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

**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**

Tatiane Loureiro da Silva

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas

**Piracicaba
2013**

Tatiane Loureiro da Silva
Bióloga

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
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2013

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

Silva, Tatiane Loureiro da

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 / Tatiane Loureiro da Silva.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
83 p: il.

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

1. Transformação genética 2. *Citrus* 3. RNA de interferência 4. *D. citri* I. Título

CDD 634.31
S586t

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

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.” (Mahatma Gandhi)

Dedico

Aos meus pais Sônia e Antônio,

Ao meu irmão Renato

Ao meu namorado e companheiro Aliedson

Por todo amor e incentivo

Meus sinceros agradecimentos

Acima de tudo e de todos, a Deus, pela vida, saúde e superação nos momentos de dificuldades, por ser um socorro nos momentos de dúvidas, reconforto nos momentos difíceis, e de agradecimento nos momentos de alegria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela confiança, oportunidade, ensinamentos e orientação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado e pela bolsa de Doutorado Sanduíche que foi de grande importância para minha formação acadêmica.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Harakava pelo apoio imprescindível à realização deste trabalho.

Aos professores do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas: Dr^a Helaine Carrer, Dr. Marcílio de Almeida, Dr. Daniel S. de Moura, Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, Dr. Ricardo Alfredo Kluge e Dr. Lázaro E. P. Peres, pela construção do conhecimento em sala de aula, os quais vou levar por toda minha vida acadêmica.

A querida Solizéte Silva, secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por ser sempre tão prestativa em todas às vezes que precisei, e pelo carinho e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal: Eder Cintra e David Ulrich, em especial, ao querido Sr. José Volpato, por ser sempre tão prestativo e cuidar das nossas plantas nas casas de vegetação.

Ao prof. Dr. Bryce W. Falk pela orientação, aprendizado e excelente convivência durante o doutorado sanduíche realizado na University of California – Davis, Davis, Califórnia, Estados Unidos da América.

A minha querida amiga Lísia Borges Attílio, uma pessoa iluminada e com um grande coração, cuja amizade quero levar por toda minha vida, por sempre me apoiar, seja me ensinando as diferentes técnicas envolvidas no trabalho, ou com palavras de incentivo e gestos de carinho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas – ESALQ (Alessandra Rigotto, Ernani Pereira Júnior, Flávia Zambon, Filipi Augusto Rodrigues, Liliane Libório Sttip, Luzia Miyata, Marina Caputo, Meire Bassan, Paulo Artur, Rodrigo Cassarotti, e as queridas Rafaella Felipe e Pâmela Fávero, que mesmo não estando mais no Laboratório, continuam presentes) e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Cena (Carolina Rossi, Fabiana Muniz, Eveline Tavano, Leonardo Soriano, Marcelo Correa e Renata Cruz) pela amizade, pelos momentos divertidos, e sempre me auxiliando quando precisei da ajuda de cada um de vocês.

A minha amada mãe Sônia Maria Rodrigues Loureiro, pelo amor, pela minha criação, e por sempre estar presente, mesmo tão distante.

A todos os meus familiares, tios, primos e avós, pela confiança depositada em mim, orações e torcida.

Ao meu companheiro-amigo-parceiro-marido Aliedson Sampaio Ferreira, por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos da minha vida, enchendo os meus dias de alegria.

E a todos aqueles que de uma maneira ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Citros: Aspectos gerais	21
2.2 Huanglongbing	23
2.3 <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	25
2.4 Transformação genética em citros	27
2.5 RNA de Interferência.....	30
2.6 V-ATPases.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Construção gênica para transformação genética	35
3.1.1 Construção do cassete de expressão	36
3.1.2 Construção do vetor de expressão	37
3.2 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.2.1 Fonte de explantes	39
3.2.2 Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> para os experimentos de transformação genética.....	39
3.2.3 Co-cultivo dos explantes com <i>A. tumefaciens</i>	40
3.2.4 Seleção e regeneração de gemas adventícias.....	40
3.2.5 Enxertia <i>in vitro</i> e aclimatização	40
3.3 Análises moleculares	41
3.3.1 Confirmação da transgenia por PCR	41
3.3.2 Análise de Southern blot	42
3.3.3 Análise de siRNA blot.....	43
3.4 Experimentos de alimentação com insetos adultos de <i>D. citri</i> em dieta artificial.....	44
3.4.1 Clonagem dos fragmentos da <i>DcV-ATPase-A</i> e GFP com sítios de ligação para T7 RNA polimerase	44
3.4.2 Síntese de dsRNA e siRNA da <i>DcV-ATPase-A</i> e do GFP	45
3.4.3 Experimentos de alimentação com insetos adultos de <i>D. citri</i> com dsRNA ou siRNA..	46

3.4.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	47
3.4.5 Análises estatísticas.....	51
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Construção gênica para transformação genética.....	53
4.2 Transformação genética	54
4.3 Análise de Southern blot.....	58
4.4 Análise de siRNA blot	60
4.5 Experimentos de alimentação com insetos adultos de <i>D. citri</i> em dieta artificial	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	71

RESUMO

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

O Brasil é o maior produtor de laranja doce no mundo. Entretanto, a cultura enfrenta grandes problemas, devido ao ataque de pragas e doenças, o que reduz a produtividade da cultura. Entre estas doenças, destaca-se o huanglongbing (HLB), doença associada a três espécies da bactéria *Candidatus Liberibacter*. No Brasil, o psílídeo *Diaphorina citri* é o inseto transmissor do HLB. A falta de cultivares de laranja doce resistentes ao HLB torna a transformação genética de plantas uma medida em potencial para o controle desta doença. Plantas transgênicas de laranja doce expressando um RNA de dupla fita (dsRNA) de um gene essencial à sobrevivência de *D. citri* podem resultar no controle do inseto por meio do mecanismo de RNA de interferência. Tal mecanismo resulta na degradação do RNAm homólogo ao dsRNA. Este trabalho teve por objetivo produzir plantas transgênicas de laranja doce, expressando um fragmento do gene *DcV-ATPase-A* de *D. citri*, em uma construção gênica tipo *hairpin*. Dessa forma, o silenciamento gênico por RNA de interferência seria ativado no psílídeo quando este for submetido à alimentação nas plantas transgênicas. O trabalho foi iniciado com a elaboração da construção gênica contendo uma sequência repetida e invertida do gene *DcV-ATPase-A* de *D. citri*, para formação de um *hairpin*. Segmentos de epicótilo, provenientes de sementes germinadas *in vitro* das laranjas ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram utilizados como fontes de explantes para a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Paralelamente aos experimentos de transformação genética, insetos adultos de *D. citri* foram submetidos a experimentos de alimentação artificial, contendo RNA de dupla fita (dsRNA) ou pequenos RNA interferentes (siRNA) da *DcV-ATPase-A*. Ao final do período de alimentação, foram avaliadas o número de insetos vivos e a expressão relativa do RNAm da *DcV-ATPase-A*. Através de PCR e Southern blot, a transgenia foi confirmada em 26 e 39 plantas de laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’, respectivamente. A transgenia não foi confirmada nas plantas regeneradas de laranja ‘Pêra’. O número de inserções no transgene variou de 1 a 4 cópias. A produção dos siRNAs foi confirmada em 10 plantas de laranja ‘Valência’, através de siRNA blot. O uso de dietas artificiais contendo dsRNA ou siRNA do gene *DcV-ATPase-A* não resultou em diferenças significativas no número de insetos vivos, ou no nível de expressão relativa do RNAm do gene *DcV-ATPase-A* em insetos adultos de *D. citri*.

Palavras-chave: Transformação genética; *Citrus*; RNA de interferência; *D. citri*

ABSTRACT

Sweet orange genetic transformation with a *hairpin* type construction gene fragment of V-ATPase-A of *Diaphorina citri* Kuwayama

Brazil is the largest sweet orange producer in the world. However, this crop faces major problems due to the attack of pests and diseases that reduce its productivity. Among the diseases, stands out the huanglongbing (HLB), disease associated with three different species of the *Candidatus* Liberibacter bacteria. In Brazil, the psyllid *Diaphorina citri* is the insect vector of HLB. The absence of resistant sweet orange cultivars to HLB makes the genetic transformation of plants a potential methodology to control this disease. Sweet orange transgenic plants engineered to express double strand RNA (dsRNA) of an essential gene for *D. citri* survival could result in insect control by RNA interference. This mechanism results in degradation of homologous RNAm to dsRNA. The aim of this work was to produce transgenic sweet orange plants expressing a fragment of *D. citri* *DcV-ATPase-A* gene, in a *hairpin* construction aiming gene silencing by RNA interference in *D. citri*, when fed on sweet orange transgenic plants. The work started developing a gene construct containing an inverted and repeated sequence of *DcV-ATPase-A* gene, to form a hairpin. Epicotyl segments collected from *in vitro* germinated seedlings of ‘Hamlin’, ‘Pêra’ and ‘Valência’ sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) were used as explants for the genetic transformation experiments via *Agrobacterium tumefaciens*. At the same time, adults of *D. citri* underwent artificial diet experiments containing dsRNA or siRNA of *DcV-ATPase-A*. At the end of feeding time, the survival of insects and the relative expression of *DcV-ATPase-A* RNAm were evaluated. Through PCR and Southern blot analysis, 26 ‘Hamlin’ and 39 ‘Valência’ sweet orange transgenic lines were confirmed. None of the regenerated ‘Pêra’ plants were transgenic. The transgenic plants had 1 to 4 T-DNA insertions. The siRNA products were observed in 10 ‘Valência’ plants, through siRNA blot. The artificial diets containing dsRNA or siRNA of *DcV-ATPase-A* resulted in no differences in the number of live insects and in the relative expression of *DcV-ATPase-A* RNAm in adult insects.

Keywords: Genetic transformation; *Citrus*; RNA interference; *D. citri*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema do cassete de expressão *hairpin/DcV-ATPase-A*, contendo o promotor 35S, o íntron, o terminador (NOS-T) e os sítios de restrição onde foram clonados os fragmentos do gene da *Dc-V-ATPase-A* nos sentidos senso e antisenso37
- Figura 2 - Construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* no vetor pCambia 2201, indicando o sítio de inserção da construção gênica após reação de clivagem com as enzimas *EcoRI* e *BstEII*38
- Figura 3 - Fragmentos amplificados por PCR do GFP (321 pb) e *DcV-ATPase-A* (206 pb), com sítios para o promotor da T7 RNA polimerase (a). Produto de reação de clivagem do pGEM[®]-T Easy + GFP (700 pb) e pGEM[®]-T Easy + *DcV-ATPase-A* (206 pb) (b). M: 1 kb ladder plus (Invitrogen[™])45
- Figura 4 - Fragmentos de dsRNA do GFP (coluna 1) e *DcV-ATPase-A* (coluna 2) obtidos através de reação de transcrição *in vitro*. M: RNA Ladder (New England Biolabs)46
- Figura 5 - Sequência completa do cDNA da *DcVATPase-A* depositada no *GenBank*, número de acesso FK254156.1. Localização da sequência dos *primers* utilizados para a síntese de dsRNA (destacado em verde), *primers* que flanqueiam a região de RT-qPCR (destacado em vermelho), e *primers* para RT-qPCR (destacado em azul). As três sequências destacadas em azul correspondem a *primer forward*, sonda e *primer reverse*, respectivamente.....49
- Figura 6 - Sequência completa do cDNA da *Ubiquitina* de *D. citri* depositada no *GenBank*, número de acesso DQ673413. Localização da sequência dos *primers* que flanqueiam a região de RT-qPCR (destacado em verde), e *primers* para RT-qPCR (destacado em azul). As sequências destacadas em azul correspondem a *primer forward*, sonda e *primer reverse*, respectivamente49
- Figura 7 - Fragmentos amplificados através de PCR da *DcV-ATPase-A* (a), e RT-PCR da *Ubiquitina* (b). M: 1 kb ladder plus (Invitrogen[™]).....50
- Figura 8 - Construção do cassete de expressão *hairpin/DcV-ATPase-A*. a) Clonagem do fragmento no vetor pGEM/35S-íntron-NOST, clivado com as enzimas *NcoI* e *KpnI*, liberando o fragmento no sentido senso. b) Clonagem do fragmento no vetor pGEM/35S-íntron-NOST, clivado com as enzimas *SacI* e *BstEII*, liberando o fragmento no sentido antisenso. c) Clivagem do vetor binário pCambia 2201 contendo o cassete de expressão *hairpin*, com a enzima de restrição *NcoI*. d) Análise de PCR de colônias de *E. coli* (1-6), mostrando a amplificação do fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A*, comprovando a clonagem do cassete de expressão no vetor pCambia 2201. e) clivagem do plasmídeo pCambia 2001 extraído de colônias de *A. tumefaciens* com a enzima de restrição *NcoI*, liberando

fragmentos com os mesmos tamanhos descritos na imagem “c”. M₁₀₀: Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); M₁: Marcador molecular de 1 Kb (Fermentas)
..... 53

Figura 9 - Aspectos gerais das diferentes etapas dos experimentos de transformação genética das laranjas ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ utilizando a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. a) Aspecto de segmentos de epicótilo inoculados com suspensão bacteriana de *A. tumefaciens*. b) Aspecto de brotação adventícia enxertada em citrange ‘Carrizo’. c) Experimento de transformação genética de laranja ‘Pêra’, utilizando segmento de epicótilo como fonte de explante. d) Experimento de transformação genética de laranja ‘Pêra’, utilizando segmentos de hipocótilo associado ao cotilédono como fonte de explante 56

Figura 10 - Análise de PCR de plantas de laranja ‘Valência’ (V5 a V13) e laranja ‘Hamlin’ (H2 a H13) contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. M1: Marcador de 100 pb (Fermentas); H₂O: Controle de reação para verificar possíveis contaminações, constituído por água; C-: DNA de planta não-transgênica; C+: Controle positivo (Plasmídeo pCambia 2201, contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*) 57

Figura 11 - Análise de Southern blot de plantas de laranja ‘Valência’ contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. O DNA foi clivado com a enzima *EcoRI* e hibridizado com a sonda contendo o amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁺: Controle positivo contendo amostra da sonda, formada pelo amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁻: Controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA das plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ 58

Figura 12- Análise de Southern blot de plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. O DNA foi clivado com a enzima *EcoRI* e hibridizado com a sonda contendo o amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁺: Controle positivo contendo amostra da sonda, formada pelo amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁻: Controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA das plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ 59

Figura 13- Análise de siRNA blot revelou a presença de pequenos RNAs interferentes nas folhas de plantas transgênicas de laranja ‘Valência’. C-: Controle negativo..... 60

Figura 14 - a) Número de insetos vivos de adultos de *D. citri* alimentados em solução de sacarose contendo dsRNA do gene alvo (ds *DcV-ATPase-A*) e dsRNA do gene controle (dsGFP) após quatro dias de alimentação. b) expressão relativa do RNAm da *DcV-ATPase-A* avaliados através de RT-qPCR..... 61

Figura 15 - a) Número de insetos vivos de adultos de *D. citri* alimentados em solução de sacarose contendo siRNA do gene alvo (si*DcV-ATPase-A*) e siRNA do gene

controle (siGFP) após cinco dias de alimentação. b) expressão relativa do RNAm da DcV-ATPase-A avaliados através de RT-qPCR.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> desenhados para amplificação do fragmento de 206 pb da <i>DcV-ATPase-A</i>	35
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para produção de dsRNA da <i>DcV-ATPase-A</i> e GFP	44
Tabela 3 - Sequência dos pares de <i>primers</i> da <i>DcV-ATPase-A</i> e <i>Ubiquitina</i> de <i>D. citri</i> , que flanqueiam a região de RT-qPCR.....	48
Tabela 4 - <i>Primers</i> e sondas utilizadas para as análises de RT-qPCR	50
Tabela 5 - Transformação genética de laranjas ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ via <i>A. tumefaciens</i> contendo a construção gênica <i>hairpin/DcV-ATPase-A</i>	55

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja doce do mundo, com mais de 19,8 milhões de toneladas, seguido pelos Estados Unidos, com uma produção de 8 milhões de toneladas em 2011 (FAO, 2013). Ainda no que se refere à produção de frutas cítricas, incluindo limões e tangerinas, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, após a China.

O Brasil também se destaca como o maior produtor e exportador de suco concentrado, sendo que 70 a 80% da produção de laranja doce é destinada à indústria para o processamento desse tipo de suco, e 98% da produção é exportada. Os principais compradores do suco concentrado são União Europeia e Estados Unidos (BOTEON; NEVES, 2005; NEVES et al., 2009).

Apesar da importância econômica que a citricultura representa para o Brasil, esta cultura tem registrado quedas de produtividade por diversas pragas e doenças. Este fato é ainda mais acentuado devido à baixa variabilidade genética encontrada nas variedades cultivadas, bem como pela ausência de cultivares tolerantes às principais doenças (BASTIANEL et al., 2006a).

