CAI ("codon adaptation index", ou índice de adaptação de códons) iguais a 1 significam que o gene utiliza sempre os códons sinônimos mais frequentemente utilizados no conjunto de referência e o número 0 é o contrário. Na análise do ENC ("efetive number of codons" ou número efetivo de códons) os valores variam de 20 a 61, ou seja, 20 ocorre quando um códon que altera um aminoácido é utilizado e 61 quando todos os códons sinônimos são igualmente utilizados (PUIGBÒ, BRAVO; GARCIA-VALLVE, 2008; ULLRICH; HISS; RENSING, 2015).

Adicionalmente, ao final da sequência otimizada de Bt foi acrescentada uma sequência codificante para glicoproteína Hemaglutinina (HA-tag), a fim de facilitar o reconhecimento do anticorpo anti-HA, pois foi demonstrada por Çevik (2013) que a adição

desta a uma sequência de citros não promoveu reação inespecífica na detecção da proteína de interesse por *Western blot*.

A sequência otimizada foi testada no pacote GeneGA do programa R com a tabela de utilização de códons de *Citrus sinensis* para conferir se o gene seria normalmente expresso em plantas dessa espécie, pois o programa utilizado só permitiu otimizar o uso de códons com os dados *Arabidopsis thaliana*. Sendo assim, o resultado obtido do gene sintético, considerando-se o uso de códon de citros e de *Arabidopsis*, foi de 99% de identidade e os aminoácidos deduzidos de nucleotídeos ocorreram 100% de similaridade (Figura 11).

Também foi verificado neste pacote que a energia livre do mRNA de *cry11* original e a *cry11* otimizada ambos estão alinhados no tamanho da região codificante (Figura 12). Desta forma, acreditamos que a expressão do gene de interesse foi direcionada nos tecidos alvo sob o direcionamento dos promotores de floema e constitutivo, e que ocorrerá a produção da proteína alvo.

Figura 12. Resultado da energia livre do mRNA da *cry11* original e a *cry11* otimizada pelo programa R no pacote GeneGA.

Na otimização, a preferência do uso de códon por bactérias é diferente do utilizado em plantas, por isso esta etapa é considerada muito importante (ULLRICH1, HISS; RENSING, 2015). Além disso, alguns parâmetros também devem ser levados em consideração para que se obtenha um resultado satisfatório, pois o rendimento da produção da proteína é dependente do direcionamento da expressão no compartimento celular, assim como do nível de expressão realizado no sistema do hospedeiro, além do método de transformação e

ainda da acumulação da proteína no local desejado (EGELKROUT; RAJAN; HOWARD, 2012; ULLRICH1, HISS; RENSING, 2015).

Sabendo dessa diferença de expressão de genes após a otimização de códons, vários pesquisadores têm utilizado a otimização de códons de genes de Bt visando à aplicação na transgenia de plantas de diversas culturas (JABEEN et al., 2010; WENG et al., 2014; SINGH et al., 2016; DAS et al., 2017), pois a mesma é de grande relevância.

Por exemplo, Perlak et al. (1991) observaram o aumento dos níveis de expressão da proteína de Bt em até 100 vezes em relação à proteína não modificada, para as culturas de tomate e tabaco. Por outro lado, embora os autores observaram o aumento dos níveis de mRNA em plantas, este aumento não é diretamente proporcional ao nível de aumento de proteína por exemplo nas melhores plantas avaliadas.

Mahmoud et al. (2016) otimizaram a sequência de *cyt2CA1* de Bt com códons altamente utilizados para cada aminoácido usando quatro genes cítricos altamente expressos e, com isso, obtiveram o controle de 43% das larvas de *Diaprepes abbreviatus*.

No nosso caso, os valores de conteúdo de CG foram baixos (de 34,1% para 33,6%), comparados com a otimização de *cry2Aa* em arroz, cujos valores aumentaram de 34,81% para 57,47%, e a substituição foi de 25,87% (492/1902) de nucleotídeos e 67,51% (428/634) de códons (WENG et al, 2014).

Por outro lado, embora nossos resultados tenham levado à pequena alteração de códons, sem alteração da sequência de aminoácidos da proteína, o mesmo foi observado por Perlack et al. (1991) ao otimizarem a sequência do gene *cry1A* para a expressão em plantas de tabaco e tomate. Ademais, pelos resultados obtidos na expressão gênica, alguns eventos transformados com o promotor de floema apresentaram elevados níveis de expressão, e tudo indica que esteja ocorrendo a tradução.

5.2. Confirmação das construções gênicas e seus respectivos promotores

Antes da síntese do gene sintético foi confirmado que os vetores pCAMBIA 2201::CaMV 35S original e pCAMBIA 2201::AtSUC2 continham os promotores de interesse, através da digestão com as enzimas *HindIII+NcoI*; *HindIII+BstEII* e *PmlI* que geraram os fragmentos correspondentes (Figura 13), visualizados em gel de agarose 0,7%.

Figura 13. Confirmação da presença dos promotores AtSUC2 e CaMV 35S através da digestão dos vetores pCAMBIA 2201::CaMV 35S (original) e pCAMBIA 2201::AtSUC::uidA, com as enzimas *HindIII*+*NcoI*, *HindIII*+*BstEI* e *PmlI* visualizados em gel de agarose 0,7%.

A digestão do DNA contendo o vetor pCAMBIA 2201::CaMV 35S gerou três fragmentos com os tamanhos de 9.914 pb, 1.109 pb e 762 pb quando as enzimas *HindIII*+*NcoI* foram utilizadas; fragmentos de 8.962 pb e 2.823 pb com as enzimas *HindIII*+*BstEI* e um fragmento de 11.785 pb com a enzima *PmlI*. Já para o vetor pCAMBIA 2201::AtSUC2, foram obtidos três fragmentos de 9.914 pb, 1.109 pb e 1.010 pb com as enzimas *HindIII*+*NcoI*, dois fragmentos de 8.962 bp e 3.070 pb com as enzimas *HindIII*+*BstEI* e outros dois fragmentos de 9.763 pb e 2.270 pb com a enzima *PmlI*, que possui sítios de restrição de maneira a cortar no promotor AtSuC2 e no vetor.

Após a confirmação da presença dos promotores, minipreps de DNA contendo estes vetores foram enviadas à empresa Epoch Life Science Inc. para a síntese do gene sintético e a clonagem dos cassetes de expressão a serem utilizados nos experimentos de transformação genética. Em seguida, as construções gênicas foram utilizadas para transformar cepas de *E. coli* DH5α e *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. A construção gênica pCAMBIA 2201::35S_ry11 foi transferida para *A. tumefaciens* estirpe AGL-1.

Todos os cassetes de expressão possuem o gene de seleção neomicina fosfotransferase (*nptII*) sob o controle do promotor CaMV 35S, apresentam resistência à canamicina, e tiveram o gene repórter *uidA* removido (Figura 14) pensando na possibilidade de facilitar o processo de regulamentação de transgênicos e aceitação pelo público

Figura 14. Representação esquemática dos vetores binários série pCambia 2201 utilizados nas transformações genéticas. 1) Vetor binário CaMV 35S_vazio contendo o promotor constitutivo CaMV 35S. 2) Vetor binário AtSUC2_vazio contendo o promotor de floema AtSUC2. 3) Vetor binário CaMV 35S_cry11 contendo o gene *cry11* sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S. 4) Vetor binário AtSUC2_cry11, contendo o gene *cry11*, sob controle do promotor floema específico AtSUC2.

Após a transformação das bactérias, foi realizada a extração do DNA plasmidial de *E. coli* e realizou-se a digestão com as enzimas *Hind*III+ *Bst*II. Os fragmentos decorrentes da digestão foram visualizados em gel de agarose 0,7%: 1) CaMV 35S_vazio: 8.964 pb e 785 pb; 2) AtSUC2_vazio: 8.964 pb e 1.034 pb; 3) CaMV 35S_cry11: 8.964 pb, 1.019 pb, 435 pb, 381 pb, 343 pb, 303 pb, 177 pb; 84 pb; 4) AtSUC2_cry11: 8.964 pb, 1.268 pb, 435 pb, 381 pb, 343 pb, 303 pb, 177 pb e 84 pb (Figura 15).

Figura 15. Confirmação da transformação em *E. coli* com as quatro construções gênicas através do resultado da digestão com as enzimas *Hind*III + *Bst*II, visualizadas em gel de agarose 0.7%. L: Ladder 1Kbp plus Invitrogen, construções: CaMV 35S_vazio, AtSUC2_vazio, CaMV 35S_cry11, AtSUC2_cry11 e Neg: controle negativo

Nas construções gênicas que continham o gene *cry11* (CaMV 35S_*cry11* e AtSUC2_*cry11*) foram obtidos oito fragmentos, porém o último de 84 pb foi visualizado somente no início da corrida eletroforética, mas não após a corrida completa, por ser muito pequeno e ter se difundindo no gel.

Para certificar que as construções gênicas continham o gene de interesse, foi feita a PCR a partir do DNA plasmidial de cada construção transformada em estirpes de *E. coli* DH5 α com os primers específicos para a detecção do gene *cry11* e foi visualizado em gel de agarose um único fragmento com o tamanho de 305 pb (Figura 16).

Figura 16. Gel de agarose 1% com o resultado da detecção do gene *cry11* nas construções gênicas CaMV 35S_vazio (35S-1,2,11), CaMV 35S_*cry11* (35S+15,11,2, 35S+C1 e C8), AtSUC2_vazio (At-11, 2 e At-) e AtSUC2_*cry11* (At+2 e At+11) transformadas em estirpes de *E. coli* DH5 α e *A. tumefaciens* AGL-1 e EHA105. L: Ladder 1Kbp Fermentas, H₂O: água e P: controle positivo gene *cry11*.

A confirmação da transformação em estirpes de *A. tumefaciens* EHA105 e AGL-1 foi realizada por PCR, utilizando-se primers específicos para a detecção do gene *cry11* e DNA plasmidial de cada uma das construções gênicas como molde. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose, sendo que foram obtidos fragmentos únicos correspondentes ao gene de Bt para as construções gênicas CaMV 35S_*cry11* e AtSUC2_*cry11* (Figura 16).

Como esperado, as construções gênicas vazias (CaMV 35S_vazio e AtSUC2_vazio) não foram amplificadas com primers específicos para o gene *cry11* (Figura 16).

5.3. Transformação genética, seleção e regeneração

Os dados de transformação genética serão divididos em quatro tabelas, para que fiquem agrupados por construção gênica, sendo que em cada tabela serão apresentados dados das cultivares 'Hamlin' e 'Valência'.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados dos experimentos de transformação com a construção gênica contendo o gene *cry11* dirigido pelo promotor AtSUC2, sendo

apresentados os dados de um dos dois experimentos de transformação genética com a cultivar ‘Hamlin’ e cinco com a cultivar ‘Valência’. Para a transformação desta construção gênica com ambas as cultivares foram introduzidos o total de 708 e 749 explantes, respectivamente. Para a cultivar ‘Hamlin’, foram introduzidos 304 e 404 explantes em dois experimentos distintos. A eficiência de transformação do experimento um foi de 16,11%. No entanto, no experimento dois, apesar de ter havido regeneração de alguns brotos, estes não se desenvolveram. O mesmo padrão foi observado no controle não transformado, e também no mesmo lote de explantes utilizados para a transformação com as outras construções gênicas (AtSUC2_vazio, CaMV 35S_vazio e CaMV 35S_cry11) evidenciando um claro problema com o lote de sementes (dados não mostrados). Posteriormente foi introduzido um novo lote de sementes para a realização de novos experimentos, porém com a construção CaMV 35S_cry11, pois as demais já haviam atingido número adequado de plantas.

