

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

**Avaliação de plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis*)
e transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*) para
resistência ao *Citrus tristeza virus* (CTV)**

Fabiana Rezende Muniz

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

**Piracicaba
2012**

Fabiana Rezende Muniz
Engenheira Agrônoma

**Avaliação de plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis*) e
transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*) para resistência ao
Citrus tristeza virus (CTV)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2012

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

Muniz, Fabiana Rezende

Avaliação de plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis*) e transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*) para resistência ao *Citrus tristeza virus* (CTV) / Fabiana Rezende Muniz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2012.
87 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Laranja doce 2. Plantas transgênicas 3. Resistência genética vegetal 4. Tristeza dos citros 5. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.31
M966a

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

DEDICO e OFEREÇO

Aos meus pais, **JOEL E ORMINDA.**

Ao meu irmão, **FREDERICO.**

Ao meu namorado, **JULIANO.**

“O Senhor te guardará de todo o mal; ele guardará a tua vida. O Senhor guardará a tua saída e a tua entrada, desde agora e para sempre.” (Salmo 121)

“Stay hungry, stay foolish” (Steve Jobs)

Meus sinceros agradecimentos:

A Deus, meu guia e minha luz.

Aos meus pais, meu namorado, meu irmão e minha cunhada por todo amor, carinho, apoio, incentivo e torcida.

À Prof^a. Dr^a. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela confiança, orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação e preciosos conselhos e colaborações.

À Prof^a. Dr^a. Gloria A. Moore e ao Dr. Vicente Febres por me receberem tão bem e por terem permitido a realização dos valiosos experimentos nos EUA.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava pela constante disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende pelo interesse, colaboração e conselhos.

À Prof^a. Dr^a. Dagmar Ruth Stach-Machado pela indispensável ajuda nas análises imunológicas.

Aos técnicos Renata Beatriz Cruz, José Raimundo, Marcelo Favareto Correa e Kimberly Niblett pela amizade e auxílio indispensáveis.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) David, Éder e Sr. José pela amizade e ajuda nos trabalhos de campo e de casa-de-vegetação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À ESALQ e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e sua equipe.

Aos queridos e essenciais amigos dos laboratórios de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP, de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da ESALQ/USP e de Citrus Biotechnology and Molecular Biology da University of Florida/Gainesville/EUA: Leonardo, Eveline, Lívia, Alessandra, Ana Paula, Carolina, Perla, Juliana, Sylvia, Hilo, Karina, Camila, Sandra, Mônica, Rafaella, Liliane, Luzia, Marina, Flávia, Lísia, Tatiane, Pâmela, Ching, Latania e Abeer. Obrigada pela grande amizade, ótimo convívio, companheirismo, carinho, ensinamentos e auxílios.

Obrigada a todos que contribuíram para a realização desse trabalho!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Citricultura no Brasil	21
2.2 Tristeza dos citros	22
2.3 Transformação genética de citros	25
2.4 Transformação genética de plantas para resistência a vírus	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Avaliação de plantas transgênicas para resistência ao CTV	37
3.1.1 Material vegetal	37
3.1.2 Inoculação com CTV	39
3.1.3 Avaliação das plantas inoculadas	39
3.1.3.1 Teste serológico de ELISA	40
3.1.3.2 Detecção de partículas virais	41
3.2 Transformação genética de laranja azeda	44
3.2.1 Material vegetal	44
3.2.2 Manutenção e cultivo da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
3.2.3 Inoculação e co-cultivo	46
3.2.4 Seleção e regeneração	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Avaliação da resistência à infecção do vírus nas plantas inoculadas	47
4.3 Transformação genética de laranja azeda	66
5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Avaliação de plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis*) e transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*) para resistência ao *Citrus tristeza virus* (CTV)

