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

**Transformação genética de laranja doce com o gene codificador de
defensina de *Citrus sinensis*, sob controle dos promotores 35S
(*Cauliflower mosaic virus*) ou AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana*)**

Renata Beatriz Cruz

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

**Piracicaba
2015**

Renata Beatriz Cruz
Bióloga

Transformação genética de laranja doce com o gene codificador de defensina de *Citrus sinensis*, sob controle dos promotores 35S (*Cauliflower mosaic virus*) ou AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana*)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Cruz, Renata Beatriz

Transformação genética de laranja doce com o gene codificador de defensina de *Citrus sinensis*, sob controle dos promotores 35S (*Cauliflower mosaic virus*) ou AtSuc2 (*Arabidopsis thaliana*) / Renata Beatriz Cruz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
68 p. : il.

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

1. Huanglongbing 2. Citros 3. Transgenia 4. Defensina 5. Promotor específico de floema I. Título

CDD 634.31
C956t

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

*Aos meus pais, avô,
irmãos, cunhado e sobrinha
por todo amor e ajuda
durante a realização deste trabalho.*

DEDICO

*Ao meu querido companheiro
André Fernando Cleto
e ao meu amado filho
Fernando Cruz Assine Cleto
por todo incentivo,
amor incondicional e paciência.
Amo muito vocês!*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes, por todo apoio, orientação, confiança, paciência em me ouvir e sempre mostrar uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelos ensinamentos, dedicação e disponibilidade na colaboração sempre que por mim foi solicitada.

Ao Dr. Ricardo Harakava, por sempre esclarecer minhas dúvidas e pela colaboração inestimável.

Aos professores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP), pelo aprendizado e pela formação acadêmica.

A Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', pela oportunidade de cursar o mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas e ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), pela infraestrutura na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, pela amizade e convívio.

À querida Maria Solizete Silva, secretária do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP), pela amizade, ajuda, incentivo e profissionalismo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP): Eveline Tavano, Lígia Erpen, Bianca Aluisi, Lívia Mendes, Carolina Rossi, Isabela Barbeiro, Fabiana Muniz, Leonardo Soriano, Perla Silva e Tatiana Moraes. Obrigada pela força, por acreditarem em mim e por não terem me deixado desistir!

Ao amigo e técnico do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Marcelo Favareto Correa, pela amizade, constante ajuda e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP): Camila Heuser, Karina Salomão, Hilo de Souza, Mônica Rossi, pela convivência e em especial a Sylvia Silveira e Sandra Santa Rosa, pela motivação e ombro amigo sempre que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ/USP): André Fadel, Tatiane Loureiro, Luzia Miyata, Filipi Rodrigues, Meire Bassan, Perla Novais e Nathalia Ansante, pela amizade e convívio.

À amiga Dra. Liliane Sttip, do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ/USP), pela amizade e todo auxílio na realização dos experimentos.

Aos queridos amigos Elcio, Fernando e Cleusa, do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (CENA/USP), pela amizade e divertidas conversas sempre acompanhadas de um bom cafezinho.

Aos funcionários Inês e Paulo do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP), pela amizade e convívio.

Aos amigos do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP), principalmente, Sabrina, Rafaela, Naiara, Karina e Tânia, pela amizade, pelos momentos divertidíssimos e por me incentivarem sempre.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP), José Volpato, Éder Cintra e Davi Ulrich, pela dedicação e pelo auxílio na manutenção das plantas em casa-de-vegetação.

Ao amigo e funcionário Geraldo Brancalion do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP), pelo serviço de computação gráfica.

Aos funcionários da seção de Manutenção Geral (CENA/USP) especialmente Becão, Zé Marques, Douglas, Pimenta e Juscelino (Bombom), sempre prontos a ajudar, pelas risadas, enfim, vocês são parceiros!

Às bibliotecárias Eliana Garcia e Silvia Maria Zinsly, pelo auxílio durante a revisão deste material.

As amigas, Danielle Scotton e Thaísa Tessutti Pinheiro, pelos bons momentos compartilhados e apoio sempre.

A Suzineide Manesco, secretária do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), pela dedicação e auxílio.

As minhas amigas do coração, Juliana, Camila, Liz Mary, Cris, Fabrícia e Mari, pela cumplicidade, carinho e por estarem sempre presentes. Namastê!

À Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Muito obrigada!

*Feliz daquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”
(Cora Coralina)*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Aspectos gerais da citricultura.....	21
2.2 Huanglongbing	23
2.3 Transformação genética de citros	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Material vegetal	33
3.2 Construções gênicas utilizadas na transformação genética.....	33
3.3 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
3.3.1 Cultura e manutenção dos isolados de <i>A. tumefaciens</i>	34
3.3.2 Co-cultivo dos explantes com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.3.3 Seleção e desenvolvimento de gemas adventícias, enxertia e aclimatização..	35
3.4 Análises moleculares	36
3.4.1 Identificação de plantas transgênicas por análise da PCR	36
3.4.2 Análise de Southern blot	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Transformação genética.....	39
Tabela 1 - Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', com o gene <i>defensina</i> , dirigido pelo promotor AtSUC2 (pCAtSUC2/def)	41
Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', com o gene <i>defensina</i> , dirigido pelo promotor 35S (pC35S/def).....	42
4.2 Caracterização molecular das plantas obtidas	43
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	53

RESUMO

Transformação genética de laranja doce com o gene codificador de defensina de *Citrus sinensis*, sob controle dos promotores 35S (*Cauliflower mosaic virus*) ou AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana*)

A citricultura brasileira é a maior produtora e exportadora de citros e tem sido afetada por doenças que causam sérios prejuízos a produção e a qualidade dos frutos. No entanto, a cultura apresenta grandes problemas, entre eles, os fatores fitossanitários, que vem dizimando milhares de plantas e afetando a produtividade e a competitividade do setor. Atualmente, o Huanglongbing (HLB), associado às bactérias de floema *Candidatus Liberibacter* spp., é considerado uma das mais destrutivas doenças de citros. A inexistência de cultivares de laranja doce resistentes ao HLB torna a transformação genética de citros uma ferramenta importante no controle desta doença. Para se defender do ataque de pragas e patógenos as plantas desenvolveram, durante o processo evolutivo, uma série de mecanismos de defesa, no qual pode-se incluir a produção de peptídeos com atividade antimicrobiana. As defensinas vegetais são peptídeos pequenos relacionadas à patogênese (PR), que possuem atividade antimicrobiana associada aos mecanismos de defesa das plantas. Assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Valência' e 'Pera', via *Agrobacterium tumefaciens*, superexpressando o gene codificador de defensina (*def*), isolado de *Citrus sinensis* cv. 'Valência', dirigido pelo promotor com expressão preferencial no floema AtSUC2 (transportador de sacarose, clonado de *Arabidopsis thaliana*) ou pelo promotor constitutivo CaMV 35S (clonado do vírus do mosaico da couve-flor). Os explantes utilizados na transformação genética foram segmentos de epicótilo obtidos de plantas germinadas *in vitro*. A identificação das plantas transgênicas foi realizada por meio da análise da PCR, utilizando-se *primers* para a detecção do fragmento do gene de seleção *nptII*. As plantas PCR+ foram aclimatizadas e transferidas para casa-de-vegetação. A análise de *Southern blot* confirmou a integração do transgene em 36 plantas. Foram obtidas 7 plantas transgênicas da cultivar 'Hamlin', 9 da cultivar 'Natal', 1 da cultivar 'Pera' e 9 da cultivar 'Valência' contendo a construção gênica pC35S/*def*, e 3 plantas transgênicas da cultivar 'Hamlin', 6 da cultivar 'Natal' e 1 da cultivar 'Valência' contendo a construção gênica pcAtSUC2/*def*. Os resultados obtidos neste trabalho serão importantes para futura avaliação e estudo visando o controle de *Candidatus Liberibacter* spp..

Palavras-chave: Huanglongbing; Citros; Transgenia; Defensina; Promotor específico de floema

ABSTRACT

Genetic transformation of sweet orange with the gene that encodes *Citrus sinensis* defensin under the control of 35S (*Cauliflower mosaic virus*) or AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana*) promoters

The Brazilian citrus industry is the world's largest producer and exporter of citrus, however, it has been affected by diseases that cause serious production losses and damages to fruit quality. However, the culture faces problems, namely phytosanitary issues that have been damaging thousands of plants, affecting yield and competitiveness of the sector. Currently, Huanglongbing (HLB), associated with phloem bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., is considered one of the most destructive citrus diseases. The lack of sweet orange cultivars resistant to HLB makes genetic transformation an important tool in the disease control. To defend from pest and pathogen attack, plants developed a series of defense mechanisms during the evolutionary process, which may include the production of peptides with antimicrobial activity. Plant defensins are small peptides related to pathogenesis (PR) which have antimicrobial activities, associated with plant defense mechanisms. The objective of this study was to obtain transgenic plants of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) cultivars 'Hamlin', 'Natal', 'Valência' and 'Pera' with *Agrobacterium tumefaciens* overexpressing the defensin gene (*def*), isolated from *Citrus sinensis* cv. 'Valência', controlled by the promoter with preferential expression in the phloem AtSUC2, (sucrose transporter, cloned from *Arabidopsis thaliana*) or by the constitutive promoter CaMV 35S (cloned from the mosaic virus of cauliflower). The explants used in genetic transformation were epicotyl segments obtained from germinated plants *in vitro*. The identification of transgenic plants was accomplished by PCR analysis using primers for the detection of *npII* gene fragment. The PCR+ plants were acclimatized and transferred to greenhouse. The analysis of *Southern blot* confirmed the transgene integration in 36 plants. Seven transgenic plants were obtained for the cultivar 'Hamlin', nine for 'Natal', one for 'Pera' and nine for 'Valência' containing the gene construct pC35S/*def* and three transgenic plants for 'Hamlin', six for 'Natal' and one for 'Valência' containing the gene construct pcAtSUC2/*def*. The results obtained in this work are important for future evaluation of the plants for resistance to *Candidatus Liberibacter* spp..

Keywords: Huanglongbing; Citrus; Transgenic; *Defensin*; phloem-specific promoter

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas pCA _t SUC2/ <i>def</i> e pC35S/ <i>def</i> , utilizadas nos experimentos de transformação genética	34
Figura 2 - Transformação genética de <i>C. sinensis</i> com as construções gênicas pCA _t SUC2/ <i>def</i> e pC35S/ <i>def</i>	39
Figura 3 - Análise da PCR para detecção do fragmento do gene <i>nptII</i> , em plantas de laranja 'Hamlin', obtidas nos experimentos de transformação genética, com a construção gênica pCA _t SUC2/ <i>def</i>	41
Figura 4 - Análise da PCR para detecção do fragmento do gene <i>nptII</i> , em plantas de laranja 'Hamlin', obtidas nos experimentos de transformação genética, com a construção gênica pC35S/ <i>def</i>	42
Figura 5 - Análise de <i>Southern blot</i> de plantas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC35S/ <i>def</i> ou pCA _t SUC2/ <i>def</i>	43
Figura 6 - Análise de <i>Southern blot</i> de plantas de laranja 'Natal' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC35S/ <i>def</i> ou pCA _t SUC2/ <i>def</i>	44
Figura 7 - Análise de <i>Southern blot</i> de plantas de laranja 'Pera' e 'Valência' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC35S/ <i>def</i> ou pCA _t SUC2/ <i>def</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', com o gene <i>defensina</i> , dirigido pelo promotor AtSUC2 (pCAtSUC2/def)	41
Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', com o gene <i>defensina</i> , dirigido pelo promotor 35S (pC35S/def)	42

1 INTRODUÇÃO

Embora o Brasil seja o maior produtor de laranja doce e o segundo maior produtor de frutas cítricas do mundo, a produtividade dos pomares ainda é considerada baixa (FAO, 2014). Entre as principais causas de baixa produção estão os problemas fitossanitários como a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), a pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), a podridão floral (*Colletotrichum acutatum*), a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*), o cancro cítrico (*Xanthomonas citri*), a clorose variegada do citros (*Xylella fastidiosa*) e atualmente, o huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS, 2014; BASTIANEL et al., 2006; MATTOS JUNIOR et al., 2005; BOVÉ, 2006).