Tabela 2. Resultados obtidos pela transformação genética de laranjeiras doce ‘Hamlin’ e ‘Valência’ com a construção AtSUC2_cry11

Cultivar	Experimento	Explantos introduzidos	Brotos regenerados	Avaliados/PCR+	Eficiência de transformação (%) ^a	Plantas na CV PCR+
‘Hamlin’	1	304	174	149/49	16,11	8
	1	200	30	21/11	5,5	
	2	252	145	104/19	7,53	
	3	155	6	6/3	1,93	
‘Valência’	4	120	14	6/1	0,83	6
	5	22	5	2/1	4,54	

a- A eficiência da transformação foi calculada pelo número de brotos positivos em relação aos explantes introduzidos.

No caso da cultivar ‘Valência’, foram regenerados o total de 200 brotos. Destes, 139 foram avaliados e 35 foram positivos para o gene *cry11*, que correspondem à eficiência de transformação entre 0,83% a 7,53%.

Os resultados da transformação genética com a construção contendo somente o promotor AtSUC2 seguido do terminador estão representados na Tabela 3. Para esta construção gênica, foram realizados dois experimentos por cultivar (‘Hamlin’ e ‘Valência’). Dos 376 e 138 explantes introduzidos para cada cultivar, houve a regeneração de 42 e 14 brotos, respectivamente.

Tabela 3. Resultados da transformação genética de laranjeiras doce ‘Hamlin’ e ‘Valência’ com a construção AtSUC2_vazio.

Cultivar	Experimento	Explantos introduzidos	Brotos regenerados	Avaliados/PCR+	Eficiência de transformação (%) ^a	Plantas na CV/PCR+
‘Hamlin’	1	244	40	40/22	9,01	2
‘Valência’	1	87	12	11/5	5,74	1
	2	51	2	1/0	0	

a- A eficiência da transformação foi calculada pelo número de brotos positivos em relação aos explantes introduzidos.

A eficiência de transformação no primeiro experimento com a cultivar ‘Hamlin’ foi de 9,01% enquanto para a cultivar ‘Valência’ o valor chegou a 5,74%. Das plantas provenientes dos brotos com a PCR positiva, apenas uma a duas conseguiram se estabelecer em casa de vegetação. O segundo experimento com cada cultivar apresentou taxa extremamente baixa de regeneração e nenhuma planta transgênica. A não regeneração dos brotos com a cultivar ‘Hamlin’, foi relatada anteriormente devido ao problema no lote de sementes utilizado nestes experimentos (dados não mostrados).

Na Tabela 4 estão descritos os resultados da transformação genética com a construção CaMV 35S_vazio. Para esta construção gênica foram realizados dois experimentos para as cultivares ‘Hamlin’ e ‘Valência’, tendo sido introduzidos o total de 436 e 155 explantes, 58 e 34 brotos regenerados, respectivamente. No experimento um ao utilizar a cultivar ‘Hamlin’ para transformar esta construção a eficiência de transformação foi de 2,96%, enquanto no experimento dois não houve regeneração de brotos para a cultivar ‘Hamlin’ (dados não mostrados). Já para a transformação da cultivar ‘Valência’ com a mesma construção gênica, dos 22 brotos avaliados, somente sete foram positivos por PCR, resultando na eficiência de transformação entre 3,53 a 5,71%.

Tabela 4. Resultados da transformação genética de laranjeiras doce ‘Hamlin’ e ‘Valência’ com a construção CaMV 35S_vazio.

Cultivar	Número de experimentos	Explantos introduzidos	Brotos Regenerados	Avaliados/PCR+	Eficiência de transformação (%) ^a	Plantas na CV/PCR+
‘Hamlin’	1	270	58	58/8	2,96	2
‘Valência’	1	70	11	13/4	5,71	4
	2	85	23	9/3	3,53	

a- A eficiência da transformação foi calculada pelo número de brotos positivos em relação aos explantes introduzidos.

A Tabela 5 refere-se à transformação genética com a construção CaMV 35S_cry11 e foram realizados quatro experimentos com a cultivar ‘Hamlin’ e nove com ‘Valência’. Com a

cultivar ‘Hamlin’, do total de 770 explantes introduzidos, somente nove brotos regeneraram, cinco foram avaliados, porém não foram obtidas plantas positivas com esta construção e cultivar, mesmo utilizando diferentes estirpes de *A. tumefaciens* (tabela 5) e a introdução de um novo lote de sementes.

Tabela 5. Resultados da transformação genética de laranjeiras doce ‘Hamlin’ e ‘Valência’ com a construção CaMV 35S_ *cry11*

Cultivar	Número de experimentos	Estirpe de <i>A. tumefaciens</i>	Explantes introduzidos	Brotos regenerados	Avaliados/PCR+	Eficiência de transformação (%) ^a	Plantas na CV/PCR+
‘Hamlin’	1	GV3101	190	6	3/0	0	0
	2		227	2	1/0	0	
	3	AGL-1	59	0	0/0	0	
	4		294	1	1/0	0	
‘Valência’	1	GV3101	163	69	46/0	0	5
	2		117	50	10/0	0	
	3		62	22	4/0	0	
	4		168	15	2/0	0	
	5	AGL-1	145	28	6/0	0	
	6		343	111	63/24	6,99	
	7		286	173	108/59	20,62	
	8		148	18	15/5	3,37	
	9		47	10	10/2	4,25	

a- A eficiência da transformação foi calculada pelo número de brotos positivos em relação aos explantes introduzidos.

Com a cultivar ‘Valência’, nos nove experimentos realizados, alguns não apresentaram pouca regeneração de brotos ou não desenvolvimento, além disso, também foi observada a contaminação com bactérias e fungos durante o co-cultivo e seleção (dados não apresentados). No entanto, embora tenham ocorrido percalços, foram introduzidos 1.479 explantes, dos quais 496 brotos regeneraram e 90 foram positivos por PCR. A eficiência de transformação foi entre 3,37 a 20,62% em ‘Valência’ com a estirpe AGL-1 de *A. tumefaciens* e 0% em ‘Hamlin’. Em particular no experimento sete, dos 108 brotos avaliados, 59 foram positivos, que corresponde à eficiência de transformação genética de 20,62%.

Os experimentos de um a cinco com a cultivar ‘Valência’ (Tabela 5) apresentaram a regeneração de 184 brotos, porém dos que foram avaliados (68) nenhum foi positivo para o gene *cry11*. Estes correspondem à clonagem da construção CaMV 35S_ *cry11* em estirpe GV3101 de *Agrobacterium*. Essa estirpe havia sido tentada por não ter sido possível obter células de EHA105 transformadas com essa construção. Foram várias tentativas sem sucesso, uma vez que a presença do gene *cry11* nunca foi confirmada após a PCR. Podemos sugerir que a estirpe de *Agrobacterium* utilizada na transformação genética de citros com

esta construção influenciou a eficiência de transformação. Por outro lado, foram obtidas cinco plantas positivas provenientes dos experimentos seis ao nove (Figura 17C-D, Tabela 5 – construção clonada em estirpe AGL-1) com a cultivar ‘Valência’ aclimatadas em casa de vegetação e confirmadas por PCR.

Figura 17. Placas provenientes da transformação genética com a construção CaMV 35S_ *cry11* com a cultivar ‘Valência’. (A e B) Explantes controle em meio de co-cultivo sem o agente seletivo; (C e D) explantes em meio de regeneração com agente seletivo; (E) explantes controle em meio de regeneração com agente seletivo.

Neste trabalho foram realizados de dois a nove experimentos para as cultivares/construção (Tabelas 2 a 5) e foi confirmado o que já foi amplamente discutido na literatura: a eficiência de transformação genética de citros é cultivar dependente e pode variar muito, por ser uma cultura recalcitrante e não hospedeira natural de *A. tumefaciens* (DUTT; GROSSER, 2009).

Os valores de eficiência de transformação obtidos com as construções AtSUC2_vazio, AtSUC2_ *cry11* e CaMV 35S_vazio transformadas com a laranjeira doce ‘Hamlin’ foi entre 2,96 a 16,11% (Tabela 2, 3 e 4). Esses resultados se assemelham aos de outros grupos que fizeram uso de promotores diversos, mas com as mesmas cultivares, e obtiveram eficiências entre 2,87% e 25% (BOSCARIOL et al., 2006; DUTT; GROSSER, 2009; MENDES et al., 2010;

MIYATA et al., 2012; ATTÍLIO et al., 2013, DUTT et al., 2015). Por outro lado, os resultados de nossa eficiência foram maiores quando comparados à eficiência média de 1,1% e 4% obtida por Tavano et al. (2015) ao utilizaram o mesmo promotor (além de outros promotores de floema) com a cultivar 'Hamlin'.

Já para a cultivar 'Valência' os valores de eficiência de transformação com as construções AtSUC2_vazio, AtSUC2_cry11, CaMV 35S_vazia e CaMV 35S_cry11 foi de 0,83% a 20,62% (Tabelas 2 a 5). Estes valores são maiores quando comparados com trabalhos que transformaram os mesmos promotores ou outros e mesma cultivar com eficiência entre 1,74 a 3,68% (MIYATA et al., 2012; ATTÍLIO et al., 2013, DUTT et al.; 2015; BOSCARIOL-CAMARGO, TAKITA, MACHADO, 2016). No entanto, valores máximos de eficiência de transformação para a construção CaMV 35S_cry11 (20,62%) foram obtidos no experimento sete e foram similares aos valores máximos de eficiência (11,3% a 23,8%) relatados em trabalhos que fizeram uso da mesma cultivar e do mesmo promotor (BOSCARIOL et al., 2003; MENDES et al., 2010; CARDOSO et al., 2010).

Para as construções gênicas contendo vetores vazios (Tabela 3 e 4), o objetivo era obter pelo menos um evento com cada promotor (AtSUC2 e CaMV 35S) para que pudessem ser posteriormente utilizados como controles para os experimentos de desafio com ninfas de *D. citri*; portanto, para estas construções não houve a preocupação de se obter um grande número de eventos transformados (1 a 4).

Foi observado que no experimento dois (Tabelas 2 a 5), a cultivar 'Hamlin' transformada com as construções AtSUC2_cry11, AtSCU2_vazio, CaMV 35S_vazio e CaMV 35S_cry11 apresentou taxas extremamente baixas de regeneração, insuficiente para o desenvolvimento de brotos e, conseqüentemente, não houve a obtenção de plantas transgênicas. Isso se deu, possivelmente, em função da inadequação do material utilizado (lote de sementes com a cultivar 'Hamlin'), conforme mencionado anteriormente.