Citrus tristeza virus (CTV) ocorre em quase todas as áreas produtoras de citros do mundo. O controle da doença se baseia, principalmente, no uso de porta-enxertos tolerantes e na premunização das copas. A obtenção de copas de laranjas doces ou de porta-enxerto de laranja azeda transgênicos resistentes ao CTV permitiria retornar a um uso mais intensivo deste excelente porta-enxerto. Com isso, esse trabalho buscou avaliar linhagens transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis*) e obter plantas transgênicas de laranja azeda (*Citrus aurantium*) para a resistência ao CTV, a fim de oferecer uma outra alternativa para o controle desta doença em citros. Foram avaliadas plantas transgênicas de laranja doce cv. 'Valência' e cv. 'Hamlin' contendo três diferentes construções gênicas. Uma contendo uma sequência sense (684 pb) do gene da capa protéica do CTV (pCTV-CP), outra contendo uma sequência conservada (559 pb) do CTV (pCTV-SC) e uma do tipo hairpin, contendo sequências sense e antisense do gene da capa protéica separadas por um íntron (pCTV-dsCP). Dez linhagens transgênicas de cada construção gênica e de cada cultivar foram previamente confirmadas por análises de Southern blot e RT-PCR, totalizando 60 linhagens transgênicas. Tais linhagens foram clonadas e enxertadas sobre limão 'Cravo' (*C. limonia*) e laranja azeda (*C. aurantium*), totalizando 360 plantas. Essas plantas, juntamente com plantas não transgênicas utilizadas como controle, foram inoculadas com o CTV por meio de *Toxoptera citricida* virulífero. As técnicas de ELISA indireto utilizando anticorpo monoclonal contra a capa protéica do CTV ou de Real-time PCR utilizando primers amplificadores dos genes *p20* e *p23* do genoma do CTV foram utilizadas para detectar o vírus nas plantas avaliadas, 4 semanas após as inoculações. Ocorreu variação na resistência ao vírus nas diferentes construções transgênicas utilizadas e entre clones de uma mesma planta. Alguns clones não foram infectados com o vírus mesmo após a quarta inoculação, indicando uma possível resistência ao patógeno. Um total de 30 experimentos de transformação genética de laranja azeda foram realizados, utilizando como explantes segmentos internodal, de epicótilo e de cotilédone associado ao hipocótilo. O teste de GUS permitiu a identificação de duas gemas com reação positiva (0,13% de eficiência de transformação). Tais gemas foram enxertadas *in vitro* sobre citrange 'Carrizo', mas apenas uma gema se desenvolveu. A planta obtida foi aclimatizada em casa-de-vegetação.

Palavras-chave: Transformação genética; *Citrus*; *Citrus tristeza virus*

ABSTRACT

Evaluation of sweet orange (*Citrus sinensis*) transgenic plants and genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) for the resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV)

Citrus tristeza virus (CTV) occurs in almost all citrus-growing areas of the world. Control of citrus tristeza relies mainly on the use of tolerant rootstocks and scion cross protection. Obtaining transgenic sweet oranges cultivars or sour orange resistant to CTV would allow a better use of this excellent rootstock. This way, the aim of this work was to evaluate transgenic sweet orange (*Citrus sinensis*) lines and to obtain transgenic sour orange (*Citrus aurantium*) for the resistance to CTV, in order to offer another alternative for the control of the disease in citrus. Transgenic sweet orange cv. 'Valencia' and cv. 'Hamlin' containing three different genetic constructs were evaluated. One gene construct contains a sense sequence (684 pb) of the coat protein gene of CTV (pCTV-CP), another contains a conserved sequence (559 pb) of CTV (pCTV-SC), and the last one a hairpin type, containing the sense and antisense sequences of the coat protein gene separated by an intron (pCTV-dsCP). Ten transgenic lines of each gene construct and each cultivar were previously confirmed by Southern blot and RT-PCR analysis, totalizing 60 transgenic lines. These lines were cloned and grafted into *C. limonia* and into *C. aurantium*, totaling 360 plants. The plants, along with non-transgenic plants used as control, were challenged four times with the CTV by means of viruliferous *Toxoptera citricida*. Indirect ELISA using monoclonal antibody against the CTV coat protein or the Real-time PCR using primers to amplify the CTV genes *p20* and *p23* were used to detect the virus in the tested plants, 4 weeks after inoculation. Variation in the virus resistance was observed among different transgenic constructs and different clones of the same plant. Some clones were not infected with the virus even after the fourth inoculation, indicating a possible resistance to the pathogen. A total of 30 genetic transformation experiments of sour orange were performed, using as explants internodal segments, epicotyl segments and cotyledon fragment with hypocotyl attached. GUS reaction detected two shoots positive (transformation efficiency of 0,13%). These shoots were *in vitro* grafted in 'Carrizo' citrange, but only one shoot developed. The plant obtained was acclimatized in greenhouse.