O huanglongbing (HLB) é uma doença associada a bactérias Gram-negativas, apresentando-se como um grave problema para a cultura, que leva a improdutividade das plantas (BELASQUE JUNIOR, et al., 2009). Até o momento, todas as espécies comerciais de citros são consideradas suscetíveis ao patógeno. As bactérias associadas à doença podem ser transmitidas por material de propagação contaminado ou pelos insetos vetores *Diaphorina citri*, presente na Ásia e América, e *Trioza erytreae*, presente na África (BOVÉ; AYRES, 2007).

Uma estratégia para contornar a agressividade desta doença é o desenvolvimento de novas cultivares resistentes ou tolerantes ao HLB. Neste sentido, técnicas de biotecnologia, como a transformação genética de plantas, aparecem como uma alternativa para a obtenção de novas cultivares possibilitando a mudança de características em uma única etapa (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Para se defender de ataques contra pragas e patógenos, as plantas desenvolveram durante seu processo evolutivo uma série de mecanismos de defesa, incluindo a produção de peptídeos com atividades antimicrobianas (VRIENS et al., 2014). Esses peptídeos podem ser expressos constitutivamente em tecidos reprodutivos e órgãos de armazenamento ou podem ser induzidos em determinadas situações e partes da planta, como folhas, durante o ataque de patógenos ou injúrias. Estruturalmente, apresentam números pares de cisteínas (4, 6 ou 8), que são ligadas por pontes dissulfeto, proporcionando uma elevada estabilidade aos peptídeos. De acordo com sua estrutura terciária são classificados em tioninas,

defensinas, proteínas de transferência de lipídeos, snakinas, heveínas e ciclotídeos (BROEKAERT et al., 1997).

As defensinas de plantas são peptídeos pequenos, com 45 a 54 resíduos de aminoácidos, altamente básicas, ricas em cisteínas, que apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes as das defensinas de insetos e de mamíferos (TERRAS et al., 1995). A maioria das defensinas foi isolada de sementes (OSBORN et al., 1995). No entanto, sua expressão também foi encontrada em diferentes tecidos, tais como folhas (TERRAS et al., 1995), frutos (MEYER et al., 1996), tubérculos (MORENO; SEGURA; GARCÍA-OLMEDO, 1994), raízes (SHARMA; LÖNNEBORG, 1996) e órgãos florais (GU et al., 1992; KRAGH et al., 1995).

Estudos relatam que as defensinas vegetais são componentes importantes de defesa do hospedeiro, tornando-se uma importante estratégia na produção de culturas transgênicas resistentes a patógenos (CHEN; LIU; ZOU, 2006; CONINCK et al., 2010; PENNINCKX, et al., 2003; THOMMA; CAMMUE; THEVISSSEN, 2002; WU et al., 2009). Desta forma, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi a obtenção de plantas transgênicas de cultivares de laranja doce, superexpressando o gene *defensina*, clonado da cultivar 'Valência', controlado pelo promotor específico para expressão gênica no floema AtSUC2 (transportador de sacarose, clonado de *Arabidopsis thaliana*) ou pelo promotor constitutivo CAMV 35S (clonado do vírus do mosaico da couve-flor), visando resistência a *Candidatus Liberibacter* spp..

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da citricultura

A história e origem geográfica dos *Citrus* foram formuladas e reportadas por diversos autores (BARRET; RHODES, 1976; SWINGLE; REECE, 1967; TANAKA 1977). A região mais antiga de cultivo do gênero *Citrus* (Linnaeus) compreende o Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanma, antiga Birmânia, havendo evidências de sua exploração no Sul da China há mais de 4.000 anos, daí dispersando-se em direção ao Sudeste, pelas Filipinas e ilhas do Pacífico (PASSOS; SOARES FILHO; SOBRINHO, 2013).

O cultivo dos citros se expandiu com o início do comércio e das guerras entre as nações, de modo que, na idade Média, a laranja foi levada pelos árabes para a Europa e, nos anos de 1500, mudas de frutas cítricas foram trazidas na expedição de Cristovão Colombo para o continente americano. No Brasil, a laranja foi introduzida logo no início da colonização, onde encontrou melhores condições para vegetar e produzir, comparado com as regiões de origem, expandindo-se por todo território nacional (NEVES et al., 2010). Em relação à laranja doce, relatos apontam sua introdução pelos portugueses, por volta de 1530, em São Paulo, e em 1549 na Bahia (HASSE, 1987).

A classificação das espécies de *Citrus* é controvertida e complexa, existindo vários sistemas de classificação, que variam principalmente, quanto ao número de espécies (NICOLOSI, 2007). Parte dessa complexidade se dá devido às características relacionadas à biologia reprodutiva da espécie e sua longa história de cultivo (SWINGLE; REECE, 1967). Dentre os sistemas taxonômicos propostos, os que mais se destacam são os formulados por Swingle e Reece (1967), que consideram 16 espécies, e o de Tanaka (1977), que propõe um total de 162 espécies (ARAÚJO; ROQUE, 2005).

Segundo os taxonomistas, as espécies do gênero *Citrus* pertencem à ordem *Geraniales*, família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*, tribo *Citreae*, subtribo *Citrineae*, possuindo mais cinco gêneros *Fortunella*, *Poncirus*, *Clymenia*, *Eremocitrus* e *Microcitrus*, que constituem, juntamente com o gênero *Citrus*, o grupo dos cítricos verdadeiros, por produzirem frutos semelhantes a laranja e ao limão (NICOLOSI, 2007; PASSOS; SOARES FILHO; SOBRINHO, 2013; SWINGLE, 1967). Barret e

Rhode (1976) estabeleceram que o gênero *Citrus* é formado por apenas três espécies biológicas básicas: cidra (*Citrus medica*), tangerina (*Citrus reticulata*) e toranja (*Citrus grandis*) (DONADIO; MOURAO FILHO; MOREIRA, 2005; MABBERLEY, 1997).

As plantas cítricas são cultivadas em todo o mundo, apresentando produção de aproximadamente 131 milhões de toneladas por ano. Os principais países produtores de citros são China, Brasil e Estados Unidos. Juntos estes três países respondem por mais de 50% da produção mundial de citros, incluindo, laranjas, limões, limas, tangerinas e pomelos (FAO, 2014).

O Brasil, que se destaca como o segundo produtor mundial de citros, com aproximadamente 22 milhões de toneladas por ano, apresenta pomares distribuídos por todo seu território, su'Pera'do apenas pela China, com cerca de 30 milhões de toneladas por ano (FAO, 2014). Em relação a área colhida, duas grandes regiões se sobressaem na citricultura brasileira, a Sudeste com 504.715 ha e a Nordeste com cerca de 124.890 ha. Na região Sudeste, o Estado de São Paulo se destaca com 455.000 ha, com ênfase para laranja doce destinada a exportação de suco concentrado, seguido por Minas Gerais com 43.020 ha. Na região do Nordeste, destacam-se os Estados da Bahia (63.134 ha) e Sergipe (52.544 ha) (IBGE, 2014).

Na maioria dos países produtores de frutas cítricas, as laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck) são predominantes, chegando a representar dois terços dos plantios comerciais (NEVES et al., 2006). Vale ressaltar também que o Brasil se destaca como o maior produtor de laranja doce do mundo, com cerca de 18 milhões de toneladas por ano (FAO, 2014). As principais cultivares de laranjas doces destinadas a produção de suco são "Pera", 'Valência', 'Natal' e 'Hamlin', e a principal cultivar de porta-enxerto utilizada é o limão 'Cravo'. O Brasil é o país que detém mais da metade da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% da sua produção (NEVES et al., 2010).

Os principais produtos industrializados obtidos a partir de frutas cítricas são os sucos, apresentados em diferentes níveis de concentração, e os subprodutos desse processamento, óleos, aromas e polpa. Outros produtos como, pectina, gomos de fruta em calda, geleias, doces em massa, xarope, licores, entre outros, também podem ser obtidos das frutas cítricas, embora com menor expressão comercial (MATSUURA; FOLEGATTI MATSUURA, 2013).

Ao longo do estabelecimento da citricultura no país, diversos problemas fitossanitários vêm atingindo os pomares, tornando a sua produtividade limitada, aumentando assim, o custo da produção. Isso acontece em razão da estreita base genética dos pomares, havendo um predomínio do emprego de copas de laranja ‘Pera’ e uma concentração ainda maior no uso do porta-enxerto limão ‘Cravo’ (FERREIRA et al., 2013).

Dentre as doenças que causam expressiva redução da produtividade de citros, podemos citar, a leprose dos citros, causada pelo vírus *Citrus leprosis virus* (CiLV), a tristeza dos citros, causada pelo vírus *Citrus tristeza virus* (CTV), a gomose, causada por patógenos do gênero *Phytophthora*, o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e atualmente, o huanglongbing (HLB), associado a bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (MATTOS-JUNIOR et al., 2005).

2.2 Huanglongbing

O huanglongbing (HLB) é considerado uma das mais destrutivas doenças de citros, e é responsável pelo declínio e morte de milhões de plantas em áreas de produção de citros em todo o mundo (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007; GOTTWALD, 2010). O HLB foi relatado pela primeira vez, na China, em 1919, cujo nome significa ‘doença do ramo amarelo’ e, atualmente, está disseminado nos cinco continentes (BOVÉ, 2006; REINKING, 1919). No Brasil, o HLB foi detectado pela primeira vez em 2004, no Estado de São Paulo, e desde então, a doença atingiu as maiores e principais regiões citrícolas, bem como os Estados de Minas Gerais e Paraná (COLLETA-FILHO et al., 2004; BELASQUE JUNIOR et al., 2009). A primeira constatação do HLB foi no Estado da Flórida/USA em 2005 (TEIXEIRA et al., 2005). Atualmente, a doença disseminou para outros Estados, como Texas e Califórnia (COLLETA-FILHO et al., 2014).

Estudos de microscopia eletrônica (GARNIER; DANIEL; BOVÉ, 1984) e biologia molecular (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994) revelaram que as bactérias associadas do HLB pertencem ao grupo das α -proteobactérias não cultivadas, conhecidas como Liberibacters. Essas bactérias, com crescimento restrito as células do floema, afetam todas as cultivares comerciais, causando perdas econômicas

substanciais na produtividade e qualidade dos frutos, diminuindo o tempo de vida das plantas infectadas (BOVÉ, 2006; COLETTA-FILHO et al., 2014).

