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

Transformação genética de laranjas ‘Pera’ e ‘Natal’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene atacina A (*attA*), dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.

Carolina Rossi de Oliveira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2014**

Carolina Rossi de Oliveira
Bióloga

Transformação genética de laranjas ‘Pera’ e ‘Natal’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene atacina A (*attA*), dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **BEATRIZ MADALENA JANUZZI MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2014

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

Oliveira, Carolina Rossi de

Transformação genética de laranjas 'Pera' e 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene atacina A (*attA*), dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp. / Carolina Rossi de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
74 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Huanglongbing 2. Citros 3. Transgenia 4. Promotores 5. Atacina A I. Título

CDD 634.31
O48t

A DEUS,

Perfeito e inigualável

Pela fé, força e luz

AGRADEÇO

Aos meus pais,

MARCILIO B. OLIVEIRA e ELIANA M. R. OLIVEIRA

Pelo amor, paciência e porto seguro sempre

DEDICO

Aos estimados,

FLORINDO ROSSI (in memorian) e DULCE F. ROSSI

JOAQUIM B. OLIVEIRA (in memorian) e LUZIA C. BUENO

Pelo privilégio do convívio e por partilharem comigo da genuína sabedoria

OFEREÇO

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, coragem e esperança sempre renovada.

Aos meus pais, Marcilio e Eliana, pelo amor, por todo incentivo e pelas infinitas formas de apoio durante este período.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes, pela orientação, confiança, ensinamentos e oportunidade junto ao grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela atenção, revisão e conselhos cedidos na elaboração desse trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pelo conhecimento compartilhado e solicitude com o grupo sempre.

Aos professores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela formação acadêmica.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli e ao Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas, pela amizade e oportunidade de aprendizado durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos técnicos de laboratório e companheiros de propósito, Renata Cruz e Marcelo Correa, pela amizade e dedicação, e à estagiária Ananda Aiello, pela ajuda com os experimentos.

À Maria Solizete Silva, secretária do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela eficiência e comprometimento com seu trabalho.

À bibliotecária Eliana Garcia, pela disponibilidade durante a revisão deste material.

Aos fortes e bons amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) e agregados: Eveline Tavano, Livia Mendes, Lúgia Erpen, Bianca Aluisi, Isabela Barbeiro, Fabiana Muniz, Leonardo Soriano, Perla Silva, Tatiana Moreira, Camila Heuser, Karina Salomão, Sylvia Silveira, Mônica Rossi, Hilo de Souza e Sandra Santa Rosa – pelos momentos de descontração e amizade inestimável; também aos amigos do laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ/USP): Liliane Sttip, Tatiane Loureiro, Luzia Miyata e Felipi Rodrigues, pelo apoio durante esse trabalho.

Ao companheiro André Luiz Fadel, pelos conhecimentos agrônômicos compartilhados, pela presença cotidiana nessa jornada e por ser tão positivista.

Aos queridos Neu, Clérída, Gê, Jô e Fer, pelo convívio e pela amizade.

Aos amigos Cebolinha, Marisa, Edmilson e Neuma, pelos risos e por todos os 'cafézinhos' que compartilhamos.

A doce Dulce Rossi, que mesmo sem saber, com carinho, trouxe-me paz em vários momentos.

À Elaine Dias, Gabriela Quitério, Carolyn Dubbern e Marcelle Esguaçabia, por acreditarem mais do eu mesma, pelo ombro amigo entusiasta e por compreenderem todas as minhas ausências.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) Sr. José Volpato, Davi Ulrich e Éder Cintra, pelos auxílios nas tarefas de campo.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento em Pesquisa de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

E a todos, que de algum modo fizeram parte dessa fase e que tenham contribuído, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

*“Porque a seus anjos Ele dará ordens a seu respeito,
para que o protejam em todos os seus caminhos;
com as mãos, eles o segurarão,
para que você não tropece em pedra alguma.”*

Salmos 91: 11-12

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A citricultura no Brasil e no mundo.....	21
2.2 O Huanglongbing	23
2.3 Transformação genética de citros	26
2.4 Transformação genética de citros para resistência a doenças.....	29
2.5 Promotores tecido-específicos em citros.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Material vegetal	37
3.2 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.2.1 Construções gênicas	37
3.2.2 Cultura e manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.2.3 Transformação genética de citros via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.2.4 Seleção, regeneração, enxertia <i>in vitro</i> e enraizamento das gemas adventícias desenvolvidas	39
3.2.5 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR.....	39
3.3 Caracterização molecular.....	40
3.3.1 Confirmação da transgenia por análise de <i>Southern blot</i>	40
3.3.2 Avaliação da expressão do gene <i>attA</i> pela análise de RT-qPCR.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Transformação genética.....	45
4.2 Caracterização molecular das plantas obtidas	53
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Transformação genética de laranjas 'Pera' e 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene atacina A (*attA*), dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.

Atualmente o Brasil ocupa lugar de destaque entre os produtores de citros sendo o maior produtor de laranja doce do mundo. Entretanto, essa produção vem sendo gravemente afetada, por doenças como o Huanglongbing (HLB), que tem causado perdas significativas para toda cadeia citrícola. O HLB está associado a bactérias Gram-negativas, restritas ao floema das plantas, denominadas *Candidatus Liberibacter* spp., que além de reduzir a produção de frutos, podem, em casos mais severos da doença, ocasionar a morte da planta. Uma importante estratégia para controle desta doença é a produção de plantas transgênicas expressando genes, especificamente no local de colonização do patógeno. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de *Citrus sinensis* cvs. 'Pera' e 'Natal', contendo o gene atacina A (*attA*) que codifica um peptídeo antibacteriano, dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema: AtSuc2 (transportador de sacarose) ou AtPP2 (proteína de floema 2), clonados de *Arabidopsis thaliana*, ou CsPP2 (proteína de floema 2) clonado de *Citrus sinensis*. A identificação de 65 plantas transgênicas foi realizada, por meio da análise de PCR. Foi verificado um número menor de eventos transgênicos, utilizando-se a construção gênica pCAtSuc2/*attA* em relação ao número de eventos transgênicos obtidos com as construções gênicas pCCsPP2/*attA* e pCAtPP2/*attA*. Plantas identificadas como transgênicas pela análise de PCR, foram aclimatizadas e transferidas para casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas. Análises de *Southern blot* foram realizadas em plantas aclimatizadas que apresentaram desenvolvimento suficiente, confirmando-se a integração do gene *attA*. A expressão do gene *attA* foi confirmada pela análise de RT-qPCR. As plantas transgênicas obtidas neste trabalho, contendo o gene *attA* dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, serão avaliadas em uma etapa futura para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.

Palavras-chave: Huanglongbing; Citros; Transgenia; Promotores; Atacina A

ABSTRACT

Genetic transformation of oranges 'Pera' and 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with the gene attacin A (*attA*), driven by preferentially expressed in phloem promoters for resistance to *Candidatus Liberibacter* spp.

Currently, Brazil is a major citrus producer and the world's largest producer of sweet oranges. However, diseases, such as Huanglongbing (HLB) have seriously affected this production, causing significant losses in citrus production chain. HLB is associated with Gram-negative bacterias, restricted to the phloem of plants, called *Candidatus Liberibacter* spp., which besides reducing fruit production, can lead to plant death. An important strategy to control this disease is the production of transgenic plants expressing genes, specifically at the region of pathogen colonization. The aim of this study was to obtain transgenic plants of *Citrus sinensis* cv. 'Natal' and 'Pera', containing the gene attacin A (*attA*) that encodes an antibacterial peptide, driven by preferentially expressed in phloem promoters: AtSuc2 (sucrose transporter) or AtPP2 (phloem protein 2), cloned from *Arabidopsis thaliana*, or CsPP2 (phloem protein 2) cloned from *Citrus sinensis*. The identification of 65 transgenic plants was performed by PCR analysis. A lower number of transgenic events were verified using the gene construct pCAtSuc2/*attA* in relation events obtained with the gene constructs pCCsPP2/*attA* and pCAtPP2/*attA*. Plants identified as transgenic by PCR analysis were acclimatized and transferred to a greenhouse certified for growing transgenic plants. The *Southern blot* analyses were performed in acclimatized plants, which had sufficiently developed, confirming the integration of *attA* gene. The expression of *attA* gene was confirmed by RT-qPCR analysis. The transgenic plants obtained in this work, containing the gene *attA* directed by preferentially expressed in phloem promoters, will be further evaluated for resistance to *Candidatus Liberibacter* spp.

Keywords: Huanglongbing; Citrus; Transgenics; Promoters; Attacin A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas utilizadas nos experimentos de transformação genética.....	38
Figura 2 -	Transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> com construções gênicas contendo o gene atacina A (<i>attA</i>), sob o controle de promotores específicos de floema.....	52
Figura 3 -	Amostra das análises de PCR realizadas com plantas regeneradas dos experimentos de transformação genética de laranjas 'Natal' e 'Pera', com a construção gênica pCA _{At} PP2/ <i>attA</i>	53
Figura 4 -	Análise de <i>Southern blot</i> em plantas de laranja 'Natal' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética, com as construções gênicas pCC _S PP2/ <i>attA</i> e pCA _{At} Suc2/ <i>attA</i>	55
Figura 5 -	Análise de <i>Southern blot</i> em plantas de laranjas 'Natal' e 'Pera' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética, com a construção gênica pCA _{At} PP2/ <i>attA</i>	56
Figura 6 -	Expressão do gene atacina A (<i>attA</i>), em plantas transgênicas de laranjas 'Natal' e 'Pera'.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de <i>primers</i> utilizados na análise de RT-qPCR para a amplificação dos genes de referência <i>FBOX</i> e <i>ubiquitina</i> , e do gene <i>attA</i>	42
Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cv. 'Natal' com as construções gênicas pCAtSuc2/ <i>attA</i> , pCAtPP2/ <i>attA</i> e pCCsPP2/ <i>attA</i>	46
Tabela 3 - Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cv. 'Pera' com as construções gênicas pCAtSuc2/ <i>attA</i> , pCAtPP2/ <i>attA</i> e pCCsPP2/ <i>attA</i>	48

1 INTRODUÇÃO

Responsável pela produção de aproximadamente de 18 milhões de toneladas de laranja doce por ano, o Brasil está entre os maiores produtores de citros do mundo (FAO, 2014). Apesar de ser amplamente cultivado, pode-se afirmar que a produtividade brasileira de citros é baixa, quando comparada a outros países produtores, devido entre outros fatores, a problemas de ordem fitossanitária (MACHADO et al., 2005).

Dentre as doenças que atingem a citricultura atualmente, o Huanglongbing (HLB) é a doença que mais ameaça a produção. Associado a bactérias restritas ao floema das plantas, o HLB tem causado perdas cada vez mais significativas em pomares em todas as regiões, e em casos mais severos, pode levar a improdutividade. Até o momento, todas as espécies comerciais de citros são suscetíveis ao patógeno. A disseminação, realizada por insetos vetores, os psílídeos, dificulta o controle da doença (BOVÉ, 2006). Os métodos de controle utilizados atualmente baseiam-se no uso de mudas sadias, trabalhos de prevenção, erradicação de plantas doentes e controle químico do vetor.

Tendo em vista a severidade da doença, uma alternativa de controle é a obtenção de plantas tolerantes ou resistentes ao HLB. Métodos de melhoramento convencional esbarram em uma série de entraves e exige longo período de tempo até o desenvolvimento de uma nova cultivar. Assim, a transformação genética de plantas se torna uma excelente alternativa, oferecendo vantagens, como o uso de material genético de organismos incompatíveis, a obtenção de cultivares melhoradas em menor tempo e a diminuição da transmissão de genes indesejáveis (MACHADO et al., 2005; PEÑA et al., 2008).

Esta tecnologia permite a introdução de genes de interesse no genoma da planta, mantendo as características genéticas da cultivar. Entre as estratégias da engenharia genética de plantas para a resistência a doenças, a utilização de peptídeos antimicrobianos, como as atacinas, vem sendo reportada com resultados promissores (REYNOIRD et al., 1999; KO et al., 2000; BESPALHOK FILHO et al., 2001; BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO, et al., 2010; TAVANO, 2013).

Atacinas são produzidas pelo sistema imunológico de insetos (*Lepidoptera*) em resposta a uma infecção bacteriana. Atuam aumentando a permeabilidade ou interferindo na síntese da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Tem se

mostrado eficiente em promover resistência a infecções causadas por bactérias e fungos em plantas de citros (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010; MONDAL et al., 2012).

Em trabalhos de transformação genética, um componente de destaque das construções gênicas é o promotor, pois determina a especificidade no tecido e o nível de expressão do gene alvo (BENYON et al., 2013). Em plantas transgênicas de citros, o promotor constitutivo 35S, oriundo do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) é o mais utilizado nas construções gênicas (FAGOAGA et al., 2001; YANG et al., 2011; MUNIZ et al., 2012). Park et al. (2010) mostraram ainda que, este promotor regula a expressão do transgene em níveis elevados.