As taxas de regeneração podem estar relacionadas à construção gênica e às condições de cultivo e seleção; uma vez que a baixa regeneração é comum em citros (PEÑA et al., 2004). Além desses aspectos, outro fator complicador da transformação de citros se deve à presença de brotos escapes, como descrevem Miyata et al. (2011), que encontraram alta frequência desse tipo de brotos em citrange 'Carrizo' transformado com o promotor de floema AtSUC2. A presença de plantas quiméricas é frequente após a regeneração, e podem apresentar resultado falso positivo na avaliação da PCR *in vitro*, também contribui para a

redução do número de eventos transgênicos ao final do processo (DOMINGUEZ et al., 2004). Finalmente, o pegamento da enxertia também pode afetar o número final de eventos cítricos transgênicos. Ambas as situações aconteceram em nosso trabalho e isto explicaria a pouca quantidade de eventos transgênicos confirmados em casa de vegetação. Por exemplo, a Tabela 3 (experimento um, cultivar ‘Hamlin’) evidencia bem a redução crescente que pode ocorrer desde a introdução dos explantes até a obtenção da planta matriz enxertada na casa de vegetação.

Embora tenham ocorrido estes percalços, foi possível obter exemplares confirmadamente transgênicos para a maioria das construções e cultivares.

5.4. Identificação da transgenia *in vitro* e aclimação das plantas em casa de vegetação

A confirmação da transgenia foi realizada a partir da extração do DNA total de um pedaço de folha expandida dos brotos *in vitro* seguida da PCR com primers específicos para cada construção, descritos no item 4.7. Foram obtidas bandas com fragmentos únicos correspondentes a cada construção entre 250 pb a 476 pb, visualizados em gel de agarose e corados com brometo de etídeo sob luz UV. Os brotos *in vitro* positivos na análise da PCR foram enxertados diretamente em porta-enxerto de limão ‘Cravo’ em casa de vegetação. Foram eles 39 plantas transformadas com AtSUC2_*cry11*, nove com AtSUC2_vazio e cinco com CaMV 35S_vazio da cultivar ‘Hamlin’. Com a cultivar ‘Valência’ foram enxertadas 46 plantas com AtSUC2_*cry11*, seis plantas com AtSUC2_vazio, 32 plantas com CaMV 35S_*cry11* e dez plantas com CaMV 35S_vazio. No entanto, durante o processo de aclimação ocorreu a perda de algumas plantas, devido à dificuldade de as mesmas se adaptarem ao novo local, ou seja, do sistema *in vitro* para a casa de vegetação. Em alguns casos ocorreu contaminação com fungo que acabou interferindo no desenvolvimento da planta, seguida da sua morte. Em outros casos, foi observada a presença de quimeras (Tabela 6). Por outro lado, com a enxertia direta em limão ‘Cravo’ na casa de vegetação, conseguimos adiantar o processo em 2 a 4 meses, tempo que o broto enxertado *in vitro* permanece no frasco antes de ser novamente enxertado no porta-enxerto e transferido para a casa de vegetação.

Foram obtidas e mantidas em casa de vegetação plantas transgênicas com as quatro construções gênicas (AtSUC2_*cry11*, AtSUC2_vazio, CaMV 35S_*cry11* e CaMV 35S_vazio) sendo variável o número de plantas/construção/cultivar (Tabela 6).

Tabela 6. Plantas aclimatadas em casa de vegetação confirmadas por PCR, provenientes da transformação genética com as construções gênicas: AtSUC2_ *cry11*, CaMV 35S_ *cry11*, AtSUC2_vazio e CaMV 35S_vazio para cada cultivar/construção

Cultivar	Construção gênica	Plantas aclimatadas	Plantas quimeras (eliminadas)	Plantas matrizes mantidas em casa de vegetação PCR+
'Hamlin'	AtSUC2_ <i>cry11</i>	39	14	8
	AtSUC2_vazio	9	4	2
	CaMV 35S_ <i>cry11</i>	-	-	0
	CaMV 35S_vazio	5	3	2
'Valência'	AtSUC2_ <i>cry11</i>	46	13	6
	AtSUC2_vazio	6	2	1
	CaMV 35S_ <i>cry11</i>	32	21	5
	CaMV 35S_vazio	10	0	4

O número de plantas matrizes obtidas com a construção AtSUC2_ *cry11*, para ambas as cultivares, foi de seis a oito. Já com a construção CaMV 35S_ *cry11*, foram obtidas cinco plantas da cultivar 'Valência' apenas. Para as construções contendo promotores vazios, o número de plantas variou entre uma a quatro. De um modo geral, as plantas obtidas não apresentaram alteração fenotípica, exceto em dois casos. Uma delas, proveniente da transformação com a construção AtSUC2_ *cry11*, apresentou folhas com aspecto rugoso e mais espessas do que as outras plantas (Figura 18A). Uma planta transformada com a construção CaMV 35S_ *cry11* apresentou porte um pouco menor e folhas com manchas de coloração esbranquiçada (Figura 18B), porém com textura semelhante às demais (Figura 18C).

Figura 18. Fenótipos de plantas provenientes da transformação genética de citros. (A) Planta transformada com construção AtSUC2_ *cry11*: VAT9.2-75 apresentando espessamento de folhas. (B) Planta transformada com construção CaMV 35S_ *cry11*: V35S9.11-55 apresentando menor porte e coloração esbranquiçada. (C) Planta transformada com a construção AtSUC2_ *cry11*: HAt9.1-111 sem alteração fenotípica.

Após a enxertia e o desenvolvimento das plantas, foi realizada nova confirmação da transgenia através de PCR para certificar que não se tratavam de quimeras. Para isso, as plantas foram setorizadas, e foi realizada a coleta das três folhas individualizadas para

extração de DNA total seguida de PCR com os primers específicos descritos anteriormente (Figura 19, A e B).

Figura 19. Confirmação da transgenia em plantas aclimatadas em casa de vegetação e propagação dos eventos transgênicos das construções AtSUC2_*cry11* e AtSUC2_vazio. (A) Coleta de folhas em três pontos em plantas para a confirmação do gene *cry11*. (B) Gel de agarose com a amplificação do fragmento de 331 pb correspondente ao gene *cry11* presente na construção AtSUC2_*cry11*. (C) Eventos transgênicos propagados após a confirmação da transgenia por PCR, mantidos em casa de vegetação.

Foram mantidas em estufa somente as plantas positivas na PCR a partir da coleta de discos foliares de folhas em três pontos dos eventos avaliados, as demais foram descartadas (Tabela 6). Durante todas as análises, sempre foram incluídos os controles negativos. Nesta etapa, o número de plantas positivas diminuiu significativamente devido à presença de quimeras ou por não se adaptarem à casa de vegetação conforme os dados descritos na tabela 6.

As plantas matrizes correspondentes às construções AtSUC2_*cry11*, AtSUC2_vazia, tanto de ‘Hamlin’ quanto de ‘Valência’ e CaMV 35S_*cry11*, CaMV 35S_vazia em ‘Valência’ foram propagadas para obtenção de dez clones de cada planta. O mesmo foi realizado para os controles negativos e “mocks” (Figura 19 C).

5.5. Análise da expressão do transcrito

Para a análise de expressão do transcrito, primeiramente foi confirmada a integridade e a quantidade dos RNAs extraídos de brotações jovens das folhas das plantas transgênicas e dos controles negativos, pela visualização das bandas das subunidades do RNA ribossomal 18S e 28S em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta (Figura 20).

Figura 20. Confirmação da integridade dos RNAs extraídos de brotações jovens de folhas dos eventos transgênicos provenientes das construções CaMV 35S_vazio (amostras H35SØ1. 38- 1, 2, 3, H35SØ1. 43- 1, 2, 3) e AtSUC2_ *cry11* (amostras HAt9.1 13 - 1, 2, 3, HAt9.1 106 -1, 2 e 3).

Posteriormente, foi realizada a normalização dos níveis de expressão do gene *cry11* com dois genes de referência já validados em citros *EF-1a* e *FBOX* (MAFRA et al., 2012).

Os dados apresentados na Figura 21 referem-se aos resultados da expressão relativa analisada em todos os eventos transformados com as duas construções contendo o gene *cry11*. As colunas se referem ao valor médio da expressão relativa nos eventos avaliados e as barras correspondem ao desvio padrão nestes eventos.

De modo geral, foi possível detectar os níveis de expressão do transcrito em todos os eventos transformados com a variação entre 2,95 a 1.250 ($\log_{10}$ 0,47 a $\log_{10}$ 3,09) (Figura 21). A diferença nos níveis de expressão do transcrito se deu em ambas as construções (CaMV 35S_ *cry11* e AtSUC2_ *cry11*), assim como entre eventos transgênicos da mesma construção (Figura 21).

Nos controles negativos e nos “mocks” (construções contendo somente dos promotores CaMV 35S_vazio e AtSUC2_vazio) não foram detectados níveis de expressão do transcrito. Por outro lado, três plantas confirmadas como transgênicas por PCR [duas AtSUC2_ *cry11* (HAt9.1 29 e VAt9.2 84B) e uma CaMV 35S_ *cry11* (V35S9.11 27)], não tiveram o transcrito amplificado por RT-qPCR (dados não mostrados). É possível que essas plantas representassem quimeras, portanto foram descartadas.

Figura 21. Análise dos níveis de expressão do transcrito *cry11* nos eventos de citros transformados com as construções CaMV 35S_ *cry11* e AtSUC2_ *cry11* nas cultivares ‘Hamlin’ (H) e ‘Valência’ (V). As denominações contendo At correspondem aos eventos transformados com a construção AtSUC2_ *cry11* e aquelas contendo 35S são transformados com a construção CaMV 35S_ *cry11*. A planta V35S9.12 73A corresponde a um evento com a menor expressão do transcrito *cry11* e, portanto, foi usada como controle para a comparação da expressão relativa dos outros eventos.

Para os eventos transformados com a construção AtSUC2_ *cry11* em ambas as cultivares (‘Hamlin’ e ‘Valência’), dos 14 eventos analisados, sete se destacaram com elevados níveis de expressão, chegando a 1.000 vezes ($\log_{10} 2,72$ a $\log_{10} 3,10$ - HAt9.1 13, 75A, 79, 98, 106, VAt9.2 75 e 96) em relação à planta controle, neste caso, a que apresentou menor expressão com o gene avaliado (V35S9.12 73A $\log_{10} 0$ - controle). Outros eventos com a mesma construção (VAt9.2 79, HAt9.1 111 e HAt9.1 1B) obtiveram valores de expressão entre 2,95 e 80,72 ($\log_{10} 0,46$ a $\log_{10} 1,91$). Esta diferença dos níveis de expressão também ocorreu em eventos transformados com a construção CaMV 35S_ *cry11*, variando entre 26,83 e 343 vezes ($\log_{10} 1,43$ a $\log_{10} 2,54$) maiores do que o controle (Figura 21).

Por outro lado, ambos os promotores foram capazes de direcionar a expressão do gene *cry11* em plantas de citros em seus respectivos tecidos, embora, como esperado, houvesse grande diferença entre os níveis de expressão do transcrito nos eventos avaliados,

variando de Log_{10} 0,47 a Log_{10} 3,09. Esta diferença também foi relatada em trabalhos de citros transgênicos usando promotores de floema ou constitutivo visando ao controle do HLB com níveis de expressão ao redor de Log_{10} 0,2 a Log_{10} 3,5 (DUTT et al., 2012; 2015; ATTÍLIO et al., 2013; BEZERRA, 2017), podendo chegar a níveis de expressão de Log_{10} 3,8 a Log_{10} 5,2 por exemplo, para o gene *attA* em eventos que possuíam um peptídeo sinal direcionado por um promotor de floema em citros (TAVANO et al., 2015).