Atualmente, o huanglongbing (HLB) ou *greening* tem causado grande preocupação entre os citricultores de todo o mundo. A severidade do HLB é intensificada devido à dificuldade de controle e rápida disseminação da doença, causando grandes prejuízos econômicos à citricultura. Nos pomares do Estado de São Paulo, o HLB é causado pelas bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), sendo esta espécie encontrada somente no Brasil, e por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). A espécie asiática apresenta maior tolerância a altas temperaturas e uma maior titulação em plantas de laranja doce infectadas com o HLB, situação que pode favorecer uma maior disseminação de CLas, que, atualmente, está mais disseminada do que a espécie americana (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS, 2009; LOPES et al., 2009). Praticamente todas as espécies e cultivares comerciais de citros são suscetíveis a esta doença (BOVÉ, 2006).

O HLB apresenta alto poder de destruição nos pomares destinados à citricultura, estando presente em quase todas as regiões do mundo. O HLB não chega a provocar a morte das plantas infectadas, mas, com o passar dos anos, a intensificação da doença leva à improdutividade das plantas, podendo levar à redução de 100% na produção de frutos (BELASQUE JÚNIOR et al., 2009).

O desenvolvimento de novas cultivares potencialmente resistentes ao HLB através de técnicas convencionais de melhoramento genético vegetal é dificultado devido aos fatores que

envolvem a biologia reprodutiva dos citros, tais como poliembrionia nucelar (apomixia), alta heterozigose, longo período juvenil e auto-incompatibilidade (SOARES FILHO et al., 2002). Dessa maneira, a introdução de genes que conferem resistência à determinada doença em citros, através da transformação genética, parece ser uma alternativa viável.

A transformação genética constitui uma ferramenta do melhoramento genético, que permite a introdução de genes específicos em genótipos elite, para a seleção de novas cultivares resistentes a doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, e mais recentemente a insetos herbívoros ou vetores de fitopatógenos. Isto possibilita a obtenção de cultivares superiores em menor espaço de tempo.

Tendo em vista a severidade do HLB, a falta de medidas curativas para o controle da doença, ausência de cultivares de citros resistentes e a ameaça que a doença representa para a produção de frutas cítricas, o silenciamento de genes importantes para a sobrevivência do inseto transmissor das bactérias causadoras do HLB, o psíldeo *Diaphorina citri*, é uma importante estratégia para resistência a esta doença.

A transformação genética visando o controle de insetos herbívoros ou vetores de fitopatógenos se baseia no mecanismo de RNA de interferência (RNAi), que visa o silenciamento de genes essenciais à sobrevivência de insetos (MAO et al., 2007). O mecanismo de RNAi é uma técnica promissora, e em citros este é um trabalho pioneiro, não sendo encontrados dados na literatura sobre transformação genética de citros para resistência a insetos vetores de fitopatógenos.

A produção de plantas transgênicas de laranja doce expressando um RNA de dupla fita (dsRNA), de um gene essencial à *D. citri* pode resultar em controle do inseto. O inseto, ao se alimentar nas plantas transgênicas, absorve o dsRNA, estrutura envolvida com o desencadeamento do mecanismo de RNAi, e uma vez presente no sistema digestivo do inseto, o dsRNA desencadeará o mecanismo de RNAi, levando à degradação do RNA mensageiro homólogo ao dsRNA. De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi selecionar um gene essencial para a sobrevivência de *D. citri*, a subunidade A da V-ATPase (*DcV-ATPase-A*), e produzir plantas transgênicas de laranja doce expressando um *hairpin* (RNA de dupla fita) da *DcV-ATPase-A*, visando controle de *D. citri*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citros: Aspectos gerais

Acredita-se que as plantas cítricas tenham se originado nas regiões tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático e do arquipélago Malaio, e a partir daí foram disseminadas para outros continentes (NICOLSI et al., 2000). A maioria das espécies que apresentam importância comercial pertence ao gênero *Citrus*. O gênero *Citrus* pertence à família botânica Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citriae, subtribo Citrinae, a qual possui mais cinco gêneros: *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Poncirus* (LU; ZHOU; XIE, 2011).

A taxonomia e a filogenia dos citros são controversas, complexas e, algumas vezes, confusas, de maneira que existem vários sistemas de classificação para o gênero *Citrus*, variando, principalmente, quanto ao número de espécies (NICOLSI, 2007). Entre os sistemas de classificação propostos, os que mais se destacam são os formulados por Swingle e Reece (1967), no qual os autores reconheceram 16 espécies como pertencentes ao gênero *Citrus* e o estabelecido por Tanaka (1977), no qual o autor descreveu 162 espécies como pertencentes ao gênero *Citrus* (ARAÚJO; ROQUE, 2005).

Os caracteres morfológicos e as diferenças anatômicas constituíram as principais ferramentas utilizadas em tempos passados para estabelecer uma classificação das espécies pertencentes ao gênero *Citrus*. Com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular, principalmente com o uso de marcadores moleculares e bioquímicos, os sistemas de classificação taxonômica foram reavaliados (ARAÚJO; ROQUE, 2005; BASTIANEL et al., 2001). Através destas novas ferramentas para estudo das relações filogenéticas de espécies cítricas, Barret e Rhodes (1976), estabeleceram que o gênero *Citrus* é formado por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*C. reticulata* Blanco) e toranja (*C. grandis* L.), e os demais representantes que haviam sido classificados como espécies, na verdade são híbridos (MOORE, 2001).

As frutas cítricas de uso comercial podem ser agrupadas em laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm. F.), limas ácidas [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle e *C. latifolia* (Yu. Tanaka)] e pomelos (*C. paradisi* Macfad) (PIO et al., 2005). No que se refere às espécies empregadas como porta-enxertos, destacam-se limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten & Pasq.), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cléopatra’ (*C. reshini* hort. ex Tanaka), laranja azeda (*C. aurantium* L.), trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), híbridos

citrange ‘Carrizo’ e citrange ‘Troyer’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck] e citrumelo ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]) (POMPEU JUNIOR, 2005).

Recentemente, a China se tornou o maior produtor mundial de citros, com produção de 30 milhões de toneladas em 2011 devido, principalmente, ao incremento na produção de tangerinas. Brasil e Estados Unidos surgem como segundo e terceiro maiores produtores de citros, com produção de 22 e 10,7 milhões de toneladas, respectivamente. Juntos, estes três países respondem por mais de 50% da produção mundial de citros (FAO, 2013).

Dentre as principais regiões produtoras de citros no Brasil, São Paulo aparece como o maior Estado produtor de citros, com ênfase para laranja doce destinada à exportação de suco concentrado. A citricultura é considerada uma das principais atividades econômicas do Estado de São Paulo, um agronegócio que movimenta em torno de R\$ 9 bilhões ao ano e gera cerca de 400 mil empregos diretos e indiretos (NEVES et al., 2006). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Estado de São Paulo é responsável por quase 80% do total de frutas cítricas produzidos no País, chegando a uma produção em 2011 de 15,2 milhões de toneladas de laranjas, 853 mil toneladas de limões e 382 mil toneladas de tangerina. No que se refere às áreas destinadas para o cultivo de laranja doce, aproximadamente 600 mil hectares estão localizados no Estado de São Paulo, de um total de 800 mil hectares em todo o Brasil (IBGE, 2013).

Na maioria dos países produtores de frutas cítricas, as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck) são predominantes, chegando a representar dois terços dos plantios comerciais. No Brasil, as principais cultivares de laranjas doces destinadas à produção de suco são ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’, e ‘Hamlin’, e a principal cultivar de porta-enxerto utilizada é o limão ‘Cravo’ (PIO et al., 2005).

Embora o Brasil seja o maior produtor de laranja doce, a sua produtividade ainda é considerada baixa (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001). Em 2011, a produção de laranja doce no Brasil foi de 238 t ha⁻¹, enquanto na Flórida (EUA), a principal região concorrente com o Brasil, a produção de laranja doce foi de 325 t ha⁻¹ (FAO, 2013). A baixa produtividade de laranja doce no Brasil está associada às inadequadas estratégias de manejo do pomar e manejo pós-colheita dos frutos, e aos inúmeros fatores fitossanitários, incluindo os vários tipos de doenças que afetam a citricultura (MACHADO et al., 2005).

Entre as principais doenças que causam diminuição na produtividade citrícola, citam-se a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico, que têm como agente causal as bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, respectivamente (BELASQUE-

JUNIOR et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2008). A leprose dos citros, transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, e o vírus da tristeza dos citros (CTV) são consideradas as principais viroses que afetam a citricultura brasileira (BASTIANEL et al., 2006b; MORENO et al., 2008). A morte súbita dos citros (MSC), que pode levar à morte da planta infectada, pode ser causada por uma nova espécie de CTV ou por um novo vírus pertencente à família Tymoviridae e transmitido por inseto (POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2008). Já a gomose e a podridão em raízes e radículas são doenças causadas por patógenos pertencentes ao gênero *Phytophthora* (FEICHTENBERGER, 2001). No momento, a principal doença dos citros e que tem causado grande preocupação para a citricultura é o Huanglongbing (BOVÉ, 2006).

2.2 Huanglongbing

O HLB foi primeiramente identificado em 1919 na China e, atualmente, está disseminado nos cinco continentes. No Brasil, o HLB foi detectado em 2004 na cidade de Araraquara, interior do Estado de São Paulo, um dos maiores polos produtores de citros no País (COLLETA-FILHO et al., 2004). Na Flórida, a segunda maior região produtora mundial de laranja doce, a constatação da presença do HLB se deu em 2005 (TEIXEIRA et al., 2005).

São conhecidas três espécies de bactérias associadas ao HLB, nomeadas conforme o continente onde foram primeiramente identificadas. Estas bactérias são *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf) e *Ca. Liberibacter americanus* (CLam), sendo a última encontrada somente no Brasil (LOPES et al., 2009). As espécies, por não serem rotineiramente cultivadas, recebem a denominação *Candidatus*, como uma condição de candidato a ter aquela classificação (MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLLETA-FILHO, 2010). De acordo com Sechler et al. (2009), utilizando meio de cultura específico, foi possível isolar e cultivar as três espécies de bactérias associadas ao HLB, mas devido a falta de repetibilidade dos resultados, o postulado de Koch ainda não foi completamente preenchido. Devido a este fato, técnicas moleculares têm sido utilizadas para confirmar e identificar a bactéria (COLLETA-FILHO et al., 2004; KIM et al., 2009).

Todas as três espécies de bactérias apresentam crescimento restrito às células do floema, e são transmitidas por insetos vetores (psílídeos) (JAGOEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994). No continente africano, o inseto vetor do HLB é o psílídeo *Trioza erythrae*, enquanto nos países asiáticos e americanos, o inseto vetor é o psílídeo *Diaphorina citri*. O psílídeo africano *T. erythrae* é sensível ao calor, desenvolvendo-se entre temperaturas de 22-25 °C, enquanto *D. citri* apresenta maior tolerância a temperaturas elevadas, sobrevivendo acima de 30 °C (BOVÉ; GARNIER, 2003).

O huanglongbing, que em chinês significa “doença do ramo amarelo”, tem nesta mudança de coloração, um dos principais sintomas da doença, com folhas apresentando uma mistura de tonalidades verdes e amarelas, que recebe o nome de mosqueamento. Além do mosqueamento das folhas, plantas infectadas pela bactéria apresentam folhas curvadas, de tamanho reduzido, com nervuras engrossadas e escurecidas. No que se refere a alterações na morfologia dos frutos, estes apresentam redução de tamanho, assimetria, maturação incompleta e sementes abortadas (BELASQUE JUNIOR et al., 2009; GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). A doença, além de provocar a queda dos frutos, também diminui a qualidade destes, acentuando os prejuízos na cadeia produtiva de citros. Bassanezi, Montesino e Stuchi (2009) observaram que os frutos colhidos de plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter* spp., quando comparados com plantas saudáveis, apresentaram diminuição da altura, peso, diâmetro, quantidade de suco, teor de Brix, e aumento de acidez.

Sintomas severos de HLB têm sido observados entre um a cinco anos após o aparecimento dos primeiros sintomas na planta. Excessiva queda de frutos é observada nos ramos afetados pelo HLB, e a redução no rendimento é proporcional à área infectada. Estima-se que pomares infectados entre o primeiro e quinto ano de idade teriam acentuada redução na produtividade dois a quatro anos após o aparecimento das primeiras plantas com sintomas, enquanto que para pomares com mais de cinco anos de idade, uma redução significativa da produtividade seria mais comumente observada após cinco a dez anos do aparecimento das primeiras plantas com sintomas (BASSANEZI, 2012, BELASQUE JÚNIOR et al., 2010). Atualmente, cerca de 6,9% das plantas cítricas do Estado de São Paulo encontram-se com sintomas do HLB (FUNDECITRUS, 2013).

A colonização pela bactéria induz o aumento da expressão dos genes envolvidos com a síntese de proteína P e calose, que são substâncias que se depositam nas extremidades das células do floema, as placas de perfuração, e assim impedem o transporte de fotoassimilados para órgãos drenos, tais como flor, frutos, folhas jovens e sistema radicular. A interrupção do fluxo de fotoassimilados leva ao acúmulo de amido nos cloroplastos, o que danifica o aparato fotossintético, resultando na clorose localizada, o que caracteriza o mosqueamento das folhas (ACHOR et al., 2010; KIM et al., 2009).

Análises de expressão gênica através de PCR quantitativo e microarranjos, em plantas infectadas como o HLB, demonstram que uma série de genes tem a sua expressão alterada, de maneira negativa ou positiva. Genes envolvidos nos mecanismos de defesa celular, transporte de fotoassimilados, organização celular, fotossíntese, metabolismo de carboidratos, metabolismo secundário, sinalização hormonal e biogênese da parede celular tiveram sua

expressão alterada devido à infecção por CLas ou CLam (ALBRECHT; BOWMAN, 2008; ARITUA et al., 2013; MAFRA et al., 2013).

Atualmente, as medidas utilizadas para impedir uma maior disseminação do HLB nos pomares brasileiros são erradicação das árvores sintomáticas, para diminuição das fontes de inóculos e da contaminação de outras plantas; uso de mudas sadias; eliminação de plantas de murta (*Murraya paniculata*) que também é hospedeira do psíldeo e da bactéria, e aplicação de inseticidas para o controle do inseto vetor (BELASQUE JUNIOR et al., 2010; LOPES; FRARE, 2008). Estas medidas, além de serem onerosas, não são totalmente eficazes. De acordo com Bassanezi (2012), em torno de 44% dos citricultores não eliminam as plantas doentes, situação que resulta em aumento do inóculo nos pomares e dificulta o controle da doença.

2.3 *Diaphorina citri* Kuwayama

O inseto vetor das bactérias associadas ao HLB, CLas e CLam, o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), foi identificado no Brasil em 1942 (COSTA-LIMA, 1942), sendo que até a constatação do HLB nos pomares brasileiros em 2004, o inseto era considerado uma praga secundária para a citricultura. Este psíldeo apresenta coloração acinzentada, com manchas escuras nas asas, mede em torno de 2 a 3 mm de comprimento, e hospeda-se em todas as variedades cítricas e na murta, espécie utilizada como cerva viva. Quanto à alimentação, prefere brotações novas, onde também deposita seus ovos e ocorre o desenvolvimento das ninfas (FUNDECITRUS, 2009; GALLO et al., 2002).

Quanto ao ciclo de vida de *D. citri*, os ovos depositados sobre folhas jovens eclodem após 2 a 4 dias, seguidos de cinco estágios ninfais posteriores, que são completados em 11 a 15 dias. Quando adultos, os indivíduos podem viver por vários meses, e uma única fêmea chega a depositar até 800 ovos durante seu ciclo de vida (HALBERT; MANJUNATH, 2004). A ocorrência do inseto se dá durante todo o ano, mas a sua população é aumentada durante o período de brotações da planta (GRAVENA et al., 2010).

No que se refere aos mecanismos de transmissão da bactéria pelo psíldeo, estes ainda não estão totalmente elucidados. Os tipos de mecanismos de transmissão podem ser do tipo não-persistente, semi-persistente, persistente circulativa, e persistente propagativa. Estes mecanismos de transmissão são definidos de acordo com quatro parâmetros biológicos, que são tempo de aquisição e inoculação do patógeno pelo inseto, período de latência (tempo entre a aquisição e a inoculação do patógeno) e retenção (o patógeno se multiplica dentro do inseto vetor). Tais parâmetros biológicos caracterizam o mecanismo de transmissão e a importância

epidemiológica do patógeno (BERGAMIN FILHO, 2009, NASCIMENTO, 2010). Segundo Parra et al. (2010), a transmissão de *Candidatus Liberibacter* spp. por psílídeos parece seguir o modelo de circulação e/ou propagação em vários tecidos do corpo do inseto, culminando com a inoculação via saliva, o que caracteriza a transmissão persistente propagativa.

A multiplicação de *Candidatus Liberibacter* spp. em psílídeos vem sendo reportada na tentativa de entender a interação patógeno-vetor. Inoue et al. (2009) monitoraram a concentração de CLas em intervalos de 5 dias, durante 20 dias, depois que ninfas do quinto instar e adultos se alimentaram em plantas infectadas com CLas por um período de 24 horas. Em insetos adultos, a concentração da bactéria não aumentou e também não houve transmissão de CLas para as plântulas de citros. Já em relação às ninfas de quinto instar, a concentração bacteriana aumentou, e estes, quando adultos, foram responsáveis pela transmissão da bactéria em 67% das plântulas estudadas. Corroborando estes resultados, Nascimento (2010) observou que ninfas de quarto e quinto ínstar apresentaram maior taxa de aquisição do patógeno quando comparados com adultos, e que estas ninfas, quando adultas, registraram aumento da população bacteriana.