No caso de plantas tolerantes ou resistentes ao HLB, pode ser vantajoso limitar a expressão do transgene no tecido vascular e minimizar expressão constitutiva na planta. Desse modo, muitos estudos estão sendo realizados, com resultados promissores, utilizando promotores de expressão preferencial no floema, como AtSUC2 (transportador de sacarose), AtPP2 (proteína de floema 2) clonados de *Arabidopsis thaliana*, CsPP2 (proteína de floema 2) clonado de *Citrus sinensis* (MIYATA et al., 2012; TAVANO, 2013), RSs1 (sacarose sintase I) clonado de *Oryza sativa*, rolC clonado de *Agrobacterium rhizogenes*, RTBV clonado de vírus (*rice tungro bacilliform virus*), WDV clonado de vírus (*wheat dwarf geminivirus*) e CsSUS clonado de *Citrus sinensis* (DUTT et al., 2012; BENYON et al., 2013).

No Brasil, Tavano (2013) iniciou estudos para a obtenção de plantas transgênicas de *C. sinensis* expressando o gene atacina A (*attA*) sob controle de promotores preferencialmente expressos no floema (AtSUC2, AtPP2 ou CsPP2), com ênfase em cultivares 'Hamlin' e 'Valência'. Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir plantas transgênicas de laranjas 'Natal' e 'Pera', com estas construções gênicas, a fim de ampliar o estudo para as principais cultivares de laranja doce cultivadas no país, visando resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A citricultura no Brasil e no mundo

As plantas cítricas pertencem à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*, que possui as tribos *Clauseneae* e *Citreae*, as quais se dividem em 3 subtribos. Indivíduos da tribo *Citreae*, subtribo *Citrenae*, somam-se em 13 gêneros e 65 espécies. Dentre estes, os três gêneros de maior interesse comercial *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* pertencem ao grupo subtribal C “árvores de citros verdadeiros”, que caracterizam-se pela presença de frutos do tipo baga, com vesículas de suco delgadas, unidas e pedunculadas (SWINGLE; REECE, 1967; ARAÚJO; ROQUE, 2005).

A classificação taxonômica do gênero *Citrus* é muito discutida entre diversos autores, por apresentarem características como reprodução assexuada, alta frequência de mutação e cruzamento entre espécies. Assim, Engler (1931) sugeriu 11 espécies para o gênero *Citrus*, ao passo que Tanaka (1977) propôs 162 espécies e Swingle e Reece (1967) indicaram 10 espécies pertencentes ao gênero *Citrus*. Possivelmente todas as espécies exploradas comercialmente hoje são híbridos originários de três espécies verdadeiras e monoembriônicas: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e toranja (*Citrus grandis* L.) (SCORA, 1975; MABBERLEY, 1997; DONADIO; MOURAO FILHO; MOREIRA, 2005).

Originários do sudeste asiático, com extensões de dispersão do nordeste da Índia ao centro da China, o gênero *Citrus* difundiu-se pelo mundo, adaptando-se a regiões tropicais e subtropicais (DAVIES; ALBRIGO, 1994). A laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) é originária da Indochina e do sul da China, com possível extensão até o sul da Indonésia. No Brasil, os primeiros relatos da existência de espécies cítricas datam o ano de 1549, em São Paulo e na Bahia. Possivelmente, a introdução da laranja doce ocorreu em torno de 1530, pelas expedições portuguesas (ANDRADE, 1933; WEBBER et al., 1967; CHAPOT, 1975; HASSE, 1987).

O gênero *Citrus* apresenta plantas perenes de porte médio, copa em formato esférico, ramos angulares, espinhos axilares, folhas brevipetioladas, flores brancas e perfumadas originárias de inflorescência ou não, frutos tipo baga, de formato oval ou esférico e presença de vesículas de suco, que agregam valor comercial a fruta (SAUNT, 1990; SCHNEIDER, 1968; QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005).

As laranjas doces são divididas em quatro categorias devido às suas características. As laranjas comuns ou “blancas” (‘Pera’, ‘Valência’, ‘Natal’ e outras) são direcionadas ao consumo de fruto *in natura* e ao processamento industrial destinado a exportação. As cultivares pertencentes ao grupo de umbigo (‘Bahia’ e ‘Baianinha’) adequam-se ao consumo *in natura*, em mercado local e para exportação. As cultivares denominadas sanguíneas (‘Moro’) e as de baixa acidez, limas, têm um mercado menor e são comumente consumidas em mercado local (DONADIO; FIGUEIREDO; PIO, 1995).

Dados da FAO (2014), atualizados até o ano de 2012, mostram que com 131 milhões de toneladas por ano, as frutas cítricas são as mais produzidas em todo o mundo, sendo a China o maior produtor mundial de citros, com aproximadamente 30 milhões de toneladas, seguida pelo Brasil, com cerca de 22 milhões de toneladas no mesmo período. Em se tratando de laranjas doces, o Brasil é o maior produtor do mundo, com aproximadamente 18 milhões de toneladas ao ano, seguido por Estados Unidos e China (FAO, 2014). Os dados de produção mostram uma posição de destaque no cenário sócio-econômico, influenciando de forma positiva a cadeia agrícola, tanto na geração de empregos como na exportação, aquecendo o mercado internacional. Em 2013, o cultivo dos citros compreendeu aproximadamente 900 mil ha de área plantada em todo o Brasil. Em relação a laranja doce, 600 mil ha de área plantada se concentram no Estado de São Paulo, tornando a citricultura paulista a mais expressiva do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014).

Estabelecida no século XX, a citricultura, principalmente a paulista, se destacou após a decadência da cultura do café, em meados de 1920. Após anos de produção significativa, por volta da década de 1940, com a desvalorização do setor devido a Segunda Guerra Mundial e a disseminação de doenças impactantes, a produção citrícola caiu significativamente e sofreu perdas na área de citros cultivada no país. Somente a partir de 1960, retomou a posição de destaque, transpondo as barreiras impostas pelas doenças e pela economia (BOTEON; NEVES, 2005).

Apesar de o Brasil contar com boas condições edafoclimáticas para a cultura dos citros, a produção é considerada baixa quando comparada a outros países líderes no segmento. Segundo Machado, Cristofani-Yali e Bastianel (2011), esse cenário é agravado com a ausência de irrigação na maioria dos pomares, manejo

inadequado de frutos durante a pós-colheita, estratégias de manejo do pomar e a presença de diversas doenças que afetam a cultura.

Entre as doenças que causam perdas consideráveis na citricultura, destacam-se a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), a melanose (*Diaporthe citri*), a pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), a podridão floral (*Colletotrichum acutatum*), a rubelose (*Erythricium salmonicolor*) e a verrugose (*Elsinoe* spp.) causadas por fungos fitopatogênicos (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS, 2014); em se tratando de doenças causadas por vírus, a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*) (BASTIANEL et al., 2006); quanto a doenças causadas por bactérias, o cancro cítrico (*Xanthomonas citri*), a clorose variegada do citros (*Xylella fastidiosa*) e atualmente, o huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) (MATTOS JUNIOR et al., 2005; BOVÉ, 2006).

2.2 O Huanglongbing

O primeiro relato mundial do huanglongbing (HLB) ocorreu em 1919, na China (REINKING, 1919). No Brasil, o HLB foi constatado na cidade de Araraquara em 2004 (COLLETA-FILHO et al., 2004) e desde então a disseminação da doença foi rápida e atingiu todas as regiões do país. Dados do Fundo de Defesa da Citricultura apontam que de 2004 a 2012, houve um aumento de 3,4% para 64,1% de talhões contaminados. Além disso, a ocorrência de plantas sintomáticas cresceu de 0,58%, em 2008, para 6,91%, em 2012 (FUNDECITRUS, 2014). Disseminado em todas as regiões brasileiras, até 2012, o HLB teve maior incidência nas regiões Centro e Leste do Estado de São Paulo, que apresentaram, respectivamente 9,9% e 14,8% de plantas com sintomas, enquanto que números menos expressivos de plantas sintomáticas, foram verificados nas regiões Norte (1,8%) e Oeste (1,4%). As menores taxas de plantas com sintomas foram encontradas nas regiões Sul e Noroeste do Estado de São Paulo, com incidências de 0,9% e 0,3%, respectivamente (FUNDECITRUS, 2014).

O HLB está associado a bactérias Gram-negativas, intracelulares, restritas aos vasos floemáticos da planta (BOVÉ, 2006). Estão relacionadas ao HLB, três espécies de bactérias, nomeadas de acordo com o continente onde foram relatadas: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), relatada na Ásia e América, *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf) presente na África e *Ca. Liberibacter americanus*

(CLam), esta última encontrada somente no Brasil (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; LOPES et al., 2009). São classificadas como α -Proteobacteria, da ordem *Rhizobiales* e família *Rhizobiaceae*, como bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Sinorhizobium*, que podem apresentar interações simbióticas com plantas (MACHADO; LOCALI-FABRIS; COLLETA-FILHO, 2010).

Ainda que Sechler et al. (2009) tenham obtido êxito ao isolar e cultivar as três espécies de bactérias relacionadas ao HLB, os postulados de Koch não foram completamente cumpridos, devido a falta de repetibilidade dos resultados. Assim, as bactérias associadas à doença, recebem a denominação *Candidatus*, usada antes do binômio latino, pois são candidatas a tal nomeação (COLLETA-FILHO et al., 2004; LARANJEIRA et al., 2005).

Assumindo que os poros da placa crivada dos elementos de vasos do floema apresentam 14 μ m de diâmetro, e que o tamanho médio da bactéria é de 2 μ de comprimento e 0,1 a 2 μ de diâmetro (TATINENI, et al., 2008), a distribuição bacteriana nos vasos do floema não é obstrutiva e é bastante irregular, o que não mascara os sintomas, já que estes são bem evidentes, mesmo com baixas concentrações da bactéria na planta (LOPES et al., 2009). Embora não aconteça obstrução dos poros pela concentração de bactérias, uma calosidade é verificada nos elementos de tubo crivados devido acúmulo de fotoassimilados. Isso se dá, provavelmente, pelo aumento da expressão de genes envolvidos da síntese da calose e da proteína P, depositadas nas paredes dos vasos do floema, dando origem a um calo de amido, que não permite a passagem da seiva até os tecidos-dreno, como flores, frutos, brotações e raízes (KIM et al., 2009). Com isso a planta passa a ter perdas significativas de produção, levando-a, em casos mais severos da doença, à improdutividade.

As bactérias podem ser transmitidas por material de propagação contaminado ou por insetos vetores, os psílídeos: *Diaphorina citri*, presente na Ásia e América, e *Trioza erytreae*, presente na África (BOVÉ; AYRES, 2007). A espécie presente no Brasil, *D. citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) apresenta coloração cinza, manchas escuras nas asas, mede de 2 a 3 mm de comprimento e se alimenta de brotações novas, o que confere aumento da população neste período. É na fase de ninfa que o psílídeo adquire a bactéria com mais eficiência, contudo também há relatos da aquisição bacteriana por adultos (GALLO et al., 2002; INOUE et al., 2009). Parra et al. (2010) observaram que psílídeos podem transmitir *Ca. Liberibacter* spp. através

do modelo de circulação ou propagação pelos vários tecidos do seu corpo, juntamente com a inoculação via saliva ao se alimentar da planta, evidenciando transmissão persistente propagativa.

Relatado no Brasil desde a década de 1940, *D. citri* foi considerado uma praga secundária da citricultura até a constatação da presença das bactérias associadas ao HLB, no ano de 2004, em Araraquara-SP (COSTA LIMA, 1942; GALLO et al., 2002; PARRA et al., 2010). Por aproximadamente 62 anos, o inseto vetor não transmitiu o patógeno, o que sugere a possível introdução de material propagativo de citros contaminado ou a existência de outras rutáceas exóticas contaminadas com o patógeno (PARRA et al., 2010).

O aparecimento de folhas amareladas marca o início dos sintomas da doença. Devido à transição de cores do verde ao amarelo nas folhas, não é evidente a delimitação clara entre essas duas cores. Esse sintoma é denominado “mosqueado” e tem sido observado nas plantas que apresentam a doença. As folhas podem se apresentar curvadas ou com tamanho reduzido. Em estágios mais avançados da doença é possível a ocorrência de desfolha e morte de ponteiros (BOVÉ, 2006). De acordo com Bassanezi; Gimenez-Fernandes; Massari (2006) em relação aos frutos nota-se tamanho reduzido, assimetria e maturação incompleta. São encontradas sementes abortadas e vasos escurecidos, quando cortes perpendiculares são realizados nos frutos. Com o progresso da doença, ocorre a queda de frutos, podendo esta ser completa em casos onde a planta tenha sido mais afetada. Há ainda o comprometimento da qualidade do suco, já que os frutos apresentam-se mais ácidos e com valores mais baixos de Brix, *ratio* e sólidos solúveis.