De modo geral, a variação da expressão gênica encontrada nos eventos avaliados pode estar relacionada com o promotor utilizado e o local de integração do transgene, uma vez que o T-DNA de *A. tumefaciens* pode se integrar em local aleatório no genoma hospedeiro. Além disso, dependendo do local da inserção pode levar a consequências negativas de modo a alterar funções muito importantes no genoma hospedeiro, podendo causar o silenciamento gênico (DUTT et al., 2012; GELVIN, 2017).

Catorze eventos foram obtidos com o promotor AtSUC2 e apenas cinco com o promotor CaMV 35S, sendo difícil fazer uma comparação isenta entre eles. No entanto, fica evidente que existe a diferença entre eventos/plantas e que alguns eventos com promotor de floema tiveram maior expressão relativa (Figura 21).

O gene *AtSUC2* (*Arabidopsis thaliana* sucrose transporter 2) está envolvido com o transporte de açúcar no floema a longa distância em *Arabidopsis* e ocorre principalmente em nervuras intermediárias e secundárias (SRIVASTAVA et al., 2008; DUTT et al., 2012). Este promotor, ao direcionar a expressão do gene *cry11* para o floema de plantas de citros, poderia potencializar o controle do psílídeo, que se alimenta nessa região. Portanto, estes eventos em particular são interessantes, pois uma vez que a expressão deverá ser dirigida quase que apenas em tecido específico (floema), isto consequentemente reduzirá o ônus do gasto de energia para a expressão constitutiva.

Outros trabalhos evidenciaram que o promotor AtSUC2 foi capaz de direcionar a expressão do gene *uidA* preferencialmente para tecido floemático em plantas de citros ('Hamlin' e 'Valência') (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012). Miyata et al. (2017) avaliaram plantas de citros transformadas com AtSUC2 e diferentes promotores de floema e sugeriram que o promotor é modulado positivamente pela presença de *Ca. L. asiaticus*, a bactéria causadora do HLB.

Desta forma, tudo indica que nossas plantas transformadas com o gene *cry11* dirigidas pelo promotor de floema citado anteriormente, principalmente os eventos com os

maiores níveis de expressão, possam ser capazes de controlar ou causar algum efeito deletério em ninfas de *D. citri*. Por esta razão, estes eventos serão testados primeiramente nos ensaios de desafio, sendo seguidos pelos demais quando possível. Outra possibilidade seria testar estas plantas para outras pragas ou vetores de patógenos de citros, como cigarrinhas.

5.6. Análise de *Southern blot*

A análise de *Southern blot* permitiu confirmar o número de inserções do transgene integrado em diferentes posições do genoma dos eventos avaliados, através dos sinais de hibridização do DNA com os amplicons correspondentes, que variaram entre 1.300 pb e acima de 10.000 pb quando cortados com a enzima *EcoR1* e marcados com o DNA das sondas com o tamanho dos amplicons de 331 pb para a construção AtSUC2_*cry11* e 466 pb para a construção CaMV 35S_*cry11* e as duas vazias constituídas dos promotores AtSUC2 e CaMV 35S sem adição do gene *cry11*.

O número de inserções integradas no genoma dos eventos avaliados para as quatro construções variou de uma a três. Nos controles negativos VAt9.2 N1 e HAt9.1 N5 (não infectados com a bactéria), como esperado, não foram observados sinais de hibridização (Figura 22- 1 a 4).

Os eventos HAt9.1 29 e V35S9.11 27 apresentaram apenas uma cópia do transgene; porém, como não foi possível detectar a expressão gênica destes eventos, as plantas foram descartadas. A inserção do transgene foi confirmada em 25 eventos, sendo 16 com a construção AtSUC2_*cry11*, dois com AtSUC2_vazio, cinco com CaMV 35S_*cry11* e quatro com CaMV 35S_vazio em ambas as cultivares de laranja doce. A maioria dos eventos evidenciou a inserção de apenas uma cópia do transgene no genoma de citros, exceto em quatro que apresentaram de duas a três cópias (VAt9.2 40, V35S9.12 73A, V35SØ 3 e 6). Em apenas um evento não foi detectada a presença do transgene por *Souther blot*, tendo essa planta sido descartada (VAt9.2 84B, Figura 22 - 2).

Os resultados descritos anteriormente estão de acordo com diversos trabalhos com transformação de citros, sendo que o mais frequente é a inserção de uma a três cópias do transgene no genoma da planta (DUTT; GROSSER, 2009; MIYATA et al.; 2012; SILVA, 2013; TAVANO et al., 2015; BOSCARIOL-CAMARGO; TAKITA; MACHADO, 2016; BEZERRA, 2017).

Figura 22. Determinação do número de cópias através da análise do *Southern blot* para as construções gênicas (1 a 4) transformadas com as cultivares ‘Hamlin’ e ‘Valência’. Número 1 e 2: eventos da construção *AtSUC2_cry11*. Número 3: eventos das construções *CaMV 35S_vazio* e *AtSUC2_vazio*. Número 4: eventos da construção *CaMV 35S_cry11*. N1 e N5: controles negativos de plantas não infectadas com o inóculo bacteriano *cry11* e (+) Controles positivos de DNA plasmidial correspondente às construções: (1): 331 pb e (2 a 4): 466 pb.

Foi observado que o número de inserções não está correlacionado com os níveis de expressão do transgene, pois tanto aqueles que apresentaram maiores níveis de expressão em relação à planta controle para a construção *AtSUC2_cry11* ($\log_{10}$ 2,72 a $\log_{10}$ 3,10 - HA9.1 13, 75A, 79, 98, 106, VA9.2 75 e 96) quanto os eventos com menores níveis de expressão transformados com a mesma construção ($\log_{10}$ 0,46 a $\log_{10}$ 1,91 - VA9.2 79, HA9.1 111 e HA9.1 1B) tiveram apenas uma inserção do transgene no genoma de citros. O mesmo padrão foi observado nos eventos correspondentes à construção *CaMV 35S_cry11*, pois das cinco plantas avaliadas, quatro delas tiveram uma única inserção (Figura 22 – 4) e o evento V35S9.12 73A ($\log_{10}$ 0) que apresentou menor nível de expressão do transgene apresentou duas inserções do transgene no genoma de citros.

O uso da transformação genética via *A. tumefaciens* possui algumas vantagens em relação a outros métodos, dentre elas sua capacidade em integrar poucas cópias do inserto no genoma hospedeiro (HWANG; YUA; LAIA, 2017). Esse pequeno número de inserções é desejado, pois a integração de várias cópias pode ocasionar silenciamento gênico ou ainda a inserção em regiões indesejadas, com alteração no fenótipo da planta (SCHUBERT et al., 2004; DUTT et al., 2012).

5.7. Detecção da proteína por *Western blot*

A análise para a detecção da proteína nos eventos selecionados foi realizada em gel 12% SDS PAGE e por *Western blot*. Foi verificado que a quantidade de proteína Cry11 produzida está muito baixa nestes eventos e por este motivo não se consegue visualizar com nitidez a banda de 72.05 KDa correspondente a proteína Cry11 (Figura 23), embora a análise de expressão do transcrito tenha sido alta nos eventos selecionados.

Figura 23. Análise de SDS PAGE (A) e Western Blot (B) da expressão da proteína Cry11 em tecidos de plantas de citros. L: Ladder; HAt9.1 N5 e VAt9.2 N1: controle negativo de plantas não infectadas com o inóculo bacteriano *cry11*; V35S9.12 75 e V35S9.12 99: eventos das construções CaMV 35S_*cry11*; HAt9.1 106 e HAt9.1 75A: eventos das construções AtSUC2_*cry11*.

Foi realizado um novo ensaio utilizando um controle positivo para a proteína Hemaglutinina, pois nossa sequência possui uma *tag* anti-HA, com intuito de facilitar a detecção da proteína. Também foram utilizados eventos das construções CaMV 35S_*cry11* (V35S9.12 75A) e AtSUC2_*cry11* (HAt9.1 75A) para a obtenção do extrato proteico, a partir da nervura central e pecíolo de folhas expandidas, de pelo menos uma amostra para cada construção contendo o gene de Bt. Mesmo assim não obtivemos sucesso na detecção da proteína (dados não mostrados). Esses resultados podem estar relacionados à não especificidade dos anticorpos utilizados ou à baixa produção da proteína. Como alternativa

podemos utilizar outro anticorpo, por exemplo, anti - Cry11. Outra possibilidade seria o *Codon Usage* não ter funcionado bem. Por outro lado, as plantas matrizes foram confirmadas quanto a expressão do transcrito e a sua inserção no genoma das plantas avaliadas. Novos ensaios para a detecção da proteína estão sendo conduzidos visando melhorar os resultados da análise com a detecção da banda referente a 72,05 KDa de Cry11 somada à cauda de Hemaglutinina (*HA-tag*) e eliminar o background.

5.8. Desafio das plantas de citros transgênicas a ninfas de *D. citri*

As plantas já foram propagadas e estão prontas para o desafio com ninfas de *D. citri*. Testes preliminares já estão sendo conduzidos e sugere-se que alguns eventos parecem causar algum efeito sobre as ninfas do psíldeo dos citros, já que ao menos três deles causaram até 34% de mortalidade das ninfas em relação ao controle não transgênico e do controle vazio (“mock”) (Figura 24) em dois bioensaios realizados.

Figura 24. Avaliação da mortalidade de ninfas de 3º instar de *D. citri* após 120 horas em dois bioensaios com plantas de citros expressando *cry11* sob o controle do promotor AtSUC2. (A) Bioensaio 1 e (B) Bioensaio 2. HAt9.1 N5: controle negativo; VATØ1 7A: “mock”; VAT9.2 75, HAt9.1 106, 1B e 98: eventos da construção AtSUC2_ *cry11*

Para os desafios com ninfas de *D. citri* foram selecionados três eventos que apresentaram elevados níveis de expressão do transcrito com expressão relativa entre 670 a 1249 vezes (HAt9.1 98, HAt9.1 106, HAt9.1 75A e VAT9.2 75) em relação à planta controle.

Adicionalmente, selecionamos um evento que apresentou menor nível de expressão do transcrito HAt9.1 1B (2,95 vezes em relação à planta controle) e os controles 'mock' e negativo (VAtØ1 7A e HAt9.1 N5, respectivamente).

A mortalidade média de ninfas mortas nos dois ensaios foi entre 10 a 34%, sendo que no experimento dois a mortalidade média das ninfas foi maior nas plantas transgênicas (27,2 a 34%), mas também nos controles (16 a 24%). Por outro lado, embora o ensaio dois apresentasse uma mortalidade mais alta, os tratamentos não diferiram entre si ($F: 0,17423$; GL: 5; $P < 0,368$) (Figura 24B). Já no experimento um, cujos controles apresentaram mortalidade mais baixa (3,6%) dos psilídeos, foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($F: 2,6206$; GL: 6; $P < 0,520$), com destaque para o evento HAt9.1 75 (30%) (Figura 24A).