O HLB é uma doença associada a três espécies de bactérias Gram-negativas, classificadas como: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), identificada na Ásia e América, *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf) presente na África e *Ca. Liberibacter americanus* (CLam) constatada no Brasil (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1994; LOPES et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2005). Mais recentemente, CLam, foi também relatada na América Central (GOTTWALD, T. R., 2010). O Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática atribuiu a denominação *Candidatus* antes do binômio latino devido ao insucesso do cultivo *in vitro* do patógeno (MURRAY; SCHLEIFER, 1994). O cultivo dessas bactérias foi relatado em meio de cultura, porém, pela falta de repetibilidade dos resultados, os postulados de Koch ainda não foram preenchidos para a confirmação destas espécies como agentes causais do HLB (SECHLER et al., 2009).

As *Ca. Liberibacter* spp. são distribuídas sistemicamente do local da infecção para toda planta pelo floema, ocorrendo de forma desigual nos diferentes tecidos, como folhas, raízes, flores e partes do fruto (pedúnculo, columela, e tegumento), não tendo sido detectadas no endosperma e embrião de sementes (TATINENI et al., 2008).

KIM et al. (2009) analisando anatomicamente as bactérias associadas ao HLB presentes no floema, verificaram que estas apresentam-se como células únicas, e por serem pequenas (2 µm de comprimento; 0,1 - 0,2 µm de diâmetro), podem passar livremente pelos elementos crivados, não formando agregados visíveis capazes de bloquear o floema. Entretanto, quando a planta é colonizada pela bactéria, observa-se que ocorre um aumento da expressão dos genes envolvidos com a síntese de proteína P e calose. Essas substâncias são depositadas nos poros da placa crivada, impedindo o transporte de fotoassimilados para órgãos-drenos como, folhas, flores, frutos e raízes (ACHOR et al., 2010; KIM et al., 2009; KOH et al., 2012). Com isso, ocorre o acúmulo de amido nos plastídeos, no parênquima vascular e em elementos do floema e pecíolo (KIM et al., 2009). Essas alterações contribuem para o desenvolvimento dos sintomas da doença, levando a perdas significativas na produção e até à morte das plantas infectadas. Estudos envolvendo o silenciamento de genes relacionados com a deposição de calose, seria uma

estratégia promissora para a redução da gravidade de sintomas do HLB, permitindo assim, o transporte de nutrientes pelo floema (MAFRA et al., 2013).

As bactérias associadas ao HLB podem ser transmitidas por meio de material vegetal infectado via enxertia, e naturalmente, pelos insetos vetores (psílídeos) *Diaphorina citri* e *Trioza erytreae* (BOVÉ, 2006). O psílídeo *D. citri* está presente na Ásia e América e transmite as bactérias CLas e CLam (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006). O psílídeo *T. erytreae* ocorre na África e está associado a bactéria CLam (BOVÉ; AYRES, 2007).

No Brasil, o inseto vetor das bactérias CLas e CLam, *D. citri* Kuwayama foi identificado em 1942 (COSTA-LIMA, 1942), o qual apresenta na fase adulta, coloração acinzentada, com manchas escuras nas asas e mede de 2 - 3 mm de comprimento. O psílídeo adquire a bactéria ao se alimentar de plantas contaminadas, geralmente brotações novas, onde também realiza a oviposição e as ninfas se desenvolvem. Entretanto, pode ser encontrado na face inferior de folhas maduras. Uma vez adquirida a bactéria, a transmissão ocorre por toda a vida do inseto (BOVÉ, 2006). Dependendo das condições de temperatura e umidade, o ciclo de vida do psílídeo dura de 15 - 40 dias. Este inseto está presente nos pomares o ano todo, porém sua população é aumentada durante a primavera e o verão, época de maior frequência de brotações. Todas as cultivares cítricas e a murta ou falsa-murta (*Murraya paniculata*), utilizada como espécie ornamental, são hospedeiras dessas bactérias (BELASQUE JUNIOR et al., 2009; FUNDECITRUS, 2014; GALLO et al., 2002).

O sintoma inicial da doença geralmente aparece em um ramo que se destaca pela presença de folhas de coloração amarelada, que recebe o nome de mosqueamento. Este é um sintoma foliar característico e os padrões são assimétricos nas duas partes da folha. As folhas também podem se tornar mais espessas, curvadas, escurecidas e apresentar tamanho reduzido (BOVÉ, 2006; BELASQUE JR, et al., 2009). Em estágios mais avançados, sintomas semelhantes aos de deficiência de zinco, seguidos pela queda de folhas e ramos podem ser observados (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). Em relação aos frutos, alterações morfológicas podem ser observadas, apresentando, tamanho reduzido, assimetria, maturação incompleta, coloração da casca irregular e sementes abortadas (BOVÉ, 2006; LARANJEIRA et al., 2005). Além de ocorrer a queda dos frutos, estes apresentam alterações na qualidade, como redução do peso, diâmetro,

quantidade de suco, teor de Brix e aumento de acidez. Todos esses sintomas comprometem a produtividade das plantas (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009).

Uma vez infectada, o tempo para que os sintomas de HLB apareçam na planta varia de acordo com o genótipo, o estado fisiológico, idade da planta, o local e intensidade de infecção e época do ano. Estudos com plantas sintomáticas para o HLB envolvendo expressão gênica demonstraram que os genes envolvidos em diversas funções celulares, incluindo o metabolismo de carboidratos, biogênese da parede celular, respostas ao estresse biótico e abiótico, sinalização e fatores de transcrição, transporte de fotoassimilados, organização celular, modificação e degradação de proteínas e a sinalização hormonal, sofrem alterações significativas após a infecção com as bactérias CLas e CLam (ALBRECHT; BOWMAN, 2008; ARITUA et al., 2013; MAFRA et al., 2013).

Considerando que, atualmente, o HLB é uma das doenças mais severas para a citricultura mundial, é de fundamental importância que o manejo adequado seja realizado, pela identificação e erradicação imediata das plantas infectadas, eliminando assim, fontes de inóculo nos pomares. Outras medidas de controle também são utilizadas como aquisição de mudas saudáveis, eliminação de plantas de murta (*Murraya paniculata*) e aplicação de inseticidas para o controle do psílídeo (BELASQUE JUNIOR et al., 2010, FUNDECITROS, 2014). Vale ressaltar, que as estratégias de manejo devem ser utilizadas em conjunto, uma vez que, adotando-as isoladamente, a chance de sucesso de controle da doença diminui. Dessa forma, com a rápida disseminação da doença, torna-se necessária a agregação de novas frentes de pesquisa, voltada para o desenvolvimento de plantas tolerantes ou resistentes ao HLB ou também repelentes ao inseto (BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

2.3 Transformação genética de citros

Um aspecto importante a ser considerado na citricultura é a alta incidência de problemas fitossanitários, que causam sérios prejuízos e aumentam os custos de produção. Uma alternativa para solucionar esses problemas, consiste na obtenção de cultivares resistentes ou tolerantes a pragas e doenças, por meio de programas de melhoramento genético. Assim, a incorporação de ferramentas biotecnológicas,

como a transformação genética, aumenta as chances de obtenção de novas cultivares de citros, pela introdução controlada de genes exógenos com características agronômicas desejáveis (ANAMI, 2013; DONMEZ et al., 2013; PEÑA, 1995; YANG et al., 2000).

O primeiro relato sobre transformação genética de citros ocorreu no final da década de 80, utilizando polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA exógeno em protoplastos de laranja doce (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). A partir de então, outros trabalhos envolvendo transformação genética em citros tem sido realizados em diversas espécies e híbridos (PEÑA et al., 2001; YU et al., 2002; BOSCARIOL et al., 2003; AZEVEDO et al., 2006; CERVERA et al., 2008; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; CARDOSO et al., 2010; MIYATA et al., 2011; MIYATA et al., 2012).

Com o desenvolvimento da cultura de tecidos e da engenharia genética, diferentes métodos de transformação genética de citros têm sido empregados, como a transformação de protoplasto, via polietilenoglicol (PEG) (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989; FLEMING et al., 2000; OMAR; GROSSER, 2008) ou eletroporação (FROMM; TAYLOR; WALBOT, 1985), a biobalística (YAO et al., 1996), além da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990; PEÑA et al., 1997; MENDES et al., 2002; MUNIZ et al., 2012; MYATA et al., 2012), que é hoje o método mais utilizado para a obtenção de plantas transgênicas de citros (ALMEIDA et al., 2003; DUTT; LEE; GROSSER, 2010; FEBRES et al., 2011; PEÑA et al., 1995; MACHADO et al., 2005).

Para a realização da transformação genética em citros via *A. tumefaciens*, são utilizados explantes provenientes de tecido juvenil, tais como segmentos de epicótilo, obtidos de sementes germinadas *in vitro* (MENDES et al., 2002; DUTT et al., 2012), segmentos de folhas, ramos (KHAN; FU; LIU, 2012), calos embriogênicos (BACHCHU et al., 2011) e suspensão celular (DUTT; GROSSER, 2010). Explantes coletados de tecido adulto, como segmentos internodais, também tem sido utilizados (CERVERA et al., 2008; FÁVERO et al., 2012; MARQUES; NOLASCO; LEITÃO, 2011; RODRÍGUEZ et al., 2008).

A técnica de transformação genética de citros via *A. tumefaciens* consiste em colocar o tecido vegetal em contato com a *Agrobacterium* contendo o gene de interesse. Após o co-cultivo, os explantes são cultivados em meio de cultura para regeneração, contendo antibiótico para eliminar as células de *Agrobacterium* e um

agente seletivo para inibir o crescimento das células não transformadas. Logo após a regeneração das gemas adventícias, via organogênese *in vitro*, é realizada a enxertia *in vitro*, sobre o porta-enxerto não transgênico proveniente de plântulas cultivadas *in vitro* (PEÑA et al., 2005; RODRÍGUEZ, et al., 2008; CERVERA, et al., 2008). Esta técnica é utilizada devido à dificuldade de enraizamento para a maioria das espécies de citros. As plantas transgênicas são então aclimatizadas e transferidas para a casa-de-vegetação para análises posteriores.

No processo de transformação genética, é essencial a presença de genes de seleção, como o *nptII* (que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II) que confere resistência ao antibiótico canamicina (AZEVEDO et al., 2006; BOSCARIOL et al., 2006; DUAN et al., 2010), assim como a utilização do genes repórteres que codificam proteínas de atividade enzimática cujo produto é facilmente detectável, e assim facilitam identificação da transgenia. Entre os genes repórteres mais utilizados estão o gene *uidA*, que codifica a enzima β -Glucuronidase (GUS) (JEFFERSON et al., 1987; PAOLI et al., 2007) e o gene *gfp*, que codifica a Green Fluorescent Protein (GFP) (CHALFIE et al., 1994; FOLIMONOV et al., 2007). Entretanto, mesmo com a presença dos genes de seleção, é muito comum ocorrer escapes. Estes escapes normalmente estão relacionados à proteção das células não transformadas ao agente seletivo pelas células transformadas adjacentes, e pela persistência da *A. tumefaciens* no tecido inoculado (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

O processo de obtenção de plantas transgênicas exige a elaboração de construções gênicas contendo promotor, gene de interesse e terminador. O promotor tem um papel importante na regulação da expressão gênica (DUTT et al., 2014), sendo caracterizado como a região 5' não transcrita do gene, que contém sequências específicas reconhecidas por proteínas envolvidas na iniciação da transcrição (POTENZA et al., 2004). Na maioria dos trabalhos de transformação genética de citros, os genes introduzidos são controlados pelo promotor constitutivo 35S, obtido do vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus* – CaMV) (CARDOSO et al., 2010; BOSCARIOL et al. 2006, MUNIZ et al., 2012). No entanto, este promotor confere elevado nível de expressão do transgene em toda a planta, o que, muitas vezes, torna-se indesejável, pois pode aumentar a carga metabólica na planta, resultando em consequências negativas para o desenvolvimento, crescimento e produtividade da cultura (SINGER; HILLY; COX, 2011; DUTT et al., 2014).