Folimonova et al. (2009) compararam títulos da bactéria em diferentes genótipos de citros e revelaram que a maioria acumulou níveis semelhantes de *Ca. L. asiaticus*, entretanto evidenciavam diferentes níveis de sintomas, demonstrando que não necessariamente, existe correlação entre a titulação bacteriana e a gravidade da doença. Ressaltam ainda, a interação entre *Ca. L. asiaticus* e o CTV, que geralmente ocorre em plantas com HLB, e não encontraram nenhum efeito sinérgico entre os dois patógenos, neste trabalho.

O controle da doença se resume na redução de fontes de inóculo, ou seja, na erradicação total das plantas doentes e substituição por mudas saudáveis, além do controle químico dos vetores (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). Ressalta-se ainda

que é necessária a eliminação da murta (*Murraya paniculata*), planta ornamental hospedeira tanto do inseto transmissor quanto da bactéria causadora do HLB (LARANJEIRA et al., 2005).

Relatórios revelaram que em 2013 foram erradicadas 3,5 milhões de plantas com sintomas de HLB, no Estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2014). Gottwald; Da Graça; Bassanezi (2007) observaram que se medidas de manejo da doença não forem aplicadas, o HLB poderá comprometer a maioria dos pomares, tornando-os inviáveis economicamente entre sete e dez anos após o aparecimento da primeira planta com sintomas. Em pomares de até quatro anos, ou seja pomares jovens, esse tempo pode ser ainda menor, podendo chegar a plantas economicamente inviáveis, em apenas cinco anos.

2.3 Transformação genética de citros

Apesar de muito empregado, o melhoramento genético clássico esbarra em inúmeros problemas nas espécies de citros. Alta heterozigose, poliembrião, apomixia, auto-incompatibilidade, esterilidade de pólen ou do óvulo e período juvenil muito longo, são entraves que retardam ou ainda limitam a obtenção de novas cultivares (MOORE; JACANO; NEIDIGH, 1992). Segundo Cervera et al. (2008) e Dutt e Grosser (2009) as principais cultivares de citros em todo o mundo, são oriundas de seleções, cruzamentos ou mutações somáticas espontâneas. Contudo, o emprego de técnicas de transformação genética e biotecnologia, oferecem vantagens sobre o melhoramento genético convencional. Além de evitar a segregação genética e manter as características agronômicas de cultivares comerciais, podem transpor as barreiras características da cultura, permitindo a introdução de características desejáveis a um genótipo, aumentando a variabilidade genética e incentivando combinações do germoplasma não explorado (GHORBEL et al., 1999).

Desde o primeiro relato de transformação genética de *Citrus*, realizado por Kobayashi e Uchimiya (1989), pela introdução de DNA em protoplastos de laranja 'Trovita' (*C. sinensis*) via polietilenoglicol – PEG, grupos de pesquisa de diferentes países produtores de citros, como o Brasil (BOSCARIOL et al., 2003; CARDOSO et al., 2010; MIYATA et al., 2012), China (YU et al., 2002), Espanha (PEÑA et al., 1995; DOMÍNGUEZ et al., 2002; CERVERA et al., 2008), Estados Unidos (GROSSER;

GMITTER JUNIOR, 1990; FEBRES; LEE; MOORE, 2008), têm estudado a produção de plantas transgênicas com diversas espécies e híbridos.

São conhecidos diferentes métodos para obtenção de plantas transgênicas. Dentre eles, eletroporação de protoplastos (HIDAKA; OMURA, 1993; FLEMING et al., 2000; NIEDZ; McCKENDREE; SHATTERS, 2003), biobalística (YAO et al., 1996) e via *Agrobacterium tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990; ALMEIDA et al., 2003; BOSCARIOL et al., 2006; AZEVEDO et al., 2006a; BARBOSA-MENDES et al., 2009) que é hoje o método mais utilizado na transferência de genes em citros. Há relatos que cerca de 90% das plantas transgênicas de citros obtidas até hoje, foram produzidas pelo processo indireto via *A. tumefaciens* (GONG; LIU, 2013).

A transformação genética mediada por *A. tumefaciens* pode ser realizada com vários tipos de explantes. A escolha do explante deve ser de acordo com sua capacidade e eficiência de regeneração *in vitro* (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Desse modo, o tecido jovem, como os segmentos de epicótilo oriundos de sementes germinadas *in vitro* (MENDES et al., 2002; PEÑA et al., 2008; DUTT; VASCONCELLOS; GROSSER, 2011, DUTT et al., 2012), se destaca na transformação genética de citros. Entretanto, também são reportados trabalhos de transformação genética envolvendo tecido adulto (MOORE; JACANO; NEIDIGH, 1992; ALMEIDA et al., 2003; DEZOTTI et al., 2004; CERVERA et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2008; MARQUES; NOLASCO; LEITÃO, 2011; FÁVERO et al., 2012).

Para uma regeneração eficaz dos brotos transgênicos *in vitro*, é necessário o uso de protocolos eficientes. Para tal, Mendes et al. (2002) otimizaram e avaliaram a eficiência da transformação genética de laranja 'Hamlin' de acordo com as condições de incubação das plântulas, fonte de explantes, tempo de inoculação dos explantes com *A. tumefaciens* e condições de co-cultivo. Outro aspecto relevante é a suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais. Para o desenvolvimento de gemas em citros, a citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP) tem se mostrado muito eficiente (BOSCARIOL et al., 2006).

Genes de seleção são usados a fim de facilitar a seleção de transgênicos. Entre os genes de seleção utilizados em citros, tem-se o gene *npII*, que codifica a neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência ao antibiótico canamicina, presente no meio de cultura (DUTT; LEE; GROSSER, 2010). Assim, somente as células portadoras da neomicina fosfotransferase, ou seja, somente as células

transgênicas desenvolvem-se, por conseguirem metabolizar a canamicina presente no meio de cultura. Na tentativa de evitar problemas futuros de aceitação de produtos transgênicos no mercado, devido o uso de antibióticos, uma opção é a utilização do gene de seleção *manA*, que ao codificar a enzima fosfomanose-isomerase (PMI), permite a regeneração das células transformadas em meio de cultura contendo manose, dispensando o uso de antibióticos (BOSCARIOL et al., 2003).

Além da aplicação de genes de seleção, também são empregados no processo de transformação genética, genes repórteres. O gene repórter mais empregado em citros é o gene *uidA* que codifica a hidrolase β -glucuronidase (GUS) (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; MOORE; JACANO; NEIDIGH, 1992). Como alternativa, o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP - 'green fluorescent protein') isolado de *Aequorea victoria* também é muito usado, pois além de não ser um método destrutivo como o GUS, não necessita de co-fatores para emitir fluorescência (GHORBEL et al., 1999; FLEMING et al., 2000).

A introdução de genes de interesse agrônômico vem sendo realizada, buscando melhorias na produtividade da cultura. Wong et al. (2001) introduziram o transgene antisense *CS-ACS1* em plantas de citrange 'Carrizo' (*Citrus sinensis* L. Osb x *Poncirus trifoliata*) e *Poncirus trifoliata*, com o objetivo de inibir ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), precursor da biossíntese de etileno, uma vez que o controle da produção de etileno modifica a tolerância ao estresse abiótico em plantas. Com o objetivo de acelerar o florescimento de citros, Peña et al. (2001) transformaram plantas de citrange 'Carrizo' com os genes *LEAFY* ou *APETALA 1* que em plantas de *Arabidopsis thaliana* promovem o florescimento. As plantas obtidas produziram flores férteis e apresentaram o encurtamento da fase juvenil, florescendo mais cedo no primeiro ano e mantendo-se assim pelos anos consecutivos.

A maioria dos porta-enxertos de citros são intolerantes a salinidade ou ao déficit hídrico. Assim, diversos trabalhos reportam a transferência de genes relacionados ao ajuste osmótico ou estabilização de membrana. A prolina é considerada um importante osmoprotetor e seu acúmulo tem sido correlacionado à tolerância ao déficit hídrico. Molinari et al. (2004) transformaram plantas de citrange 'Carrizo' com um gene mutante da síntese de prolina que não limita a taxa biossintética deste aminoácido. Assim obtiveram plantas transgênicas que

apresentaram regulação osmótica superior e taxa fotossintética maior do que as plantas não transgênicas, após 15 dias de retenção de água.

Cervera et al. (2000) obtiveram plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' com o gene *hal2*, isolado de levedura, e estas apresentaram melhor tolerância ao estresse salino. Fu et al. (2011a) relataram que a superexpressão do gene *AhBADH*, clonado a partir de *Atriplex hortensis*, em plantas transgênicas de *P. trifoliata* levou ao aumento da tolerância ao estresse salino, o que pode ser correlacionado com os baixos níveis de peroxidação lipídica, proteção da maquinaria fotossintética e aumento da absorção de potássio.

2.4 Transformação genética de citros para resistência a doenças

A produtividade da cultura dos citros é afetada devido o elevado número de pragas e doenças (MACHADO et al., 2005). Estudos envolvendo a introdução de genes relacionados ao controle de doenças, tem resultado na redução de sintomas causados por bactérias (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010), fungos (MONDAL et al., 2012) e vírus (MUNIZ et al., 2012).

Várias estratégias estão relacionadas com a introdução de genes que interfiram no estabelecimento da doença como a utilização de genes que codificam proteínas relacionadas a patogênese (PR), genes que estimulam a defesa em plantas, genes maiores de resistência (R), genes que codificam para proteínas ou peptídeos antimicrobianos, genes relacionados a resistência derivada do patógeno (MOURÃO FILHO; STIPP; MENDES, 2010).

Os primeiros trabalhos visando resistência a vírus e viróides, como o CTV (*Citrus tristeza virus*) se basearam na resistência derivada ao patógeno, a partir da introdução de transgenes derivados de diferentes regiões do genoma do CTV. Gutiérrez, Luth e Moore (1997) introduziram o gene da capa protéica do CTV em quatro cultivares de citros, em trabalhos pioneiros. Ghorbel et al. (2000) introduziram o gene da capa protéica do vírus da tristeza em plantas de laranja azeda e otimizaram o protocolo de transformação genética, aumentando cerca de 50 vezes a eficiência de transformação genética em relação aos resultados obtidos por Gutiérrez, Luth e Moore (1997).

Ananthakrishnan et al. (2007) relataram uma redução de 5,2% na replicação do vírus da tristeza, em plantas transgênicas de pomelos. Em um estudo recente, foi verificado uma redução dos níveis de vírus do CTV, em plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin' e 'Valência', contendo o gene da proteína capsidial, em construção gênica tipo hairpin ou em construção gênica contendo uma região de 559 nt conservados do genoma CTV, indicando um bom potencial de resistência dessas plantas (MUNIZ et al., 2012, 2014).

Em relação ao cancro cítrico, causada pela bactéria *Xanthomonas citri*, Barbosa-Mendes et al. (2009) obtiveram plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' com o gene *hrpN*, que codifica a proteína harpina e está associada a hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida em plantas. Assim observaram que as plantas expressando o gene *hrpN*, exibiram maior tolerância a *X. citri*, com uma redução de até 79% na severidade da doença em alguns casos. Mendes et al. (2010) utilizaram o gene de resistência, *Xa21*, isolado de arroz selvagem (*Oryza longistaminata*) e verificaram plantas de laranja doce que apresentaram suscetibilidade reduzida ao cancro cítrico.

Com uso do gene *NPR1* relacionado à ativação da resistência sistêmica adquirida, Zhang et al. (2010) demonstraram que plantas transgênicas contendo o gene *NPR1* quando desafiadas com *X. citri* se mostraram menos suscetíveis ao cancro cítrico. A partir de calos embriogênicos de laranja doce 'Anliucheng', Fu et al. (2011b) utilizando o gene da biossíntese da poliamina, *MdSPDS1*, desencadeador da resposta de hipersensibilidade ou da ativação de genes de defesa em plantas, mostraram redução da suscetibilidade ao cancro cítrico em relação às plantas selvagens.

A resposta de hipersensibilidade (RH) é uma defesa comum da planta em resposta a infecção causada por agentes patogênicos. A RH causa morte celular rápida em torno do ponto de infecção evitando o alastramento sistêmico da doença (YALPANI et al., 1991). A partir desse conceito, Azevedo et al. (2006a) obtiveram uma significativa redução nos sintomas de gomose ao transformarem plantas de limão 'Cravo' com o gene *bO* (bacterio-opsin) para controle de *Phytophthora nicotianae*.