Foi observado que os níveis de expressão do transcrito não tiveram correlação positiva com a mortalidade apresentada em ninfas de *D. citri* após 120 horas de avaliação. Por exemplo: o evento VAt9.2 75 apresentou maior nível de expressão (1.249 vezes mais em relação à planta controle), porém a mortalidade média apresentada no primeiro ensaio foi de apenas 10%, valor ao redor dos obtidos nos controles (HAt9.1 N5 = 3,6% e VAtØ1 7A 14%) (Figura 24A). Por outro lado, os eventos HAt9.1 98, HAt9.1 75A e HAt9.1 106, que apresentaram expressões entre 669,26 e 987,98 vezes maiores que as da planta controle, apresentaram mortalidade média de ninfas entre 24 e 34% nos dois ensaios (Figura 24A e B). Já para o evento com menor nível de expressão do transcrito HAt9.1 1B (2,95 vezes maior que o controle), a mortalidade média foi próxima a encontrada nos eventos mencionados anteriormente com 23,2 e 32% nos ensaios A e B, respectivamente.

Esses números estão longe de serem desejados para o manejo do psilídeo, mas novos ensaios serão conduzidos com estes e outros eventos para se confirmar os resultados. Por outro lado, a baixa quantidade de proteína produzida pode estar relacionada com a mortalidade, uma vez que o *Western Blot* realizado sugere-se pouca quantidade da proteína visualizada na membrana pelo sistema de detecção fosfatase alcalina.

Ao final do ensaio foi realizado o isolamento de Bt de *pool* de brotações jovens das folhas dos tratamentos e controles, em que as ninfas mortas se alimentaram, para confirmar se não tinha nenhum outro isolado de Bt presentes nestes locais, pois Bt pode ser isolado principalmente do solo e endofiticamente. O resultado do isolamento seguido do plaqueamento em meio de cultura com agente seletivo em ambos os ensaios, tanto de

folhas quanto de ninfas, não ocorreu resultou em crescimento bacteriano, confirmando a ausência de Bt nas plantas (dados não mostrados).

Os resultados obtidos em ambos os ensaios não estão fora dos obtidos por outros autores. No único outro trabalho envolvendo citros-Bt, Mahmoud et al. (2016) também observaram mortalidade baixa, ao redor de 43%, de larvas do coleóptero *Diaprepes abbreviatus* em plantas de citros expressando o gene de Bt *cyt2Ca1* em raízes. Porcar et. al (2009), ao expressarem o gene *cry11* em *E. coli*, testaram diferentes concentrações da toxina ativada com tripsina em afídeos e verificaram um aumento da mortalidade de 30 para 100% ao utilizarem concentração maior. Além disso, os autores observaram a redução das taxas de crescimento e desenvolvimento do afídeo.

Deste modo, novos ensaios estão sendo conduzidos para certificar os resultados obtidos e determinar se algum evento pode se destacar apresentando um efeito maior em ninfas de *D. citri* ou no seu desenvolvimento, principalmente nas próximas gerações. Como perspectivas futuras, podemos testar estes eventos para outros insetos sugadores de floema ou outras pragas de citros, na busca de tentar ampliar o espectro de ação de Bt e outras pragas principalmente na citricultura.

6. CONCLUSÕES

Foi possível produzir plantas de laranja doce 'Hamlin' e 'Valência' transgênicas superexpressando o gene *cry11* de Bt sob o controle de dois promotores, sendo que um deles direciona a expressão gênica preferencialmente ao floema (AtSUC2) enquanto o outro é constitutivo (CaMV 35S).

Foi possível, ainda, avaliar os níveis de expressão do transgene, com destaque para os eventos dirigidos pelo promotor AtSUC2. Esse promotor de floema foi capaz de direcionar fortemente a expressão do transgene na maioria dos eventos avaliados, mostrando-se promissor na busca da resistência a pragas que se alimentem do (ou se multipliquem no) floema de citros.

A integração de uma a três cópias do transgene no genoma dos eventos avaliados foi confirmada por Southern blot, sendo que tanto plantas transgênicas de 'Hamlin' quanto 'Valência' a grande maioria apresentou apenas uma cópia em ambas as cultivares.

Ensaio preliminares evidenciaram que plantas de citros expressando *cry11* sob controle do promotor AtSUC2 parecem possuir pequeno efeito deletério sobre o desenvolvimento de ninfas de *D. citri*. Apesar desses resultados não serem muito promissores, novos ensaios estão sendo conduzidos para verificar o efeito dos demais eventos sobre o psíldeo dos citros.

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro esforço em produzir plantas de citros expressando genes de Bt visando ao controle do psíldeo *Diaphorina citri*, inseto vetor do agente causal da principal doença da citricultura mundial.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-266, 1925.
- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of Anatomical Symptom Observations in Citrus Affected with Huanglongbing Disease. **Plant Pathology Journal**, v. 9, p. 56-64, 2010.
- ADANG, M.J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J.L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: DHADIALLA, T.S.; GILL, S.S. (Ed.) Insect Midgut and Insecticidal Proteins, UK: **Academic Press**, 2014, Chapter 2, v. 47, p. 39-87.
- AGOSTINI, J.P.; PREUSSLER, C.; OUTI, Y. Huanglongbing (HLB) ex greening. In: ROSSINI, M.N.; DUMMEL, D.M.; AGOSTINI, J.P. (Ed.) Plagas cuarentenarias de frutales de la República Argentina Avances en los resultados. **INTA**, Argentina, p. 183–198, 2015.
- AGROFIT - **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**, 2017. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Disponível em:<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 out. 2017.
- ALLEN, Q.; ROGERS, K.L.; CHAPARRO, J.X. Evidence for a dominant huanglongbing tolerance gene in citrus. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA. **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n.1, 2017.
- ALQUÉZAR, B.; VOLPE, H.X.L.; MAGNANI, R.F.; MIRANDA, M.P.; SANTOS, M.A.; WULFF, N.A.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P.; BOUWMEESTER, H.; PEÑA, L. β -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus* Liberibacter. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 5639, 2017
- ANDRADE, E.; HUNTER, W. RNAi Feeding Bioassay - Development of a Non-transgenic approaches to Control Asian Citrus Psyllid and other Hemipterans. In: **Proceedings 4rd International Research Conference on Huanglongbing**, Florida, USA, 2015
- ANSANTE, N. F. **Transformação genética de tomate Micro-Tom e de laranja doce com os genes *chitinase type III (PR-8)* e *constitutive disease resistance protein (CDR-1)* de *Citrus sinensis***. 2015. 80p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

AMMAR, E.D.; RAMOS, J.E.; HALL, D.G.; DAWSON, W.O.; SHATTERS JR, R.G. Acquisition, Replication and Inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following Various Acquisition Periods on Huanglongbing-Infected Citrus by Nymphs and Adults of the Asian Citrus Psyllid. **PLOS One**, v. 11, n.7, e0159594, 2016 doi:10.1371/journal.pone.0159594.

AMMAR, E.D.; HALL, D.G.; SHATTERS JR, R.G. Ultrastructure of the salivary glands, alimentary canal and bacteria-like organisms in the Asian citrus psyllid, vector of citrus huanglongbing disease bacteria. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 5, p. 9-20, 2017.

AMMAR, E.-D., SHATTERS, R. G., LYNCH, C., AND HALL, D. G. Detection and relative titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the salivary glands and alimentary canal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of citrus huanglongbing disease. **Annals of Entomological Society of America**, v. 104, n.3, p, 526-533, 2011.

ATTÍLIO, L.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; HARAKAVA, R.; SILVA, T.L.; MIYATA, L.Y.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of sweet oranges with the *D4E1* gene driven by the AtPP2 promoter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 741-747, 2013.

AUBERT, B. *Trioza erytreae* (del Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, v. 42, n.3, p. 149-162, 1987.

AUSIQUE, J.J.S.; D’ALESSANDRO, C.P.; CONCESCHI, M.R.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. **Journal of Pest Science**, v. 90, p. 947-960, 2017.

BADARACCO, A.; REDES, F.J.; PREUSSLER, C.A.; AGOSTINI, J.P. Citrus huanglongbing in Argentina: detection and phylogenetic studies of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p. 171–175, 2017.

BALBINOTTE, J. **Desenvolvimento de sistemas de aquisição de *Bacillus thuringiensis* por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) para estudos de patogenicidade**. 2012. 92p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BARBOSA, C.J.; RORIZ, A.K.P.; SILVA, S.X.B.; BARBOSA, L.V. **Pragas quarentenárias A1 e A2 da citricultura Baiana**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014. 7p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado Técnico, 156).

BAUM, J.A.; SUKURU, U.R.; PENN, S.R.; MEYER, S.E.; SUBBARAO, S.; SHI, X.; FLASINSKI, S.; HECK, G.R.; BROWN, R.S.; CLARK, T.L. Cotton Plants Expressing a Hemipteran Active *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Impact the Development and Survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) Nymphs. **Journals Science & Mathematics Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 2, p. 616-624, 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**, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; GOTTFELD, T.R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 789-796, 2013.

BELASQUE JUNIOR, B.; 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**, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE JR, J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK JR, A.; GIORGI, F.; DI TERSI, F.E.A.; MENEZES, G.M.; DRAGONE, J.; JANK JR, R.H.; BOVÉ, J.M. Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BELOTI, V.H.; ALVES, G.R.; ARAÚJO, D.F.D.; PICOLI, M.M.; MORAL, R.A.; DEMÉTRIO, C.G.B.; YAMAMOTO, P.T. Lethal and Sublethal Effects of Insecticides Used on Citrus, on the Ectoparasitoid *Tamarixia radiata*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, e0132128. doi:10.1371/journal.pone.0132128, 2015

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, 2014.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OMOTO, C. Manejo da Resistência de insetos a plantas Bt. 1ª Edição, Engenheiro Coelho / SP, **PROMIP**, 2016.

BERRY, C.; CRICKMORE, N. Structural classification of insecticidal proteins – Towards an in silico characterisation of novel toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 16-22, 2017.

BEZERRA, Y.C.A. **Expressão do gene *uidA* sob controle de promotores preferencialmente expressos no floema de plantas transgênicas de citrange 'Carrizo'**. 2017. 62p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

BIDESHI, D.K.; WALDROP, G.; FERNANDEZ-LUNA, M.T.; DIAZ-MENDOZA, M.; WIRTH, M.C.; JOHNSON, J.J.; PARQUE, H.W.; FEDERICI, B.A. Intermolecular interaction between Cry2Aa and Cyt1Aa and its effect on larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1107-1115, 2013.

BIRNBOIM, H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Methods in Enzymology**, v. 100, p. 243-255, 1983.

BOAVA, L.P.; CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M.A. Physiologic, anatomic, and gene expression changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata* and their hybrids after '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. **Phytopathology**, v. 107, n. 5, p. 590-599, 2017.

BOAVA, L.P.; SAGAWA, C.H.D.; CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M.A. Incidence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'- Infected Plants Among Citrandarins as Rootstock and Scion Under Field Conditions. **Phytopathology**, v.105, n.4, p. 518-524, 2015.

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/mannoses lesion system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 122-128, 2003.

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, G.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin'. **Journal of American Societ for Horticultural Science**, v. 131 n.4, p. 530-536, 2006.

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

BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; TAKITA, M.A.; MACHADO, M.A. Bacterial resistance in AtNPR1 transgenic sweet orange is mediated by priming and involves EDS1 and PR2. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 6, p. 341-349, 2016.

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

BOWMAN, K.D.; ALBRECHT, U. Gene expression patterns in leaves and roots of citrus trees composed of different scion and rootstock genotypes to elucidate control of tolerance to HLB. In: **Proceedings 4rd International Research Conference on Huanglongbing**, February 9–13, Orlando, Florida, USA, 2015.