Estudos envolvendo o uso de promotores que expressam o transgene apenas em tecidos específicos têm se tornado uma alternativa interessante na obtenção de plantas transgênicas. Esses promotores possuem vantagens particulares para expressar proteínas conferindo resistência a patógenos que atacam os tecidos vasculares (GUO et al., 2004). Os promotores tecido-específicos mais utilizados em citros são aqueles que apresentam atividade específica no floema, tais como AtSUC2 (transportador de sacarose), AtPP2 (proteína de floema 2) clonado de *Arabidopsis thaliana*, CsPP2 (proteína de floema 2) e CsSUS clonados de *Citrus sinensis*, RSs1 (sacarose sintase I) clonado de *Oryza sativa*, rolC clonado de *Agrobacterium rhizogenes*, RTBV clonado de vírus (*Rice tungro bacilliform virus*) e WDV clonado de vírus (*Wheat dwarf geminivirus*) (BENYON et al., 2013; DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012; TAVANO, 2013).

Vários trabalhos têm relatado o uso de genes de interesse agrônômico em diferentes cultivares de citros, com objetivos distintos como por exemplo, genes que conferem redução do período juvenil (CERVERA; NAVARRO; PEÑA, 2009; DUAN; FAN; GUO, 2010), resistência à salinidade (CERVERA et al., 2000; FU e al., 2011), resistência a afídeos (YANG et al., 2000), qualidade do suco (GUO et al., 2005), resistência a doenças causadas por fungos (PEÑA; NAVARRO, 1999; GENTILE et al., 2007; KATOH et al., 2007), resistência a doenças causadas por vírus (SCHINOR, 2006; FEBRES et al., 2008; ZANEK et al., 2008; MUNIZ et al., 2012, 2014) e resistência a doenças causadas por bactérias (BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; MENDES et al., 2010; YANG et al., 2011; LOUREIRO, 2013).

Uma das estratégias que têm sido utilizadas visando aumentar a resistência de plantas transgênicas a doenças, está relacionada ao uso de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR) (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). A expressão dessas proteínas PR é induzida em respostas a infecções patogênicas e representam grandes alterações quantitativas da proteína solúvel durante a resposta de defesa (VAN LOON et al., 1994).

As PRs foram descobertas em 1970, quando folhas de tabaco foram infectadas com o vírus do mosaico do tabaco (*Tobacco mosaic virus* - TMV) e apresentaram reação de hipersensibilidade ao ataque do agente patogênico (VAN LOON; KAMMEN, 1970). Essa reação é caracterizada pela morte do tecido no local de infecção e indução de intensas alterações metabólicas nas células que circundam as lesões necróticas, impedindo a proliferação do patógeno (BAKER et al., 1997).

Estas respostas locais, muitas vezes desencadeiam resistência não específica em toda a planta, conhecida como resistência sistêmica adquirida (SAR), que oferece proteção significativa e duradoura contra a infecção de patógenos (TORNERO et al., 1997). Elevados níveis de expressão dos genes que codificam as proteínas PR, durante a resposta a hipersensibilidade local e a SAR, têm sido sugeridos como marcadores para ambas as respostas de defesa (LAWRENCE et al., 1996; TORNERO et al., 1997).

Algumas proteínas PR vêm sendo utilizadas na obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças. Podemos citar o gene *RCC2* codificador de uma quitinase na espécie *Oriza sativa*, que introduzido em pepino (*Cucumis sativus*), conferiu resistência a *Botrytis cinerea* (TABEL et al., 1998), assim como em videira (*Vitis vinifera*) a *Uncinula necator* e a *Ensinoe ampelina* (YAMAMOTO et al., 2000). Os genes da quitinase e glucanase isolados de tabaco foram introduzidos em calos embriogênicos de alho e conferiram tolerância a *Sclerotium cepivorum* (LAGUNES-FORTIZ et al., 2013).

As proteínas PR foram classificadas em 17 famílias de acordo com suas funções e propriedades, incluindo o grupo das PR-12 que engloba as defensinas (EBRAHIM; USHA; SINGH, 2011; VAN LOON et al., 2006). As defensinas vegetais são peptídeos pequenos (~5 kDa) contendo 8 resíduos de cisteína envolvidos por 4 pontes dissulfeto (BROEKAERT et al., 1995). As primeiras defensinas de plantas foram isoladas e identificadas em 1990 em trigo (COLILLA; ROCHER; MENDEZ, 1990) e em cevada (MÉNDEZ et al., 1990), sendo originalmente chamadas de γ -tioninas devido à sua dimensão e conteúdo de cisteína ser semelhantes aos encontrados nas tioninas (BRUIX et al., 1993). Mais tarde, devido suas propriedades antimicrobianas e sua semelhança estrutural com defensinas de mamíferos e insetos, foram renomeadas como defensinas vegetais e classificadas na família PR-12 (TERRAS et al., 1995).

As proteínas do grupo das PR-12 estão localizadas na parede das células e ocorrem predominantemente nas camadas de células que revestem a parte externa de diferentes órgãos de sementes (TERRAS et al., 1995). Apresentam atividade antimicrobiana, com função de permeabilização da membrana plasmática, o qual contribui para a plasmólise e danos aos patógenos, inibindo o seu crescimento e desenvolvimento (ABAD et al., 1996; VAN LOON; STRIEN, 1999, SELITRENNIKOFF, 2001; VIGERS et al., 1992). Esta atividade é observada

principalmente contra fungos, porém, efeitos inibitórios contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também foram relatados, embora a propriedade antibacteriana não esteja completamente elucidada (GAO et al., 2000; LACERDA et al., 2014; MORENO et al., 1994; OSBORN et al., 1995; PELEGRINI et al., 2011; SEGURA et al., 1998; TERRAS et al., 1992; VRIENS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2014). As defensinas vegetais apresentam também uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo inibição da síntese de proteínas, atividade enzimática e bloqueio de canal de íons (PELLEGRINI; FRANCO, 2005; THOMMA; CAMMUE; THEVISSSEN, 2002).

A maioria das defensinas vegetais tem sido isolada a partir de sementes, onde são abundantes (BLOCH; RICHARDSON, 1991; COLILLA; ROCHER; MÉNDEZ, 1990; OSBORN et al., 1995), como também de outros tecidos incluindo folhas (TERRAS et al., 1995), tubérculos (MORENO; SEGURA; GARCÍA-OLMEDO, 1994), frutos (MEYER et al., 1996), raízes (SHARMA; LÖNNEBORG, 1996) e órgãos florais (GU et al., 1992; KRAGH et al., 1995). Elas são expressas após a infecção com o patógeno, como parte da resposta de defesa sistêmica (BROEKAERT et al., 1997). Além disso, a produção de defensinas em plantas é induzida em resposta ao estresse ambiental, como a seca (MAITRA; CUSHMAN, 1998). As defensinas também são induzidas por moléculas de sinalização, incluindo metil-jasmonato, etileno e ácido salicílico (HANKS et al., 2005).

Estudos envolvendo a superexpressão do gene *defensina* têm sido relatados com o objetivo de promover resistência de plantas a infecções causadas por patógenos. Plantas transgênicas de arroz superexpressando o gene *defensina* de wasabi, isolado de *Wasabia japonica* L., apresentaram resistência ao brusone do arroz, causada por *Magnaporthe grisea* (KANZAKI et al., 2002). Em *Brassica oleracea*, a superexpressão do gene *defensina*, designado *BoDFN*, levou ao aumento da resistência ao míldio, causado por *Hyaloperonospora parasitica* (MING et al., 2012). Plantas de pimenta superexpressando o gene *defensina* também apresentaram resistência à antracnose (SEO et al., 2014). Os resultados apresentados nos trabalhos citados indicam que as defensinas tem um grande potencial para serem utilizadas na obtenção de plantas transgênicas, visando resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba/SP.

3.1 Material vegetal

Para a realização dos experimentos de transformação genética, sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivares 'Hamlin', 'Valência', 'Pera' e 'Natal' foram extraídas de frutos maduros 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.

As sementes foram lavadas para a retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente. O tegumento externo das sementes foi retirado, seguido de desinfestação em solução de água e hipoclorito de sódio (2,5%) (3:1), durante 20 min, sob agitação constante. Após o tratamento, as sementes foram lavadas (3x) com água destilada estéril, em condições assépticas, e introduzidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), Phytigel (2,0 g L⁻¹) e pH ajustado para 5,8.

A incubação das sementes foi realizada a 27 °C, em ausência de luz por 30 dias, para germinação e alongamento do epicótilo. As plântulas obtidas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h de luz, por cerca de 15 - 20 dias e utilizadas para obtenção dos explantes, segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm).

3.2 Construções gênicas utilizadas na transformação genética

As construções gênicas pCAtSUC2/*def* e pC35S/*def* contendo o gene *defensina* (*def*), clonado de *Citrus sinensis* cv. 'Valência', dirigido pelo promotor AtSUC2 (Figura 1a), isto é, promotor do gene que codifica a proteína transportadora de sacarose (SUC2), isolado de *Arabidopsis thaliana* (MYATA et al., 2012) e pelo promotor constitutivo CaMV 35S (Figura 1b), foram utilizadas neste trabalho para transformação genética das cultivares de citros. As construções gênicas foram elaboradas pela Dra. Liliane Cristina Libório Stipp, do Laboratório de Biotecnologia

de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba/SP, sob a supervisão do Dr. Ricardo Harakava do Instituto Biológico de São Paulo.

a) pCA_tSUC2/def

b) pC35S/def

Figura 1 – Esquema da região de transferência (T-DNA) das construções gênicas pCA_tSUC2/def (a) e pC35S/def (b), utilizadas nos experimentos de transformação genética. *Defensina*: gene (815 pb) isolado de *C. sinensis* cv. ‘Valência’; *nptII*: gene de seleção, neomicina fosfotransferase II, confere resistência ao antibiótico canamicina. AtSUC2: promotor preferencialmente expresso no floema; 35S-P: promotor constitutivo CaMV 35S; 35S-T: terminador; NOS-T: terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita;

3.3 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

3.3.1 Cultura e manutenção dos isolados de *A. tumefaciens*

Os isolados de *A. tumefaciens* (EHA 105) contendo os vetores de expressão pCA_tSUC2/def e pC35S/def foram mantidos 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 os antibióticos canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (25 mg L⁻¹).