Trabalhos iniciais sobre o alojamento de CLas no corpo *D. citri* foram realizados por Chen, Miyakawa e Matsui (1973), que através de microscopia eletrônica, observaram estruturas semelhantes a bactérias em células da glândula salivar de psílídeos provenientes de plantas com sintomas de HLB. Xu et al. (1988) também observaram estruturas parecidas com bactérias, em células da glândula salivar e intestino médio de psílídeos previamente alimentados em plantas contaminadas com CLas.

Ammar et al. (2011), objetivando identificar e detectar CLas em diferentes partes do corpo de *D. citri* infectados, confirmaram por PCR quantitativo, a presença da bactéria nas glândulas salivares e canal alimentar do psílídeo. Ao que tudo indica, somente após a bactéria atingir e se multiplicar na glândula salivar do inseto vetor, é que esta pode ser transmitida para a planta hospedeira, visto que a saliva é necessária para a lubrificação do aparelho bucal do inseto durante a absorção da seiva floemática (BOVÉ et al., 2003).

Até o momento, o uso de inseticidas constitui a principal medida para diminuir a população de *D. citri*. Entretanto, o uso indiscriminado de inseticidas pode resultar em um eventual mecanismo de resistência por parte do inseto (MARUTANI-HERT et al., 2009). Além do mais, o constante uso de agentes químicos pode resultar em implicações ambientais e econômicas, tais como maiores gastos com aquisição e aplicação destes insumos nos pomares (STUCHI; GIRARDI, 2010).

A falta de sucesso nos trabalhos de cultivo *in vitro* de *Candidatus Liberibacter* spp. dificulta a obtenção de medidas efetivas para o controle desta bactéria. Portanto, alternativas que visam o controle do psilídeo são importantes estratégias para diminuir os danos causados pelo HLB à citricultura.

2.4 Transformação genética em citros

O rendimento econômico que a citricultura gera ao Brasil não é maior devido ao grande número de pragas e doenças que atacam a cultura. Aliado a este fato, citam-se as características da biologia reprodutiva dos citros, que dificultam a obtenção de novas cultivares resistentes a pragas, através de técnicas convencionais de melhoramento genético vegetal (MACHADO et al., 2005).

Para superar estes entraves, a biotecnologia, através da cultura de tecidos vegetais e técnicas moleculares, surge como importante aliada na busca de cultivares de citros resistentes a pragas e patógenos. Dentre estas tecnologias, destacam-se a hibridação somática através da fusão de protoplastos e a transformação genética (MENDES et al., 2002).

O entendimento das bases moleculares envolvidas no processo de infecção por *Agrobacterium* spp. entre seus hospedeiros permitiu a utilização desta bactéria como vetor natural de transformação genética de plantas (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003), sendo este método de transformação conhecido como método indireto, e o mais utilizado para a obtenção de plantas transgênicas em citros (DUTT; LEE; GROSSER, 2010; PEÑA et al., 1995; ZOU et al., 2008). Os métodos diretos de transformação genética baseiam-se no uso de processos físicos ou químicos, e os mais utilizados são a biolística e eletroporação, sendo estes processos utilizados em espécies que apresentam recalcitrância à transformação via *Agrobacterium* (ANDRADE, 2003).

A transformação genética via *A. tumefaciens*, consiste em imersão do tecido vegetal em suspensão bacteriana de *A. tumefaciens*, contendo o gene de interesse. Após o co-cultivo, os explantes são transferidos para um meio de regeneração de gemas adventícias contendo antibióticos, para eliminar as células de *A. tumefaciens* e um agente de seleção, que permita o crescimento somente das células transformadas (BRASILEIRO; LACORTE, 2000). A produção de plantas transgênicas depende da integração estável do DNA exógeno dentro do genoma receptor, seguido da regeneração de gemas adventícias a partir das células transformadas, demonstrando o papel crucial das técnicas de biologia molecular e cultura de tecidos para a transformação genética (PEÑA et al., 2004).

Vários tipos de explantes são utilizados como fonte de material vegetal para os trabalhos de transformação genética em citros via *A. tumefaciens*, destacando-se explantes provenientes de tecido juvenil, como segmentos de epicótilo extraído de sementes previamente germinadas *in vitro*, e segmentos internodais de plantas jovens cultivadas em casa de vegetação (MARQUES; NOLASCO; LEITÃO, 2011; MIYATA et al., 2011; SILVA et al., 2005).

Para a regeneração de gemas adventícias a partir dos explantes previamente co-cultivados com *A. tumefaciens*, geralmente, faz-se uso de reguladores vegetais, tais como auxinas e citocininas. Em trabalhos de transformação genética de citros, destaque tem sido dado para a utilização da citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) durante a regeneração de gemas (ALMEIDA et al., 2002; BOSCARIOL et al., 2006; SILVA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2008).

Genes de seleção são usualmente introduzidos dentro do genoma da planta juntamente com o gene de interesse para permitir a seleção das poucas células efetivamente transformadas, em detrimento da inibição do crescimento das células não transformadas, e assim, garantir a regeneração de gemas provenientes de células transformadas. Os genes de seleção mais utilizados são aqueles que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas. Em citros, o gene de seleção mais utilizado é o *nptII*, o qual é isolado de *Escherichia coli*, e codifica a neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência a antibióticos aminoglicosídeos que contêm um grupo 3-hidroxila, tais como, a canamicina (DUTT; LEE; GROSSER, 2010). As células transformadas contendo o gene de seleção conseguem metabolizar a canamicina presente no meio de cultura, graças à atividade da neomicina fosfotransferase II, até se diferenciarem em gemas adventícias.

Devido à dificuldade de enraizamento da maioria das cultivares de citros, as gemas regeneradas são enxertadas *in vitro* em porta-enxertos não transgênicos, provenientes de sementes germinadas *in vitro* (PEÑA et al., 1995). A partir do sucesso da enxertia, as plântulas são aclimatizadas e, então, transferidas para casa de vegetação, obtendo-se assim uma planta completa, que será avaliada quanto à expressão do gene introduzido.

O primeiro trabalho de transformação genética de citros foi realizado por Kobayashi e Uchimiya (1989), utilizando polietilenoglicol (PEG) para a introdução de DNA exógeno em protoplastos de laranja doce. Entretanto, os autores não obtiveram sucesso durante a regeneração de plantas. Contudo, este foi o passo inicial para a transformação genética de citros tornar-se uma realidade promissora na busca de melhorias na produtividade da cultura. Desde então, diversos trabalhos têm sido realizados em diferentes cultivares de citros e com

diferentes finalidades: resistência à salinidade em citrange ‘Carrizo’ através da inserção dos genes *Halotolerance* (*HAL2*) e *Betaina Aldeído Desidrogenase* (*BADH*) (CERVERA et al., 2000; FU et al., 2011), qualidade do suco, através da expressão da *pectina metiltransferase* (*PME*) em laranja ‘Valência’ (GUO et al., 2005), diminuição do período juvenil, utilizando o gene *APETALA1* (*API*) em diferentes cultivares de laranja (CERVERA; NAVARRO; PEÑA, 2009; DUAN; FAN; GUO, 2010).

Grande parte dos trabalhos de transformação genética em citros visa a obtenção de cultivares resistentes ao ataque de pragas e doenças. As estratégias utilizadas para obter resistência a doenças incluem introdução de genes que interfiram no estabelecimento do patógeno na planta hospedeira, e assim impedir o desenvolvimento da doença. Esses genes que conferem resistência, geralmente, estão envolvidos com a síntese de peptídeos antimicrobianos, síntese de proteínas relacionadas à patogenicidade, e indução do sistema de defesa das plantas, como a resistência derivada do patógeno (GER et al., 2002).

Vários trabalhos têm reportado que a transformação genética em cultivares de laranja doce pode conferir resistência a doenças bacterianas (BOSCARIOL et al., 2006; HE et al., 2011; MENDES et al., 2010; YANG et al., 2011). Plantas de laranja doce expressando o peptídeo atacina A (*attA*), quando desafiadas com a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico, foram mais resistentes do que as plantas não-transgênicas (CARDOSO et al., 2010). Zhang et al. (2010) também promoveram a transformação genética de laranja doce expressando o gene *NPRI*, que participa da ativação de resistência sistêmica adquirida e, de acordo com os autores, as plantas contendo o gene *NPRI* foram mais resistentes ao cancro cítrico. Plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *hrpN* que codifica uma proteína envolvida com resposta de hipersensibilidade, apresentaram redução da suscetibilidade ao cancro cítrico (BARBOSA-MENDES et al., 2009).

Plantas de limão ‘Cravo’ transformadas com o gene *bacteriopsina* (*bO*) apresentaram diminuição dos sintomas causados por *Phytophthora nicotinae* (AZEVEDO et al., 2006). Plantas de limão transformadas com o gene *chit42*, uma endoquitinase isolada de *Trichoderma harzianum*, inibiram a germinação de esporos e o crescimento de hifas do fungo *Phoma tracheiphila*, agente causador do mal seco, e apresentaram redução de lesões quando submetidas à inoculação com *Botrytis cinerea*, o agente causal do mofo cinzento em citros (GENTILE et al., 2007). Análise de expressão gênica revelou que as plantas transgênicas de limão apresentaram elevados níveis de RNAm de genes associados com produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Resistência Sistêmica Induzida (ISR), rotas bioquímicas envolvidas com resistência a doenças (DISTEFANO et al., 2008).

Para o controle de doenças virais que afetam a citricultura, tais como o vírus da tristeza dos citros (CTV), as estratégias de controle através da transformação genética se baseiam na resistência derivada do patógeno, em que sequências derivadas do genoma do vírus são introduzidas dentro do genoma da planta. Ananthakrishnan et al. (2007) obtiveram plantas transgênicas de diferentes cultivares de pomelo (*Citrus paradisi* Macf) contendo sequências do CTV. As plantas, quando desafiadas com o CTV, apresentaram redução da replicação deste vírus. Plantas transgênicas de laranja doce expressando sequências derivadas do CTV, quando desafiadas com o vírus, mostraram-se infectadas, porém foi encontrada uma baixa titulação do vírus, com valores similares aos encontrados nas plantas não inoculadas, indicando que as plantas transgênicas apresentam algum nível de resistência à replicação do vírus (MUNIZ et al., 2012).

Além dos trabalhos de transformação genética de citros visando controlar doenças causadas por bactérias, vírus e fungos, a transformação genética visando o controle de insetos herbívoros ou vetores de fitopatógenos, através de RNA de interferência, é uma alternativa ao uso de inseticidas.

2.5 RNA de Interferência

Uma das grandes descobertas dos últimos anos foi a elucidação do mecanismo de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) no nematóide *Caenorhabditis elegans*, demonstrando que um RNA de dupla fita (dsRNA) atua como um precursor na rota que leva à degradação do RNA mensageiro homólogo ao dsRNA (FIRE et al., 1998). Os pesquisadores americanos Andrew Fire e Craig Mello, que elucidaram o mecanismo de RNAi, foram os ganhadores do Prêmio Nobel em Medicina em 2006.

O silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos envolvidos na repressão da expressão de determinado gene, através da inibição da transcrição ou tradução. O silenciamento gênico pode ocorrer por meio da inibição da transcrição (Silenciamento Gênico Transcricional - SGT), através de metilações na região do promotor, inibindo a transcrição, ou pela destruição do transcrito (Silenciamento Gênico Pós-Transcricional - SGPT) através de RNA de interferência (RNAi) (GORDON; WATERHOUSE, 2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008). Os mecanismos de Silenciamento Gênico Pós-Transcricional através de RNAi, basicamente são desencadeados por duas rotas, uma por pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e outra por microRNAs (miRNAs), sendo considerado que, os miRNAs são expressos a partir de genes endógenos, participando de processos de regulação gênica, enquanto que os siRNAs atuam como defensores da integridade do genoma em resposta à

entrada de ácidos nucléicos invasores, tais como vírus, elementos transponíveis e transgênicos (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). A maquinaria de silenciamento gênico é conservada na maioria dos organismos eucariontes (MEISTER; TUSCHL, 2004).

O mecanismo de RNAi é ativado por ribonucleases do tipo RNase III, conhecidas como *Dicer*, que clivam dsRNAs em siRNAs, com tamanho variando de 21 a 23 nucleotídeos. Os siRNAs são processados por uma helicase, e uma das fitas é incorporada ao complexo enzimático RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), onde uma proteína pertencente à família Argonata (Ago), que possui um domínio RNaseH, cliva o RNA mensageiro quando este se associa ao siRNA (MEISTER; TUSCHL, 2004; PRICE; GATEHOUSE, 2008). Esta clivagem do RNAm leva ao seu silenciamento, impedindo a sua tradução em um peptídeo.

O mecanismo de RNAi, utilizado como uma ferramenta biotecnológica, tem aberto novas possibilidades para o controle de pragas que atacam grandes culturas. Este mecanismo pode ser utilizado por meio da transformação genética, através da inserção de um transgene na forma de RNA dupla-fita, o qual deve ter, necessariamente, homologia à sequência do gene a ser silenciado. O uso de RNAi para o controle de insetos é uma alternativa tão promissora que alguns autores, referem-se ao RNAi como RNA inseticida (PRIDGEON et al., 2008).

Para a eficiente aplicação de RNAi, o inseto, ao internalizar o dsRNA através de alimentação, precisa absorver estes dsRNA do lúmen intestinal, para dentro das células intestinais, a fim de silenciar o gene alvo. Os mecanismos de absorção de dsRNA exógenos pelo sistema digestivo de insetos ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, estudos em *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* revelaram a existência de rotas envolvidas na absorção de dsRNAs, uma rota através de proteínas transmembranas de canal, e uma rota envolvendo endocitose.

SID-1 é uma proteína transmembrana, localizada na superfície celular, agindo como canais que permitem a entrada de dsRNAs nas células, em cooperação ou coordenação com a proteínas SID-2. A presença desta proteína foi confirmada no nematóide *C. elegans*, mas não em *D. melanogaster*, embora ortólogos de SID-1 tenham sido encontrados em diferentes ordens de insetos, incluindo Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Lepidóptera, e Hemíptera. Uma segunda rota para a absorção de dsRNAs, que inclusive foi descrita em *D. melanogaster*, envolve a absorção a partir de receptores que medeiam a endocitose (HUVENNE; SMAGGHE, 2010; KATOCH et al., 2013). O entendimento dos mecanismos moleculares de como os dsRNAs são exportados para outros tecidos dentro do inseto, é de extrema importância para consolidar a tecnologia do RNAi para o controle de insetos.

Nos anos recentes, várias pesquisas com RNAi têm sido realizadas visando a degradação de RNAs essenciais para a sobrevivência de insetos considerados pragas para a agricultura (GHANIM; KONTSEDALOV; CZOSNEK, 2007; MAO et al., 2007). *Plutella xylostella* é uma das principais pragas em Brassicaceas, principalmente por sua habilidade em desenvolver resistência a inseticidas. Esta habilidade está relacionada à detoxificação de inseticidas à base de permetrina, pela ação da citocromo P450. Bautista et al. (2009), ao alimentarem larvas de *P. xylostella* com o dsRNA da citocromo P450, observaram que as larvas tornaram-se suscetíveis à permetrina.

Embora os mecanismos utilizados para aplicação do dsRNA, como microinjeções, aplicações tópicas ou dietas artificiais, sejam importantes para a validação do gene a ser silenciando, somente a transformação genética de planta é realmente efetiva para o controle de pragas em condições de campo (MAO et al., 2007). Para a ativação do RNAi, a planta transformada via *A. tumefaciens* deve carregar vetores de expressão contendo sequências repetidas e invertidas do gene alvo do inseto, as quais quando transcritas formam RNA na forma de um *hairpin*, que são funcionalmente equivalentes a um dsRNA (GU; KNIPPLE, 2013).

Baum et al. (2007) demonstraram ser possível o silenciamento de genes importantes para a sobrevivência do coleóptero *Diabrotica virgifera virgifera*, praga que ataca a raiz de milho, por meio de transformação genética, através de RNAi. Plantas transgênicas de milho contendo o dsRNA homólogo ao gene da *V-ATPase A* foram submetidas ao ataque por *D. virgifera*, onde observou-se supressão da expressão da *V-ATPase A*, e diminuição dos danos causados nas raízes devido ao ataque de *D. virgifera*.

Em algodão, o lepidóptero *Helicoverpa armigera* é uma das pragas que mais causam prejuízos à cultura, e seu ataque à planta hospedeira é acentuado devido a sua capacidade de metabolizar o composto secundário gossipol, através da atividade detoxificadora da enzima citocromo P450. Baseado nestes fatos, Mao et al. (2007) desenvolveram o dsRNA da citocromo P450, e transformaram plantas de algodão com este dsRNA. Quando as larvas do lepidóptero se alimentaram nas plantas transgênicas de algodão, estas perderam a resistência ao gossipol, resultando em morte das larvas.

2.6 V-ATPases

V-ATPases ou ATPases vacuolar são complexos multienzimáticos altamente conservados, distribuídos entre diferentes organismos eucariontes, que funcionam como bombas de prótons dirigidas por ATP, participando da acidificação de organelas celulares e

transporte de prótons H^+ através de membranas plasmáticas (ALLAN et al., 2005; CIPRIANO et al., 2008).