BOWMAN, K.D.; MCCOLLUM, G.; ALBRECHT, U. Performance of 'Valencia' sweet orange on twelve rootstocks in two Florida locations indicates rootstock field tolerance to HLB. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

BRAR, G.S.; MARTINI, X.; STELINSKI, L.L. Lethal and sub-lethal effects of a novel sulfoximine insecticide, sulfoxaflor, against Asian citrus psyllid and its primary parasitoid under laboratory and field conditions. **International Journal of Pest Management**, v. 63, n. 4, 2016 4, p. 299-308, 2017.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. Different Models of the Mode of Action of Bt 3d-Cry Toxins. In: SOBERÓN, M.; GAO, Y.; BRAVO, A. (Ed.) Bt resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins, Wallingford, UK: **CABI biotechnology** series n. 4, cap. 6, p. 56-68, 2015.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–26, 2012.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BRAVO, A.; PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GARCIA-GÓMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERÓN, M. Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action. In: FIUZA, L.M.; POLANCZYK, R.A.; CRICKMORE, N. (Ed.) ***Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus***. Springer, 2017, Chapter:4, Publisher: Springer International Publishing., p. 53-66

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.; NUÑEZ-VALDEZ, M.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

CAPOOR, S.; RAO, D.; VISWANATH, S. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: **Proceedings 6th Conf. Int. Organization of Citrus Virologists**, University of California, Riverside, CA, 1974, p. 43-49.

CANALE, M.C.; TOMASETO, A.F.; HADDAD, M.L.; COLETTA-FILHO, H.D.; LOPES, J.R.S. Latency and Persistence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Its Psyllid Vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Phytopathology**, v. 107, n. 3, p. 264-272, 2016.

CARDOSO, S.C.; BARBOSA-MENDES, J.M.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M.L.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, FA.A. Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the *attacin* A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, n. 2, p. 185–192, 2010.

CARNEIRO, A.A.; GUIMARÃES, C.T.; VALICENTE, F.H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M.J.V.; CARNEIRO, N.P.; MENDES, S.M. Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga. Minas Gêrias: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 26p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica 135).

CARRIÈRE, Y.; FABRICK, J.A.; TABASHNIK. B.E. Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 291-302, 2016.

CÉLERES. **3º Levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2014/15**. Disponível em <http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf>. Acesso em: 24 out. 2017.

ÇÉVIK, B. The RNA-dependent RNA polymerase of *Citrus tristeza virus* forms oligomers. **Virology**, v. 447, n.1, p. 121-130, 2013.

CHEN, X.D.; SEO, M., STELINSKI, L.L. Behavioral and hormetic effects of the butenolide insecticide, flupyradifurone, on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Crop Protection**, v. 98, p. 102-107, 2017.

CHOUGULE, N.P.; BONNING, B.C. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. **Toxins**, v. 4, n. 6, p. 405-429, 2012.

CHOUGULE, N.P.; LI, H.; LIU, S.; LINZ, L.B.; NARVA, K.E.; MEADE, T.; BONNING, B.C. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8465–8470, 2013.

CitrusBR. 2015. Disponível em: <www.citrusbr.com> Acesso em: 21 jul. 2017.

CitrusBR. 2017. **O setor citrícola brasileiro.** Disponível em: <http://www.citrusbr.com/laranjapatrimonio/imgs/Citrus_Institucional_Setor_Citricola_Brasileiro_versao2_vale.pdf> Acesso em: 21 jul. 2017.

CitrusBR. 2018 a. Safra 2017/18 fecha em 398,35 milhões de caixas. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312536>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

CitrusBR. 2018 b. USDA mantém estimativa de 45 milhões de caixas para Flórida. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312525>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J.; AMARAL, A.M.; MULLER, G.W.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382, 2004.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* resistance in *Plutella* — too many trees? **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, p. 84-88, 2016.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature", 2016. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>> Acesso em: 28 ago. 2017.

CTNBIO. Resumo Geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**. 2016.

CTNBIO. Resolução Normativa Nº 10, de 2 de Outubro de 2013. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas/>>. Acesso em: 18 jan. 2018

DA GRACA, J.V. Citrus Greening disease. **Annual Review of Phytopathology**. v. 29, p. 109-136, 1991.

DA GRAÇA, J.V.; DOUHAN, G.W.; HALBERT, S.E.; KEREMANE, M.L.; LEE, VIDALAKIS, G.; I ZHAO, H. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n.4, p. 373–387, 2016.

DA GRAÇA, J.V.; KUNTA, M.; SÉTAMOU, M.; RASCOE, J.; LI, W.; NAKHLA, M.K.; SALAS, B.; BARTELS, D.W. Huanglongbing in Texas: Report on the first detections in commercial citrus. **Journal of Citrus Pathology**, v. 2, n. 1, 2015.

DAR, S.A.; WANI, A.B.; KANDOO, A.A. Genetic engineering and insect resistance. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 3, p. 1175-1184, 2017.

DAS, A.; DATTA, S.; THAKUR, S.; SHUKLA, A.; ANSARI, J.; SUJAYANAND, G.K.; CHATURVEDI, S.K.; KUMAR, P.A.; SINGH, N.P. Expression of a Chimeric Gene Encoding Insecticidal Crystal Protein Cry1Aabc of *Bacillus thuringiensis* in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Confers Resistance to Gram Pod Borer (*Helicoverpa armigera* Hubner). **Frontiers in Plant Science**, v. 8:1423, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.01423. eCollection, 2017.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Reviews of Genetics**. v. 37, p. 409-433, 2003.

DE SCHRIJVER, A.; DE CLERCQ, P.; DE MAAGD, R.A.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Relevance of Bt toxin interaction studies for environmental risk assessment of genetically modified crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1221-1223, 2015.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, v.12, n.2, p. 171-183, 2004.

DONOVAN, W.P.; ENGLEMAN J.T.; DONOVAN, J.C.; BAUM, J.A.; BUNKERS, G.J.; CHI, D.J.; CLINTON, W.P.; ENGLISH, L.; HECK, G.R.; ILAGAN, O.M.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.C.; PITKI, J.W.; ROBERTS, J.K.; WALTERS, M.R. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 713-719, 2006.

DORTA, S. de O. **Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* patogênicos à *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**. 2013. 75p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

DOUD, M.M.; WANG, Y.; HOFFMAN, M.T.; LATZA, C.L.; LUO, W.; ARMSTRONG, C.M.; GOTTWALD, T.R.; DAI, L.; LUO, F.; DUAN, Y. Solar thermotherapy reduces the titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and enhances canopy growth by altering gene expression

profiles in HLB-affected citrus plants. **Horticulture Research**, v. 4, n. 17054, 2017; doi:10.1038/hortres.2017.54

DOUD, M.S.; LUO, F.; WANG, Y.; ZHOU, L.; STOVER, E.; DUAN Y. Thermotherapy And The Molecular Mechanism Behind The Success Of Heat Treatment For The Control Of Citrus Huanglongbing. IN: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING (HLB) IRCHLB IV 2015. Orlando, Florida USA **Proceedings...**, Orlando, Florida, Feb. 9-13, p. 1-266, 2015.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 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**, v. 32, n.1, p. 83–93, 2012.

DUTT, M.; BARTHE, G.; IREY, M.; GROSSER, J. Transgenic Citrus Expressing an *Arabidopsis* NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, e0137134, 2015.

DUTT, M.; GROSSER, J.W. Can engineered trees protect citrus against huanglongbing (HLB)? In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

DUTT, M.; GROSSER, J.W. Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, v. 98, n.3, p. 331-340, 2009.

EL-SHESHENY, I.; HAJERI, S.; EL-HAWARY, I.; GOWDA, S.; KILLINY, N. Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. **PLoS ONE**, v.8, n.5, e65392, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0065392.

EGELKROUT, E.; RAJAN, V.; HOWARD, J.A. Overproduction of recombinant proteins in plants. **Plant Science**, v. 184, p. 83-101, 2012.

EPA – United States Environmental Protection Agency. 1998. *Bacillus thuringiensis*: Reregistration Eligibility Decision - EPA Archives. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0247fact.pdf>> Acesso em: 21 out. 2017.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FAO. 2014 Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

FAN, J.; CHEN, C.; ACHOR, D.S.; BRLANSKY, R.H.; LI, ZHENG-GUO, GMITTER JR, F.G. Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 69-74, 2013.

FEBRES, V.J.; REZENDE-MUNIZ, F.; MOORE, G.A. A quick evaluation method of AtNPR1 transgenic plants for resistance to HLB. In: **Proceedings 3rd International Research Conference on Huanglongbing – IRCHLB III**, Feb. 4-8, Orlando, Florida, USA, 2013.

FERNANDEZ-LUNA. Modification of a Bt Toxin to Target Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*, Hemiptera). **Event: Seminar**. Iowa State University, Department of Entomology, 2016.

FIÚZA, L.M.; BERLITZ, D.L. Produtos de *Bacillus thuringiensis*: Registro e Comercialização. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 58060, 2009.

FLORES, D.; CIOMPERLIK, M. Biological Control Using the Ectoparasitoid, *Tamarixia radiata*, against the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*, in the Lower Rio Grande Valley of Texas. **Southwestern Entomologist**, v. 42, n. 1, p. 49-59, 2017.

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

FOLIMONOVA, S.Y.; ROBERTSON, C.J.; GARNSEY, S.M.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, n.12, p. 1346-1354, 2009.

FUNDECITRUS. CTNBio aprova normas para pesquisa com laranjeiras transgênicas no campo. 2013. Disponível em:<<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/ctnbio-aprova-normas-para-pesquisa-com-laranjeiras-transgenicas-no-campo/181>>. Acesso em: 18 jan. 2018

FUNDECITRUS, 2017a. **Estimativa da safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: cenário em maio/2017/Fundo de Defesa da Citricultura...** [et al.]. – Araraquara, SP: Fundecitrus, 2017. 26 p

FUNDECITRUS. 2017b. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

FUNDECITRUS. 2017c. **Pesquisa e Desenvolvimento.** Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/pesquisa/projetos>>. Acesso em: 18 jan. 2018

FUNDECITRUS. **Relatório de Atividades - Jun/2015 a Mai/2016.** Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2016.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2016.

GALDEANO, D.M.; BRETON, M.C.; LOPES, J.R.S.; FALK, B.W.; MACHADO, M.A. Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3: e0171847, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0171847

GARCÍA-SUÁREZ, R.; VERDUZCO-ROSAS L.A.; DEL RINCÓN-CASTRO, M.C.; DÉLANO-FRIER, J.P.; IBARRA, J.E. Translocation of *Bacillus thuringiensis* in *Phaseolus vulgaris* tissues and vertical transmission in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 1092-1100., 2017. doi: 10.1111/jam.13407.

GELVIN, S. B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. **Annual Review of Genetics**, v. 51, p. 195-217, 2017.

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; MATUS, V.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, v. 459, n. 2, p. 383–396, p. 2014.

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

HALBERT, S. The discovery of huanglongbing in Florida. Proceedings of the 2nd International *Citrus Canker* and Huanglongbing Research Workshop, Orlando Florida, USA, **Plant Management Network**, p.50, 2005

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L.; RAMADUGU, C.; BRODIE, M.W.; WEBB, S.E.; LEE, R.F. Trailers transporting oranges to processing plants move Asian citrus psyllids. **Florida Entomologist**, v. 93, n.1, p. 33–38, 2010.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 41-64, 2000.