Para a realização de cada experimento de transformação genética, *A. tumefaciens* foi cultivada em placa de Petri, contendo meio de cultura YEP sólido, acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (50 mg L^{-1}), em ausência de luz, à 28°C , por 3 dias. Após esse período, uma colônia isolada foi cultivada em frasco erlenmeyer, durante 16 h, sob agitação a 180 rpm, à 28°C , contendo meio de cultura YEP líquido (50 mL), suplementado com os mesmos antibióticos. A absorbância da suspensão bacteriana foi determinada em espectrofotômetro ($\lambda = 600 \text{ nm}$), até atingir um valor entre 0,5 - 0,6. A suspensão bacteriana foi centrifugada (4800 rpm; 25°C ; 15min), e o precipitado ressuspensionado em meio de cultura MS líquido ($5 \times 10^8 - 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$).

3.3.2 Co-cultivo dos explantes com *Agrobacterium tumefaciens*

Os segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm) foram inoculados com a suspensão bacteriana por 15 min. Em seguida, os explantes foram secos em papel toalha estéril, para remover o excesso de bactéria, e transferidos para placa de Petri (90 x 15 mm), contendo meio de cultura de co-cultivo MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com benzilaminopurina (BAP - $1,0 \text{ mg L}^{-1}$), acetoseringona (100 mM L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), ágar (0,8 %) e pH 5,5, incubados à 24°C , em ausência de luz, por 48 h.

3.3.3 Seleção e desenvolvimento de gemas adventícias, enxertia e aclimatização

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de seleção e regeneração, constituído do meio de cultura MT, suplementado com BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), ácido ascórbico (50 mg L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), pH 5,8 e os antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e cefotaxima sódica (500 mg L^{-1}), responsáveis pela seleção das células transformadas e controle do crescimento de *A. tumefaciens*, respectivamente. Os explantes foram incubados à 27°C , na ausência de luz, por 30 a 45 dias, e subcultivados a cada 15 dias. Os explantes que desenvolveram gemas adventícias foram transferidos para fotoperíodo de 16 h, à $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

As gemas adventícias regeneradas com tamanho superior a 0,8 cm de comprimento foram enxertadas *in vitro*, sobre plântulas de citrange 'Carrizo', também

germinadas *in vitro*. As plantas enxertadas foram transferidas para tubos de ensaio, contendo meio de cultura MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), e incubadas à $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 16h, até a fixação da enxertia e desenvolvimento das plantas.

As plantas que apresentaram bom desenvolvimento foram transferidas para vasos plásticos (0,5 L), contendo substrato Multiplant 1075 (Terra do Paraíso – Holambra/SP). Após o transplântio, as plantas foram mantidas sob alta umidade relativa, a qual foi diminuída gradativamente até a aclimatização do material, sendo posteriormente transferidas para casa-de-vegetação.

3.4 Análises moleculares

3.4.1 Identificação de plantas transgênicas por análise da PCR

A identificação de plantas transgênicas foi realizada pela análise da PCR nas plantas aclimatizadas. Como o gene *def* foi isolado de citros (cultivar 'Valência'), sendo portanto, um gene endógeno das cultivares analisadas, foi utilizado para a análise da PCR, primers para a detecção de fragmento do gene *npftII*. O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens, utilizando-se o reagente comercial DNAzol® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Os primers utilizados foram *npftII* F 5' GAGGCTATTCGGCTATGACTGG 3' e *npftII* R 5' ATTCGCCGCCAAGCTCTT 3', que amplificam um fragmento de 656 pb do gene *npftII*. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o programa: 94 °C por 4 min, mais 40 ciclos de 94 °C a 30 s, 60 °C a 30 s, 72 °C a 45 s e uma extensão final 4 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese, em gel de agarose (1%), contendo brometo de etídio (0,5 ug/mL), visualizado em luz ultravioleta e fotografado com o auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA). As plantas transgênicas identificadas por esta análise foram mantidas sob fotoperíodo de 16 h e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo posteriormente transferidas para casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas.

3.4.2 Análise de Southern blot

A análise de Southern blot foi realizada para confirmar a integração do transgene nas plantas obtidas, bem como determinar o número de eventos de inserção do transgene no genoma das plantas. Esta análise também foi realizada em plantas não transgênicas, utilizadas como controle negativo. A extração de DNA foi realizada pelo método de DOYLE; DOYLE (1990), a partir de folhas jovens (1,4 g) coletadas das plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Em seguida, as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop® - Thermo Scientific, San Jose, EUA), e a pureza das amostras determinada pela razão OD260/OD280 (1,80 - 2,00).

Após a quantificação, 20 - 60 µg de DNA foram submetidos à reação de digestão com a enzima *Eco* RI (5 u/ µg de DNA; 16 h; 37 °C). A enzima utilizada, digere o T-DNA em um único local, fora da sequência do gene *nptII*. O DNA foi precipitado com acetato de amônio (7,8 M) e álcool absoluto, ressuspenso em água pura (MilliQ) e os fragmentos obtidos separados por eletroforese em gel de agarose (1%), tampão TAE (1X) e brometo de etídio (0,1%), a 35 V, por 16 h.

Após a separação dos fragmentos resultantes da clivagem com a enzima de restrição, o gel foi lavado em tampões apropriados, transferidos para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N+' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e fixados à 80 °C, por 2 h. A membrana foi hibridizada (16 h; 60 °C) com 150 ng de sonda marcada com a enzima Fosfatase Alcalina ('AlkPhos Direct Labelling Reagents', GE Healthcare, Little Chalfont, UK), para a detecção do gene *nptII*.

A reação de detecção foi realizada com auxílio do kit 'CDP - Star™ Detection Reagent' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), conforme as instruções do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi introduzida no cassete fotográfico (Hypercassette™ - Amersham Life Science, Little Chalfont, UK) com uma chapa fotográfica (Hyperfilm™ MP - GE Healthcare, Little Chalfont, UK), por um período de 2 h. Após o tempo de exposição, a chapa fotográfica foi revelada, utilizando-se revelador e reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA), por 4 min, lavada em água (1 min), e em seguida, transferida para fixador e reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA), por 15 min, e lavada em água (1 min).

4 RESULTADOS

4.1 Transformação genética

A Figura 2 mostra as etapas do processo de produção de plantas transgênicas de *C. sinensis* com as construções gênicas pCAtSUC2/*def* e pC35S/*def*. Após 30 dias de cultivo dos explantes, segmentos de epicótilo (Figuras 2a-b), em meio de cultura MT, foi possível verificar o desenvolvimento de gemas adventícias (Figura 2c). A enxertia *in vitro* permitiu o desenvolvimento de plantas (Figura 2d), as quais foram transferidas para vasos contendo substrato para aclimatização. Durante o processo de aclimatização, ocorreu o desenvolvimento de folhas novas (Figura 2e) e após 50 dias as plantas foram transferidas para de casa-de-vegetação (Figura 2f).

Figura 2 - Transformação genética de *C. sinensis* com as construções gênicas pCAtSUC2/*def* e pC35S/*def*. a) Explante inicial; b) Explantes cultivados em meio de cultura de co-cultivo MT; c) Desenvolvimento de gemas adventícias em segmentos de epicótilo mantidos em meio de cultura de seleção, após o co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*; d) Planta desenvolvida após a enxertia *in vitro* em citrange 'Carrizo'; e) Planta em fase de aclimatização; f) Plantas transgênicas aclimatizadas

Foram realizados 35 experimentos de transformação genética de laranja doce, com as construções gênicas pCAtSUC2/*def* e pC35S/*def* de laranja doce (Tabelas 1 e 2). Para a construção gênica pCAtSUC2/*def*, foram realizados 5 experimentos com laranja 'Hamlin' (total de 2019 explantes), 5 com laranja 'Natal' (total de 2044 explantes), 5 com laranja 'Pera' (total de 2491 explantes) e 3 com laranja 'Valência' (total de 1055 explantes). Nestes experimentos, os explantes responsivos obtidos foram 184 explantes de laranja 'Hamlin', 109 explantes de laranja 'Natal', 183 explantes de laranja 'Pera' e 126 explantes de laranja 'Valência' (Tabela 1). A análise da PCR (Figura 3) confirmou a transgenia por meio da detecção do gene *npfII* em 15 plantas de laranja 'Hamlin', 12 plantas de laranja 'Natal', 6 plantas de laranja 'Pera' e 3 plantas de laranja 'Valência' (Tabela 1). A média da eficiência de transformação genética foi de 0,74, 0,59, 0,24 e 0,28% para as cultivares 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', respectivamente (Tabela 1).

Para a construção gênica pC35S/*def* foram realizados 5 experimentos com laranja 'Hamlin' (total de 2192 explantes), 5 com laranja 'Natal' (total de 2268 explantes), 5 com laranja 'Pera' (total de 2231 explantes) e 2 com laranja 'Valência' (total de 782 explantes). Nestes experimentos, os explantes responsivos obtidos foram 365 explantes de 'Hamlin', 121 explantes de 'Natal', 121 explantes de 'Pera' e 91 explantes de 'Valência' (Tabela 2). A análise da PCR (Figura 4) confirmou a transgenia, por meio da detecção do gene *npfII*, em 39 plantas de laranja 'Hamlin', 10 plantas de laranja 'Natal', 5 plantas de laranja 'Pera' e 11 plantas de laranja 'Valência' (Tabela 2). A média da eficiência de transformação genética foi de 1,78, 0,44, 0,22 e 1,41% para as cultivares 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', com o gene *defensina*, dirigido pelo promotor AtSUC2 (pCAAtSUC2/*def*)

Experimento	Cultivar	Explantos responsivos*/ total de explantes	Plantas PCR+/ plantas avaliadas	Eficiência de transformação genética (%) ^a
1	'Hamlin'	52/662	1/1	0,15
2	'Hamlin'	17/367	1/1	0,27
3	'Hamlin'	93/379	8/8	2,11
4	'Hamlin'	2/247	1/1	0,40
5	'Hamlin'	20/364	4/4	1,09
Total		184/2019	15/15	0,74
1	'Natal'	4/631	1/1	0,16
2	'Natal'	40/543	3/4	0,55
3	'Natal'	42/413	3/4	0,73
4	'Natal'	0/155	0	0
5	'Natal'	23/302	5/5	1,65
Total		109/2044	12/14	0,59
1	'Pera'	33/624	1/7	0,16
2	'Pera'	47/417	4/4	0,96
3	'Pera'	4/474	1/1	0,21
4	'Pera'	79/698	0	0
5	'Pera'	20/279	0	0
Total		183/2491	6/12	0,24
1	'Valência'	78/483	1/1	0,20
2	'Valência'	44/285	2/2	0,70
3	'Valência'	4/287	0	0
Total		126/1055	3/3	0,28

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

* Gemas adventícias que regeneraram após a transformação genética

Figura 3 - Análise da PCR para detecção do fragmento do gene *nptII*, em plantas de laranja 'Hamlin', obtidas nos experimentos de transformação genética, com a construção gênica pCAAtSUC2/*def*. Colunas: 1 - 12 plantas de laranja 'Hamlin'; C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 2201); C-: controle negativo (água); M: marcador de peso molecular 1 Kb; Seta: fragmento de 656 pb correspondente ao gene *nptII*

Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cvs. 'Hamlin', 'Natal', 'Pera' e 'Valência', com o gene *defensina*, dirigido pelo promotor 35S (pC35S/*def*)