Estes complexos enzimáticos estão presentes em vesículas sinápticas (contendo neurotransmissores), endossomos, vesículas de reserva nutricional, vesículas provenientes do complexo de Golgi e vesículas secretórias. Em lisossomos e no tonoplasto (membrana que envolve vacúolos), participam da acidificação destas organelas e, assim, ativam enzimas digestivas envolvidas com a degradação de macromoléculas (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006). As V-ATPases também são encontradas em membranas plasmáticas de variados tipos de células animais, onde participam da regulação do pH e transporte ativo secundário de íons através de membranas (WIECZOREK et al., 2009). A hidrólise de ATP fornece a energia necessária para o transporte ativo de H^+ , e o gradiente eletroquímico gerado dirige o transporte secundário de outros íons através de membranas plasmáticas (CIPRIANO et al., 2008).

V-ATPases apresentam múltiplas subunidades, organizadas em dois domínios: V_1 – localizado no citoplasma, o qual interage com ATP, ADP e P_i , e V_0 - complexo integral de membrana, que medeia o transporte de H^+ . O complexo V_1 é formado por 8 subunidades (A à H), apresentando a estequiometria $A_3B_3CDE_2FG_2H$, enquanto o complexo V_0 é formado pelas subunidade a, c, c', c'', de , com estequiometria $ac_4c'c''de$. O sítio catalítico para a hidrólise do ATP está presente na subunidade A do complexo V_1 (JEFFERIES; CIPRIANO; FORGAC, 2008; LEE et al., 2010).

Em insetos, as V-ATPases são encontradas nas membranas apicais de tecidos epiteliais, incluindo glândulas salivares, intestino médio e túbulos de Malpighi, onde participam da energização do transporte ativo secundário através destes epitélios (ALLAN et al., 2005). Na lagarta do tabaco (*Manduca sexta*), observou-se a presença da V-ATPase na membrana apical das células que revestem o intestino, conhecidas como células caliciformes, as quais apresentam alta concentração de íons K^+ . A secreção de K^+ é realizada pelas células caliciformes através de duas proteínas de transporte. A primeira é a V-ATPase, que secreta prótons no espaço luminal, criando um potencial de membrana positivo. A segunda é uma bomba eletrogênica do tipo antiporte ($K^+/2H^+$), que transporta dois prótons para dentro da célula caliciforme, para cada K^+ transportado para o lúmen intestinal. Dessa maneira, o potencial de membrana estabelecido pela V-ATPase dirige a secreção de K^+ (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006).

A estequiometria $K^+/2H^+$ torna o espaço luminal alcalino, e esta alcalinização pode estar envolvida com a degradação de metabólitos secundários, tais como taninos, os quais

bloqueiam a absorção de nutrientes em insetos (ZHUANG; LINSEY; HARVEY, 1999). Nota-se que as V-ATPases em células caliciformes de insetos têm com função principal a criação de um potencial elétrico transmembrana, e não a criação de um gradiente de pH (JEFFERIES; CIPRIANO; FORGAC, 2008).

Na glândula salivar de *Calliphora vicina* (Diptera), o estímulo para a produção e liberação de saliva mais ácida e rica em KCL depende de uma cascata de sinais que envolve aumento do AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) intracelular, induzida pela presença do neurotransmissor serotonina na hemolinfa. O aumento do AMPc ativa a V-ATPase presente nas células da glândula salivar, e a ativação da enzima resulta no bombeamento de H^+ para o lúmen da glândula, resultando em acidificação da saliva (SCHEWE; SCHMÄLZLIN; WALZ, 2008).

Além do trabalho realizado por Baum et al. (2007) com o silenciamento de *D. virgifera* através de dsRNA da V-ATPase A, outras pesquisas que visam o controle de insetos via RNAi de subunidades que compõem a V-ATPase têm sido realizadas. Li et al. (2011) alimentaram larvas de *Nilaparvata lugens* com dsRNA homólogo à subunidade E da V-ATPase. Análise da expressão gênica desta subunidade nas larvas revelou redução da transcrição do RNAm da subunidade E. Segundo Upadhyay et al. (2011) adultos da mosca branca (*Bemisia tabaci*) alimentados com dsRNA da subunidade A da V-ATPase apresentaram altas taxas de mortalidade, variando entre 70 a 97%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP. Os experimentos de alimentação em dieta artificial com insetos adultos de *D. citri* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, coordenado pelo Prof. Dr. Bryce W. Falk, na Universidade da Califórnia – Davis, Davis, Califórnia, EUA.

3.1 Construção gênica para transformação genética

A partir da similaridade entre as sequências de aminoácidos da *V-ATPase-A* de *Drosophila melanogaster* (CG3762, 614 aminoácidos), foram encontradas duas ESTs (Expressed Sequence Tags) de *Diaphorina citri* com alta similaridade, depositadas no banco de dados públicos – *GenBank* (National Center for Biotechnology Information - NCBI). A partir da EST FK254156.1, foi desenhado o par de *primers* para amplificar um fragmento de 206 pb correspondente à *DcVATPase-A* (*V-ATPase-A* de *D. citri*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos *primers* desenhados para amplificação do fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A*

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
<i>DcV-ATPase-A - Forward</i>	5' <u>GGTGACCAT</u> GGCTGATGAAGATAGGGAAG3'
<i>DcV-ATPase-A - Reverse</i>	5' <u>GAGCTCGGTACCC</u> GATGTTTCTTCGTACAC3'

O sítio de restrição das enzimas *Bst*EI (GGTGACC, destacado em vermelho) e *Nco*I (CCATGG, destacado em verde) foram adicionados ao *Forward primer* e os sítios de restrição para *Sac*I (GAGCTC, destacado em preto) e *Kpn*I (GGTACC, destacado em azul) foram adicionados ao *Reverse primer*

Insetos adultos de *D. citri* coletados na cidade de Matão – SP, foram submetidos a extração do DNA genômico, o qual foi submetido à PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O produto da reação de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo, seguido de visualização sob luz ultravioleta.

O fragmento obtido de 206 pb, após reação de amplificação, foi cortado do gel de agarose e purificado usando-se o kit ‘QIAEX II Gel Extraction’ (QIAGEN), seguido da clonagem no vetor pGEM®-T (Easy Vector Systems - Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.1.1 Construção do cassete de expressão

Para a obtenção do cassete de expressão, utilizou-se o plasmídeo pGEM modificado, contendo o promotor constitutivo *CaMV35S* (*Cauliflower mosaic virus 35S promoter*), um íntron do gene da quitinase de citros, e o terminador NOS (nopalina sintase) – pGEM/35S-íntron-NOST.

O vetor pGEM[®]-T previamente clonado com o fragmento senso da *DcV-ATPase-A*, entre os sítios de restrição *NcoI* e *KpnI*, e o vetor pGEM/35S-íntron-NOST (vetor de expressão) foram submetidos à reação de clivagem com as enzimas de restrição *NcoI* e *KpnI* por 2 horas, a temperatura de 37 °C.

Os produtos das reações de clivagem foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose, em que o fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A*, e o vetor pGEM/35S-íntron-NOST foram purificados com o kit ‘QIAEX II Gel Extraction’ (QIAGEN), seguido de reação de ligação. A reação de ligação consistiu de 6 µL do inserto (o fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A*), 2 µL do vetor (pGEM/35S-íntron-NOST), 1 µL de tampão 10X e 1 µL de T4 DNA ligase, por 16 horas, a 16 °C.

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* (DH5α) através de choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A reação de ligação foi misturada com 200 µL de células competentes, seguida de incubação por 30 minutos no gelo. Após o choque térmico a 42 °C, por 90 segundos, as células foram mantidas no gelo por 2 minutos e, em seguida, foram adicionados 1000 µL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 10% de glicerol) e incubadas a 37 °C, por 1 hora, a 150 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas a 13000 rpm, durante 1 minuto, e em seguida, ressuspensas em 100 µL de meio SOC, e plaqueadas em meio YEP sólido (10 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de NaCl e 15 g L⁻¹ de Agar bacteriológico), suplementado com 100 mg L⁻¹ de ampicilina. As placas foram incubadas por 16 horas, a 37 °C.

Para a confirmação da presença do inserto no vetor pGEM modificado, colônias de *E. coli* transformadas foram escolhidas aleatoriamente para análise através de PCR, utilizando os *primers* para o fragmento da *DcV-ATPase-A* (Tabela 1). As colônias PCR positivas foram submetidas à reação de extração do plasmídeo, por meio do kit ‘Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems’ (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, seguida de

clivagem com as enzimas de restrição *NcoI* e *KpnI*, onde após corrida em gel de agarose, visualizou-se o fragmente do 206 pb da *DcV-ATPase-A*.

Para a clonagem do fragmento *DcV-ATPase-A* no sentido antisenso, este foi ligado entre os sítios de restrição das enzimas *SacI* e *BstEII* no vetor pGEM/35S-senso-íntron-NOST. A reação de clivagem do vetor pGEM/35S-senso-íntron-NOST foi realizada utilizando as enzimas de restrição *SacI* e *BstEII*. As amostras contendo o vetor foram primeiramente digeridas com a enzima *SacI* durante 1 hora, a 37 °C, e em seguida foi adicionada a enzima *BstEII* às amostras, a 60 °C, por 1 hora. Ao final da reação de clivagem, as amostras foram aplicadas em gel de agarose. O fragmento liberado pela reação de clivagem com as enzimas *SacI* e *BstEII* (inserto), juntamente com o vetor pGEM/35S-senso-íntron-NOST foram cortados do gel de agarose e purificados por meio do kit 'QIAEX II Gel Extraction' (QIAGEN), seguido de reação de ligação.

A reação de ligação foi utilizada para a transformação de células de *E. coli* competentes, por meio de choque térmico, como já descrito anteriormente. Para a confirmação da presença do inserto, realizou-se a extração do plasmídeo, seguido de clivagem com as enzimas *SacI* e *BstEII* e visualização em gel de agarose. A Figura 1 representa o cassete de expressão *hairpin/DcV-ATPase-A*.

Figura 1 - Esquema do cassete de expressão *hairpin/DcV-ATPase-A*, contendo o promotor 35S, o íntron, o terminador (NOS-T) e os sítios de restrição onde foram clonados os fragmentos do gene da *Dc-V-ATPase-A* nos sentidos senso e antisenso

3.1.2 Construção do vetor de expressão

O cassete de expressão contendo o fragmento da *DcV-ATPase-A* no sentido senso e antisenso (Figura 1) foi inserido no vetor binário pCambia 2201 (Cambia G0PO Box 3200, Camberra ACT 2601, Austrália). O plasmídeo pCambia 2201 contém o gene de seleção *nptII*, que confere resistência à canamicina.

O vetor contendo o cassete de expressão (pGEM/35S-senso-íntron-antisenso-NOST) e o vetor binário pCambia 2201 foram clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BstEII* durante 1 hora, em banho-maria a 37 °C. As etapas seguintes de purificação e ligação foram realizadas conforme descrito no item 3.1.1. A transformação das células de *E. coli* com o produto da reação de ligação foi realizada por eletroporação, de acordo com Sambrook e Russell (2001).

As colônias isoladas foram analisadas por PCR, e o produto de PCR obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose para visualização do fragmento da *DcV-ATPase-A*. Em seguida, realizou-se extração do plasmídeo, o qual foi submetido à reação de clivagem com as enzimas *EcoRI* e *BstEII*, obtendo-se um fragmento de aproximadamente 1400 pb, e com a enzima *NcoI*, obtendo-se dois fragmentos, de aproximadamente 2400 pb e 800 pb. Minipreps das células de *E. coli* contendo o vetor pCambia 2201, com a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*, foram analisadas por sequenciamento, em sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

O vetor pCambia 2201, contendo a construção gênica (Figura 2), foi introduzido em células competentes de *A. tumefaciens*, estirpe EHA 105, pelo método de choque térmico. Após a transformação das colônias realizou-se miniprep seguida de clivagem com as enzima *NcoI*, liberando os fragmentos com os tamanhos esperados, e assim confirmando a presença do vetor de expressão pCambia 2201 *hairpin/DcV-ATPase-A* em *A. tumefaciens*. As linhagens de *A. tumefaciens* contendo a construção gênica foram cultivadas em meio de cultura YEP líquido e conservadas em freezer a -80 °C, em solução contendo glicerol 50%.

Figura 2 - Construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* no vetor pCambia 2201, indicando o sítio de inserção da construção gênica após reação de clivagem com as enzimas *EcoRI* e *BstEII*

3.2 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.1 Fonte de explantes

Sementes de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) das cultivares ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, extraídas de frutos maduros foram utilizadas como fonte de material vegetal para produção de explantes. O tegumento externo das sementes foi retirado, seguido de desinfestação, que consistiu em imersão em álcool 70% durante 2 minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,25%, durante 15 minutos, e tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As sementes foram incubadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel, com pH ajustado para 5,8. A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave, por 20 minutos, a 121 °C e 1,5 atm de pressão.

As sementes introduzidas *in vitro* foram incubadas na ausência de luz, a 27 ± 2 °C para germinação e alongamento do epicótilo, durante um período aproximado de 30 dias. Após o processo de germinação e alongamento do epicótilo, as plântulas foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas, durante 20 dias. Após este período, o epicótilo das plântulas foi repicado em segmentos de tamanho aproximado de 1 cm, os quais foram utilizados como explantes para os experimentos de transformação genética.

Tendo em vista a recalcitrância de laranja ‘Pêra’, em experimentos de transformação genética (CARDOSO et al., 2010), foram utilizados, além de segmentos de epicótilo, segmentos de hipocótilo associado ao cotilédone, como fonte de explantes. As sementes de laranja ‘Pêra’ foram submetidas ao processo de desinfestação, e inoculadas em frascos tipo magenta (6,5 x 6,5 x 10 cm), contendo 50 mL de meio MS, nas mesmas condições utilizadas para as sementes germinadas em tubos de ensaio. Foram introduzidas 10 sementes por frasco, as quais foram mantidas na ausência de luz, a 27 °C, por 10 dias, período no qual ocorreu a germinação. Para o preparo dos explantes, o excesso de raiz foi removido, permanecendo somente parte da radícula, os cotilédones foram separados, o embrião removido, e o hipocótilo cortado em sentido longitudinal. Cada parte do corte permaneceu em contato com um dos cotilédones, e estes foram cortados em sentido transversal.

3.2.2 Cultivo de *A. tumefaciens* para os experimentos de transformação genética

Em cada experimento de transformação genética, a cultura permanente de *A. tumefaciens* contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* mantida a -80 °C foi

plaqueada em meio YEP sólido contendo os antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (50 mg L^{-1}) e incubada a 28°C , por 3 dias. Após o crescimento das células de *A. tumefaciens*, os inóculos foram preparados a partir de uma única colônia, a qual foi selecionada e transferida para meio YEP líquido, contendo os mesmos antibióticos, durante 16 h, sob agitação a 180 rpm e temperatura de 28°C .

A absorbância da suspensão bacteriana foi determinada em espectrofotômetro a $\lambda = 600 \text{ nm}$, e ao atingir 0,5 de absorbância, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4800 rpm durante 15 minutos, a 15°C . As células precipitadas foram ressuspensas em meio MS líquido, em volume adequado para obter uma concentração bacteriana de $5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$.

3.2.3 Co-cultivo dos explantes com *A. tumefaciens*

Os segmentos de epicótilo ou hipocótilo associado ao cotilédone, previamente repicados, foram incubados em placas de Petri ($100 \times 15 \text{ mm}$) contendo a suspensão bacteriana, durante 15 minutos. Em seguida, os explantes foram dispostos em papel toalha estéril para remover o excesso de suspensão bacteriana. Os explantes foram incubados em placas de Petri contendo meio de cultura para co-cultivo com *A. tumefaciens*. O meio de cultura foi composto de 25 mL de meio MT sólido (MURASHIGE; TUCKER, 1969) acrescido $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e 30 g L^{-1} de sacarose, por 48 horas a 24°C , na ausência de luz.

3.2.4 Seleção e regeneração de gemas adventícias

Ao final do período de co-cultivo com *A. tumefaciens*, os explantes foram transferidos para meio de seleção e regeneração das gemas adventícias, constituído por meio MT suplementado com BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), sacarose (30 g L^{-1}), canamicina (100 mg L^{-1}) para seleção das células transformadas, e cefotaxima sódica (500 mg L^{-1}), para controle do crescimento de *A. tumefaciens*. Os explantes foram incubados em BOD, a 28°C , na ausência de luz, por 30 a 45 dias. A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para novo meio de seleção. As gemas adventícias desenvolvidas foram transferidas para sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.5 Enxertia *in vitro* e aclimatização

As gemas adventícias regeneradas com tamanho superior a 0,8 cm de comprimento foram enxertadas *in vitro*, sobre plântulas de citrange ‘Carrizo’, também germinadas *in vitro*. Para a enxertia, as plântulas de citrange ‘Carrizo’ tiveram a gema apical, os cotilédones e o

excesso de raiz removidos. As gemas adventícias regeneradas a partir dos experimentos de transformação genética tiveram a extremidade cortada em bisel, para auxiliar no encaixe na região apical superior do porta-enxerto. Ao final da enxertia, o material foi transferido para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio MS sólido, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), e mantido em sala de crescimento, nas mesmas condições já citadas no item anterior.