Em outro estudo, a proteína de tomate *PR-5* foi introduzida em laranja doce 'Pineapple', visando controle de *Phytophthora citrophthora*. Nove plantas foram regeneradas e em algumas linhagens foi detectado aumento à tolerância à doença

(FAGOAGA et al., 2001). Dois clones transgênicos de limão (E-23 e E-24), contendo o gene *chit42* de *Trichoderma harzianum*, mostraram desenvolvimento significativamente menor de lesões, após a inoculação com *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em citros (DISTEFANO et al., 2008).

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas produzidas por vários organismos, como um componente essencial de resposta imunológica. São responsáveis pela defesa do hospedeiro, seja ele inseto, anfíbio, mamífero ou planta, pelo colapso da membrana plasmática do patógeno infeccioso (ZANETTI, 2004; PUSHPANATHAN; GUNASEKARAN; RAJENDHRAN, 2013). A especificidade dos peptídeos antimicrobianos é dependente da interação preferencial dos peptídeos com as células de infecção, o que lhes permite reconhecer células-alvo específicas (PUSHPANATHAN; GUNASEKARAN; RAJENDHRAN, 2013).

Peptídeos como as atacinas, atuam contra bactérias Gram-negativas, ao passo que as defensinas são ativas contra bactérias Gram-positivas e cecropinas detêm a capacidade de ação contra ambos os tipos. A maioria dos peptídeos antimicrobianos interfere na síntese ou atuam na desintegração da membrana plasmática bacteriana. Essa atuação possivelmente está relacionada com interação eletrostática dos peptídeos com as moléculas carregadas negativamente presentes na membrana ou ainda alguns peptídeos podem estar relacionados com a desativação de alguma proteína bacteriana de maneira estereoespecífica (OTVOS JUNIOR, 2000). Cary et al. (2000) transformaram com sucesso plantas de tabaco com o gene que codifica um peptídeo antimicrobiano *D4E1* para controle do crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Verticillium dahliae*, que depreciam culturas como algodão, milho e amendoim, evidenciando que os peptídeos também exercem atividade contra fungos patogênicos, apesar de agirem principalmente contra bactérias.

Seis atacinas isoladas foram divididas em dois grupos de acordo com a composição de aminoácidos e sequências amino-terminais. As atacinas A, B, C e D constituem um grupo básico e as atacinas E e F um grupo neutro-ácido. Trabalhos têm demonstrado que os genes codificantes desse peptídeo podem ser isolados de insetos como *Drosophila melanogaster* e *Trichoplusia ni* – *attA* (ASLING; DUSHAY; HULTMARK, 1995; KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996) e *Hyalophora cecropia* L. – *attE* (SUN et al., 1991).

Estudos da atividade antimicrobiana das atacinas *Escherichia coli*, apontaram alterações na permeabilidade da membrana plasmática externa (ENGSTRON et al., 1984), evidenciando a ação das atacinas. Também foi demonstrado, em estudos de Carlsson et al. (1991, 1998) que as atacinas promovem indução de várias proteínas relacionadas ao estresse biótico e que detêm a capacidade única de interferir especificamente na síntese de proteínas de membrana externa sem penetrar a membrana interna ou citoplasma. Após a elucidação do mecanismo de ação das atacinas, a utilização de genes codificadores para estas proteínas tornou-se um atrativo para a transformação genética de plantas visando resistência ou tolerância a doenças de importância econômica. Norelli et al. (2000); Reynoird et al. (1999) após inserirem o gene codificante da *AttE* em maçã e Pera, constataram redução dos sintomas causados por *Erwinia amylovora*, bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, agente causal do fogo bacteriano em ambas as culturas.

Boscariol et al. (2006) relataram uma redução significativa na suscetibilidade ao cancro cítrico em sete das oito linhagens de plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' expressando o gene *attA*. Plantas transgênicas de laranjas 'Natal', 'Pera' e 'Valência', também expressando o gene *attA*, evidenciaram redução da suscetibilidade ao cancro cítrico (CARDOSO et al., 2010). Tavano (2013) mostrou que o gene *attA* foi transcrito no tecido vascular de plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin', 'Valência', 'Pera' e 'Natal'. Plantas transgênicas dessas mesmas quatro cultivares e controles não transgênicos, foram inoculados com ramos infectados por HLB, via enxertia. Cinco linhagens transgênicas de laranjeira 'Pera', que expressam o gene *attA*, apresentaram concentrações de *Ca. L. asiaticus* significativamente inferiores às das plantas não transgênicas (FELIPE et al., 2013).

Em relação a resultados em longo prazo, foi investigada a estabilidade de expressão e efeito da resistência adquirida ao fogo bacteriano em plantas de maçã 'Galaxy' transformadas com o gene da *attE*, e há 12 anos cultivadas em campo. A estabilidade de expressão do gene não afetou a forma do fruto, tamanho, acidez, firmeza, peso, nível de açúcar, morfologia da árvore, estrutura foliar, morfologia flor ou cor quando comparadas com plantas controle (BOREJSZA-WYSOCKA et al., 2010).

As atividades das atacinas não estão relacionadas apenas a bactérias. Mondal et al. (2012), obtiveram redução dos sintomas de verrugose, doença

causada pelo fungo *Elsinoë fawcettii* ao estudarem plantas transgênicas de pomelo 'Duncan' com o gene da *attE*.

2.5 Promotores tecido-específicos em citros

Rotineiramente, a expressão dos genes introduzidos em plantas modificadas geneticamente é conduzida por promotores constitutivos, que permitem a expressão do gene em toda a planta. Estes promotores podem ser isolados de diferentes fontes como vírus (vírus do mosaico da couve flor - CaMV) promotor 35S (ODELL; NAGY; CHUA, 1985); bactérias (*Agrobacterium tumefaciens*) promotor nopalina sintase NOS (BEVAN; FLAVELL; CHILTON, 1983) ou plantas (*Arabidopsis thaliana*) promotor Act 2 (AN et al., 1996).

Essa manifestação gênica em toda a planta pode não ser necessária. Além de acarretar aumento da carga metabólica da planta e influenciar em outros aspectos como crescimento, porte e produtividade da cultura (SINGER; HILLY; COX, 2011), a indução de transgenes em órgãos vasculares, é suficiente para expressar peptídeos que poderiam conferir resistência aos agentes patogênicos que infectam tecidos vasculares (GUO et al., 2004). Outra vantagem de expressão preferencial em vasos como o floema é a diminuição da expressão do transgene em outros tecidos (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004).

Assim, estudos com promotores tecido-específicos têm se tornado uma ferramenta interessante no direcionamento da expressão de genes. Segundo Truernit; Sauer (1995) a especificidade do promotor Suc 2, relacionada a proteína sacarose sintase, dirigiu a expressão do gene marcador *uidA* para o floema em todos os tecidos de *A. thaliana*, inclusive em raízes. Resultados semelhantes também foram verificados em tabaco e morango (IMLAU; TRUERNIT; SAUER, 1999; ZHAO; LIU; DAVIS, 2004). Outro promotor, o PP2, clonado a partir de *Cucurbita moschata* cv. 'Dunzi' associado à proteína de floema 2, direcionou a expressão gênica no floema em plantas de tabaco (GUO et al., 2004).

Azevedo et al. (2006b) utilizaram o promotor CsPP, clonado a partir do gene que codifica a enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) de citros, e observaram que esse promotor dirigiu a expressão do gene *uidA* (GUS), nos vasos do xilema e em células da epiderme de pecíolos em plantas transgênicas de tabaco e laranja 'Valência'. Esse mesmo promotor foi ainda usado para dirigir a expressão do gene

MB39 em vasos xilemáticos, visando a obtenção de plantas transgênicas resistentes a clorose variegada dos citros (PAOLI et al., 2007).

Em um estudo desenvolvido por Singer, Hily e Cox (2011) procurou-se isolar a sequência do promotor do homólogo SUC1 de *C. sinensis* e, posteriormente determinar sua capacidade de conduzir a expressão de um gene repórter no tecido floemático de plantas transgênicas. Foram identificados dois alelos separados da região SUC1 de *C. sinensis* que são capazes de dirigir a expressão específica em tecidos do floema em várias espécies de plantas. Myata et al. (2012) relataram a obtenção de plantas transgênicas de três cultivares de laranja doce com construções gênicas envolvendo o gene *uidA* com três promotores específicos de floema. Foi observada a expressão preferencial de GUS no floema impulsionado pelos promotores AtSUC2 (transportador de sacarose 2), AtPP2 (proteína de floema 2), clonados de *Arabidopsis thaliana* e CsPP2 (proteína de floema 2), clonado de *Citrus sinensis*.

Após a regeneração de plantas transgênicas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle) com a introdução do gene *uidA* (GUS), foram avaliados 4 promotores específicos de floema em citros: rolC promotor de *Agrobacterium rhizogenes*, RSS1, RTBV promotores de arroz, e AtSUC2 promotor de *Arabidopsis thaliana*. Os quatro promotores se mostraram eficientes em dirigir a expressão do gene. Apesar de os promotores AtSUC2 e RSS1 evidenciarem níveis baixos de expressão gênica em relação aos níveis de expressão obtidos por RTBV e rolC, promotores derivados de plantas, apesar de mais fracos, podem ser mais interessantes para futura comercialização de plantas transgênicas (DUTT et al., 2012).

Também foi avaliado o nível de expressão de cinco promotores, três tecido-específicos (AtSUC2, CsSUS, e WDV) e dois promotores constitutivos (2X35S e *bul409* S). Para tal, foi utilizado o gene repórter GUS, em plantas transgênicas do porta-enxerto híbrido trifoliata 'US-802'. Foi visto que, apesar da atividade da enzima GUS no floema ter sido maior utilizando o promotor constitutivo 35S, os promotores tecido específicos também dirigiram a expressão do gene *uidA* (GUS), mesmo em níveis menores (BENYON et al., 2013).

O gene *D4E1*, dirigido pelo promotor de *A. thaliana* (AtPP2) preferencialmente expresso no floema, foi introduzido em plantas de laranjas 'Pera' e 'Valência', via *A. tumefaciens*. Conforme os autores, através de análises da expressão do transgene,

os níveis de expressão variaram de 5 a 50 vezes de acordo com os eventos de transformação genética (ATTÍLIO et al., 2013).

Desse modo, acredita-se que plantas transgênicas de laranja doce, expressando genes que codificam peptídeos antibacterianos, com expressão preferencial no floema, é uma estratégia válida e viável para a obtenção de plantas resistentes ao HLB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos relatados nesse trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), na cidade de Piracicaba/SP.

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de frutos maduros de laranjas ‘Pera’ e ‘Natal’ (*Citrus sinensis*), coletados no Banco Ativo de Germoplasma, do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ em Cordeirópolis/SP, ou da coleção de plantas cítricas do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP em Piracicaba/SP.

Após serem lavadas, para a retirada da mucilagem, e secas à temperatura ambiente (24 h), as sementes foram selecionadas e o tegumento foi retirado. Depois deste processo, as sementes foram desinfestadas em solução de hipocloritode sódio (2,5%) e água na proporção de 2:1 (20 min), sob agitação constante. Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada estéril (3x), em condições assépticas, e foram introduzidas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), PhytigelTM (2,0 g L⁻¹) e pH ajustado para 5,8.

A fim de obter plântulas germinadas com epicótilo alongado, as sementes foram incubadas (27 °C), no escuro por 30 dias. Após este período, o material foi transferido para condições de fotoperíodo de 16 h de luz (15 dias). O epicótilo de plântulas com aproximadamente 10 cm de altura foi seccionado em segmentos (0,8 cm), em condições assépticas, para a obtenção dos explantes utilizados nos experimentos de transformação genética.

3.2 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.1 Construções gênicas

Neste trabalho, foram utilizadas três diferentes construções gênicas, contendo o gene atacina A (*attA*) não associado ao peptídeo sinal, dirigido pelos promotores

de floema AtSUC2 (pCAtSUC2/attA), AtPP2 (pCAtPP2/attA) ou CsPP2 (pCCsPP2/attA) (TAVANO, 2013), elaboradas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba/SP (Figura 1).

Figura 1 - Região de transferência (T-DNA) das construções gênicas utilizadas nos experimentos de transformação genética. a-c) Plasmídeos AtSUC2/pCambia2201, AtPP2/pCambia2201 e CsPP2/pCambia2201. *nptII*: gene de seleção. 35S-P: promotor constitutivo CaMV 35S; 35S-T: terminador; NOS-T: Terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita

3.2.2 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

Os isolados de *A. tumefaciens* (EHA 105) contendo os vetores de expressão pCAtSUC2/attA, pCAtPP2/attA e pCCsPP2/attA foram armazenados a -80 °C, em solução contendo glicerol (50%) e meio de cultura YEP (peptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹, cloreto de sódio 5 g L⁻¹, ágar 10 g L⁻¹), suplementado com canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (25 mg L⁻¹).