Experimento	Cultivar	Explantos responsivos*/ total de explantes	Plantas PCR+/ plantas avaliadas	Eficiência de transformação genética (%) ^a
1	'Hamlin'	214/748	15/15	2,00
2	'Hamlin'	8/362	1/1	0,27
3	'Hamlin'	26/301	2/2	0,66
4	'Hamlin'	9/244	4/4	1,64
5	'Hamlin'	108/537	17/18	3,16
Total		365/2192	39/40	1,78
1	'Natal'	0/840	0	0
2	'Natal'	37/546	0	0
3	'Natal'	44/424	7/8	1,65
4	'Natal'	6/156	0	0
5	'Natal'	34/302	3/3	0,99
Total		121/2268	10/11	0,44
1	'Pera'	20/579	1/2	0,17
2	'Pera'	19/398	2/2	0,50
3	'Pera'	17/503	0	0
4	'Pera'	30/473	1/1	0,21
5	'Pera'	35/278	1/1	0,36
Total		121/2231	5/6	0,22

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

* Gemas adventícias que regeneraram após a transformação genética

Figura 4 - Análise da PCR para detecção do fragmento do gene *nptII*, em plantas de laranja 'Hamlin', obtidas nos experimentos de transformação genética, com a construção gênica pC35S/*def*. Colunas: 1- 12 plantas de laranja 'Hamlin'; C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 2201); C-: controle negativo (água); M: marcador de peso molecular 1 Kb; Seta: fragmento de 6556 pb correspondente ao gene *nptII*

4.2 Caracterização molecular das plantas obtidas

A análise de *Southern blot* foi realizada em plantas de laranja doce PCR+ aclimatizadas em casa-de-vegetação, das cultivares ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pera’ e ‘Valência’. Foram analisadas as plantas que estavam em estágio adequado de desenvolvimento para a coleta de material vegetal utilizado nesta análise. Para esta análise o DNA genômico, digerido com a enzima *EcoRI*, foi hibridizado com sonda para o gene *np11*. Foram analisadas 19 plantas de laranja ‘Hamlin’, das quais 10 plantas foram obtidas com a construção gênica pC35S/*def* (Figura 5a) e 9 com a construção gênica pCAtSUC2/*def* (Figura 5b), 18 plantas de laranja ‘Natal’, sendo 9 plantas para cada construção gênica (Figura 6a-b), 3 plantas de laranja ‘Pera’, constituindo 2 plantas com a construção gênica pC35S/*def* e 1 planta com a construção gênica pCAtSUC2/*def* (Figura 7a) e 11 plantas de laranja ‘Valência’, do qual 9 com a construção gênica pC35S/*def* e 2 com a construção gênica pCAtSUC2/*def* (Figura 7b).

Figura 5 - Análise de *Southern blot* de plantas de laranja ‘Hamlin’ obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC35S/*def* (a) ou pCAtSUC2/*def* (b). Colunas de 1-10 (a) e 1-9 (b): DNA de plantas PCR+, digerido com a enzima *EcoRI*; C+: controle positivo (fragmento amplificado do gene *np11* – 656 pb); C-: controle negativo (DNA de planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica, digerido pela enzima *EcoRI*)

Figura 6 - Análise de *Southern blot* de plantas de laranja 'Natal' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC35S/*def* (a) ou pCAtSUC2/*def* (b). Colunas de 1-9 (a-b): DNA de plantas PCR+, digerido com a enzima *EcoRI*; C+: controle positivo (fragmento amplificado do gene *npII* – 656 pb); C-: controle negativo (DNA de planta de laranja 'Natal' não transgênica, digerido pela enzima *EcoRI*)

Figura 7 - Análise de *Southern blot* de plantas de laranja 'Pera'(a) e 'Valência'(b) obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pC35S/*def* ou pCAtSUC2/*def*. (a) Colunas de 1-3: DNA de plantas de laranja 'Pera'PCR+, digerido com a enzima *EcoRI*.; colunas 1 e 2 plantas de laranja 'Pera'com a construção gênica pCAtSUC2/*def*; coluna 3 planta de laranja 'Pera'com a construção gênica pC35S/*def*. (b) Colunas de 1-11: DNA de plantas de laranja 'Valência'PCR+, digerido com a enzima *EcoRI*; colunas 1-9 plantas de laranja 'Valência'com a construção gênica pC35S/*def*; colunas 10-11 plantas de laranja 'Valência'com a construção gênica pCAtSUC2/*def*. (a) e (b) C+: controle positivo (fragmento amplificado do gene *npII* – 656pb); C-: controle negativo (DNA de planta de laranja 'Pera'(a) ou 'Valência'(b) não transgênica, digerido pela enzima *EcoRI*)

Pela análise dos resultados obtidos, pode-se verificar sinais de hibridização para a maioria das plantas analisadas, indicando que o cassete de expressão foi inserido no genoma das plantas. O perfil de hibridização difere entre as plantas analisadas, indicando que as plantas são provenientes de eventos independentes de transformação genética. O número e eventos de inserção variou de 1 a 3 (Figuras 5-8). Não foram observadas hibridizações nas amostras de DNA das plantas não transgênicas.

Quinze plantas não apresentaram sinal de hibridização, sendo 3 plantas da cultivar 'Hamlin', contendo a construção gênica pC35S/*def* (Figura 5a: colunas 2, 6 e 9), 6 plantas da cultivar 'Hamlin' contendo a construção gênica pCAtSUC2/*def* (Figura 5b: colunas 1, 2, 6, 7, 8 e 9), 3 plantas da cultivar 'Natal' contendo a construção gênica pCAtSUC2/*def* (Figura 6b: colunas 4, 6 e 9), 2 plantas de laranja 'Pera' contendo a construção gênica pCAtSUC2/*def* (Figura 7a: colunas 1 e 2) e 1 planta de laranja 'Valência' com a construção gênica pCAtSUC2/*def* (figura 7b: coluna 10).

5 DISCUSSÃO

A transformação genética de citros tem sido estudada desde 1989 com diferentes espécies e cultivares (KOBAYASHI; UCHIMYIA, 1989; PEÑA et al., 1005; MENDES et al., 2010) e, desde então, genes isolados de fungos, bactérias, insetos e plantas têm sido introduzidos em citros levando à produção de plantas transgênicas tolerantes a stresses bióticos e abióticos, seja por meio da superexpressão ou do silenciamento gênico (GONG, LIU, 2013).

Os primeiros trabalhos relacionados à transformação genética de citros tinham por finalidade a otimização de protocolos contendo somente genes de seleção e repórter (MOORE; JACANO; NEIDIGH, 1992). Trabalhos utilizando genes de interesse agrônômico têm sido relatados principalmente para resistência a doenças (ANANTHAKRISHNAN et al., 2007; BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2010), sendo que a maioria deles utilizam construções gênicas dirigidas por promotores constitutivos, o qual confere elevado níveis de expressão do transgene (CARDOSO et al., 2010; BOSCARIOL, et al. 2006, MUNIZ et al., 2012). Por outro lado, o uso de promotores tecido-específicos também tem sido relatado, pois, evita uma expressão desnecessária do gene e reduz a possibilidade de interferência no desenvolvimento da planta (DUTT et al., 2012; DUTT et al., 2014; PORTO et al., 2014). Estudos utilizando promotores tecido-específicos para expressão gênica no floema foram reportados em diversos trabalhos (ATÍLIO et al., 2013; MYIATA et al., 2012; TAVANO, 2013), visando a obtenção de plantas cítricas resistentes a *Candidatus Liberibacter* spp..

Uma das principais restrições relacionadas ao uso de plantas transgênicas refere-se à introdução de genes oriundos de plantas que não hibridizam naturalmente. Diante disso, uma alternativa para contornar esse problema seria a adoção da cisgenia, uma nova abordagem de transformação genética que consiste na utilização de construções gênicas constituídas por elementos genéticos (promotor, gene de interesse e terminador) provenientes da mesma espécie ou de espécies relacionadas (JACOBSEN; SCHOUTEN, 2009; HOLME et al., 2013). Dessa forma, a superexpressão de genes de resistência já presentes na espécie constitui uma nova maneira de obter plantas resistentes a doenças (HOLME et al., 2013). Assim, neste trabalho foi feita a avaliação da eficiência do gene da própria

espécie associado a um promotor tecido-específico, expresso preferencialmente no floema, tornando-se uma abordagem mais atual de transformação genética.

Devido aos danos que o HLB vem causando nos pomares e pela ausência de cultivares resistentes a esta doença, obter plantas transgênicas de citros, superexpressando o gene *defensina*, isolado de laranja 'Valência', associado ao promotor constitutivo (35S) ou ao promotor tecido-específico (AtSUC2), torna-se uma boa estratégia para o aumento da resistência em plantas. Vale ressaltar que, embora muitas espécies já tenham sido transformadas (KANZAKI et al., 2002; SJAHRIL et al., 2006; GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2012; NTUI et al., 2010), não há relatos de plantas transgênicas de citros contendo o gene *defensina*, dirigido por promotores constitutivo (35S) ou preferencialmente expresso no floema (AtSUC2).

Com relação à transformação genética de citros sabe-se que sua eficiência varia em função do genótipo, tipo de explante (BACHCHU et al., 2011; DUTT; GROSSER, 2010; DUTT et al., 2012; KHAN; FU; LIU, 2012), estirpe de *Agrobacterium* (DUTT; GROSSER, 2009; BOND; ROOSE, 1998), espécie (CERVERA et al., 2008; GHORBEL et al., 2000; PEÑA et al., 1997), cultivar (BOSCARIOL et al., 2003; MUNIZ et al., 2012) e construção gênica (MIYATA et al., 2012; PORTO et al., 2014). Entre as cultivares de laranja doce, 'Hamlin' e 'Valência' são as que apresentam os melhores resultados em relação à eficiência de transformação genética (BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2010), enquanto a cultivar 'Pera' é considerada a menos responsiva ao processo de transformação genética (CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010). Isto pode ser observado neste trabalho, em que a eficiência de transformação genética foi maior para a cultivar 'Hamlin' (1,78%) em relação as outras cultivares estudadas, embora os valores obtidos foram relativamente inferiores aos já relatados.

A baixa eficiência de transformação genética relatada neste trabalho pode estar relacionada com a construção gênica. Os resultados obtidos mostram que os valores de eficiência de transformação genética entre as construções gênicas pC35S/*def* e pCAAtSUC2/*def* foram semelhantes para as cultivares 'Natal' e 'Pera', porém para a cultivar 'Valência' e 'Hamlin' a construção gênica pCAAtSUC2/*def* apresentou valores de eficiência inferiores (Tabela 1 e 2). Esta queda na eficiência de transformação genética também foi verificada por Tavano (2013), que obteve eficiência de transformação genética de 1 - 4% trabalhando com o gene *attA*, sob

controle dos promotores preferencialmente expresso no floema, AtPP2, CsPP2 e AtSUC2, sendo que com o promotor AtSUC2, foi obtida a menor eficiência de transformação genética.