Keywords: Genetic transformation; *Citrus*; *Citrus tristeza virus*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Planta de *Citrus sinensis* transgênica, mostrando colonização por afídeos virulíferos da espécie *Toxoptera citrida* 48
- Figura 2 – Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da primeira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce ‘Hamlin’ contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão ‘Cravo’. - = planta de laranja doce ‘Hamlin’ não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce ‘Hamlin’ não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce ‘Hamlin’ enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce ‘Hamlin’ enxertadas sobre limão ‘Cravo’ utilizadas como controle da inoculação 50
- Figura 3 – Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da primeira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce ‘Valência’ contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão ‘Cravo’. - = planta de laranja doce ‘Valência’ não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce ‘Valência’ não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce ‘Valência’ enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce ‘Valência’ enxertadas sobre limão ‘Cravo’ utilizadas como controle da inoculação 51
- Figura 4 – Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da segunda inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce ‘Hamlin’ contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão ‘Cravo’. - = planta de laranja doce ‘Hamlin’

não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira inoculação e não avaliados na segunda inoculação 53

Figura 5 – Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da segunda inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Valência' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira inoculação e não avaliados na segunda inoculação 54

Figura 6 – Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da terceira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Hamlin' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira ou segunda inoculações e não avaliados na terceira inoculação 57

Figura 7 – Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da terceira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce ‘Valência’ contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão ‘Cravo’. - = planta de laranja doce ‘Valência’ não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce ‘Valência’ não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce ‘Valência’ enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce ‘Valência’ enxertadas sobre limão ‘Cravo’ utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira ou segunda inoculações e não avaliados na terceira inoculação 58

Figura 8 – Análises de RT-PCR para o gene *p23* de 40 clones transgênicos. M = marcador; - = controle negativo constituído de cDNA de planta de laranja ‘Valência’ não transgênica não inoculada com o CTV; + = controle positivo constituído de cDNA de planta de laranja ‘Valência’ não transgênica inoculada com o CTV; 1 - 40 = Clones transgênicos que permaneceram com baixos valores de absorbância na análise de ELISA após a terceira inoculação, numerados de acordo com a Tabela 1 61

Figura 9 – Detecção do CTV pela expressão dos genes *p20* e *p23* constituintes do genoma do vírus por Real-time PCR em plantas de *Citrus sinensis* cv. ‘Hamlin’ e cv. ‘Valência’, sendo duas plantas não-transgênicas não inoculadas (H-, V-), duas não-transgênicas inoculadas (H+, V+) e 40 clones previamente selecionados para baixa concentração ou ausência de CTV após três inoculações com *Toxoptera citricida* (1 a 40), numerados de acordo com a Tabela 1 63

Figura 10 – Detecção do CTV após a quarta inoculação com *Toxoptera citricida* através da expressão dos genes *p20* e *p23* constituintes do genoma do vírus por Real-time PCR em plantas de *Citrus sinensis* cv. ‘Hamlin’ e

cv. 'Valência', sendo duas plantas não-transgênicas não inoculadas (H-, V-), duas não-transgênicas inoculadas (H+, V+), oito não-transgênicas cultivadas em pomares cítricos e fontes do vetor virulífero (Pomar 1 a Pomar 8) e 26 clones previamente selecionados para baixa concentração ou ausência de CTV (1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 38 e 39) e numerados de acordo com a Tabela 1 65

Figura 11 – Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*) via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com o gene da capa protéica do CTV em construção *hairpin* (pCTV-dsCP). A) Explante contendo segmento de cotilédone associado a hipocótilo. B) Desenvolvimento de gemas adventícias na região do hipocótilo deste explante. C) Teste histoquímico de GUS mostrando expressão do gene *uidA*. D) Análise de PCR para o gene da capa protéica do CTV, mostrando resultado positivo para a planta GUS positiva. M = marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); - = controle negativo constituído da reação de PCR sem DNA; + = controle positivo constituído do plasmídeo da bactéria *E. coli* com a construção pCTV-dsCP; P = planta PCR positiva de laranja azeda, confirmando presença do gene da capa protéica do CTV, correspondente à 684 pb. E) Planta transgênica de laranja azeda aclimatizada 68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Clones transgênicos que permaneceram com baixos valores de absorvância no ELISA após a terceira inoculação 60
- Tabela 2 – Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de epicótilo, segmento internodal ou segmento de cotilédone associado ao hipocótilo como explantes 67

| 1 INTRODUÇÃO

A tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), é considerada uma das doenças de maior importância histórica para a citricultura. Na década de 1940, a tristeza foi responsável por dizimar milhões de plantas cítricas no Brasil, causando uma escassez de frutas cítricas no país. Tal fato se deveu principalmente ao uso intensivo do porta-enxerto laranja azeda nos pomares cítricos da época, porta-enxerto intolerante à esta doença. O programa de premunização contra o CTV utilizando estirpes fracas do vírus e o replantio de pomares substituindo a laranja azeda por porta-enxertos tolerantes ao CTV levaram à recuperação dos pomares brasileiros.