Os brotos enxertados que apresentaram pelo menos dois pares de folhas, e tamanho aproximado de 2 cm de comprimento, foram removidos dos tubos de ensaio, as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do excesso do meio de cultura e, em seguida, transferidos para vasos plásticos (0,5 L de capacidade) contendo substrato Multiplant 1075 (Terra do Paraíso) previamente autoclavado. Após o transplântio, foi adicionado aproximadamente 0,5 g de fertilizante de liberação lenta, 19-06-10 Osmocote (Scotts), sobre o substrato em cada vaso.

As plantas recém transplantadas foram recobertas com sacos plásticos para manutenção de alta umidade relativa. O processo de aclimatização iniciou-se após uma semana do transplântio, e consistiu na remoção da cobertura plástica por um período aproximado de 15 minutos, ou até ser observada murcha das folhas. Este processo foi repetido todos os dias, por aproximadamente 30 dias. A cada dia, o período de aclimatização (sem cobertura plástica) aumentou gradualmente. As plantas foram consideradas aclimatizadas quando não apresentaram murchamento das folhas após um período de 8 horas sem o uso da cobertura plástica. Ao final da aclimatização, pequenos segmentos de folhas foram utilizados para amostragem e confirmação da transgenia por análise de PCR, utilizando o par de *primers* descrito na Tabela 1. As plantas com a transgenia confirmada permaneceram em sala de crescimento até atingirem condições fisiológicas para serem transferidas para casa de vegetação, onde foram transplantadas para vasos com 5 L de capacidade.

3.3 Análises moleculares

3.3.1 Confirmação da transgenia por PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para detecção do transgene nas plantas regeneradas. O DNA foi obtido de folhas jovens, através do método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). O par de *primers* descrito na Tabela 1 foi usado para amplificação do fragmento da *DcV-ATPase-A*. As análises de PCR foram realizadas em termociclador, com a seguinte programação: 1 ciclo de 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C, e por último, 1 ciclo de 4 minutos a 72 °C.

Os produtos da reação de amplificação foram separados por eletroforese, aplicando-se as amostras em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e, posteriormente, visualizado e fotografado em luz ultravioleta, com o auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

3.3.2 Análise de Southern blot

A análise de Southern blot foi realizada para confirmar a inserção do transgene nas plantas obtidas, bem como o número de cópias inseridas no genoma das plantas. Folhas recém expandidas coletadas das plantas mantidas em casa de vegetação foram utilizadas para as análises de Southern blot. Para a obtenção do DNA, 1400 mg de folhas recém coletadas foram maceradas em almofariz, utilizando nitrogênio líquido. O macerado foi submetido à extração de DNA de acordo com o método CTAB, e ao final da extração, adicionou-se RNase concentrada, durante um período de 16 horas a temperatura ambiente.

Ao final desta fase, o DNA foi submetido a uma segunda extração, desta vez utilizando fenol, seguida de purificação utilizando clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com acetato de amônio e álcool absoluto, e ressuspensionado em água miliQ, acrescido de RNase, para degradação de eventuais contaminações por RNA.

O DNA total foi quantificado por fluorimetria, utilizando-se o aparelho Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) e o reagente QuantiT™ dsDNA BR assay kit, conforme instruções do fabricante. Um total de 30 µg do DNA total foi submetido à reação de clivagem utilizando 300 U da enzima *EcoRI*, por 16 horas, a 37 °C. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de amônio e álcool absoluto, ressuspensionado em água MiliQ e, então, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, a 24 volts, por 16 horas. Ao final da separação dos fragmentos por meio da eletroforese, o gel foi submetido à lavagem em tampões apropriados de acordo com o protocolo de Southern blot (SOUTHERN, 2006) e, em seguida, transferido para membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences). A membrana foi fixada a 80 °C, por duas horas.

A sonda foi produzida utilizando o plasmídeo pCAMBIA 2201 contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*, a partir de PCR, onde o produto de PCR foi aplicado em gel de agarose, seguida de purificação do fragmento amplificado, utilizando-se o kit “QIAEX® II Gel Extraction” (Qiagen). Em seguida, o fragmento foi submetido à marcação com o kit “AlkPhos Direct Labelling Reagents” (Amersham Biosciences).

A hibridização da membrana com a sonda foi realizada em tampão de hibridização a 62 °C, por cerca de 16 horas, sob rotação, e ao final, a reação de detecção foi realizada

utilizando o kit “CDP-StarTM Detection Reagent” (Amersham Biosciences). O excesso do agente de detecção foi removido por evaporação, e a membrana, envolvida em filme plástico, foi colocada no cassete de revelação (Amersham Lifescience) em contato com chapa fotográfica (50 mm), seguida de revelação da imagem.

3.3.3 Análise de siRNA blot

O RNA extraído a partir de folhas jovens de 17 plantas de laranja ‘Valência’, com a transgenia já confirmada através de PCR e Southern blot, foi submetido à análise de siRNA blot, para a detecção de pequenos RNAs interferentes, com o intuito de confirmar se a maquinaria de silenciamento gênico estava ativa nas plantas transgênicas obtidas, e se estas estavam produzindo os siRNAs a partir da construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*.

Folhas jovens recém expandidas foram submetidas à extração do RNA total utilizando TRizol[®] (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Para maximizar a obtenção dos siRNAs, tendo em vista o pequeno tamanho destas moléculas, ao final da extração foi adicionado polietileno glicol de alta densidade (PEG 8000) 50% e cloreto de sódio (NaCl₂) 5 M ao RNA ressuspendido, para a separação do RNA total e siRNA, respectivamente, precipitado e sobrenadante. O sobrenadante obtido foi submetido à precipitação com etanol absoluto, centrifugado e ressuspendido em água DEPC (Dietilpirocarbonato). As amostras foram quantificadas em NanoDrop. Como controle negativo, foi utilizado RNA proveniente de uma planta transgênica contendo o vetor vazio (pCAMBIA 2201).

As amostras de siRNA (1 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida) (acrilamida 15%, ureia 8M), contendo o marcador de microRNA (New England BioLabs) e, em seguida, transferidas para membrana de nylon HybondTM-NX (Amersham Biosciences). A membrana foi pré-hibridizada em 25 mL de tampão de hibridização Ultraspeed[®] (Ambion), adicionado de solução de Denhardt's 5x, SDS 7% e 100 µg mL⁻¹ de espermatozoides de salmão. A reação foi incubada a 65 °C, por 3 horas.

A sonda radioativa foi produzida a partir de 1 µg do fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A*, obtido a partir do produto da PCR, previamente purificado com o kit QIAquick[®] (Qiagen). O fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A* foi utilizado para a reação de transcrição *in vitro* com o kit MAXIScript T7 (Ambion) e marcado com ³²P-dUTP. Para a produção de pequenos RNAs, o transcrito radioativo foi fragmentado em solução de 120 mM de Na₂CO₃: 80 mM de NaHCO₃, a 65 °C, por 30 minutos. A sonda fragmentada foi adicionada à membrana, e a hibridização ocorreu a 42 °C, por 16 horas.

Ao final da hibridização, a membrana foi submetida à dupla lavagem com a solução tampão NorthernMax[®] a 42 °C, por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram envolvidas em filme plástico, colocadas no cassete em contato com chapa de raio-X e mantidas a -80 °C por uma semana. Após esse período, a membrana foi revelada.

3.4 Experimentos de alimentação com insetos adultos de *D. citri* em dieta artificial

3.4.1 Clonagem dos fragmentos da *DcV-ATPase-A* e GFP com sítios de ligação para T7 RNA polimerase

Para a validação da construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*, utilizada nos experimentos de transformação genética, em induzir silenciamento gênico do gene *DcV-ATPase-A* em *D. citri* por RNAi, o fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A* foi utilizado para a produção de dsRNA, utilizado em dietas artificiais, a partir das quais os insetos foram alimentados. Como tratamento controle, um fragmento de 321 pb do GFP (Green Fluorescent Protein) também foi sintetizado como dsRNA. Em ambos os pares de *primers*, foi adicionada a sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase, no sentido 5' (Tabela 2). A adição da sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase, no sentido senso e antisenso dos *primers*, geram produtos de PCR com sítios de ligação para T7 RNA polimerase, enzima presente nos kits para a síntese de dsRNA através de transcrição *in vitro*.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para produção de dsRNA da *DcV-ATPase-A* e GFP

<i>Primers</i>	Sequência
T7-VATPASEA-F	5' <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CTGATGAAGATAGGGAAGGTT 3'*
T7-VATPASEA-R	5' <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ATGTTTCTTCGTACACTTGAAT 3'
T7-GFP-F	5' <u>CTAATACGACTCACTATAGG</u> GCGGCC 3'
T7-GFP-R	5' <u>CTAATACGACTCACTATAGG</u> GCGGCC 3'

*Região em destaque corresponde à sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase

O plasmídeo purificado pCAMBIA 2201, contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*, foi submetido à PCR utilizando os pares de *primers* descritos na Tabela 2. O produto de PCR foi purificado com o kit QIAquick[®] (Ambion), e inserido no vetor pGEM[®]-T Easy, através de reação de ligação, que consistiu em 7 µL do inserto (fragmento da *DcV-ATPase-A*, contendo a sequência do promotor da T7 RNA polimerase), 1 µL do pGEM[®]-T Easy, 1 µL de tampão 10 x, e 1 µL T4 DNA Ligase, a 14 °C, por 16 horas.

A reação de ligação foi utilizada para a transformação de células eletrocompetentes de *E. coli*, e plaqueadas em meio LB contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina, 40 µL de X-Gal e 40 µL de IPTG. As placas foram incubadas a 37 °C, por 16 horas. Colônias de *E. coli* com coloração branca foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina, a 37 °C, por 16 horas, sob agitação. Em seguida, as culturas desenvolvidas em meio líquido foram purificadas com o kit QIAprep[®] (Qiagen), e o plasmídeo obtido foi submetido à análise de PCR e reação de clivagem com *Eco*R1 para confirmação da integração do produto de ligação pGEM[®]-T Easy + *DcV-ATPase-A* (Figura 3).

Figura 3 - Fragmentos amplificados por PCR do GFP (321 pb) e *DcV-ATPase-A* (206 pb), com sítios para o promotor da T7 RNA polimerase (a). Produto de reação de clivagem do pGEM[®]-T Easy + GFP (700 pb) e pGEM[®]-T Easy + *DcV-ATPase-A* (206 pb) (b). M: 1 kb ladder plus (Invitrogen[™])

Colônias de *E. coli* clonadas com o pGEM[®]-T Easy contendo um fragmento de 700 pb do GFP foram utilizadas como amostra para análise de PCR (Figura 3a), utilizando os *primers* descritos na Tabela 2, os quais amplificam um fragmento de 321 pb. O pGEM[®]-T Easy contendo o fragmento de 700 pb do GFP também foi submetido à reação de clivagem com *Eco*R1 (Figura 3b).

3.4.2 Síntese de dsRNA e siRNA da *DcV-ATPase-A* e do GFP

Os plasmídeos purificados, pGEM[®]-T Easy + *DcV-ATPase-A* e pGEM[®]-T Easy + GFP, foram submetidos à PCR com os *primers* descritos na Tabela 2. O produto de PCR de cada gene foi purificado com o kit QIAquick[®] (Ambion) e utilizado para a síntese de dsRNA, o qual foi sintetizado através de transcrição *in vitro* utilizando o kit T7 RiboMAX[™] (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade dos fragmentos obtidos foi verificada em gel de agarose (Figura 4), e a concentração, determinada por NanoDrop.

Figura 4 - Fragmentos de dsRNA do GFP (coluna 1) e *DcV-ATPase-A* (coluna 2) obtidos através de reação de transcrição *in vitro*. M: RNA Ladder (New England Biolabs)

Nos experimentos de alimentação com insetos adultos de *D. citri* utilizando siRNA em vez de dsRNA, estes foram sintetizados a partir dos dsRNAs da *DcV-ATPase-A* e do GFP. Os dsRNAs foram digeridos com a enzima ShortCut® RNase III (New England Biolabs), a qual é reconhecida por sua atividade em clivar dsRNAs em fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídeos (siRNAs).

A reação com a enzima, consistiu em clivagem de 10 ug de dsRNA da *DcV-ATPase-A* ou GFP, a 37 °C, por 30 minutos. Em seguida, 10 µL de EDTA 10 X foram adicionados para interromper a reação. A precipitação dos siRNAs em álcool 70% foi realizada logo após. Assim como na síntese dos dsRNAs, os siRNAs tiveram a qualidade verificada em gel de poliacrilamida (acrilamida 15%, ureia 8M), e a concentração determinada por NanoDrop.

3.4.3 Experimentos de alimentação com insetos adultos de *D. citri* com dsRNA ou siRNA

Insetos adultos de *D. citri*, crescidos em plantas cítricas e mantidos em gaiolas, foram utilizados para a realização dos experimentos de alimentação, utilizando dieta artificial contendo solução de sacarose 15%. Com auxílio de um aspirador, os insetos foram coletados em tubos de acrílico, os quais foram selados com uma camada de parafilme, onde 100 µL de solução de sacarose, contendo os dsRNAs ou siRNAs foram aplicados na superfície desta membrana. Em seguida, uma segunda camada de parafilme foi colocada sobre a solução de sacarose, formando uma dupla membrana, onde os insetos se alimentaram.

Os experimentos de alimentação em dieta artificial contendo dsRNA foram conduzidos com os seguintes tratamentos: dois tipos de dsRNAs: *DcV-ATPase-A* (gene alvo) e GFP (controle negativo) x duas concentrações: 100 e 500 ng de dsRNA para cada µL de solução de sacarose, mais o tratamento formado somente de solução de sacarose, totalizando cinco tratamentos. Cada tratamento foi constituído por três repetições, e cada repetição,

formada por um tubo de acrílico contendo 10 insetos adultos. O experimento foi repetido três vezes.

Os experimentos de alimentação contendo siRNA foram formados pelos seguintes tratamentos: dois tipos de siRNAs: *DcV-ATPase-A* (gene alvo) e GFP (controle negativo) x duas concentrações: 20 e 100 ng de siRNA para cada μL de solução de sacarose, totalizando quatro tratamentos. Cada tratamento foi constituído por três repetições, e cada repetição, formada por um tubo de acrílico contendo 10 insetos adultos. O experimento foi repetido três vezes.

Todos os experimentos foram mantidos em temperatura ambiente, sob fotoperíodo de 14 horas. Ao final de quatro dias para os experimentos com dsRNA, e cinco dias para os experimentos com siRNA, os insetos que permaneceram vivos foram individualmente coletados, e submetidos a extração do RNA total, utilizando TRizol[®], de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA obtido foi quantificado em NanoDrop, e 500 ng μL^{-1} foram utilizadas para a síntese do cDNA, o qual foi sintetizado com o kit iScript[™] (Bio-Rad), e utilizados para análises de expressão gênica através de RT-qPCR.

3.4.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Os efeitos de dsRNA e de siRNA nos níveis de expressão do RNAm da *DcV-ATPase-A* de *D. citri* foram quantificados através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), pelo método TaqMan[®]. A *Ubiquitina* de *D. citri* foi utilizada como gene de referência (número de acesso: DQ673413, 361 pb).

Os *primers* descritos na Tabela 3 foram desenhados para amplificar um fragmento de 300 pb da *DcV-ATPase-A* e um fragmento de 289 pb da *Ubiquitina* de *D. citri*. Dentro da região amplificada pelos *primers*, foram desenhados os *primers* e sondas para as reações de RT-qPCR (Figuras 5 e 6). O fragmento de 300 pb da *DcV-ATPase-A* amplificado pelos *primers* descritos na Tabela 3, e os *primers* para RT-qPCR, localizam-se fora da região do fragmento utilizado para os experimentos de alimentação artificial. Esta medida foi tomada para evitar que os *primers* de RT-qPCR se anelassem ao dsRNA absorvido pelos insetos durante o período de alimentação, o que poderia interferir nos resultados de expressão gênica.

Tabela 3 - Sequência dos pares de *primers* da *DcV-ATPase-A* e *Ubiquitina* de *D. citri*, que flanqueiam a região de RT-qPCR

<i>Primers</i>	Sequência	Amplicon
<i>DcV-ATPase-F</i>	5' <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AGCTGAGGCTCGTCTGGTT 3' [*]	300 pb
<i>DcV-ATPase-R</i>	5' TGATTTCTCCCACCAGTTCA 3'	
<i>Ubiquitina-F</i>	5' TCAAAACTTTGACAGGGAAGA 3'	289 pb
<i>Ubiquitina-R</i>	5' CGACAGATCATCTTTTCACAGTT 3'	

*A região do *primer Forward* da *DcV-ATPase-A* destacada, corresponde à sequência do promotor da enzima T7 RNA polimerase. Dessa forma, o produto de PCR contendo o sítio de ligação para a T7 RNA polimerase foi utilizado para a transcrição *in vitro*, e o transcrito utilizado para síntese de cDNA. O cDNA foi utilizado para determinar a eficiência de reação dos *primers* de RT-qPCR

O produto amplificado pelo par de *primers* descrito na Tabela 3, para *DcV-ATPase-A*, foi utilizado para determinar a curva de eficiência dos *primers* para RT-qPCR. Para isso, o produto de PCR de 300 pb (Figura 7a), foi purificado com o kit QIAprep® (Ambion), e submetido à reação de transcrição *in vitro* (MEGAscript - Ambion). O transcrito, previamente quantificado, foi utilizado para a obtenção de seis diluições seriadas, iniciando com 50 ng L⁻¹, as quais foram usadas para síntese de cDNA (iScript™, Bio-Rad). O cDNA produzido foi utilizado para determinar a curva de eficiência da reação, utilizando os *primers* de RT-qPCR (Tabela 4).