Com relação à construção gênica contendo o promotor 35S, a eficiência foi maior para as cultivares 'Hamlin' (1,78%) e 'Valência' (1,41%) quando comparado ao promotor AtSUC2 (0,74% para 'Hamlin' e 0,28% para 'Valência'), porém esses valores ainda são considerados baixos em comparação aos obtidos em outros trabalhos. Mendes et al. (2010) na transformação genética de laranja 'Hamlin' e 'Valência' com uma construção contendo o gene *Xa21* sob controle do promotor constitutivo 35S obteve eficiência de transformação genética de 18,6% e 11,3%, respectivamente. Resultado semelhantes foram observados por Boscariol et al. (2006) trabalhando com o gene *attA*, dirigido pelo promotor constitutivo 35S, que obteve uma eficiência de transformação de 14% para a cultivar 'Hamlin'. A baixa eficiência de transformação genética com a construção pC35S/*def* obtida neste trabalho pode indicar uma possível interferência do gene *defensina* no processo de transformação genética.

Para confirmar a integração do transgene e determinar o número de cópias inseridas no genoma das plantas, análise de *Southern blot* foi realizada nas plantas em estudo. A maioria das plantas analisadas (72,5%) apresentaram sinais de hibridização do gene *nptII* contendo de 1-3 eventos de inserção do transgene, em diferentes padrões de integração (Figura 3-6). Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos de transformação genética de citros via *A. tumefaciens* utilizando construções gênicas com os promotores 35S (CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010; MUNIZ et al., 2012) e promotores de floema (MIYATA et al., 2012; TAVANO, 2013), nos quais também relatam a ocorrência de 1-3 eventos de inserção no genoma das plantas transformadas.

Resistência a doenças tem sido um dos principais objetivos de trabalho de transformação genética de citros. Genes para resistência a doenças causadas por vírus (GUTIÉRREZ et al., 1997; MUNIZ et al., 2012; SOLER et al., 2012), fungos (MONDAL et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013) ou bactérias (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013) têm sido introduzidos em diferentes cultivares copa e porta-enxerto. A análise desses resultados indica que embora não tenham sido identificadas plantas imunes aos patógenos, os transgenes podem influenciar a resistência das plantas. Muniz (2012; 2014) verificou que plantas

transgênicas de laranja doce contendo o gene da proteína capsidial do CTV apresentaram uma redução dos níveis deste vírus, indicando uma possível resistência dessas plantas. Em relação ao cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri*, plantas de laranja 'Hamlin' transformadas com o gene *hrpN*, que codifica uma proteína associada a hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida, apresentaram redução da suscetibilidade àquela doença (BARBOSA-MENDES et al., 2009). Ao utilizar o gene *Xa21*, isolado de arroz selvagem, Mendes et al. (2010) verificaram que em plantas de laranja doce, a suscetibilidade ao cancro cítrico foi reduzida. Zhang et al. (2010) ao transformar laranja doce expressando o gene *NPR1*, que participa da ativação da resistência sistêmica adquirida, observaram que as plantas transgênicas obtidas foram mais resistentes ao cancro cítrico.

Diante desses resultados, as plantas obtidas neste trabalho podem representar uma alternativa promissora para o controle do HBL em laranja doce. Para completar esse estudo, a expressão do gene *defensina* será verificada e as plantas serão desafiadas para resistência a *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

6 CONCLUSÕES

Foram obtidas plantas transgênicas de laranja doce cvs. 'Hamlin', 'Valência', 'Natal' e 'Pera' contendo o gene *defensina* de *Citrus sinensis* dirigido pelo promotor expresso preferencialmente no floema (AtSUC2) ou pelo promotor constitutivo (35S).

A eficiência da transformação genética variou em função da cultivar estudada e da construção gênica.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L.R.; D'URZO, M.P.; LIU, D.; NARASIMHAN, M.L.; REWENI, M.; ZHU, J.K.; NIU, X.; SINGH, N.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, Amsterdam, v. 118, p. 11-23, 1996.
- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, Pakistan, v. 9, n. 22, p. 56-64, 2010.
- 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 tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 203-211, 2003.
- ANAMI, S.; NJUGUNA, E.; COUSSEMS, G.; AESAERT, S.; VAN LIJSEBETTENS, M. higher plant transformation: principles and molecular tools. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 57, p. 483-494, 2013.
- 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.
- 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.
- ARITUA, V.; ACHOR, D.; GMITTER, F.G.; ALBRIGO, G.; WANG, N. Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **Plos One**, San Francisco, v.8, n. 9, p. 73742, 2013.
- ATÍLIO, L.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; HAKAKA, 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. 76p. 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.; HAKAKA, R.; GABRIEL, D.W.; LEE, R.F. *GUS* gene expression driven by

a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valência'sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 11, p. 1623-628, 2006.

BACHCHU, M.A.A.; JIN, S.B.; PARK, J.W.; SUN, H.J.; YUN, S.H.; LEE, H.Y.; LEE, D.S.; HONG, Q.C.; KIM, Y.W.; RIU, K.Z.; KIM, J.H. *Agrobacterium*-mediated transformation using embryogenic calli in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Miyagawa Wase. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Suwon, v. 52, n. 2, p. 170-175, 2011.

BAKER B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR S.P. Signaling in Plant-Microbe Interactions. **Science**, New York, v. 276, n. 5313, p. 726-733, 1997.

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, n. 1, p. 109-115, 2009.

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

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.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; STUCHI, E. S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivar in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.125, p. 565-570, 2009.

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, DF, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

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

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

BLOCH, JR.; RICHARDSON, M. A new Family of small (5kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have

sequence homologies with wheat g-purothionins. **FEBS**, Berlim, v. 279, p. 101-104, 1991.

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.

BOND, J.E.; ROOSE, M.L. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, p. 229-234, 1998.

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**, New York, 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.

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

BOVÉ, J.M.; 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**. Embrapa, v.2, p.679 -736, 1999.

BROEKAERT, W.F.; TERRAS, F.R.G.; CAMMUE, B.P.A.; OSBORN, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of host defense system. **Plant Physiology**, Scotland, v. 108, p. 1353-1358, 1995.

BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; DE BOLLE, M.F.C.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G.W.; OSBORN, R.W. Antimicrobial peptides from plants. **Plant Sciences**, Heverlee, v. 16, n. 3, p. 297-323, 1997.

BRUIX, M.; JIMENEZ, M.A.; SANTORO, J.; GONZALEZ, C.; COLILLA, F.J.; MENDEZ, E.; RICO, M. Solution structure of 1-H and 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1 H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 32, p. 715-724, 1993.

CAPOOR, S.P.; RAO, B.B.; VISWANATH, S.M. *Diaphorina citri*, a vector of greening disease of citrus in India. **India Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 37, p. 572-576, 1967.

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.

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

CERVERA, M.; 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.

CEVERA, M.; NAVARRO, L.; PENÁ, L. Gene stacking in 1-year-cycling *APETALA* citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 140, p. 278-282, 2009.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, 1994.

CHEN, S.C.; LIU, A.R.; ZOU, Z.R. Over expression of glucanase gene and defending gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 5, p. 671-677, 2006.

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.

COLLETTA-FILHO, H.D.; DAUGHERTY, M.P.; FERREIRA, C.; LOPES, J.R.S. Temporal progression of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection in citrus and acquisition efficiency by *diaphorina citri*. **American Phytopathology Society Journals**, Saint Paul, v. 104, n. 4, p. 416-421, 2014.

COLILLA, F.J.; ROCHER, A.; MÉNDEZ, E. γ-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm, **FEBS**, Berlin, v. 270, p. 191–194, 1990.

COLLINGE, D.B.; LUND, O.S.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants? **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, p. 217-231, 2008.

CONINCK, B.M.A.; SELS, J.; VENMANS, E.; THYS, W.; GODERIS, I.J.W.M.; CARRON, D.; DELAURÉ S.L.; CAMMUE, B.P.A.; BOLLE, M.F.C.; MATHYS, J. *Arabidopsis thaliana* plant defending AtPDF1.1 is involved in the plant response to biotic stress. **New Phytologist**, Oxford, v. 187, p. 1075-1088, 2010.

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

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMEO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 171-183, 2004.

DONADIO, L.C.; MOURÃO-FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. cap. 1, p. 3-18.

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

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

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.; 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.

DUTT, M.; DHEKNEY, S.A.; SORIANO, L.; KANDEL, R.; GROSSER, J. W. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research*, v 1, p. 14047, 2014.

FAO. Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 06 set 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. **Pant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 1, p. 93-104, 2008.

FEBRES, V.J.; FISHER, L.; KHALAF, A.; MOORE, G.A. Citrus transformation: challenges and prospects. In: ALVAREZ, M.A. (Ed.) **Genetic transformation**. Rijeka: in Tech, 2011. p. 101-122.

FERREIRA, F.R.; SANTOS, I.R.I.; SOARES FILHO, W.S.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S.; SOUZA, A.S. Recursos genéticos. **Cultura dos citros**, Embrapa, Brasília, v.1, p. 47-60, 2013.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; DEL-BOSCO, S.F.; GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 36, n. 6, p. 450-455, 2000.

FOLIMONOV, A.S.; FOLOMONOVA, M.; BAR-JOSEPH; DAWSON, W.O. A stable RNA virus-based vector for citrus trees. **Virology**, Amsterdam, v. 368, p. 205-216, 2007.

FROMM, M.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Science**, Riverside, v. 82, n. 17, p. 5824-5828, 1985.

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

FUNDECITRUS. Disponível em: <<http://www.fudecitrus.com.br/doencas/10-Greening>>. Acesso em: 26 set 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. 920p.

GAO, A.G.; HAKIMI, S.M.; MITTANCK, C.A.; WU, Y.; WOENER, B.M.; STARK, D.M.; SHAH, D.M.; LIANG, L.; ROMMENS, C.M.T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1307-1310, New York, 2000.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a Gram negative bacterium. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., 1984, Riverside. **Proceedings of the National Academy of Science**, Riverside, 1984. p. 115-124.

GENTILE, C.; SPILLER, N.; NOCI, G. How to sustain the customer experience: An overview of experience components that co-create value with the customer. **European Management Journal**, Glasgow, v.25, p.395-410, 2007.

GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U.K.S.; GANAPATHI, T.R. Petunia Floral Defensins with Unique Prodomains as Novel Candidates for Development of Fusarium Wilt Resistance in Transgenic Banana Plants. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39557, 2012.

GOTTWALD, T.R. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the Western Hemisphere. **Outlooks Pest Management**, v.18 (6), p. 274 e 279, 2007.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological Understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, California, v. 48, p. 119;p.139, 2010.

GU, G.; KAWATA, E.E.; MORSE, M.J.; WU, H.M.; CHEUNG, A.Y. A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco. **Molecular and General Genetics**, cidade, v. 234, p. 89-86, 1992.

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.

GUO, W.W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic 'Valência' sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, n. 8, p. 482-486, 2005.

GUTIÉRREZ-E, 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**, New York, v. 16, n. 11, p. 745–753, 1997.

HANKS, J.N.; SNYDER, A.K.; GRAHAM, M.A.; SHAH, R.K.; BLAYLOCK, L.A.; HARRISON, M.J.; SHAH, D.M. Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, p. 385-399, 2005.

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

HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAKI, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; OHSHIMA, 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.

HOLME, I.B.; Wendt, T.; Holm, P.B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. **Plant Biotechnology Journal**, v.1, p.1–13, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2012/tabelas_pdf/tabela04.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2012/tabelas_pdf/tabela04.pdf). Acesso em: 06 set. 2014.