HAO, G.; STOVER, E.; GUPTA, G. Overexpression of a Modified Plant Thionin Enhances Disease Resistance to Citrus Canker and *Huanglongbing* (HLB). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 1078, 2016.

HATCHER, C. Deployment of disease resistant or tolerant citrus rootstocks and scions. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

HERRERO, S.; BEL, Y.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J. Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, p. 89-96, 2016.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computation Statistics & Data Analysis**, v. 27, p. 151-170, 1988.

HOFFMAN, M.T.; DOUD, M.S.; WILLIAMS, L.; ZHANG, M.Q.; DING, F.; STOVER, E.; HALL, D.; ZHANG, S.; JONES, L.; GOOCH, M.; FLEITES, L.; DIXON, W.; GABRIEL, D.; DUAN, Y.P. Heat Treatment Eliminates '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from Infected Citrus Trees Under Controlled Conditions. **Phytopathology**, v. 103, n. 1, p. 15-22, 2013.

HWANG, H.H.; YU, M.; LAI, E.M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and Applications. **The Arabidopsis Book**, 15:e0186. doi: 10.1199/tab.0186, 2017.

ICA. Instituto Colombiano Agropecuario. Sistema de Alerta Fitossanitário, 2012. Disponível em: <<https://www.ica.gov.co/Alertas-Fitosanitarias/Alertas-Fitosanitarias/Detalle-alerta-fitosanitari/HLB-ARGENTINA.aspx>> Acesso em: 23 ago. 2017.

IFTIKHAR, Y.; RAUF, S.; SHAHZAD, U.; ZAHID, M.A. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management – A review. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, p. 1–11, 2016.

INOUE, H.; OHNISHI, 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**, v. 155, n. 1, p. 29–36, 2009.

INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA - 53, de 16/10/2008. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-mapa-53-de-16-102008,830.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2017.

ISAAA. 2016. **Beyond Promises: Facts about Biotech/GM Crops in 2016**. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech_booklets/beyondpromises/download/2017%20Beyond%20Promises%20Booklet_For%20Uploading_July202017.pdf>.

Acesso em: 30 jul. 2017

ISAAA. 2015. **50 Biotech Bites. ISAAA: Ithaca, New York, USA**. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/50biotechbites/download/50_Biotech_Bites.pdf> Acesso em: 24 ago. 2017.

JABEEN, R.; KHAN, M.S.; ZAFAR, Y.; ANJUM, T. Codon optimization of *cry1Ab* gene for hyper expression in plant organelles. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 1011–1017, 2010.

JAGOEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.

JAMES, C. 2016. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY

JAVOID, S.; AMIN, I.; JANDER, G.; MUKHTAR, Z.; SAEED, N.A.; MANSOOR, S. A transgenic approach to control hemipteran insects by expressing insecticidal genes under phloem-specific promoters. **Science Reports**, v. 6, 34706; 2016. doi: 10.1038/srep34706.

JISHA, V.N.; SMITHA, R.B.; BENJAMIN, S. An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 462-472, 2013.

JURAT-FUENTES, J.L; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 5-10, 2017

KHAN, A.A.; AFZAL, M.; QURESHI, J.A.; KHAN, A.M.; RAZA, A.M. Botanicals, selective insecticides, and predators to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in citrus orchards. **Insect Science**, v. 21, n. 6, p. 717-26, 2014.

KILLINY, N.; KISHK, A. Delivery of dsRNA through topical feeding for RNA interference in the citrus sap piercing-sucking hemipteran, *Diaphorina citri*. Archives of Insect **Biochemistry Physiology**, v. 95, n.2, e21394, 2017 <https://doi.org/10.1002/arch.21394>

KILLINY, N.; HAJERI, S.; TIWARI, S.; GOWDA, S.; STELINSKI, L.L. Double-Stranded RNA Uptake through Topical Application, Mediates Silencing of Five CYP4 Genes and Suppresses Insecticide Resistance in *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10: e110536, 2014. [doi:10.1371/journal.pone.0110536](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110536).

KIM, JEONG-SOON, SAGARAM, U.S.; J.K.; BURNS, LI, JIAN-LIANG ,WANG, N. Response of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Infection: Microscopy and Microarray Analyses. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 50-57, 2009.

KOCH, M.S.; WARD, J.M.; LEVINE, S.L.; BAUM, J.A.; VICINI, J.L.; HAMMOND, B.G. The food and environmental safety of Bt crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.

KOCH, K.G.; CHAPMAN, K.; LOUIS, J.; HENG-MOSS, T.; SARATH, G. Plant Tolerance: A Unique Approach to Control Hemipteran Pests. **Frontiers in Plant Science**, v. 7:1363, 2016.

KOURTI, A.; SWEVERS, L.; KONTOGIANNATOS, D. In Search of New Methodologies for Efficient Insect Pest Control: "The RNAi "Movement". In SHIELDS, V.D.C. (Ed.). **"Biological Control of Pest and Vector Insects"**. Agricultural and Biological Sciences. Rijeka: INTECH, chapter 4, p. 71-95, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/66633>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

KUMAGAI, L.B.; LEVESQUE, C.S.; BLOMQUIST. C.L.; MADISHETTY, K.; GUO, Y.; WOODS, P.W.; ROONEY-LATHAM, S.; RASCOE, J.; GALLINDO, T.; SCHNABEL, D.; POLEK, M. First report of *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated with citrus Huanglongbing in California. **Plant Disease**, v. 97, n. 2, p. 283–283, 2013.

KUMAR, S; SINGH, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 6, n. 2, p. 1000e129, 2015.

LAVAGI, I.; CHRISTIANO, R.; GREER, G.; GROSSER, J.; GMITTER, F.; BOWMAN, K.; STOVER, E.; MCCOLLUM, G.; ROSSON, B.; SIEBURTH, P.; POLEK, M.; KRUEGER, R.; VIDALAKIS, G. Introducing new and licensed huanglongbing tolerant citrus varieties into California. A case study – Florida. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Ed.). *Bacillus thuringiensis*: an environmental biopesticide: theory and practice. West Sussex: J. Wiley, 1993. p. 37-69.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CHÁVEZ-FLORES, O.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A.; SKODA, S.R.; REYES-MARTÍNEZ, G.; BARBA-REYNOSO, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; RUÍZ-AGUILAR, G.M.L.; FOSTER, J.E. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 32, n. 1, p.39–44, 2012.

LI, Y. Production of non-transgenic mutant plants via *Agrobacterium-mediated* transient CRISPR expression. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

LI, Z.; HUANG, H. GeneGA: Design gene based on both mRNA secondary structure and codon usage bias using Genetic algorithm. R package version 1.28.0, <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>, 2013. Disponível em: <<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GeneGA.html>> Acesso em: 26 jan. 2018.

MADUELL, P.; ARMENGOL, G.; LLAGOSTERA, M.; LINDOW, S.; ORDUZ, S. Immigration of *Bacillus thuringiensis* to bean leaves from soil inoculum or distal plant parts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2593-2600, 2007.

MAFRA, V.; KUBO, K.S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R.M.; BOAVA, L.P.; RODRIGUES, C.M.; MACHADO, M.A. Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2: e31263. doi:10.1371/journal.pone.0031263, 2012.

MAHMOUD, S.B.; RAMOS, J.E.; SHATTERS JR., R.G.; HALL, D.G.; LAPOINTE, S.L. NIEDZ, R.P.; ROUGÉ, P.; CAVE, R.D.; BOROVSKY, D. Expression of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin (Cyt2Ca1) in citrus roots to control *Diaprepes abbreviatus* larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 136, p. 1-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.07.006>.

MANN, R.S.; PELZ-STELINSKI, K.; HERMANN, S.L.; TIWARI, S.; STELINSKI, L.L. Sexual Transmission of a Plant Pathogenic Bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between Conspecific Insect Vectors during Mating. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p e29197, 2011.

MARCELINO, L.H.; SÁ, M.F.G. Detecção e Análise de Proteínas pela Técnica *Western Blot*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.) Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília, DF, EMBRAPA, Serviço de Produção de Informação –SPI, cap 17, p. 251-265, 1998.

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**, v. 59, n. 1, p. 68-75, 2010.

MIGUEL, P.S.B.; DELVAUX, J.C.; DE OLIVEIRA, M.N.V.; MONTEIRO, L.C.P.; FREITAS, F. DE S.; COSTA, M.D.; TÓTOLA, M.R.; MORAES, C.A. DE; BORGES, A.C. Diversity of endophytic

bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 7, p. 586-594, 2013.

MISHRA, P.K.; BISHT, S.C.; RUWARI, P.; SUBBANNA, A.R.N.S.; BISHT, J.K.; BHATT, J.C.; GUPTA, H.S. Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from the North Western Indian Himalayas. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 143–155, 2017.

MIYATA, L.Y.; HARAKAVA, R.; ATTÍLIO, L.B.; MENDES, B.M.J.; LOPES, J.R.S.; COLETTA-FILHO, H.D.; SOUZA, A.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Phloem promoters in transgenic sweet orange are differentially triggered by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39 n. 3, p. 1-9, 2017.

MIYATA, L.Y.; HARAKAVA, R.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; MOURAO-FILHO, F.A.A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters, **Plant Cell Reports**, 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**, v. 33, n. 1, p. 311-315, 2011.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 163-2000.

MONNERAT, R.G. Identificação, caracterização e disponibilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes ao controle de lepidópteros desfoliadores da cultura do algodão. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov., 2003. 46.p (Relatório Final).

MONNERAT, R.G.; SOARES, C.M.; CAPDEVILLE, G.; JONES, G.; MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.; CORDEIRO, B.A.; BRAZ, S.V.; DOS SANTOS R.C.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 512-520, 2009.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; HJORT, K.; ROOS, S.; GRANHALL, U. Characterization of Rhizobacteria isolated from Wild *Coffea arabica* L. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 2, p. 100-108, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 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.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal of Statistical Society**, v. 135, p. 370-384, 1972

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. Anuário da Citricultura 2017. 1ª Edição, São Paulo: CitrusBR, 2017, 60p.

NI, M.; MA, W.; WANG, X.; GAO, M.; DAI, Y.; WEI, X.; ZHANG, L.; PENG, Y.; CHEN, S.; DING, L.; TIAN, Y.; LI, J.; WANG, H.; WANG, X.; XU, G.; GUO, W.; YANG, Y.; WU, Y.; HEUBERGER, S.; TABASHNIK, B.E.; ZHANG, T.; ZHU, Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 9, p.1204–1213, 2017.

ODCE-FAO. Perspectivas e desafios Agrícola 2015-2024. Disponível em:< <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2017.

OLIVEIRA, M.L.P.; STOVER, E.; THOMSON, J.G. The *codA* gene as a negative selection marker in Citrus. **Springer Plus**, v. 4: 264 DOI 10.1186/s40064-015-1047y, 2015.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

OSMAN, G.E.H.; ALREADY, R.; ASSAEEDI, A.S.A.; ORGANJI, S.R.; EL-GHAREEB, D.; ABULREESH, H.H.; ALTHUBIANI, A.S. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a Comprehensive Review. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 25, n. 1, p. 271-288, 2015.

PALMA, L.; BERRY, C. Understanding the structure and function of *Bacillus thuringiensis* toxins. Letter to the Editor/**Toxicon**, v. 109, p.1 -3, 2016.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3–22, 2013.