1	CCTGAAGCTGAGGCTCGTCTGGTTTCGTTCAATTATTGTGTTTAAATTTTAAATAAAGTGATCTTTTAAACCCAGAAGC	80
1	GGACTTCGACTCCGAGCAGACCAAAGCAAGTTAATAACACAAATTTAAATTTTATTCACATAGAAAAATGGGTCTTCG	80
81	TATCTTTTAAATCCTACAGAAGAAGAACCATCAGAATTCATCCAGGTAACACACAAAATCAACATGTCAACTGCATTA	160
81	ATAGAAAATTTAGGATGTCTTCTTCTTGGTAGTCTTAAGGTAGGTCCATTGGTGTGTTTTAGTTGTACAGTTGACGTAAT	160
161	GGAAAAATGGCTGATGAAGATAGGGAAGGTTTGGGTTTGTGTATGCCGTCTCAGGTCCTGTGGTAACGCAGAAAA	240
161	CCTTTTACCAGTACTTCTATCCCTTCCTTCCAAACCCAAACACATACGGCAGAGTCCAGGACACCATTGACGTCTTTT	240
241	AATGTCAGGATCTGCTATGTACGAACCTGGTACGAGTGGGATACTTTGAACCTGGTGGGAGAAATCATCAGATTAGAGGTG	320
241	TTACAGTCCTAGACGATACATGCTTGACCATGCTCACCCATGAAACTTGACCACCTCTTTAGTAGTCTAATCTCCAC	320
321	ACATGGCTACTATTCAAGTGTACGAAGAAACATCGGGTGTGACTGTCGGTGACCCCTGTGCTAAGGACAGGCAACCCTTA	400
321	TGTACCGATGATAAGTTCACATGCTTCTTTGTAGCCCACTGACAGCCACTGGGACACGATTCTGTCCGTTTGGGAAT	400
401	TCTGTTGAGCTTGGTCTGGTATCCTGGGAAGTATATTGTATGGTATTTCAGCGTCCATTGAAAGACATCAATGAGTTATC	480
401	AGACAACTCGAACCCAGGACCATAGGACCCCTTCATATAAACTACCATAAGTCGCAGGTAACCTTCTGTAGTTACTCAATAG	480
481	TCAGAGCATTACATCCCCAAGGGTGTCAACATTCCTGCATTGAACAGAGATGTTAGTTGGGAGTTCAACCCAATGAATC	560
481	AGTCTCGTAAATGTAGGGTTCACAGTTGTAAGGACGTAACCTGTCTCTACAATCAACCCCTCAAGTTGGGTACTTAG	560
561	TGAAGATTGGAAGTCATATCACTGGTGGAGATCAGTATGGTCTTGTTCATGAGAATACACTGTCAAGCACAAGATGATC	640
561	ACTTCTAACCTTCAGTATAGTGACCACCTCTAGTCATACCAGAACAAGTACTCTTATGTGAACAGTTCGTGTTCTACTAG	640
641	ATGCCCCCTAAAGCTAAGGGTACTGTCACTTACATTGCACCTGCTGGTAACATAAAGTTGATGAAGTTGTTCTTGAAAC	720
641	TACGGGGGATTCGATTCCCATGACAGTGAATGTAACGTGGACGACCATTGATATTTCAACTACTTCAACAAGAACTTTG	720
721	TGAATTTGATGGAGAGAAGAGTAAATACACCATGGTTCAAGTATGGCCTGTCCGTGAGCCCGCCCTGTACAGAAAAAGC	800
721	ACTTAACTACCTCTCTTCTCATTTATGTGGTACCAAGTTCATACCGGACAGGCAGTCGGGGCGGGACAGTGTCTTTTCG	800
801	TACCTGCTAACTATCCTCTATTGACAGGTCAAAGA	835
801	ATGGACGATTGATAGGAGATAACTGTCCAGTTTCT	835

Figura 5 - Sequência completa do cDNA da *DcVATPase-A* depositada no *GenBank*, número de acesso FK254156.1. Localização da sequência dos *primers* utilizados para a síntese de dsRNA (destacado em verde), *primers* que flanqueiam a região de RT-qPCR (destacado em vermelho), e *primers* para RT-qPCR (destacado em azul). As três sequências destacadas em azul correspondem a *primer forward*, sonda e *primer reverse*, respectivamente

1	ATGCAGATCTTTGTCAAACCTTTGACAGGGAAGACCATCACCCCTTGAGGTCGAGCCAGT	60
61	GACACCATCGAGAATGTCAAAGCCAAATCCAGGACAAGGAAGGTATCCCTCCCGATCAA	120
121	CAGAGATTGATCTTTGCCGGCAAACAGTTGGAAGATGGAAGAACTCTGTGCACTACAAT	180
181	ATTCAAAAGAATCCACCCCTTCACTTGGTTCTTCGTCTGAGAGGAGGTGTCATTGAACCC	240
241	ACACTGAAGAGCTTGGCCGAGAAGTACAACCTGTGAAAAGATGATCTGTGCGCAAGTGTTAC	300
301	GCTAGACTTCACCCCGTGCCACCACTGCCGTAAGAAGAAGTGTGGACACACCAACAAC	360
361	ATCCGCCCCAAGAAGAAGGTGAAGAAGTAG	

Figura 6 - Sequência completa do cDNA da *Ubiquitina* de *D. citri* depositada no *GenBank*, número de acesso DQ673413. Localização da sequência dos *primers* que flanqueiam a região de RT-qPCR (destacado em verde), e *primers* para RT-qPCR (destacado em azul). As sequências destacadas em azul correspondem a *primer forward*, sonda e *primer reverse*, respectivamente

Figura 7 - Fragmentos amplificados através de PCR da *DcV-ATPase-A* (a), e RT-PCR da *Ubiquitina* (b). M: 1 kb ladder plus (Invitrogen™)

O par de *primers* descrito na Tabela 3 para a *Ubiquitina* foi desenhado para amplificar um fragmento de 289 pb, através de RT-PCR (Transcriptase Reversa-PCR), utilizando RNA total de *D. citri* como amostra. O produto de RT-PCR da *Ubiquitina* (Figura 7b) foi purificado do gel agarose com o kit MinElute® (Qiagen), quantificado, e clonado no pGEM®-T Easy, seguido de eletroporação em células eletrocompetentes de *E. coli*. O plasmídeo pGEM®-T Easy + *Ubiquitina* foi linearizado com a enzima *Bsr*GI, seguido de transcrição *in vitro* (MEGAscript - Ambion). O transcrito, previamente quantificado, foi utilizado para a obtenção de seis diluições seriadas, iniciando com 50 ng L⁻¹, as quais foram usadas para síntese de cDNA (iScript™, Bio-Rad). O cDNA produzido foi utilizado para determinar a curva de eficiência da reação, utilizando os *primers* de qRT-PCR (Tabela 4). Na Figura 6, está a sequência completa do cDNA da *Ubiquitina* de *D. citri*, demonstrando a sequência dos *primers* que flanqueiam a região de RT-qPCR, e a sequência dos *primers* de RT-qPCR.

Tabela 4 - *Primers* e sondas utilizadas para as análises de RT-qPCR

<i>Primers</i>	Sequência	Amplicon
<i>qPCR_DcV-ATPase-A_fwd</i>	5'GCTCGTCTGGTTTCGTTCA 3'	
<i>qPCR_DcV-ATPase-A_rvs</i>	5'TGCAGTTGACATGTTGATTTTG 3'	165 pb
<i>qPCR_DcV-ATPase-A_sonda</i>	5'CCATCAGAATTCCATCCAGGTAACCA 3'	
<i>Ubiquitina_fwd</i>	5'GAGGTCGAGGCCAGTGACA 3'	
<i>Ubiquitina_rvs</i>	5'GATCGGGAGGGATACCTTCCT 3'	165 pb
<i>Ubiquitina_sonda</i>	5'ATCGAGAATGTCAAAGCCAAAATCCAGGAC 3'	

As análises de RT-qPCR foram compostas por 1 µL do cDNA proveniente dos insetos submetidos aos experimentos de alimentação, 10 µL de iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad), 0,18 µL de cada par de *primers* de ambos os genes, 0,05 µL de sonda de ambas as sondas e 8,59 µL de água, totalizando 20 µL.

As amplificações foram feitas em triplicatas para cada inseto, e amostras controle sem cDNA foram feitas para verificar possíveis contaminações dos reagentes utilizados. As análises de RT-qPCR foram realizadas no real time CFX96 Touch™ (Bio-Rad), nas seguintes condições de amplificação: ciclo inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento e extensão a 59 °C por 30 segundos. Os resultados de amplificação foram visualizados no Software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad). A quantificação da expressão relativa do RNAm da *DcV-ATPase-A* foi determinada através do método $2^{-\Delta\Delta C_q}$, utilizando o Software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad), para análise dos dados.

Para amostras de cada inseto foi detectado o valor C_q tanto para o gene alvo (*DcV-ATPase-A*), quanto para o gene de referência (*Ubiquitina*). Para calcular o ΔC_q individual de cada amostra (inseto), o valor C_q (Ciclo de quantificação) do gene de referência (*Ubiquitina*) foi subtraído pelo valor C_q do gene alvo (*DcV-ATPase-A*), e para o cálculo do $\Delta\Delta C_q$, o valor ΔC_q do gene alvo foi subtraído do valor do ΔC_q do calibrador (uma amostra de RNAm de *D. citri* alimentada com solução de sacarose nos experimentos de dsRNA, ou uma amostra de RNAm de *D. citri* alimentada com siRNA do GFP). A expressão relativa do RNAm da *DcV-ATPase-A* em comparação com a expressão do RNAm da *Ubiquitina* em cada amostra é representada pelo valor do $2^{-\Delta\Delta C_q}$, onde o número 2 representa a somatória de eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100 % de eficiência. As médias e o erro padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ em cada tratamento e nos controles foram calculados separadamente, e as análises estatísticas foram realizadas entre estes dois grupos.

3.4.5 Análises estatísticas

Os dados experimentais do número de insetos vivos submetidos a experimentos de alimentação artificial e o resultados de RT-qPCR foram analisados pelo teste de Bonferroni (Dunn) ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa SAS 9.1.

4 RESULTADOS

4.1 Construção gênica para transformação genética

A confirmação da clonagem dos fragmentos de 206 pb da *DcV-ATPase-A* nos sentidos senso e antisenso no plasmídeo p-GEM modificado (pGEM/35S-íntron-NOST) foi realizada por reação de clivagem do plasmídeo utilizando as enzimas *NcoI* e *KpnI* (Figura 8a) e *SacI* e *BstEII* (Figura 8b).

A confirmação da construção *hairpin/DcV-ATPase-A* dentro do vetor pCambia 2201 em *E. coli* foi realizada através de reação de clivagem com a enzima de restrição *NcoI*, liberando dois fragmentos, com tamanhos aproximados de 2400 pb e 800 pb (Figura 8c). Este último fragmento corresponde ao conjunto da sequência do íntron e dos fragmentos senso e antisenso da *DcV-ATPase-A*. A confirmação da clonagem no vetor pCambia 2201 também se deu através de PCR (Figura 8d). A clonagem do plasmídeo pCambia 2201 com a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* em *A. tumefaciens* foi confirmada pela reação de clivagem com a enzima *NcoI*, com liberação de dois fragmentos (2400 pb e 800 pb) (Figura 8e).

Figura 8 - Construção do cassete de expressão *hairpin/DcV-ATPase-A*. a) Clonagem do fragmento no vetor pGEM/35S-íntron-NOST, clivado com as enzimas *NcoI* e *KpnI*, liberando o fragmento no sentido senso. b) Clonagem do fragmento no vetor pGEM/35S-íntron-NOST, clivado com as enzimas *SacI* e *BstEII*, liberando o fragmento no sentido antisenso. c) Clivagem do vetor binário pCambia 2201 contendo o cassete de expressão *hairpin*, com a enzima de restrição *NcoI*. d) Análise de PCR de colônias de *E. coli* (1-6), mostrando a amplificação do fragmento de 206 pb da *DcV-ATPase-A*, comprovando a clonagem do cassete de expressão no vetor pCambia 2201. e) clivagem do plasmídeo pCambia 2201 extraído de colônias de *A. tumefaciens* com a enzima de restrição *NcoI*, liberando fragmentos com os mesmos tamanhos descritos na imagem “c”. M₁₀₀: Marcador molecular de 100 pb (Fermentas); M₁: Marcador molecular de 1 Kb (Fermentas)

4.2 Transformação genética

Na Tabela 5 estão apresentados os dados referentes aos experimentos de transformação genética das laranjas ‘Hamlin’, ‘Pêra’ com explantes provenientes de epicótilo e hipocótilo associado ao cotilédone, e de laranja ‘Valência’, transformadas via *A. tumefaciens* com a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. A Figura 9 representa diferentes etapas durante a realização dos experimentos de transformação genética.

Para a laranja ‘Hamlin’, foram realizados 6 experimentos de transformação genética, utilizando um total de 1486 explantes, com eficiência média de transformação genética de 1,74%.

No que se refere à laranja ‘Pêra’ foram realizados 5 experimentos de transformação genética utilizando segmentos de epicótilo como fonte de explantes, totalizando 1612 explantes inoculados. Apesar do alto número de explantes inoculados, só foi possível a aclimatização de uma única planta, a qual se mostrou não transgênica, quando avaliada por PCR (Tabela 5). Em relação ao uso de segmentos de hipocótilo associado ao cotilédone, como fonte de explantes, foram aclimatizadas 36 plantas, as quais quando avaliadas por PCR também mostraram-se como não transgênicas. Estes dados realçam ainda mais a recalcitrância da laranja ‘Pêra’ em trabalhos de transformação genética. No referente ao tipo de explante utilizado em transformação genética de laranja ‘Pêra’, constata-se maior eficiência de conversão em plantas a partir de hipocótilo associado ao cotilédone, com alto número de brotos regenerados e plantas aclimatizadas em relação ao número de explantes introduzidos (499), quando comparada à de explantes de epicótilo. Além disso, os brotos são mais vigorosos do que aqueles provenientes de epicótilo (Figura 9 “e” e “f”), fato que facilita a enxertia *in vitro*, refletindo em um alto número de plantas aclimatizadas.

Para a laranja ‘Valência’ foram realizados quatro experimentos de transformação genética, totalizando 2081 explantes inoculados, com eficiência média de transformação genética de 1,87%.

Tabela 5 - Transformação genética de laranjas ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ via *A. tumefaciens* contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*

Variedade	Explantes introduzidos	Explantes responsivos	Brotos enxertados	Plantas aclimatizadas	PCR+	Eficiência de transformação**
‘Hamlin’	1486	437	101	37	26	1,74%
‘Pêra’	1612	194	9	1	0	0
‘Pêra’*	499	262	80	36	0	0
‘Valência’	2081	367	103	51	39	1,87%

*Explantes provenientes de hipocótilo associado ao cotilédone

**Porcentagem do número de plantas PCR positivas em relação ao número total de explantes introduzidos

Os dados referentes ao número de explantes responsivos e número de brotos enxertados são variáveis que confirmam a dificuldade de execução dos trabalhos de transformação genética em citros. Embora sejam registrados elevados números de explantes responsivos, ou seja, que apresentam início de formação de gemas adventícias, estas geralmente não se desenvolvem por completo. Já na enxertia *in vitro*, observou-se que o número de brotos enxertados é superior ao número de plantas aclimatizadas, devido ao não pegamento da enxertia, muitas vezes, devido ao pequeno tamanho das gemas.

Figura 9 - Aspectos gerais das diferentes etapas dos experimentos de transformação genética das laranjas 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência' utilizando a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. a) Aspecto de segmentos de epicótilo inoculados com suspensão bacteriana de *A. tumefaciens*. b) Aspecto de brotação adventícia enxertada em citrange 'Carrizo'. c) Experimento de transformação genética de laranja 'Pêra', utilizando segmento de epicótilo como fonte de explante. d) Experimento de transformação genética de laranja 'Pêra', utilizando segmentos de hipocótilo associado ao cotilédone como fonte de explante

A coleta de segmentos foliares para análise de PCR foi realizada durante o período de aclimatização. Os segmentos foliares foram submetidos à extração de DNA, e o DNA utilizado para confirmação da transgenia por PCR, utilizando os *primers* descritos na Tabela 1, para amplificação do fragmento de 206 pb da construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* (Figura 10).