JAGOEIX, S.; BOVÉ J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria.

International Journal of Systematic Bacteriology, Ames, v. 44, p. 379-386, 1994.

JEFFERSON, R.A.; KLASS, M.; WOLF, N.; HIRSH, D. Expression of Chimeric Genes in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, Cambridge, v. 193, p. 41-46, 1987.

KATOH, H.; OHTANI, K.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Overexpression of a Gene Encoding a Catabolite Repression Element in *Alternaria citri* Causes Severe Symptoms of Black Rot in Citrus Fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 5, p. 557-563, 2007.

KANZAKI, H.; NIRASAWA, S.; SAITOH, H.; ITO, M.; NISHIHARA, M.; TERAUCHI, R.; NAKAMURA, I. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. **Theoretical and Applied Genetic**, Stuttgart, v. 105, p. 809-814, 2002.

KHAN, E.U.; FU, X.Z.; LIU, J.H. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf segments as explants in 'Valência' sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 383-390, 2012.

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

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 64, n. 2, p. 91-97, 1989.

KOH, E.J.; ZHOU, L.; WILLIAMS, D.S.; PARK, J.; DING, N.; DUAN, Y.P.; KANG, B.H. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". **Protoplasma**, Lipzig, v. 249, n. 3, p. 687-697, 2012.

KRAGH, K.M.; NIELSEN, J.E.; NIELSEN K.K.; DREBOLDT, S.; MIKKELSEN, J.D. Characterisation and localization of new anti-fungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 424-434, 1995.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAS, K.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.

LACERDA, A.F.; VASCONSELOS, A.R.V.; PELEGRINI, P.B.; SA, M.F.G. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 116, 2014.

LAGUNES-FORTIZ, E.; ROBLEDO-PAZ, A.; GUTIÉRREZ-ESPINOSA, M.A.; MASCORRO-GALLARDO, J.O.; ESPITIA-RANGEL, E. Genetic transformation of garlic (*Allium sativum* L.) with tobacco chitinase and glucanase genes for tolerance to the fungus *Sclerotium cepivorum*. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 12, n. 22, p. 3482-3492, 2013.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIN, 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: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 18, p. 509-566.

LAWRENCE, C.B.; JOOSTEN, M.H.A.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis related protein in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Michigan, v.48, p.361-377, 1996.

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, n.3, 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, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 9, p. 221-277.

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**, San Francisco, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031263#pone-0031263-g004>>.

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

MAITRA, N.; CUSHMAN, J. C. Characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a plant defensin. **Plant Physiology**, Strasbourg, v. 118, p. 1536, 1998.

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.

MATSUURA, F.C.A.U.; FOLEGATTI MATSURRA, M.L.S. Processamento. **Cultura dos citros**, Embrapa, Brasília, v.1, p. 347-369, 2013.

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

MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURAO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, 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.

MENDEZ, E.; MORENO, A.; COLILLA, F.; PELAEA, F.; LIMAS, G. G.; MENDEZ, R.; SORIANO, F.; SALINAS, M.; HARO, C. D. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, y-hordothionin, from barley endosperm. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 194, p. 533-539, 1990.

MEYER, B.; HOULNE, G.; POZUETA-ROMERO, J.; SCHANTZ, M.; SCHANTZ, R. Fruit-specific Expression of a defensin-type gene Family in beel pepper. **Plant Physiology**, Strasbourg Cedex, v. 112, p. 615-622, 1996.

MING, J.; CAI-MING, H.; LI-XIANG, M.; YU-CHAO, Z. Overexpression of a Broccoli Defensin Gene BoDFN Enhances Downy Mildew Resistance. **Journal of Integrative Agriculture**, China, v. 11, n. 7, p. 1137-1144, 2012.

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

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

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**, New York, v. 11, n. 5-6, p. 238-242, 1992.

MORENO, M.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 223, p.135-139, 1994.

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.

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.

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

MURRAY, R.G.E.; SCHLEIFER, K.H. Taxonomic notes: A proposal for recording the properties of putative taxa of Procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 1, p. 174-176, 1994.

NEVES, M. F.; JANK, M.S. (Org) **Perspectivas da cadeia produtiva de laranja no Brasil**. 2006. Disponível em: http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.pdf. Acesso em: 27 out.2014.

NEVES, M.F. (Org.). **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138p.

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

NTUI, V.O.; G.; THIRUKKUMARAN, P. ;AZADI, R.S. ;KHAN, I.; NAKAMURA ;M. MII. Stable integration and expression of Wasabi defensin gene in “Egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* leaf spot. **Plant Cell Reporter**, New York, v. 29, p. 943-954, 2010.

OLIVEIRA, M.L.P.; SILVA, C.C.L.; ABE, V.Y.A.; COSTA, M.G.C.; CERNADAS, R.A.; BENEDETTI, C.E. Increased Resistance Against Citrus Canker Mediated by a Citrus Mitogen-Activated Protein Kinase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 26, n. 10, p. 1190-1199, Oct. 2013.

OMAR, A.A.; GROSSER, J.W. Comparison of endoplasmic reticulum targeted and non-targeted cytoplasmic GFP as a selectable marker in citrus protoplast transformation. **Plant Science**, Amsterdam, v. 174, n. 2, p. 131–139, 2008.

OSBORN, R.W.; DE SAMBLANX, G.W.; THEVISSSEN, K.; GODERIS, I.; TORREKENS, S.; LEOVEN, F.V.; ATTENBOROUGH, S.; REES, S.B.; BROEKAERT, W.F. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifraganaceae*. **Febs**, Berlin, v. 368, p. 257-262, 1995.

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

PASSOS, O.S.; SOARES FILHO, W.S.; SOBRINHO, A.P.C. Origem, classificação botânica e distribuição geográfica, **Cultura dos citros**, Embrapa, Brasília, v.1, p. 15-23, 2013.

PELEGRINI, P.B.; FRANCO, O.L. Plant α -thionins: Novel insights on the mechanisms of a multi-functional class of defense proteins. **The international Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Nedlands, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PELEGRINI, P.B.; DEL SARTO, R.P.; SILVA, O.N.; FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-SA, M.F. Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. **Biochemistry Research International**, Minnesota, 2011.

PEÑA L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, n. 10, p. 616-619, 1995.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia*): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, New York, v.16, p.731-737, 1997.

PEÑA, L.; NAVARRO, L. Transgenic citrus. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: transgenic trees**. Berlin: Springer-Verlag, v.8. p. 39- 55, 1999.

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, 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. Transgenic plants: methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 286, p. 176-187, 2005.

PENNINCKK, I.A.M.A.; EGGERMONT, K.; SCHENK P.M.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; CAMMUE B.P.A.; THOMMA, B.P.H.J. The *Arabidopsis* mutant *iop1* exhibits induced over-expression of the plant defensin gene PDF1.2 and enhanced pathogen resistance. **Molecular Plant Pathology**, Harpenden, v.4, n. 6, p. 479-486, 2003.

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

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.

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.

RODRIGUES, M.B.C.; FÁVARO, L.C.L.; PALLU, A.P.S.; FERREIRA, A.; SEBASTIANES, F.S.; RODRIGUES, M.J.C.; SPÓSITO, M.B.; DE ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Agrobacterium-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*: An efficient tool to gene transfer and random mutagenesis. **Fungal Biology**, Scotland, v. 117, p. 556-568, 2013.

SJAHRIL, R., D.P. CHIN, R.S. KHAN, S. YAMAMURA, I. NAKAMURA, Y. AMEMIYA AND M. MII. Transgenic Phalaenopsis plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing Wasabi defensin gene using Agrobacterium method. **Plant Biotechnology**, Indianapolis, v. 23, p.191-194, 2006.

SHARMA, P.; LÖNNERBORG, A. Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 31, n. 3, p. 707-712, 1996.

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. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SECHLER, A.; 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.

SEGURA, A.; MORENO, M.; MOLINA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters*, v. 435, p. 159-162, 1998.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SEO, H-H.; PARK, S.; PARK, S.; OH, B-J.; BACK, K.; HAN, O.; KIM, J-IL ; KIM, Y. S. Overexpression of a Defensin Enhances Resistance to a Fruit-Specific Anthracnose Fungus in Pepper. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e97936, 2014.

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

SOLER, C.; HAN, J.; TAYLOR, M.V. The conserved transcription factor Mef2 has multiple roles in adult *Drosophila* musculature formation. **Research Report**, cidade, v. 139, p. 1270-1275, 2012.

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.

TABEI, Y.; KITADE, S.; NISHIZAWA, Y.; KIKUCHI, K.; KAYANO, T.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 159–164, 1998.

TANAKA, T. Fundamental discussion of Citrus classification. **Studia Citrogia**, 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. 5, p. 5992-599, 2008.

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

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1857–1862, 2005.

TERRAS, F.R.G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N.V.; OSBORN, R.W.; KESTER, A.; REES, S.B.; TORREKENS, S.; LEUVEN, F.V.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 7, p. 573-588, 1995.

TERRAS, F.R.G.; GODERIS, I.J.; VAN LEUVEN, F.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W.F. In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. **Plant Physiology**, Strasbourg, v.100, p 1055-1058, 1992.

TORNERO P.; CONEJERO V.; VERA P. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, p. 14412–14419, 1997.

THOMMA, B.P.H.J.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. **Planta**, Berlin, v. 216, p. 193-202, 2002.

VAN LOON, L.C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, Amsterdam, v. 40, p.199-211, 1970.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. ecommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 12, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Michigan, v. 55, p. 85–97, 1999.

VIGERS, A.J.; WIEDEMANN, S.; ROBERTS, W.K.; LEGRAND, M.; ELITRENNIKOFF, C.P.; FRITIG, B. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**, Amsterdam, v. 83, p. 155-161, 1992.

VRIENS, K.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensin: mechanisms of action and production. **Molecules**, Heverlee, v. 19, p. 12280-12303, 2014.

XIAO-QING GONG; JI-HONG LIU. 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.

WU, J.; WU, L.; LIU, Z.; QIAN, L.; WANG, M.; ZHOU, L.; YANG, Y.; LI, X. A plant defensin gene from *Oryshophragmus violaceus* can improve *Brassica napus*' resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 22, p. 6101-6109, 2009.

YAMAMOTO, M.; NAKATSUKA, S.; OTANI, H.; KOHMOTO, K.; NISHIMURA, S. Catechin acts as na infection-inhibiting factor in strawberry leaf. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.6, p.595-600, 2000.

YAMAMOTO, P.T.; FILIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHÃO, D.P.; BRAZ, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psillidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. **Proceedings of the huanglongbing-greening international workshop**, 2006. p. 96-97.

YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 12, p.1203-1211, 2000.

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA*-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 75, n.1-2, 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 JUNIOR.; 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. 147–155, 2002.

ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELÁZQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PEÑA, L.; GARCÍA, M.L. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 1, p.57-66, 2008.

ZANDONG, Y.; SHUANGYI, Z.; QIWEI, H. High level resistance to *Turning mosaic virus* in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis* (Lour) Olsson) transformed with the antisense NBI gene using marker-free *Agrobacterium tumefaciens* infiltration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, p. 920-929, 2007.

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.