Para os experimentos de transformação genética, a suspensão bacteriana em estoque foi transferida para placas de Petri, contendo meio de cultura YEP sólido, suplementado com os antibióticos citados acima, e cultivada a 27 °C por 72 h. Após o crescimento das colônias, uma colônia isolada foi transferida para o meio de cultura YEP líquido, novamente suplementado com os antibióticos citados acima, e incubada em agitador orbital (28 °C; 180 rpm; 16 h). Em seguida, foi realizada a centrifugação da suspensão bacteriana (15 °C; 4800 rpm; 15 min), e o precipitado foi ressuscitado em meio de cultura MS (5 x 10⁸- 10⁹ UFC mL⁻¹).

3.2.3 Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*

Os explantes, oriundos de sementes germinadas *in vitro* de laranjas 'Natal' e 'Pera', foram inoculados com a suspensão bacteriana em placa de Petri (15 min). Posteriormente, os explantes foram retirados da suspensão bacteriana, secos em papel de filtro estéril, e transferidos para meio decultura de co-cultivo EME (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), suplementado com BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), acetoseringona (100 mM L^{-1}), sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}) e pH ajustado para 5,5. As placas foram incubadas a 24°C (3 dias), em ausência de luz.

3.2.4 Seleção, regeneração, enxertia *in vitro* e enraizamento das gemas adventícias desenvolvidas

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos, em condições assépticas, para meio de cultura de seleção EME, suplementado com BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), ácido ascórbico (50 mg L^{-1}), canamicina (100 mg L^{-1}), cefotaxima sódica (500 mg L^{-1}), pH ajustado para 5,8 e incubados a 27°C (15 dias) em ausência de luz. Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias.

Logo após o desenvolvimento das gemas adventícias, estas foram isoladas dos explantes, enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo' e incubadas a 27°C , sob o fotoperíodo de 16 h de luz, para pegamento da enxertia e desenvolvimento das plantas. Brotos pouco desenvolvidos, que não apresentavam condições para a enxertia, como: ausência de no mínimo dois pares de folhas, não-desenvolvimento do caule e aparência oxidada, foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS sólido, suplementado com ácido indol-3-acético (500 mg L^{-1}) e ácido naftalenacético (500 mg L^{-1}), na tentativa de favorecer o desenvolvimento de plântulas. O material foi incubado a 27°C , sob o fotoperíodo de 16 h de luz e subcultivados a cada 15 dias.

3.2.5 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR

Após o desenvolvimento das plantas, foi realizada a identificação de plantas contendo o gene da atacina A (*attA*), pela análise de PCR. A extração do DNA total foi realizada a partir de folhas jovens, pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990).

Para as análises de PCR, utilizaram-se os *primers*: *Att-F* (5' ACATGTCCCGTTATTTGGTCTTTGAA 3') e *Att-R* (5' GGTCACCTACCACTTATTACCAAAGAC 3'). A reação consistiu do programa: 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30s, 52 °C por 30s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 4 min. Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese, para a visualização de um fragmento de 725 pb, correspondente ao gene *attA*. Para tal, os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose (1%) a uma voltagem de 70 V. O gel, corado com brometo de etídio (0,5 ug/ml), foi visualizado e fotografado em luz UV, com auxílio do equipamento EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

Plantas enxertadas e plantas não enxertadas, identificadas como transgênicas, foram transferidas para vasos plásticos, contendo substrato não autoclavado, incubadas a 27 °C, sob o fotoperíodo de 16 h de luz em condições de alta umidade relativa. Após um período de aproximadamente 50 dias e desenvolvimento de novas folhas, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, certificada para cultivo de plantas transgênicas (ESALQ/USP).

3.3 Caracterização molecular

3.3.1 Confirmação da transgenia por análise de *Southern blot*

Para as análises de *Southern blot*, foram utilizadas plantas identificadas previamente como transgênicas, pela análise de PCR e também plantas não transgênicas, submetidas ao processo de transformação genética, via *A. tumefaciens*, utilizadas como testemunhas. Para tal, foram selecionadas plantas de laranja doce transgênicas das cultivares 'Pera' e 'Natal' com as três construções gênicas utilizadas, pCAtSUC2/*attA*, pCAtPP2/*attA* e pCCsPP2/*attA*, conforme disponibilidade de tecido vegetal para extração de DNA. O DNA total foi extraído de folhas jovens (1,4 g) pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e quantificado por fluorimetria (QuantiiT DNA Assay - Invitrogen, Carlsbad, USA). Após a quantificação, 6-30 µg de DNA foram incubados com as enzimas *BamHI* (construção gênica pCAtSUC2/*attA*) ou *HindIII* (construções gênicas pCAtPP2/*attA* e pCCsPP2/*attA*), para digestão. As enzimas utilizadas, digerem o T-DNA em um único local, fora da sequência do gene *attA*. Para a digestão, utilizou-se cinco unidades de enzima por

µg de DNA. A reação de digestão foi realizada por 16 h, a 30 °C (*BamHI*) ou 37 °C (*HindIII*).

Após a digestão, os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), a uma voltagem de 35V, por 16 h. Posteriormente, o gel foi submetido à lavagem em tampões apropriados de acordo com o protocolo (SOUTHERN, 2006) e transferidos por capilaridade para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N+' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Em seguida a membrana foi fixada a 80 °C (2 h). Para hibridização, foram utilizados 150 ng de sonda marcada com a enzima fosfatase alcalina ('AlkPhos Direct Labelling Reagents', GE Healthcare), para a detecção do gene *attA*.

A reação de detecção foi realizada com auxílio do kit 'CDP - Star™ Detection Reagent' (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi introduzida no cassete fotográfico (Hypercassette™ - Amersham Life Science) com uma chapa fotográfica (Hyperfilm™ MP - GE Healthcare), por um período de 1h e 30 min. Após o tempo de exposição previsto, a chapa fotográfica foi revelada com auxílio do revelador e reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA) (4 min), lavada em água, para reduzir o excesso de reagente (1min), em seguida incubada em solução fixadora e reforçadora Kodak GBX (14 min), seguindo-se de nova lavagem em água (1 min). A chapa foi seca em temperatura ambiente (5 min).

3.3.2 Avaliação da expressão do gene *attA* pela análise de RT-qPCR

As análises de RT-qPCR foram realizadas para as mesmas plantas transgênicas identificadas pela análise de PCR e validadas pela análise de *Southern blot*. Também foi incluída na análise, uma planta não transgênica e uma planta transgênica contendo o gene *attA* sob o controle do promotor 35S (BOSCARIOL et al., 2006). Com o uso do produto comercial TRIzol (Invitrogen), o RNA foi extraído a partir da nervura principal das folhas, conforme indicações do fabricante. O RNA foi purificado (RNA easy Plant Mini Kit - Qiagen, Hilden, Germany) e tratado com DNase (RNase-Free DNase Set-Qiagen) de acordo com instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada, utilizando-se espectrofotômetro (NanoDrop® - Thermo Scientific, Wilmington, USA) e a pureza foi determinada pela razão de OD260/OD280 (1,80 - 2,00).

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA, 1 µl de *primeroligo* dT (10 µM), 1 µl de mix de dNTP (10 mM) e água destilada livre de RNase, para um volume final de 12 µL. A reação foi incubada a 65 °C (5 min) e depois acondicionada em gelo (3 min). Posteriormente, 4 µl de tampão First Strand (5x), 2 µl de DDT (0,1 M) e 1 µl de RNaseOUT (Invitrogen) foram adicionados a reação e esta foi incubada a 37 °C (2 min). Foi acrescido 1 µl da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) permanecendo a 37 °C (50 min). Para inativação da atividade enzimática, a reação foi incubada a 70 °C (15 min). Em seguida, as amostras de cDNA foram normalizadas para 2,5 ng mL⁻¹ e armazenadas a -20 °C.

A análise de RT-qPCR foi realizada no equipamento 7500 Fast™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) disponível no laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP). Foram utilizados dois genes de referência para analisar a expressão gênica do transgene *attA*, o gene *FBOX* (MAFRA et al., 2012), e o gene *ubiquitina* (BOAVA et al., 2011), utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes de referência *FBOX* e *ubiquitina*, e do gene *attA*, utilizados na análise de RT-qPCR

Gene	Sequência 5' - 3'F	Sequência 5' - 3'R
<i>FBOX</i>	TTGGAAACTCTTTCGCCAC	CAGCAACAAAATACCCGTG
<i>ubiquitina</i>	TTCGTCAGTTGACTAATCCT	GTTGCTGTGTTGACTGTG
<i>attA</i>	TCGTCACCAAGAACATGCCTGACT	AAGAATGGAGTGTTTGCCATGCCG

Para a reação, foram utilizados 10 µl do cDNA diluído (2,5 ng/µl), 0,6 µl do conjunto de *primers* (5 µM), 7,5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 1,9 µl de água isenta de nuclease em placa de 96 poços (0,1 ml; MicroAmp - Applied Biosystems). As amostras foram analisadas em triplicatas para cada planta e o gene analisado, incluindo amostras de plantas não transgênicas, nas condições de amplificação padrão, no modo FAST, de acordo com o programa: 1 ciclo de 20 segundos (95 °C), seguido de 40 ciclos de 3 segundos (95 °C) e 30

segundos (60 °C). Ao final da reação foi determinado o ponto de fusão médio dos amplicons, por meio da análise de Melting, que se deu submetendo as amostras a 95 °C (15 segundos), aquecendo-as gradativamente de 60 - 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,3 °C por segundo, e finalmente mantendo-as a 60 °C (15 segundos).

O valor do ciclo de quantificação (Cq) foi detectado para o gene alvo e para os dois genes de referência em cada evento de transformação. Os dados gerados durante a análise de RT-qPCR foram avaliados pelo software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Este software faz uma regressão linear para cada uma das curvas de amplificação e gera um valor de eficiência para cada reação, bem como um rendimento médio para cada gene. Após este cálculo, os dados Cq produzidos através da análise RT-qPCR foram inseridos no software GenEx, versão 5.3.6.170 (KUBISTA et al., 2006) e o cálculo da expressão gênica foi realizado, pelo método comparativo, usando a seguinte fórmula de quantificação relativa: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os genes *FBOX* e *ubiquitina* foram utilizados como genes de referência, para a normalização da expressão gênica. Como calibrador, foi utilizada a planta de menor expressão, ou seja, a planta com maior valor de Cq.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação genética

A partir de segmentos de epicótilo das cultivares 'Natal' e 'Pera', foram realizados 45 experimentos de transformação genética, com as construções pCAtSuc2/*attA*, pCAtPP2/*attA* e pCCsPP2/*attA*, sendo 22 experimentos com laranja 'Natal' e 23 experimentos com laranja 'Pera'.

De acordo com a Tabela 2, para laranja 'Natal', utilizando-se a construção gênica pCAtSuc2/*attA*, foram realizados 13 experimentos de transformação genética com a introdução de 4.890 explantes. Nestes experimentos, foram obtidos 273 explantes responsivos que resultaram no desenvolvimento de 48 plantas. Após a análise de PCR, foram identificadas 7 plantas transgênicas contendo o gene *attA*, com eficiência de transformação genética de 0,14%.

Em relação à construção gênica pCAtPP2/*attA*, 7 experimentos foram conduzidos e 3.223 explantes de laranja 'Natal' foram introduzidos. Destes, 152 foram responsivos. Houve a formação de 46 plantas e após análise por PCR, 17 apresentaram o gene *attA*, resultando em uma eficiência de transformação genética de 0,52% (Tabela 2).

Foram realizados três experimentos de transformação genética com a construção gênica pCCsPP2/*attA*, para laranja 'Natal', tendo sido introduzidos 1.646 explantes, dos quais 112 se mostraram responsivos, que resultaram no desenvolvimento de 27 plantas. Após análises de PCR, 12 plantas transgênicas foram identificadas, o que resultou em uma eficiência de transformação genética de 0,72% (Tabela 2).