Figura 10 - Análise de PCR de plantas de laranja 'Valência' (V5 a V13) e laranja 'Hamlin' (H2 a H13) contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. M1: Marcador de 100 pb (Fermentas); H₂O: Controle de reação para verificar possíveis contaminações, constituído por água; C-: DNA de planta não-transgênica; C+: Controle positivo (Plasmídeo pCambia 2201, contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*)

4.3 Análise de Southern blot

Após a confirmação da transgenia por PCR, as plantas foram transferidas para casa de vegetação. Após novos ciclos de desenvolvimento, foram coletadas folhas jovens para análise de Southern blot, técnica utilizada para confirmar a integração do transgene, bem como determinar o número de cópias inseridas no genoma das plantas transgênicas, a partir do uso da sonda formada pelo fragmento da *DcV-ATPase-A*.

Um total de 65 plantas de laranja doce (39 de laranja ‘Valência’ e 26 de laranja ‘Hamlin’) foram confirmadas como transgênicas, as quais permanecem em casa de vegetação destinada ao cultivo de transgênicos. Houve uma variação de 1 a 4 cópias inseridas, sendo que a maioria das plantas apresentaram uma única inserção da construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. Não foram observadas hibridizações nas amostras não transgênicas em nenhuma das análises realizadas (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Análise de Southern blot de plantas de laranja ‘Valência’ contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. O DNA foi clivado com a enzima *EcoRI* e hibridizado com a sonda contendo o amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁺: Controle positivo contendo amostra da sonda, formada pelo amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁻: Controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA das plantas transgênicas de laranja ‘Valência’

Figura 12- Análise de Southern blot de plantas de laranja 'Hamlin' contendo a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. O DNA foi clivado com a enzima *EcoRI* e hibridizado com a sonda contendo o amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁺: Controle positivo contendo amostra da sonda, formada pelo amplicon do gene da *DcV-ATPase-A* de 206 pb. C⁻: Controle negativo (DNA de planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA das plantas transgênicas de laranja 'Hamlin'

4.4 Análise de siRNA blot

Como a maquinaria de silenciamento gênico está ativa em todas as células de organismos eucariontes, as plantas transgênicas durante a transcrição gênica deverão expressar a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. Esta construção gênica, por sua vez, por estar desenhada em forma de grampo, quando transcrita em RNAm será clivada por RNAses do tipo III, gerando os siRNAs, e estes, provavelmente, irão se acumular no citoplasma celular, já que o alvo destes siRNA não estão presentes nas plantas transgênicas, mas sim em *D. citri*.

As análises de siRNA blot foram realizadas utilizando o RNA de 17 plantas de laranja ‘Valência’, utilizando uma sonda radioativa, formada por fragmentos do *DcV-ATPase-A*. Um total de 10 plantas de laranja ‘Valência’ apresentaram hibridização com a sonda. Não foi observada hibridização no controle negativo, formado pelo RNA de uma planta não-transgênica (Figura 13). Além das plantas identificadas no filme fotográfico, os eventos de transformação V-7 e V-10, também apresentaram o sinal de hibridização com a sonda.

Figura 13- Análise de siRNA blot revelou a presença de pequenos RNAs interferentes nas folhas de plantas transgênicas de laranja ‘Valência’. C-: Controle negativo

4.5 Experimentos de alimentação com insetos adultos de *D. citri* em dieta artificial

Em ambos os experimentos, utilizando dsRNA ou siRNA, não foram observadas diferenças significativas no número de insetos vivos. Da mesma forma, não foram constatadas diferenças significativas na expressão relativa do RNAm da *DcV-ATPase-A* avaliado por RT-qPCR, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Bonferroni (Figuras 14 e 15). O valor de eficiência dos *primers* (para ambos os genes, *DcV-ATPase-A* e *Ubiquitina*) variou entre 86 e 104%, calculados pelo software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad), através de comparação dos valores Cq.

Figura 14 - a) Número de insetos vivos de adultos de *D. citri* alimentados em solução de sacarose contendo dsRNA do gene alvo (ds *DcV-ATPase-A*) e dsRNA do gene controle (dsGFP) após quatro dias de alimentação. b) expressão relativa do RNAm da *DcV-ATPase-A* avaliados através de RT-qPCR

Figura 15 - a) Número de insetos vivos de adultos de *D. citri* alimentados em solução de sacarose contendo siRNA do gene alvo (siDcV-ATPase-A) e siRNA do gene controle (siGFP) após cinco dias de alimentação. b) expressão relativa do RNAm da DcV-ATPase-A avaliados através de RT-qPCR

O tratamento controle formado por dsGFP é importante para observar se dsRNA inespecífico pode desencadear a maquinaria de RNAi, o que levaria ao silenciamento gênico de genes não alvos, o que comprometeria o uso da técnica, pois, o silenciamento deve ser específico ao RNAm correspondente ao dsRNA do gene alvo.

5 DISCUSSÃO

A transformação genética em citros vem sendo realizada há mais de 20 anos e, cada vez mais, esta ferramenta revela-se muito importante na integração com outras no melhoramento destas plantas. Genes isolados de plantas, bactérias, fungos e insetos são experimentalmente introduzidos em citros, levando à produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses bióticos e abióticos, seja através da super-expressão ou silenciamento gênico (GONG; LIU, 2013).

A severidade do HLB, associada à dificuldade de controle desta doença, a ausência de cultivares resistentes à doença, e as implicações decorrentes do uso de químicos no controle de *D. citri*, torna a transformação genética de citros uma alternativa para o controle de *D. citri* através do mecanismo de RNAi, e assim impedir uma maior disseminação do HLB.

Este é o primeiro relato da produção de plantas transgênicas de citros almejando silenciamento gênico em *D. citri* através de RNAi. Além dos trabalhos iniciais de Baum et al. (2007) e Mao et al. (2007), nos quais plantas transgênicas foram produzidas para silenciar genes essenciais em *Diabrotica virgifera* e *H. armigera*, outros trabalhos vêm reportando o silenciamento gênico em insetos pragas através de plantas transgênicas (KUMAR; PANDIT, BALDWIN, 2011; PITINO et al., 2011; ZHA et al., 2011). O hemíptero *Myzus persicae* (pulgão-verde-do-pessegueiro) submetido à alimentação em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, transformadas com o dsRNA dos genes *MpC002* e *Rack-1*, apresentaram diminuição da expressão em torno de 60%, e redução da progênie (PITINO et al., 2011). Ainda de acordo com os autores, foi confirmada a presença de siRNA nas plantas transgênicas, e estes foram translocados do floema das plantas até o aparelho estiletar de *M. persicae*, e alcançaram o aparelho digestivo do pulgão, onde desencadearam o silenciamento dos genes alvos.

No que se refere à eficiência de transformação genética obtida neste trabalho utilizando a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*, as cultivares ‘Hamlin’ e ‘Valência’ apresentaram valores similares entre si (Tabela 5). Alguns trabalhos de transformação genética com laranja ‘Hamlin’ relatam alta eficiência de transformação, com alguns trabalhos alcançando eficiência de transformação de 14% (BOSCARIOL et al., 2006). Neste trabalho, a eficiência de transformação genética de laranja ‘Hamlin’ foi de 1,74% o que é considerado um baixo valor para esta cultivar. Outros trabalhos têm apresentando valores de eficiência de transformação similares, como os obtidos por Tavano (2013), que observou eficiência de transformação para laranja ‘Hamlin’ variando de 5,4 a 1,1% em função da construção gênica

empregada, sugerindo que a construção gênica interfere no valor de eficiência. Paoli (2007) obteve eficiência de transformação de 1,6%, e Schinor (2006) reportou eficiência de transformação de 0,89% para laranja ‘Hamlin’.

Foram aclimatizadas 36 plantas de laranja ‘Pêra’ provenientes de hipocótilo associado ao cotilédone, as quais foram consideradas como não transgênicas. A recalcitrância de laranja ‘Pêra’ à transformação genética vem sendo reportada por diversos trabalhos (ATTÍLIO, 2013; AZEVEDO, 2005; PAOLI, 2007), demonstrando que a transformação genética em citros é dependente do genótipo. Schinor (2006) não obteve plantas transgênicas de laranja ‘Pêra’ ao transformar segmentos de epicótilo com o gene da capa proteica do vírus da tristeza dos citros (CTV). Attílio (2013) alcançou eficiência de transformação em laranja ‘Pêra’ de 0,3 a 1,9% ao utilizar segmentos de epicótilo, e de 4,41% ao utilizar segmentos de hipocótilo associado ao cotilédone como fonte de explantes, demonstrando que o uso de segmentos de hipocótilo associado ao cotilédone como fonte de explantes pode ser uma alternativa para alcançar maiores valores de eficiência de transformação em laranja ‘Pêra’.

Os brotos regenerados não transgênicos são considerados como escapes, que segundo Peña et al. (1995) é um dos principais problemas da transformação genética em citros. A regeneração de escapes pode ser explicada pela alta eficiência de regeneração de brotos, em oposição à baixa transformação mediada por *A. tumefaciens*; ineficiência de seleção pela canamicina, devido à proteção que as células transformadas fazem as células não transformadas, impedindo que o agente seletivo entre em contato com estas; e ainda a persistência de *A. tumefaciens* nos explantes por um longo período após o co-cultivo, podendo favorecer a formação de brotos falsos positivos ou quiméricos (COSTA; OTONI; MOORE, 2002; PEÑA et al., 1995).

De acordo com Attílio (2013), plantas transgênicas onde o gene repórter GUS é introduzido junto com o gene de interesse, apresentam maiores valores de eficiência de transformação, já que a eficiência é determinada com os brotos ainda ligados ao explante, a partir de testes histoquímicos. A eficiência de transformação determinada através de análise de PCR só é realizada em plantas já enxertadas e aclimatizadas, e como grande número de brotos não sobrevivem à enxertia, e, portanto não podem ser avaliados por PCR, a eficiência de transformação é baixa.

A análise de Southern blot foi realizada para confirmar a integração estável da construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* no genoma das cultivares submetidas à transformação genética. Cada planta transgênica apresentou diferentes padrões de integração e, portanto, são provenientes de diferentes eventos de transformação. O número de cópias do

transgene inseridas no genoma das plantas transgênicas variou de 1 a 4 cópias. O número de cópias inseridas está de acordo com o observado em outros trabalhos de transformação genética de citros (CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010)

A comprovação dos siRNA da *DcV-ATPase-A* nas folhas coletadas demonstra que a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A* esta ativa, já que a maquinaria de silenciamento gênico das plantas reconheceu o dsRNA, processando-os em siRNAs. A confirmação dos siRNA nas folhas das plantas transgênicas é também importante, para avaliação de ninfas de *D. citri* submetidas à alimentação nestas plantas, já que os siRNA se acumulam nos vasos de floema (BUHTZ et al., 2008). Wuriyanghan, Rosa e Falk (2011) destacam que a eficiência e especificidade dos siRNAs absorvidos via oral por insetos em plantas transgênicas é uma das principais aplicações do mecanismo de RNAi, especialmente para sugadores de floema, tais como os psílídeos *Bactecicerca cockerelli* e *D. citri*.

A introdução de dsRNAs exógenos em insetos através de ensaios de alimentação em dietas artificiais tem mostrado que é possível o silenciamento do RNAm homólogo ao dsRNA, comprovando que o mecanismo de RNAi é uma importante ferramenta na busca do controle de insetos que causam prejuízos à agricultura, e até mesmo insetos vetores de doença no homem. Larvas de segundo instar do hemíptero *Rhodnius prolixus* (vetor da doença de Chagas) foram alimentados com dsRNA da NP2 (Nitrofina 2, proteína anticoagulante), resultando em diminuição da expressão do RNAm da proteína, assim como a sua atividade nas glândulas salivares do inseto (ARAÚJO et al., 2006). Ninfas de *Nilaparvata lugens*, uma das principais pragas que atacam o cultivo de arroz, alimentadas com dsRNA de TPS (trealose fosfato sintase) apresentaram redução do níveis do RNAm da TPS, assim como diminuição da atividade enzimática, o que resultou em letalidade nas ninfas (CHEN et al., 2010).

No presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas no número de insetos vivos e no nível de expressão da *DcV-ATPase-A* em *D. citri*, seja nos experimentos de dieta artificial utilizando dsRNA da *DcV-ATPase-A*, ou siRNA da *DcV-ATPase-A*. Vários fatores podem interferir neste resultado, tais como o tempo em que os insetos se alimentaram na dieta artificial, o estágio de desenvolvimento do inseto e fatores intrínsecos à espécie, bem como o gene e os tipos celulares que são almejados (BELLÉS, 2010). Ainda de acordo com Bellés (2010), muitos resultados positivos de RNAi em insetos têm sido publicados, mas nem todas as espécies apresentam o mesmo grau de sensibilidade, e como resultados negativos não são reportados, é provável que um alto número de espécies fracamente sensíveis ao mecanismo de RNAi tenham sido testadas, mas os dados não publicados.

O primeiro relato de silenciamento gênico via RNAi em *D. citri* foi reportado por El-Shesheny et al. (2013), em que o dsRNA do gene *awd* (gene associado com o desenvolvimento das asas em insetos) foi aplicado (aplicação tópica) em ninfas de quinto instar. De acordo com os autores, a aplicação do dsRNA de *awd* causou altas taxas de mortalidade das ninfas e má formação das asas nos adultos, bem como diminuição da expressão gênica de *awd*.

Alguns trabalhos têm reportado a diminuição nos níveis de expressão no RNAm do gene alvo. Contudo, esta diminuição da expressão não resulta em mortalidade nos insetos alvos, fato relatado por Li et al. (2011), que apesar de encontrarem diferença significativa no nível de expressão do gene alvo, não encontraram diferença significativa na taxa de sobrevivência do hemíptero *Nilaparvata lugens*. Foram construídos três dsRNAs alvejando diferentes regiões dentro da sequência da V-ATPase-E (ds1-21E01, ds2-21E01 e ds3-21E01), os quais foram utilizados em ensaios de dieta artificial com ninfas de segundo instar de *N. lugens*. De acordo com os autores, nenhum dos três dsRNAs causaram taxas de mortalidade significativas, quando comparado com o tratamento controle (ds-GFP) em um período de alimentação de até 10 dias. Ainda de acordo com os autores, ninfas alimentadas por um período de 2 e 6 dias com a construção gênica ds1-21E01, não apresentaram diferenças significativas no nível de expressão gênica da V-ATPase-E. Para esta construção, diferença estatística no nível de expressão gênica da V-ATPase-E, só foi observada após 10 dias de alimentação na dieta artificial. Estes resultados são importantes, pois demonstram que o dsRNA de diferentes regiões de uma mesma sequência gênica, resultam em diferentes níveis de expressão do RNAm através de RNAi.

Segundo ZHA et al. (2011), ninfas de terceiro instar de *N. lugens* alimentadas em plantas transgênicas de arroz expressando diferentes dsRNAs (*NIHT1*, um transportador de hexose, *Nlcar*, carboxipeptidase e o *Nltry*, uma protease), tiveram a expressão destes genes reduzidas devido à ação do RNAi, com redução dos RNAm variando de 40 a 70%. Entretanto, de acordo com os autores, não foi observada mortalidade nos insetos quando estes se alimentaram nas plantas transgênicas, mesmo estas demonstrando a produção de dsRNA e siRNA nos vasos do floema. Os autores sugerem que tais resultados podem estar relacionados com a quantidade de dsRNA/siRNA absorvida pelos insetos, ou os genes estudados podem pertencer à uma família multigênica, na qual outros membros podem compensar a supressão de um membro. Também é possível que os genes alvos não sejam fisiologicamente significantes para induzir mortalidade quando silenciados.

No presente estudo, as concentrações de dsRNA do gene alvo (*DcV-ATPase-A*) e controle (GFP), utilizadas nos ensaios de alimentação foram superiores (500 e 100 ng μL^{-1}) em relação concentrações de siRNA (100 e 20 ng μL^{-1}). Em experimentos de alimentação com o psílídeo da batata (*Bactericerca cockerelli*), a diminuição da expressão do RNAm da V-ATPase só foi possível utilizando altas concentrações do dsRNA homólogo (1000 e 500 ng μL^{-1}), enquanto nos experimentos utilizando siRNA da V-ATPase, 100 ng μL^{-1} foi suficiente para a repressão do RNAm da V-ATPase (WURIYANGHAN; ROSA; FALK, 2011).

Grande parte dos trabalhos que visam o controle de insetos através de RNAi utilizam os insetos ainda em estágios ninfais, já que neste estágio os insetos parecem ser mais suscetíveis ao RNAi. De acordo com Khan et al. (2013), a cochonilha dos citros (Hemíptera: *Planococcus citri*) quando submetida à alimentação em plantas de tabaco agro-infiltradas (expressão transiente) com o dsRNAs da *quitina sintase I* (CHSI) ou V-ATPase, apresentou altas taxas de mortalidade e diminuição da expressão do RNAm correspondente aos dsCHSI e dsV-ATPase. Segundo os autores, este resultado foi muito mais proeminente nas ninfas do que em adultos. As ninfas podem ser mais suscetíveis ao mecanismo de RNAi, devido ao comportamento alimentar voraz, quando comparadas a insetos adultos. Portanto, podem ingerir maiores quantidades de dsRNA/siRNA, ativando a maquinaria de RNAi.