PARRA, J.R.P.; ALVES, G.R.; DINIZ, A.J.F.; VIEIRA, J.M. *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): Mass Rearing and Potential Use of the Parasitoid in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 7, n. 1, p.1–11, 2016.

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**, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

PELZ-STELINSKI, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid Hemiptera: Psyllidae. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 5, p. 1531–1541, 2010.

PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L. Early Events in *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Citrus Explants. **Annals of Botany**, v. 94, n. 1, p. 67–74, 2004.

PERLAK, F.J.; FUCHAS, R.L.; DEAN, D.A.; MCPHERSON, S.L.; FICHHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein gene. IN: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 3324–3328, 1991.

PORCAR, M.; GRENIER, A.M.; FEDERICI, B.; RAHBÉ, Y. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4897-4900, 2009.

PORTALANZA, D.E.; SANCHEZ, L.; PLÚAS, M.; FELIX, I.; COSTA, V.A.; DIAS-PINIC, N.S.; FERREIRA-STAFANOUS, S.; GÓMEZ-TORRES, M.L. First records of parasitoids attacking the Asian citrus psyllid in Ecuador. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, n. 2, p. 107-110, 2017.

PRAÇA, L.B.; GOMES, A.C.M.M.; CABRAL, G.; MARTINS, E.S.; SUJII, E.R.; MONNERAT, R.G. Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown *in Vitro*. **Bt Research**, v. 3, n. 3, p. 11-19, 2012.

Premier Biosoft. Disponível em:<http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html>. Acesso em: 23 jan. 2018.

PUIGBÓ, P.; GUZMÁN, E.; ROMEU, A.; GARCIA-VALLVÉ, S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W126–W131, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna: Austria, 2016.

RABINOVITCH, L.; VIVONI, A.M.; MACHADO, V.; KNAAK, N.; BERLITZ, D.L.; POLANCZYK, R.A.; FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In: Fiuza, L.; Polanczyk, R.; Crickmore, N. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus***. Springer, pp 1-18, Chapter 1. 2017.

RAIOL JÚNIOR, LAUDÉCIR LEMOS. **Translocação de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em citros**. 2017. 102p. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2017.

RICHARDSON, M.L.; HALL, D.G. Resistance of *Poncirus* and *Citrus* x *Poncirus* germplasm to the Asian citrus psyllid. In: Proceedings 3rd International Research Conference on Huanglongbing – IRCHLB III, Feb. 4-8, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 1, n.1 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMPURNA, S.; MAITI, M.K. Molecular Characterization of a Novel Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis* Effective Against Sap-Sucking Insect Pest **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 937–946, 2011.

SAHAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, p. 283–300, 2011.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystals proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

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

SENAVE. Servicio Nacional de Calidad Y Sanidad Vegetal Y de Semillas. Resolución N° 80. 2013. Disponível em: <<http://www.senave.gov.py/docs/resoluciones/senave/Res80-13.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2018

SHATTERS JR, R.G.; BOROVSKY, D.; AMMAR, E.D.; HALL, D.; STURGEON, K.; WARWICK, E.R.; GIULIANOTTI, M.; SANTOS, R.G.; PINILLA, C. Identification of gut epithelium binding peptides

that reduce systemic movement of '*Candidatus*' *Liberibacter asiaticus* within the Asian citrus psyllid vector. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

SILVA, T.L. **Transformação genética de laranja doce com uma construção gênica do tipo *hairpin* de um fragmento do gene da *V - ATPase-A* de *Diaphorina citri* Kuwayama**. 2013. 83 p. Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

SINGH, A.K.; PARITOSH, K.; KANT, U.; BURMA, P.K.; PENTAL, D. High Expression of Cry1Ac Protein in Cotton (*Gossypium hirsutum*) by Combining Independent Transgenic Events that Target the Protein to Cytoplasm and Plastids. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7: e0158603, 2016.

SRIVASTAVA, A.C.; GANESAN, S.; ISMAIL, I.O.; AYRE, B.G. Functional characterization of the *Arabidopsis AtSUC2* sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. **Plant Physiology** v. 148, n.1, p. 200-211, 2008.

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of Action of Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis* and Resistance Mechanisms. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; STILES, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; DUBREUIL, J.D.; MANDAL, M. (Ed.) **Microbial Toxins**, Springer Netherlands, Dordrecht, the Netherlands. p. 1–13, 2016.

SOBERÓN, M.; LÓPEZ-DÍAZ, J.A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, v. 41, p. 87–93, 2013.

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

STOVER, E.; DRIGGERS, R.; HALL, D.; GUPTA, G. Resistance and tolerance to huanglongbing in citrus. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

STOVER, E.; INCH, S.; RICHARDSON, M.L.; HALL, D.G. Conventional Citrus of Some Scion/Rootstock Combinations Show Field Tolerance under High Huanglongbing Disease Pressure. **Hortscience**, v. 51, n. 2, p. 127–132, 2016.

SULZBACH, M.; OLIVEIRA, R.P.; GIRARDI, E.A.; BASSANEZI, R.B.; LARANJEIRA, F.F.; SCHWARZ, S.F. Risk analysis of introduction and spread of huanglongbing in citrus groves in Rio Grande do Sul, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-10, 2017.

SUTTON, B.; DUAN, Y.; HALBERT, S.; SUN, X.; SCHUBERT, T.; DIXON, W. Detection and identification of citrus huanglongbing (greening) in Florida, USA. GOTTFELD T.R. (Ed.). In: INTERNATIONAL CITRUS CANCER AND HUANGLONGBING RESEARCH WORKSHOP, 2, 2005. Orlando. **Proceedings...**7-11 Nov. 2005; Dixon WN: Graham JH, Berger P. Florida, 2005.

TABACHNICK, W.J. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Vector Competence for the Citrus Greening Pathogen '*Candidatus Liberibacter Asiaticus*'. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 839-848, 2015.

TABASHNIK, B. E.; FABRICK, J. A.; UNNITHAN, G. C.; YELICH, A. J.; MASSON, L.; ZHANG, J.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins alone and in combinations against pink bollworm resistant to Cry1Ac and Cry2Ab. **PLoS One**, v. 8, n. 11. p. e80496. 2013.

TABASHNIK, B.E.; ZHANG, M.; FABRICK, J.A.; WU, Y.; GAO, M.; HUANG, F.; WEI, J.; ZHANG, J.; YELICH, A.; UNNITHAN, G.C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; CARRIÈRE, Y.; LI, X. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, v. 5, n. 15107, 2015

TAO, A.; PANG, F.; HUANG, S.; YU, G.; LI, B.; WANG, T. Characterisation of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 8, p. 901-924, 2014.

TANUJA; BISHT S.C.; MISHRA,P.K. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas. **European Journal of Soil Biology**, v. 56, p. 56-64, 2013.

TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T.; WANG, N. Planta Distribution of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, v. 98, n.5 p. 592–599, 2008.

TAVANO, E.C.R.; VIEIRA, M.L.C.; MOURÃO FILHO.; F.A.A.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J. Genetic Transformation of *Citrus sinensis* 'Hamlin' with *Attacin A* Driven by a Phloem Tissue-Specific Promoter for Resistance to *Candidatus Liberibacter* spp. IN: Proc. XIIth Intl. Citrus Congress Eds.: B. Sabater-Muñoz et al. **Acta Horticulturae**. 1065, ISHS 2015, p. 695-702, 2015.

TEIXEIRA D. C., AYRES, A.J., KITAJIMA, E.W., L. DANET, JAGOUEIX-EVEILLARD, S., SAILLARD, C., BOVE, J.M.. First report of a Huanglongbing-like disease of Citrus in São Paulo State, Brazil

and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. **Plant Disease**, v. 89, p. 107, 2005.

TEIXEIRA, D.C. ; SAILLARD, C. ; COUTURE, C. ; MARTINS, E.C. ; WULFF, N.A. ; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S. ; YAMAMOTO, P.T. ; AYRES, A.J. ; BOVE, J.M. Distribution and quantification of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 3, p. 139–150, 2008.

ULLRICH, K.K.; HISS, M.; RENSING, S.A. Means to optimize protein expression in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 61–67, 2015.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 **Nucleic Acids Research** 2007 35: W71-W74; doi:10.1093/nar/gkm306. Disponível em: < <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plusAbout.cgi>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

USDA. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service. 2018. Citrus Maturity Test Results and Fruit size. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publications/Citrus/Citrus_Forecast/2017-18/cit0318.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2018.

WANG, N.; JIA, H.; ZOU, X.; WANG, S.; PRASAD, S.; PANG, Z.; YING, X. Development of disease resistant/tolerant citrus varieties using CRISPR technology. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA, **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

WARREN, G. W., KOZIEL, M. ; MULINS, M. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins, 1998. US patent 5770696.

WENG, L.; DENG, L.; LAI, F.; XIAO, G. Optimization of the *cry2Aa* Gene and Development of Insect-resistant and Herbicide-tolerant Photoperiod-sensitive Genic Male Sterile Rice. **Czech Journal of Genetics Plant Breeding**, v. 50, n. 1, p. 19–25, 2014.

WOLFERSBERGER, M.G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia**, v. 46, n.5, p. 475-477, 1990.

XU, C.; XIA, Y.; LI, K.; KE, C. Further study of the transmission of citrus Huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. IN: Proc. 10th Conf. Int. Organization of Citrus Virologists, 1988, University of California, Riverside, CA, p. 243-248.

YADAV, A.; KEVAL, R.; CHOUDHARY, S. Biopesticide: The Need for Present and Future Agriculture. **Journal of Agroecology and Natural Resource Management**, v. 2, n. 1, p. 57-60, 2015.

YANG, C.; POWELL, C.A.; DUAN, Y.; SHATTERS, R.G.; LIN, Y.; ZHANG, M. Mitigating citrus huanglongbing via effective application of antimicrobial compounds and thermotherapy. **Crop Protection**, v. 84, p. 150-158, 2016.

ZHANG, Q.; HUA, G.; ADANG, M.J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. **Insect Science**, v. 5, p. 714-729, 2017 doi: 10.1111/1744-7917.12401. Epub 2016 Nov 24.

ZHANG, M.; GUO, Y.; POWELL, C.A.; DOUD, M.S.; YANG, C.; DUAN, Y. Effective Antibiotics against '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in HLB-Affected Citrus Plants Identified via the Graft-Based Evaluation. **PLoS ONE**, v. 9, n.11, p. e111032, 2014.

ZHANG, M.Q.; GUO, Y.; POWELL, C.A.; DOUD, M.S.; YANG, C.Y.; ZHOU, H.; DUAN, Y.P. Zinc treatment increases the titre of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in huanglongbing affected citrus plants while affecting the bacterial microbiomes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1616-28, 2016.

ZHANG, S.; SHI, Q.; DUAN, Y.; STOVER, E. Editing *DMR6* orthologs in citrus via a CRISPR/Cas9 system. In: IOCV, Organization. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing, March 15-17, Orlando, Florida, USA. **Journal of Citrus Pathology**, v. 4, n. 1, 2017.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA JR, L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/*PKA* signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 9897–902, 2006.

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

ZOU, X.; JIANG, X.; XU, L.; LEI, T.; PENG, A.; HE, Y.; YAO, L.; CHEN, S. Transgenic citrus expressing synthesized *cecropin B* genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. **Plant Molecular Biology**, v. 93, n. 4–5, p. 341–353, 2017.