Tabela 2 – Experimentos de transformação genética de *C. sinensis* cv. 'Natal' com as construções gênicas pCAtSUC2/attA, pCAtPP2/attA e pCCsPP2/attA

construção gênica	experimentos	explantes responsivos/ total de explantes	plantas PCR+/ plantas avaliadas	eficiência de transformação (%) ^a
pCAtSUC2/attA	1	12/500	0/0	0
pCAtSUC2/attA	2	12/523	0/3	0
pCAtSUC2/attA	3	51/522	1/8	0,19
pCAtSUC2/attA	4	11/589	1/2	0,16
pCAtSUC2/attA	5	4/219	0/0	0
pCAtSUC2/attA	6	17/385	3/7	0,77
pCAtSUC2/attA	7	9/337	0/0	0
pCAtSUC2/attA	8	10/380	0/4	0
pCAtSUC2/attA	9	18/370	0/5	0
pCAtSUC2/attA	10	36/359	0/3	0
pCAtSUC2/attA	11	7/239	0/2	0
pCAtSUC2/attA	12	81/400	2/12	0,50
pCAtSUC2/attA	13	5/167	0/2	0
Total	13	273/4.890	7/48	0,14
pCAtPP2/attA	1	19/510	0/1	0
pCAtPP2/attA	2	17/610	0/0	0
pCAtPP2/attA	3	25/605	5/9	0,82
pCAtPP2/attA	4	6/566	0/0	0
pCAtPP2/attA	5	63/318	11/26	3,45
pCAtPP2/attA	6	15/316	1/7	0,31
pCAtPP2/attA	7	7/298	0/3	0
Total	7	152/3.223	17/46	0,52
pCCsPP2/attA	1	63/607	10/23	1,64
pCCsPP2/attA	2	31/505	1/2	0,19
pCCsPP2/attA	3	18/534	1/2	0,18
Total	3	112/1.646	12/27	0,72

^a Número de plantas PCR+(x100)/ número total de explantes introduzidos

Para laranja 'Pera', foram realizados 7 experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAtSUC2/attA, com a introdução de 2.870 explantes, dos quais 158 foram responsivos, resultando no desenvolvimento de 35 plantas. A análise de PCR identificou apenas 1 planta transgênica contendo o gene *attA*, apontando uma eficiência de transformação genética de 0,03% (Tabela 3).

Com a construção gênica pCAtPP2/*attA*, foram realizados 7 experimentos com um total de 2.764 explantes de laranja 'Pera' introduzidos, dos quais 257 foram responsivos e resultaram na formação de 98 plantas. Após análise de PCR, foram identificadas 18 plantas transgênicas, o que indicou uma eficiência de transformação genética de 0,65% (Tabela 3).

Já com a construção gênica pCCsPP2/*attA*, 8 experimentos com laranja 'Pera' foram conduzidos, com a introdução de 3.229 explantes. Destes 280 foram responsivos. Foram avaliadas por análises de PCR, 86 plantas regeneradas, sendo 10 plantas identificadas como transgênicas, contendo o gene *attA*, resultando em uma eficiência de transformação genética de 0,30% (Tabela 3).

Tabela 3 – Experimentos de transformação genética de *C. sinensis* cv. ‘Pera’ com as construções gênicas pCAtSuc2/*attA*, pCAtPP2/*attA* e pCCsPP2/*attA*

construção gênica	experimentos	explantos responsivos/ total de explantes	plantas PCR+/ plantas avaliadas	eficiência de transformação (%) ^a
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	1	13/560	0/0	0
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	2	18/464	0/0	0
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	3	12/326	0/4	0
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	4	28/420	0/9	0
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	5	25/392	0/8	0
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	6	29/340	1/5	0,29
pCAtSuc2/ <i>attA</i>	7	33/368	0/9	0
Total	7	158/2.870	1/35	0,03
pCAtPP2/ <i>attA</i>	1	4/300	0/0	0
pCAtPP2/ <i>attA</i>	2	6/605	0/0	0
pCAtPP2/ <i>attA</i>	3	31/519	0/5	0
pCAtPP2/ <i>attA</i>	4	0/147	0/0	0
pCAtPP2/ <i>attA</i>	5	82/393	12/34	3,05
pCAtPP2/ <i>attA</i>	6	71/395	3/32	0,75
pCAtPP2/ <i>attA</i>	7	63/405	3/27	0,74
Total	7	257/2.764	18/98	0,65
pCCsPP2/ <i>attA</i>	1	8/545	0/0	0
pCCsPP2/ <i>attA</i>	2	36/335	2/13	0,59
pCCsPP2/ <i>attA</i>	3	47/386	3/25	0,77
pCCsPP2/ <i>attA</i>	4	16/400	0/4	0
pCCsPP2/ <i>attA</i>	5	18/380	3/9	0,78
pCCsPP2/ <i>attA</i>	6	30/371	0/5	0
pCCsPP2/ <i>attA</i>	7	44/452	0/11	0
pCCsPP2/ <i>attA</i>	8	81/360	2/19	0,55
Total	8	280/3.229	10/86	0,30

^a Número de plantas PCR+(x100) / número total de explantes introduzidos

A respeito da eficiência de transformação genética, sabe-se que, em citros, é genótipo dependente. Esta diferença é atribuída principalmente a cultivar e sua afinidade com *A. tumefaciens* (MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; MIYATA et al., 2011). Plantas de citrange ‘Carrizo’ têm obtido as melhores médias de eficiência de transformação genética entre os genótipos de citros. Moore, Jacano, Neidigh (1992) e Peña et al. (1995) obtiveram as primeiras plantas transgênicas de citrange ‘Carrizo’, e desde então, estudos relatam até 80% de eficiência de

transformação genética para esse genótipo (YU et al., 2002; DUTT; GROSSER, 2009). Já *Citrus limonia* e *C. aurantium* estão entre os genótipos considerados recalcitrantes, com poucos resultados reportados (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; AZEVEDO et al., 2006a). Estudos desenvolvidos por Rodriguez et al. (2008) envolvendo laranja 'Pineapple' e laranja 'Navelina', mostraram que duas cultivares de mesma espécie (*C. sinensis*) apresentaram eficiências de transformação genética com diferenças expressivas entre si. Orbović, Dutt e Grosser (2011) em experimentos com pomelos 'Duncan' e 'Flame' e laranja 'Hamlin', apontaram que a idade das sementes, dentro de uma mesma safra de frutas, também pode exercer influência sobre o potencial de regeneração de plantas transgênicas.

Entre as cultivares de laranja doce cultivadas no Brasil, a laranja 'Hamlin' é a mais responsiva, com médias de até 18% de eficiência de transformação genética (BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2010). A laranja 'Pera', principal cultivar destinada ao mercado interno de fruta fresca e para a industrialização (PIO et al., 2005), é a menos responsiva. Schinor (2006) não obteve gemas transgênicas ao transformar plantas de laranja 'Pera' com o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (CTV), entretanto, obteve índices de 0,84% de eficiência de transformação genética para laranja 'Hamlin', utilizando construções contendo sequências do genoma CTV. Azevedo (2005) em estudos com laranjas 'Hamlin', 'Valência', 'Natal' e 'Pera', também relatou maior dificuldade em obter eventos transgênicos com as cultivares 'Natal' e 'Pera', que demonstraram médias de eficiência de transformação genética inferiores as médias obtidas com laranjas 'Hamlin' e 'Valência'.

Outro fator de influência significativa sobre a eficiência de transformação genética é a construção gênica utilizada. A maioria dos estudos com transgenes é conduzida com o uso de promotores de expressão constitutiva, caracterizados pela forte expressão em todos os tecidos das plantas (DOMÍNGUEZ et al., 2002; FAGOAGA et al., 2006). Para doenças como o HLB, uma estratégia interessante, é direcionar a expressão gênica através de promotores com expressão preferencial no floema, local de colonização do patógeno, evitando a expressão da proteína em todos os tecidos da planta (ZHAO; LIU; DAVIES, 2004). A introdução do gene atacina A em plantas transgênicas de citros, já se mostrou eficiente para redução da suscetibilidade de cultivares de laranja doce a *X. citri* (BOSCARIOL et al., 2006).

Recentemente, Tavano (2013) iniciou estudos relacionados ao uso dos promotores de expressão preferencial no floema, utilizando os promotores AtSuc2 (transportador de sacarose), AtPP2 (proteína de floema 2) clonados de *Arabidopsis thaliana*, e CsPP2 (proteína de floema 2) clonado de *Citrus sinensis*, contendo o gene atacina A (*attA*) em plantas de laranjas 'Hamlin', 'Valência', 'Natal' e 'Pera'. Abordou também o uso de uma construção gênica contendo o gene *attA* ligado a um peptídeo sinal (pCAtSuc2/*attA*-PS), sequência de 54 aminoácidos, responsável pela exportação da proteína para o apoplasto, o que não foi abordado no presente trabalho, visto que as bactérias do HLB são restritas ao floema, portanto intracelulares.

Entretanto, Tavano (2013) obteve um baixo número de eventos transgênicos para as cultivares 'Natal' e 'Pera', sendo uma única planta de laranja 'Natal' com a construção pCAtSuc2/*attA*, seis plantas de laranja 'Pera' (três plantas com a construção pCAtSuc2/*attA* e três plantas com a construção pCAtPP2/*attA*) e nenhum evento transgênico de laranjas 'Natal' e 'Pera' com a construção pCCsPP2/*attA*.

A fim de complementar estes estudos, para laranja 'Natal', obtivemos médias de eficiência de transformação genética entre 0,14% a 0,72%, de acordo com a construção gênica utilizada (Tabela 2). O maior índice de eficiência de transformação genética, para laranja 'Natal', foi verificado com a construção pCCsPP2/*attA* (0,72%). Miyata et al. (2012) também relataram maior eficiência de transformação genética com o promotor CsPP2, em plantas transgênicas de laranjas 'Hamlin' (6,08%) e 'Pera' (1,7%), contendo o gene *uidA* (GUS).

Em relação à laranja 'Pera', foram obtidas médias de eficiência de transformação genética menores do que as obtidas com laranja 'Natal', que variaram de 0,03% a 0,65%, dependendo da construção gênica estabelecida (Tabela 3). Azevedo (2005) verificou resultados próximos ao deste trabalho, com médias de 0,5% de eficiência de transformação genética em plantas transgênicas de laranja 'Pera', contendo o gene *cecropin* MB39. Barbosa-Mendes (2007) obteve médias de eficiência de transformação genética menores para laranja 'Pera' (2,7%) em relação a laranja 'Natal', em plantas transgênicas contendo o gene *hrpN* dirigido pelo promotor *Pgst1*. Boscariol et al. (2003) trabalhando com o sistema de seleção positiva PMI/manose, também obtiveram diferenças entre as duas cultivares estudadas, com médias de eficiência de transformação genética de 7,6% para laranja 'Pera' e 12,0% para laranja 'Natal'.

Médias mais eficientes, utilizando laranja 'Pera', foram alcançadas com a construção pCAtPP2/*attA*, dados que concordam com estudos de Tavano (2013) que também verificou melhores resultados de eficiência de transformação genética com a construção pCAtPP2/*attA*, porém com plantas de laranja 'Hamlin'. Em relação à construção pCAtSuc2/*attA*, foi verificado o menor índice de eficiência de transformação genética, para ambas as cultivares, sendo de 0,14% para laranja 'Natal' e 0,03% para laranja 'Pera'. Esses dados corroboram com os dados obtidos por Tavano (2013), onde a eficiência máxima de transformação genética para essa construção gênica foi de 1,1%, para laranja 'Hamlin', caracterizando esta construção gênica, menos eficiente em relação as outras duas construções gênicas utilizadas.

Attílio et al. (2013) obtiveram plantas transgênicas de laranja 'Pera', com a construção gênica *CaMV35S/D4E1* e relataram eficiência de transformação genética de 1,9%, ao utilizar segmentos de epicótilo e de 4,41% ao utilizar segmentos de hipocótilo associado ao cotilédone, o que indica ser uma boa alternativa, para aumentar a eficiência transformação genética de laranja 'Pera'.

Verificou-se ainda, que as cultivares 'Pera' e 'Natal' além de apresentarem baixa eficiência de transformação genética, também apresentaram alto número de brotos escapes, independente da construção genética utilizada. Esses números levaram à realização de um maior número de experimentos, com maior quantidade de explantes do que o previsto. Segundo Peña et al. (1995), os brotos regenerados não transgênicos (escapes) são um grande desafio da técnica de transformação genética. Moore, Jacano e Neidigh (1992) acrescentam que a regeneração de brotos escape sob seleção da canamicina, pode ocorrer e que pode ser possível que um pequeno número de bactérias sobreviventes inativem a canamicina presente no meio de cultura, protegendo assim as células da planta contra a infecção.

A Figura 2 representa as diferentes etapas do processo de cultivo dos explantes, a partir do explante inicial (Figura 2a) e regeneração de gemas adventícias em meio de seleção EME, suplementado com o regulador de crescimento BAP (Figura 2b-d). Brotos que obtiveram bom desenvolvimento (presença de pequenas folhas, desenvolvimento do caule, aparência clorofilada) foram enxertados *in vitro*, em plantas de citrange 'Carrizo', obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes (Figura 2e), incluindo brotos de laranja 'Pera', que mesmo considerada incompatível com citranges (POMPEU JUNIOR, 2005), não apresentaram incompatibilidade precoce após 10 meses da enxertia. Posteriormente

borbulhas dessas plantas serão coletadas e enxertadas em limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osb.) para propagação do material. Essa estratégia foi utilizada para melhor manejo e separação visual dos brotos, tendo em vista a característica morfológica de folhas trilobadas do citrange 'Carrizo'. As gemas que não alcançaram desenvolvimento para serem enxertadas, foram transferidas para meio de cultura MS sólido, suplementado com 500 mg L⁻¹ de AIA e 500 mg L⁻¹ de ANA, para o desenvolvimento de brotos ou enraizamento (Figura 2f).