Foram realizados experimentos com ninfas de *D. citri* em sistema de dieta artificial contendo somente solução de sacarose, para observar o comportamento destas quando submetidas à condição de dieta artificial. As ninfas demonstraram ser extremamente recalcitrantes ao sistema de dieta artificial, não conseguindo se alimentar na solução de sacarose e, portanto, não completando o seu desenvolvimento, morrendo no primeiro ou segundo dia após o início do experimento. Devido à recalcitrância das ninfas de *D. citri* em sistema de dieta artificial, o uso das plantas transgênicas expressando siRNA, é uma alternativa à realização de experimentos utilizando ninfas, e também para confirmar se o siRNA da *DcV-ATPase-A* resulta em diminuição da expressão gênica em ninfas de *D. citri*.

O uso de dietas artificiais é importante para validação do dsRNA, como ativador do mecanismo de RNAi, e se a degradação do RNAm homólogo ao dsRNA compromete o desenvolvimento ou sobrevivência do inseto alvo, mas a obtenção de plantas transgênicas é a principal estratégia para efetivar o mecanismo de RNAi para o controle de insetos em condições de campo.

Tendo em vista que nas plantas transgênicas foi confirmada a presença dos siRNAs da *DcV-ATPase-A*, e que *D. citri* se alimenta nas células floemáticas das plantas cítricas, ninfas

de *D. citri* serão submetidas à alimentação nas plantas transgênicas, seguida de avaliação da expressão gênica através de RT-qPCR.

6 CONCLUSÕES

Foram obtidas plantas transgênicas de laranja doce, cultivares ‘Hamlin’ e ‘Valência’ expressando a construção gênica *hairpin/DcV-ATPase-A*. A maquinaria de silenciamento gênico nas plantas transgênicas está processando o *hairpin/DcV-ATPase-A* em siRNA.

O uso de dietas artificiais contendo dsRNA ou siRNA da *DcV-ATPase-A* não resultou em diminuição da expressão gênica do RNAm da *DcV-ATPase-A* em insetos adultos de *D. citri*, nem tampouco aumentou a taxa de mortalidade nestes insetos.

REFERÊNCIAS

- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, Pakistan, v. 9, n. 22, p. 56-64, 2010.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing huanglongbing in Florida. **Plant Science**, Limerick, v. 175, p. 291-306, 2008.
- ALLAN, A.K.; DU, J.; DAVIES, S.A.; DO, J.A.T. Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. **Physiological Genomics**, Rockville, v. 22, p. 128-138, 2005.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p.35-40, 2002.
- AMMAR, E.D.; SHATTERS JR., R.G.; LYNCH, C.; 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 the Entomological Society of America**, College Park, v. 104, n. 3, p. 526-533, 2011.
- ANANTHAKRISHNAN, G.; ORBOVIĆ, V.; PASQUALI, G.; ČALOVIĆ, M.; GROSSER, J.W. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 43, p. 593-601, 2007.
- ANDRADE, G.M.; SARTORETTO, L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.
- ANDRADE, S.R.M. **Transformação genética**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 27 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 102).
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. cap. 6, p. 127-124.
- ARAUJO, R.N.; SANTOS, A.; PINTO, F.S.; GONTIJO, N.F.; LEHANE, M.J.; PEREIRA M.H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, p. 683-693, 2006.
- ARITUA, V.; ACHOR, D.; GMITTER, F.G.; ALBRIGO, G.; WANG, N. Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 9, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0073742&representation=PDF>>. Acesso em: 16 set. 2013.

ATTÍLIO, L.B. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2***. 2013. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2013.

AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os gene bacteriopsina (*bO*), cecropina e gus**. 2005. 76 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005.

AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PI0, R.; BARBOSA, J.M.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the *bO* (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 24, p. 185-196, 2006.

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

BARRET, H.C., RHODES, A.M. A numerical study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. **Systematic Botany**, Kent, v. 1, p. 105-136, 1976.

BASSANEZI, R.B. Manejo do Huanglongbing dos citros pela redução do inóculo e controle do vetor: dificuldades e avanços. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais eletrônicos...** Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <http://www.congressofructicultura2012.com.br/anais/programacao/textospaineis/Painel_8_Reato.pdf>. Acesso em: 14 out. 2013.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; STUCHI, E.S. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 565-57, 2009.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006a.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor ‘Murcott’ avaliada por AFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p.779-784, 2006b.

BASTIANEL, M.; DORNELLES, L.C.; MACHADO, M.A.; WICKERT, E.; MARASCHIN S.F.; COLETTA FILHO, H.D.; SCHÄFER, G. Caracterização de genótipos de *Citrus* spp. através de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 763-768, 2001.

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.

BAUTISTA, M.A.M.; MIYATA, T.; MIURA, K.; TANAKA, T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, *CYP6BG1*, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, p. 38-46, 2009.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; RIBEIRO, L.M.; JESUS JUNIOR, W.C.; AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J.; MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A.R.; TANK JR., A.; GIORGI, F.D.; 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**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BELLÉS, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 55, p. 111-128, 2010.

BERGAMIN FILHO, A. Controle do huanglongbing dos citros. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, Tucumán, v. 86, n. 1, p. 47-48, 2009.

BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 577-589, 2006.

BOSCARIOL, R.L.; ALMEIDA, W.A.B.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, p. 122-128, 2003.

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; 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* 'Hamlin'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. cap. 2, p. 19-36.

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

- BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 423-438, 2003.
- BOVÉ, J.M.; RENAUDIN, J.; SAILLARD, C.; FOISSAC, X.; GARNIER, M. *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 483-500, 2003.
- BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 15, p. 12-15, 2000.
- BUHTZ, A.; SPRINGER, F.; CHAPPELL, L.; BAULCOMBE, D.C.; KEHR, J. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. **The Plant Journal**, v. 53, p. 739-749, 2008.
- 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, F.A.A. Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the *attacin A* gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 192, p. 28-185, 2010.
- CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, Maryland Heights, v. 136, p. 642-655, 2009.
- CERVERA, M.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Gene stacking in 1-year-cycling *APETALA1* citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 140, p. 278-282, 2009.
- CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, p. 26-30, 2000.
- CHEN, J.; ZHANG, D.; YAO, Q.; ZHANG, J.; DONG, X.; TIAN, H.; CHEN, J.; ZHANG, W. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 777-786, 2010.
- CHEN, M.H.; MIYAKAWA, T.; MATSUI. Citrus likubin pathogens in the salivary glands of *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 194-195, 1973.
- CIPRIANO, D.J.; WANG, Y.; BOND, S.; HINTON, A.; JEFFERIES, K.C.; QI, J.; FORGAC, M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1777, p. 599-604, 2008.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JUNIOR, J.; MACHADO, M.A.; AMARAL, A.M.; MULLER, G.W. First report of the causal agent of huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, n. 12, p. 1382, 2004.

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

COSTA-LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 101 p. (Série Didática, 3: Homoptera).

DISTEFANO, G.; LA MALFA, S.; VITALE, A.; LORITO, M.; DENG, Z.; GENTILE, A. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 5, p. 873-879, 2008.

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

DUAN, Y.X.; FAN, J.; GUO, W.W. Regeneration and characterization of transgenic kumquat plants containing the Arabidopsis *APETALA1* gene. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 273-281, 2010.

DUTT, M.; LEE, D.H.; GROSSER, J.W. Bifunctional selection-reporter systems for genetic transformation of citrus: mannose- and kanamycin-based systems. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 46, p. 467-476, 2010.

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**, San Francisco, v. 8, n. 5, 2013.

Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0065392>>.

Acesso em: 05 set. 2013.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>.

Acesso em: 01 jul. 2013.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MUTSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas: Livraria Editora Rural, 2001. p. 283-342.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-811, 1998.

FU, X.Z.; KHAN, E.U.; HU, S.S.; FAN, Q.J.; LIU, J.H. Overexpression of the *betaine aldehyde dehydrogenase* gene from *Atriplex hortensis* enhances salt tolerance in the transgenic trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 74, p. 106-113, 2011. Disponível em:

<<http://www.citeulike.org/article/9359931>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual técnico – greening**. 2009. Disponível em: <<http://www.relatoriogreening.com.br/greening.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2010.

_____. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/22-greening-atinge-69-das-arvores-dos-pomares-paulistas>>. Acesso em: 13 out. 2013.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GENTILE, A.; DENG, Z.; MALFA, S.L.; DISTEFANO, G.; DOMINA, F.; VITALE, A.; POLIZZI, G.; LORITO, M.; TRIBULATO, E. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. **Plant Breeding**, Berlin, v. 126, p. 146-151. 2007.

GER, M.J.; CHEN, C.H.; HWANG, S.Y.; HUANG, H.E.; PODILE, A.R.; DAYAKAR, B.V.; FENG, T.Y. Constitutive expression of *hrap* gene in transgenic tobacco plant enhances resistance against virulent bacterial pathogens by induction of a hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 764-773, 2002.

GHANIM, M.; KONTSEDALOV, S.; CZOSNEK, H. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 732-738, 2007.

GONG, X.; LIU, J. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in *Citrus* and its related genera. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, p. 137-147, 2013.

GORDON, K.H.J.; WATERHOUSE, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1231-1232, 2007.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. Citrus huanglongbing: The pathogen and its impact. **Plant Management Network**. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2007/huanglongbing/>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

GRAVENA, S.; GRAVENA, R.; SILVA, J.L.; SILVA, M.T.F.; BENVENGA, S.R.; AMORIM, L.C. S.; HORTO, L.R.G. Efeito fisiológico do inseticida pyriproxyfen no controle do psíldeo dos citros em laranja doce. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p. 145-154, 2010.

GUO, W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, p. 482-486, 2005.

GU, L.; KNIPPLE, D.C. Recent advances in RNA interference research in insects: implications for future insect pest management strategies. **Crop Protection**, Guildford, v. 45, p. 36-40, 2013.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 330-353, 2004.

HE, Y.; CHENA, S.; PENG, A.; ZOU, X.; XU, L.; LEI, T.; LIU, X.; YAO, L.; Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (*Shiva A* and *Cecropin B*) via a novel *Agrobacterium*-mediated transformation of mature axillary buds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, p. 99-107, 2011.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, p. 227-235, 2010.

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**, Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2009/tabelas_pdf/tabela04.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2013.

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**, Reading, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.

JEFFERIES, K.C.; CIPRIANO, D.J.; FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 476, p. 33-42, 2008.

KATOCH, R.; SETHI, A.; THAKUR, N.; MURDOCK, L.L. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 171, n. 4, p. 847-873, 2013.

KHAN, A.M.; ASHFAQ, M.; KISS, Z.; KHAN, A.A.; MANSOOR, S.; FALK, B.W. Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 9, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0073657>>. Acesso em: 19 set. 2013.

KIM, J.; SAGARAM, U.S.; BURNS, J.K.; LI, J.; WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 1, p. 50-57, 2009.

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

KUMAR, P.; PANDIT, S.S.; BALDWIN, I.T. Tobacco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031347>>.

Acesso em: 20 set. 2012.

LARANJEIRA, F.F.; SILVA, L.G.; FONSECA, E.L.; SILVA, S.X.B.; ROCHA, J.B.; SANTOS-FILHO, H.P.; LEDO, C.A.S.; HAU, B. Prevalence, incidence and distribution of citrus variegated chlorosis in Bahia, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 339-347, 2008.

LEE, S.K.; LI, W.; RYU, S.E.E.; RHIM, T.Y.; AHNN, J. Vacuolar (H⁺)-ATPases in *Caenorhabditis elegans*: What can we learn about giant H⁺ pumps from tiny worms? **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1797, p. 1687-1695, 2010.

LI, J.; CHEN, Q.; LIN, Y.; JIANG, T.; WUA, G.; HUAA, H. RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 777-786, 2011.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 1, p. 21-24, 2008.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 257-262, 2009.

LU, Z.; ZHOU, Z.; XIE, R. Molecular phylogeny of the “true citrus fruit trees” group (Aurantioideae, Rutaceae) as inferred from chloroplast DNA sequence. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 10, n. 1, p. 49-57, 2011.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C.. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. . In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 9, p. 221-277.

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

MAFRA, V.; MARTINS, P.K.; FRANCISCO, C.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, v. 14, n. 247, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-14-247.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2013.

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2007.

MARQUES, N.T.; NOLASCO, G.B.; LEITÃO, J.P. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, p. 176-182, 2011.

MARUTANI-HERT, M.; HUNTER, W.B.; KATSAR, C.S.; SINISTERRA, X.H.; HALL, D.G.; POWELL, C.A. Reovirus-like sequences isolated from adult Asian citrus psyllid, (Hemiptera: Psyllidae: *Diaphorina citri*). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 92, n. 2, p. 314-320, 2009.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, London, v. 431, p. 343-349, 2004.

MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 955-961, 2002.

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.B.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZA, 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**, Dordrecht, v. 59, p. 68-75, 2010.

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

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

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 2, p. 251-268, 2008.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; PIO, R.; MENDES, B.M.J.; AZEVEDO, F.A.; SCHINOR, E.H.; ENTELMANN, F.A.; ALVES, A.S.R.; CANTUARIAS-AVILÉS, T.E. Evaluation of citrus somatic hybrids for tolerance to *Phytophthora nicotianae* and citrus tristeza virus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, p. 301-308, 2008.

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.; FREITAS, Jr., W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with *Citrus tristeza virus* (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 56, p. 162-166, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1169.

NASCIMENTO, F.E. **Estudos sobre aquisição e concentração de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e “*Candidatus Liberibacter americanus*” em *Diaphorina citri* Kuwayama.** 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. (Org.). **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil.** 2006. Disponível em:
<http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Agenda_Citrus_2015_PE_NSAICONE.pdf>. Acesso: 22 out. 2013.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. (Ed.). **O retrato da citricultura brasileira.** Ribeirão Preto: Markestrat - CitrusBR, 2009. 138 p.

NICOLOSI E. Origin and taxonomy. In: KHAN, I.A. (Ed.). **Citrus: genetics and biotechnology.** Wallingford: CAB international, 2007. chap. 3, p. 19-43.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

PAOLI, L.G. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa* Wells et al.** 2007. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007.

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**, London, v. 94, p. 67-74, 2004.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DUÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v. 104, p. 183-191, 1995.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros.** Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 3, p. 39-60.

PITINO, M.; COLEMAN, A.D.; MAFFEI, M.E.; RIDOUT, C.J.; HOGENHOUT, S.A. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em:
<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0025709>>. Acesso em: 29 jun. 2012.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 4, p. 63-104.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Morte súbita dos citros: suscetibilidade de seleções de limão ‘Cravo’ e uso de interenxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 1159-1161, 2008.

PRICE, D.R.G.; GATEHOUSE, J.A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008.

PRIDGEON, J.W.; ZHAO, L.; BECNEL, J.J.; STRICKMAN, D.A.; CLARK, G.G.; LINTHICUM, K.J. Topically applied *AaeIAP1* double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 45, n. 3, p. 414-420, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1, p. 1119-1122.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCHEWE, B.; SCHMÄLZLIN, E.; WALZ, B. Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands: the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 211, p. 805-815, 2008.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa proteica em uma sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2006.

SECHLER, A.; SCHUENZEL E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E. Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 480-486, 2009.

SILVA, R.P.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azeda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p.1331-1337, 2008.

SILVA, R.P.; COSTA, M.A.P.C.; SOUZA, A.S.; ALMEIDA, W.A.B. Regeneração de plantas de laranja ‘Pêra’ via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1153-1159, 2005.

SOARES FILHO, W.S.; MEDRADO, A.C.M.; CUNHA, M.A.P.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S. Frequência de híbridos em cruzamentos controlados de citrus: cultivo de sementes versus cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 981-988, 2002.

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

STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A. **Use of horticultural practices in citriculture to survive huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 71 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 189).

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

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

TAVANO, E.C.R. **Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.** 2013. 86 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

TEIXEIRA, D.C.; DANET, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ *Liberibacter* species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 173-179, 2005.

UPADHYAY, S.K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C.; BORGIO, J.F.; SINGH, P.K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 36, n. 1, p. 153-161, 2011.

WIECZOREK, H.; BEYENBACH, K.W.; HUSS, M.; VITAVSKA, O. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 212, p. 1611-1619, 2009.

WURIYANGHAN, H.; ROSA, C.; FALK, B.W. Oral delivery of double-stranded RNAs and siRNAs induces RNAi effects in the potato/tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, 2011. Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0027736>>.

Acesso em: 10 jun. 2012.

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

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 75, p. 11-23, 2011.

ZHA, W.; PENG, X.; CHEN, R.; DU, B.; ZHU, L.; HE, G. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 5, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0020504>>. Acesso em: 25 out. 2012.

ZHANG, X.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIĆ, V.; TRIPLETT, E.W.; MOU, Z. Over-expression of the *Arabidopsis NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128, p. 91-100, 2010.

ZHUANG, Z.; LINSER, P.J.; HARVEY, W.R. Antibody to H⁺ V-ATPase subunit E localizes with proteasomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti* L.). **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 202, p. 2449-2460, 1999.

ZOU, X.; LI, D.; LUO, X.; LUO, K.; PEI, Y. An improved procedure for *Agrobacterium*-mediated transformation of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) via indirect organogenesis. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 44, p. 169-177, 2008.