Figura 2 - Transformação genética de *Citrus sinensis* com construções gênicas contendo o gene atacina A, sob o controle de promotores preferencialmente expressos no floema. a) explante inicial (segmento de epicótilo); b-c) desenvolvimento de gemas adventícias em segmentos de epicótilo cultivados em meio de cultura de seleção; d) detalhe das gemas adventícias desenvolvidas; e) enxertia *in vitro* em citrange 'Carrizo'; f) plantas enraizadas

Plantas de laranja 'Natal' e 'Pera', com aproximadamente dois pares de folhas, foram analisadas por PCR para a identificação de plantas transgênicas (Figura 2e-f). Fragmentos de 725 pb correspondentes ao gene da atacina (*attA*) foram amplificados, confirmando a introdução do transgene (Figura 3). Foram identificadas 65 plantas transgênicas de laranja 'Natal' e 'Pera' por análises de PCR,

sendo que em relação à laranja 'Natal', foram obtidas 17 plantas transgênicas com a construção pCAtPP2/*attA*, 12 plantas transgênicas com a construção pCCsPP2/*attA* e 7 plantas transgênicas com a construção pCAtSuc2/*attA*. Em relação à plantas transgênicas de laranja 'Pera', 18 plantas transgênicas foram obtidas com a construção pCAtPP2/*attA*, 10 plantas transgênicas com a construção pCCsPP2/*attA* e 1 planta transgênica com a construção pCAtSuc2/*attA*.

Plantas PCR+ foram aclimatizadas, a 27 °C, sob o fotoperíodo de 16 h, em condições de alta umidade, e em seguida, foram encaminhadas para casa de vegetação, onde foram transplantadas em vasos com cinco litros de capacidade.

Figura 3 - Amostra das análises de PCR realizadas com plantas regeneradas dos experimentos de transformação genética de laranja 'Natal' e 'Pera' com a construção gênica pCAtPP2/*attA*. M: Marcador de peso molecular 1 Kb; C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 2300 contendo o gene *attA*); C-: controle negativo (água); 1-5: plantas de laranja 'Natal'; 6-11: plantas de laranja 'Pera'; T: testemunha (planta não transgênica); Fragmento 725 pb correspondente ao gene *attA* (seta)

Contudo, algumas plantas não obtiveram sucesso durante o processo de aclimatização, e 8 plantas morreram. Dessas plantas, 4 eram da cultivar 'Natal' com a construção gênica pCAtPP2/*attA* e 4 eram da cultivar 'Pera' com a construção gênica pCCsPP2/*attA*. Assim, apesar de 65 plantas transgênicas, contendo o gene *attA*, terem sido identificadas por análises de PCR, apenas 57 plantas transgênicas estão vivas, devidamente aclimatizadas e estão sendo mantidas em casa-de-vegetação específica para o cultivo de plantas transgênicas. Até o momento, todas as plantas têm se desenvolvido adequadamente, não apresentando alterações fenotípicas quando comparadas a plantas não transgênicas.

4.2 Caracterização molecular das plantas obtidas

Plantas transgênicas, previamente identificadas por análise de PCR, aclimatizadas em casa-de-vegetação, com cerca de 10 a 12 folhas jovens, foram selecionadas e analisadas por *Southern blot*, para confirmar a integração do transgene e verificar o número de eventos de inserção no genoma das plantas obtidas. Do total de 65 plantas transgênicas (36 plantas 'Natal' e 29 plantas 'Pera'), foram selecionadas 19 plantas para análise de *Southern blot*. Isso se deu, devido à ausência de plantas em estágio de desenvolvimento adequado para a análise. Foram selecionadas 18 plantas de laranja 'Natal', sendo duas plantas com a construção gênica pCAtSUC2/attA (Figura 4c, colunas 1 e 2), quatro plantas com a construção gênica pCAtPP2/attA (Figura 5d, colunas 1 e 2; Figura 5e, colunas 1 e 2) e 12 plantas com a construção gênica pCCsPP2/attA (Figura 4a, colunas 1 a 6; Figura 4b, colunas 1 a 6). Para laranja 'Pera', foi analisada uma planta contendo a construção gênica pCAtPP2/attA (Figura 5f, coluna 1).

Através das hibridizações, é possível identificar os eventos de inserção do T-DNA no genoma das plantas analisadas (Figuras 4 e 5). Também pode ser notado que as plantas avaliadas apresentaram inserções de T-DNA em diferentes posições do genoma, indicando que as plantas foram obtidas em eventos independentes de transformação genética. Não foram observadas hibridizações nas amostras não transgênicas, utilizadas como testemunhas, em nenhuma das análises realizadas.

A transformação mediada por *Agrobacterium* é um processo aleatório, e a integração de um número definido de cópias do transgene não é possível (NAGAYA et al., 2005). Neste trabalho, houve variação de um a quatro eventos de inserção, sendo que a maioria das plantas analisadas apresentou um único evento de inserção. Este dado, corrobora com dados apresentados por Tavano (2013), que após análises de *Southern blot*, relatou 76% do total de plantas transgênicas contendo de um a dois eventos de inserção do transgene attA, dirigido pelos mesmos promotores preferencialmente expressos no floema, relatados neste trabalho. Resultados obtidos por Dutt et al. (2012), durante a avaliação de promotores específicos de floema, em plantas cítricas transgênicas, também verificaram uma variação de um a quatro eventos de inserção do transgene em análises de *Southern blot*.

Nota-se ainda que uma planta de laranja 'Natal' obtida com a construção gênica pCAtSUC2/attA (Figura 4c, coluna 2) não apresentou sinal de hibridização.

Isso pode ser atribuído a não integração do transgene no genoma da planta ou ainda alguma falha durante a análise.

Figura 4 - Análise de *Southern blot* de plantas de laranja 'Natal' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pCCsPP2/*attA* (a-b) e pCA_tSuc2/*attA* (c). C+: controle positivo (fragmento amplificado do gene *attA*; 0,725 kb). T: testemunha (DNA de planta de laranja 'Natal' não transgênica)

Figura 5 - Análise de *Southern blot* de plantas de laranja 'Natal' (d-e) e 'Pera' (f) obtidas a partir de experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAtPP2/*attA*. C+: controle positivo (fragmento amplificado do gene *attA*; 0,725 kb) T: testemunha (DNA de planta de laranja 'Natal' não transgênica (d-e) e DNA de planta de laranja 'Pera' não transgênica (f))

A análise da expressão do transgene foi verificada pela análise de RT-qPCR em 12 plantas, sendo 11 plantas de laranja 'Natal' (6 plantas contendo a construção gênica pCCsPP2/*attA*; 4 plantas contendo a construção gênica pCAtPP2/*attA* e 1 planta contendo a construção gênica pCAtSuc2/*attA*) e 1 planta de laranja 'Pera' (contendo a construção gênica pCAtPP2/*attA*), previamente analisadas por *Southern blot* (Figura 4a, colunas 1 a 6; 4c, coluna 2; 5d, colunas 1 e 2; 5e, colunas 1 e 2). A análise de RT-qPCR foi realizada nestas plantas, baseando-se no estágio de desenvolvimento das mesmas (folhas jovens). Para todas as plantas analisadas, foi possível detectar a expressão do transgene (Figura 6), inclusive na planta que não mostrou sinal de hibridização durante a análise pelo *Southern blot* (Figura 4c, coluna 2) e (Figura 6, coluna 12).

Segundo Thellin et al. (1999), o uso de genes de referência em análises de expressão gênica por RT-qPCR é necessário para garantir que a quantidade de cDNA seja igual em todas as amostras. Uma característica de genes de referência é estar presente em todas as células em quantidades similares. Neste trabalho, dois genes de referência, *FBOX* e *ubiquitina*, foram utilizados para analisar a expressão

do transgene por meio de RT-qPCR. O gene *FBOX*, foi selecionado de acordo com resultados de Mafra et al. (2012), que o apontaram como um dos genes de referência com expressão mais estável para citros, e o gene *ubiquitina* foi selecionado através de estudos de Boava et al. (2011). Attílio (2013) realizou análises de expressão gênica por RT-qPCR, com sucesso, em plantas transgênicas contendo o gene *D4E1*, utilizando os genes de referência *ubiquitina* e *ciclofidina*.

Neste trabalho, o nível de expressão do transgene em plantas transgênicas variou tanto em função da construção gênica, como também em plantas contendo a mesma construção gênica (Figura 6). Dutt et al. (2012) ao analisarem a expressão do gene *uidA*, associado a diferentes promotores de expressão preferencial no floema, também notaram diferença no nível de expressão gênica entre os promotores e observaram que os promotores derivados de plantas (*AtSuc2* e *Rs1*) foram menos eficientes, em relação a promotores clonados de vírus e bactéria. Tavano (2013) relatou que o nível de expressão do transgene varia em função do promotor utilizado, ao analisar níveis de expressão do gene *attA*, dirigido pelos promotores preferencialmente expressos no floema, aqui estudados.

A planta transgênica contendo o gene *attA*, dirigido pelo promotor constitutivo CAMV 35S (BOSCARIOL et al., 2006) (Figura 6, coluna P12-35S), mostrou nível de expressão gênica mais elevado que construções gênicas contendo o gene *attA*, dirigido por promotores de expressão preferencial no floema. Trabalhos envolvendo análises de expressão de genes dirigidos por promotores tecido-específicos e por promotores constitutivos (DUTT et al., 2012; TAVANO, 2013; ATTÍLIO, 2013) também reportam nível de expressão mais elevado em plantas transgênicas sob direção do promotor constitutivo CAMV 35S, quando comparadas a plantas transgênicas sob direção de promotores de expressão preferencial no floema. Isso é esperado, já que o promotor CAMV 35S é um promotor eficiente e constitutivamente expresso em citros (PEÑA et al., 1995; DUTT et al., 2011).

Foram verificados, níveis mais elevados de expressão do gene *attA*, em plantas transgênicas de laranja 'Natal', obtidas com a construção gênica pCCsPP2/*attA* (Figura 6, colunas 2 a 6), quando comparados aos níveis de expressão do gene *attA* em plantas obtidas com as construções gênicas pCA_tPP2/*attA* (Figura 6, colunas 7 a 10) e pCA_tSuc2/*attA* (Figura 6, coluna 12). Esse fato, pode ser explicado devido o promotor CsPP2 ter sido clonado de *C. sinensis*, aumentando a similaridade dos genes.

Figura 6 - Expressão do gene *attA* em plantas transgênicas de laranja 'Natal' e 'Pera'. P12-35S: planta de laranja 'Pera' contendo a construção gênica pCAMV 35S/*attA*; 1: planta de laranja 'Natal' utilizada como calibrador, contendo a construção gênica pCCsPP2/*attA*; 2 - 6: plantas de laranja 'Natal' contendo a construção gênica pCCsPP2/*attA*; 7-10: plantas de laranja 'Natal' contendo a construção gênica pCatPP2/*attA*; 11: planta de laranja 'Natal' contendo a construção gênica pCatSuc2/*attA*; 12: planta de laranja 'Pera' contendo a construção gênica pCatPP2/*attA*

Estudos de Felipe et al. (2013) indicaram que o gene *attA*, introduzido em plantas de laranja doce, pode reduzir a suscetibilidade em relação ao HLB. Avaliações futuras envolvendo o gene *attA*, dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, sem o uso do peptídeo sinal para dirigir o produto do gene para o espaço extracelular, tendem a resultados ainda mais promissores contra o HLB, devido a especificidade das construções gênicas. As plantas transgênicas contendo o gene *attA*, dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema obtidas neste trabalho, serão futuramente avaliadas para resistência a *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

5 CONCLUSÕES

Foram obtidas plantas transgênicas de *Citrus sinensis* cv. 'Natal' e 'Pera' contendo o gene *attA*, dirigido pelos promotores específicos de floema *Atsuc2*, *AtPP2* e *CsPP2* e a integração do gene *attA* no genoma das plantas transgênicas foi confirmada, pela análise de *Southern blot*.

A expressão do gene *attA*, foi confirmada pela análise de RT-qPCR.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissue of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerik, v. 164, n. 2, p. 203-122, 2003.
- AN, Y.Q.; MCDOWELL, J.M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E.C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R.B. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **Plant Journal**, Malden, v. 10, n. 1, p. 107–121, 1996.
- 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 and Developmental Biology - Plant**, Oxon, v. 43, n. 6, p. 593–601, 2007.
- ANDRADE, E.N. **Manual da citricultura: I parte – cultura e estatística**. São Paulo: Chácara e Quintais, 1933. 212 p.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. cap. 6, p. 125-145.
- ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; HULTMARK, D. Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 511-518, 1995.
- ATTÍLIO, L.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; HARAKAVA, R.; SILVA, T.L.; MIYATA, L.Y.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of sweet oranges with the *D4E1* gene driven by the AtPP2 promoter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 7, p. 741-747, 2013.
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (bO), cecropina e gus**. 2005. 76 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.M.J.; HARAKAVA, R.; GABRIEL, D.W.; LEE, R.F. GUS gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and ‘Valencia’ sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1623-1628, 2006a.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA, J.M.; GUIDETTI-GONZALEZ.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of rangpur lime (*Citrus limonia*) with the *bO* (Bacterio-Opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Report**. Dordrecht, v. 24, p. 185-196, 2006b.

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

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

BASSANEZI, R.B.; GIMENEZ-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A. Progresso da morte súbita dos citros no estado de São Paulo no período de 2002-2005. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, n. 1, p. 13-29, 2006.

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, 2006.

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

BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, A.S.; 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, p. 137-145, 2009.

BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; HISSANO, Z.; VIEIRA, L.G.E. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, p. 27-34, 2001.

BEVAN, M.W., FLAVELL, R.B. CHILTON, M.D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature**, London, v. 304, n. 1, p. 184–187, 1983.

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

BOREJSZA-WYSOCKA, E.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; MALNOY, M. Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period. **BMC Biotechnology**, London, v. 10, n. 1, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/10/41>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

BOSCARIOL, R.L.; ALMEIDA, W.A.B.; DERBYSHIRE, M.T.V.C; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 2, p. 122-128, 2003.

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, G.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C., CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. Attacin A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, 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. **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. cap. 2, p. 19-36.

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

BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo state: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, London, v. 59, p. 346-354, 2007.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília. EMBRAPA, SPI; CNPH, 1999.

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 Report**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 185–192, 2010.

CARLSSON, A.; ENGSTROM, P.; PALVA, E.T.; BENNICH, H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. **Infect Immunology Journal**, Washington, v. 59, p. 3040–3045, 1991.

CARLSSON, A.; NYSTROM, T.; COCK, H.; BENNICH, H. Attacin - an insect immune protein – binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 2179-2188, 1998.

CARY, J.W.; RAJASEKARAN, K.; JAYMES, J.M.; CLEVELAND, T.E. Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth *in vitro* and in planta. **Plant Science**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 171-181, 2000.

CERVERA, M.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, n. 1, p. 55-66, 2008.

CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plant with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 1, p. 26-30, 2000.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HAFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**. Basle: CIBA-GEIGY, 1975. p. 6-13.

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

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

DEZOTTI, D.F.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; TAKITA, M.A.; CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A. Obtenção de brotações adventícias *in vitro* de laranjas doces a partir de tecido adulto visando transformação para resistência ao cancro cítrico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBF, 2004. 1 CD-ROM.

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.

DONADIO, L.C., FIGUEIREDO, J.O., PIO, R.M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 228 p.

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

DOMINGUEZ, A.; MENDONZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen derived resistance to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2002.

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

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

DUTT, M.; LEE, D.H.; GROSSER, J.W. Biofunctional selection-reporter system for genetic transformation of citrus:mannose and kanamycin-based systems. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 46, n. 6, p. 467-476, 2010.

DUTT, M.; VASCONCELOS, M.; GROSSER, J.W. Effects of antioxidants on *Agrobacterium*-mediated transformation and accelerated production of transgenic plants of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 79-89, 2011.

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

ENGLER, A. Rutaceae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.). **Die Naturlichen Pflazzenfamilien**. 2. Aufl. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1931. v. 19, p. 187-199.

ENGSTRÖM, P.; CARLSSON, A.; ENGSTRÖM, A.; TAO, Z.J.; BENNICH, H. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**, London, v. 3, n. 13, p. 3347-3351, 1984.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MENDOZA, A.H.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Post-transcriptional gene silencing of the *p23* silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Molecular Biology**, Athens, v. 60, n. 2, p. 153–165, 2006.

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

FAO. Disponível em: <<http://faostat.org.br>>. Acesso em: 31 mar. 2014.

FÁVERO, P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of three sweet orange cultivars from explants of adult plants. **Acta Physiology e Plantarum**, Heidelberg, v. 34, n. 2, p. 471–477, 2012.

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 93-104, 2008.

FELIPE, R.T.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; LOPES, S.A.; MENDES, B.M.J.; BEHLING, M.; PEREIRA JUNIOR, E.V. Reaction of sweet orange cultivars expressing the attacin A gene to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 11, p. 1440-1448, 2013.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; DEL-BOSCO, S.; GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Berlin, v. 36, p. 450-455, 2000.

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

FU, X.Z.; AHSAN, U.K.; 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 trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf). **Environment Experimental Botany**, Oxford, v. 74, p. 106-113, 2011a.

FU, X.Z.; CHEN, C.W.; WANG, Y.; LIU, J.H.; MORIGUCHI, T. Ectopic expression of MdSPDS1 in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) reduces canker susceptibility: involvement of H₂O₂ production and transcriptional alteration. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2011b.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas>>. Acesso em: 02 fev. 2014.

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.

GHORBEL, R.; DOMÍNGUEZ, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, n. 17, p. 1183-1189, 2000.

GHORBEL, R.; JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Frankfurt, v. 99, n. 1/2, p. 350-358, 1999.

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.

GOTTWALD, T.R.; DA GRAÇA, J.V.; BASSANEZI, R.B. *Citrus* Huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2007. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/sub/php/review/2007/huanglongbing/>>. Acesso em: 07 fev. 2014.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 8, p. 339-374, 1990.

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

GUTIÉRREZ, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 11, p. 745-753, 1997.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo: Edição de Duprat; lobe Propaganda, 1987. 236 p.

HIDAKA, T.; OMURA, M. Transformation of citrus protoplasts by eletroporation. **Japan Social Horticultural Science**, Tokyo, v. 62, p. 371-376, 1993.

HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAK, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; OSHIMA, M.; MOTOYOSHI, F. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 40, p. 199-207, 1990.

IMLAU, A.; TRUERNIT, E.; SAUER, N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, n. 1, p. 309-322, 1999.

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>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

IWANAMI, T.; SHIMIZU, T.; ITO, T.; HIRABAYASHI, T. Tolerance of citrus mosaic virus in transgenic trifoliate orange lines harboring capsid polyprotein gene. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 1, p. 865-868, 2004.

JAGOEUX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 44, n. 1, p. 379-386, 1994.

KANG, D.; LUNDSTROM, A.; STEINER, H. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. **Gene**, Amsterdam, v. 174, p. 245-249, 1996.

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

KO, K.; NORELLI, J.L.; REYNOLDS, J.P.; BORESJZA-WYSOCKA, E.; BROWN, S.K.; ALDWINCKLE, H.S. Effect of untranslated leader sequence of *AMV RNA 4* and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 373-381, 2000.

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

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Washington, v. 2, p. 95-125, 2006.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. cap. 18, p.509-566.

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.

MABBERLEY, D.J. A classification of edible *Citrus* (*Rutaceae*). **Telopea**, Camberra, v. 7, p. 167-172, 1997.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI-YALI, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 158-172, 2011.

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

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, 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: IAC; FUNDAG, 2005. cap. 9, p. 221-277.

MAFRA, V.; KUBO, K.S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R.M.; BOAVA, L.P.; RODRIGUES, C.M.; MACHADO, M.A. Reference genes for accurate transcript normalization in *Citrus* genotypes under different experimental conditions. **Plos One**, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031263#pone-0031263-g004>>. Acesso em: 15 maio 2014.

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.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. 929 p.

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.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the Rice *Xa21* gene. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 59, p. 68-75, 2010.

MIYATA, L.M.; HARAKAVA, R.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B.; MOURÃO FILHO, F.A.A. GUS expression in sweet oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck) driven by three different phloem-specific promoters. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 31, n. 11, p. 2005-2013, 2012.

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

MOLINARI, H.B.C.; MARURA, C.J.; BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGG, M.; LEITE JUNIOR, R.P.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 1375-1381, 2004.

MONDAL, S.N.; DUTT, M.; GROSSER, J.W.; DEWDNEY, M.M. Transgenic citrus expressing the antimicrobial gene Attacin E (*attE*) reduces the susceptibility of 'Duncan' grapefruit to the citrus scab caused by *Elsinoë fawcettii*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, p. 391-404, 2012.

MOORE, G.A.; JACANO, C.C.; NEIDIGH, J.L. Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 5/6, p. 238-242, 1992.

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

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.; HARAKAVA, R.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; STACH-MACHADO, D.; REZENDE, J.A.M.; FEBRES, V.J.; MOORE, G.A.; MENDES, B.M.J. Reaction of transgenic *Citrus sinensis* plants to *Citrus tristeza virus* infection by *Toxoptera citricida*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 139, n. 1, p. 151-159, 2014.

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.; FREITAS JUNIOR, 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, n. 1, p. 162-166, 2012.

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

MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid Isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, San Francisco, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NAGAYA, S.; KATO, K.; NINOMIYA, Y.; HORIE, R.; SEKINE, M.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, Liverpool, v. 46, n. 1, p. 438-444, 2005.

NIEDZ, R.P.; McCKENDREE, W.L.; SHATTERS Jr., R.G. Eletroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) and regeneration of transformed plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Berlin, v. 39, p. 586-594, 2003.

NORELLI, J.L.; BORESZA-WYSOCKA, E.; REYNOIRD, J.P.; ALDWINCKLE, H.S. Transgenic 'Royal Gala' Apple expressing attacin *E* has increased field resistance to *Erwinia Amylovora* (Fire blight). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 2, n. 538, p. 631-633, 2000.

ODELL, J.T.; NAGY, F.; CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35 S promoter. **Nature**, London, v. 313, n. 1, p. 163-171, 1985.

ORBOVIĆ, V.; DUTT, M.; GROSSER, J.W. Seasonal effects of seed age on regeneration potential and transformation success rate in three citrus cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 262-266, 2011.

OTVOS JUNIOR, L. Antibacterial peptides isolated from insects. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v. 6, n.10, p. 497-511, 2000.

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

PARK, S.H.; YI, N.; KIM, Y.S.; JEONG, M.; BANG, S.; CHOI, Y.D.; KIM, J. Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 9, p. 2459–2467, 2010.

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

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

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZAPATER, M. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, London, v. 19, n. 3, p. 263-267, 2001.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; ROMERO, J.; BALLESTER, A.; SOLER, N.; PONS, E.; RODRIGUEZ, A.; PERIS, J.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Citrus. In: KOLE, C.; HALL, T.C. (Org.) **Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008. v. 5, p. 1-62.

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

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

PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. **International Journal of Peptides**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-15, 2013.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; BLUMER, S. Morfologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, 2005. cap. 5, p. 105-123.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, New Haven, v. 13, p. 62–66, 2003.

REINKING, O.A. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agricultural**, Los Baños, v. 8, p. 109-135, 1919.

REYNOIRD, J.P.; MOURGUES, F.; NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H.S.; BRISSET, M.N.; CHEVREAU, E. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 149, p. 23-31, 1999.

RODRÍGUEZ, A.; CERVERA, M.; PERIS, J.E.; PEÑA, L. The same treatment for transgenic shoot regeneration elicits the opposite effect in mature explants from two closely related sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) genotypes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n. 1, p. 97-106, 2008.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world: an illustrated guide**. Colorado: Sinclair International, 1990. 128 p.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética de *Citrus sinensis* L. Osb, com o gene da capa protéica 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.

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

SCHNEIDER, H. The anatomy of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v. 2, p. 1-85.

SCORA, R.W. On the history and origin of *Citrus*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lancaster, v. 102, n. 6, p. 369-375, 1975.

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

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

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

SUN, S.C.; LINDSTROM, I.; LEE, J.Y.; FAYE, I. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 196, p. 247-254, 1991.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley; Los Angeles: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.

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

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 1, p. 592–599, 2008.

TAVANO, E.C.R. **Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus Liberibacter spp.*** 2013. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

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

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

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 1-39.

WONG, W.S.; LI, G.; NING, W.; XU, Z.F.; HSIAO, W.; ZHANG, L.Y.; LI, N. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, n.1, p. 969–977, 2001.

YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; WILSON, T.M.A.; KLEIER, D.A.; RASKIN, I. Salicylic acid 1s a systemic signal and an Inducer of pathogenesis-related proteins in virus-Infected tobacco. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, n. 1, p. 809-818, 1991.

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 75, n. 1, p. 11–23, 2011.

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

YU, C.; HUANG, S.; CHEN, C.; DENG, Z.; LING, P.; GMITTER Jr., F.G. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 2, p. 93-109, 2002.

ZANETTI, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, Toronto, v. 75, n. 1, p. 39-48, 2004.

ZHANG, X.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIÉ, 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, n. 1, p. 91–100, 2010.

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