O vírus da tristeza pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Closterovirus*. Possui um RNA de fita simples como material nucléico e partícula viral de tamanho aproximado de 10 a 12 nm de diâmetro e 2000 nm de comprimento, sendo considerado o maior vírus de plantas detectado até os dias atuais (GARNSEY; LEE, 1989). O vírus é transmitido por material propagativo infectado e por afídeos de forma semi-persistente, sendo o pulgão preto (*Toxoptera citricida*) o de maior eficiência na transmissão (ROCHA-PEÑA et al., 1995; MULLER et al., 2005).

A tristeza é uma doença de interação entre a copa e o porta-enxerto e, por isso, seu potencial destrutivo é aumentado em certas combinações. Grande parte das cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), embora permitam a multiplicação do CTV, são tolerantes à sua presença. São consideradas suscetíveis e tolerantes, já que permitem a multiplicação em altas concentrações do CTV, mas não apresentam sintomas graves quando em pé franco. Entretanto, podem apresentar sintomas drásticos quando enxertadas em porta-enxerto intolerante. Por isso, devem ser cultivadas sobre porta-enxertos que também tenham tecidos tolerantes, como é o caso do limão 'Cravo' (*Citrus limonia* (L.) Osb.). A laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), não permite a multiplicação do vírus, sendo resistente ao mesmo, mas é intolerante a presença do CTV. Quando em combinação com uma copa suscetível, recebe a carga viral multiplicada no tecido da copa suscetível e mostra os mais graves sintomas da doença, inclusive a morte da planta (BORDIGNON et al., 2003; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A laranja azeda foi o principal porta-enxerto da citricultura de muitos países, até a introdução do vírus da tristeza dos citros. Tal importância se deve, principalmente, ao seu bom desempenho como porta-enxerto, com características de alto vigor, boa qualidade e alta produção de frutos e resistência ao déficit hídrico, à gomose de *Phytophthora* e ao frio (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

O desenvolvimento de resistência a doenças é um importante componente de qualquer programa de melhoramento de plantas, sendo que para as plantas cítricas, a transformação genética é considerada uma alternativa interessante para obtenção de plantas melhoradas. Existem, atualmente, diversas estratégias para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças. Para a resistência a vírus, a aplicação do conceito de resistência derivada do patógeno (PDR), proposto por Sanford e Johnston em 1985, pode ser considerada a estratégia padrão. De acordo com esses autores, a resistência do hospedeiro ao patógeno pode ser obtida pela introdução de genes específicos do próprio patógeno ao genoma do hospedeiro (SANFORD; JOHNSTON, 1985).

Assim, torna-se de extrema importância a obtenção de novos cultivares, tanto de porta-enxerto como de copa de citros que sejam resistentes à multiplicação do CTV, aumentando a diversidade de plantas nos pomares. A obtenção de copas de laranja doce e de porta-enxertos de laranja azeda transgênicos e resistentes ao CTV permitiria o retorno do uso intensivo deste importante porta-enxerto na citricultura brasileira. As construções derivadas do genoma do CTV utilizadas neste trabalho atuariam na proteção cruzada ou no silenciamento do vírus. Com isso, os objetivos do trabalho foram avaliar a resistência ao CTV de plantas transgênicas de *Citrus sinensis* cvs. 'Valência' e 'Hamlin', contendo três diferentes construções gênicas derivadas do genoma do vírus e obter plantas transgênicas do porta-enxerto laranja azeda contendo uma construção gênica relacionada ao gene da capa protéica do CTV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citricultura no Brasil

Os citros são uma das principais frutas cultivadas do mundo, com expressiva importância econômica. A cultura está amplamente distribuída e é economicamente importante nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições edafoclimáticas são adequadas para o seu desenvolvimento. As plantas cítricas são cultivadas em regiões compreendidas entre os paralelos 40° N e 40° S, estando as principais regiões produtoras concentradas em latitudes superiores a 22° N e 22° S (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

No Brasil, a cultura teve seu maior avanço nas últimas quatro ou cinco décadas. Desde então, o país se mantém em posição de destaque na liderança mundial, sendo responsável pela geração de elevada quantidade de divisas para o país e pelo emprego de grande quantidade de mão-de-obra direta e indireta. Além disso, tal cadeia produtiva permitiu ainda grande avanço em tecnologia e ciência e o Brasil passou a integrar o pequeno grupo de países que desenvolvem pesquisas avançadas em genética molecular, principalmente após o impulso gerado pelo mapeamento do genoma da *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora da Clorose Variegada dos Citros (NEVES; JANK, 2006).

O Brasil se tornou na década de 1980 o maior produtor mundial, sendo que é, atualmente, o segundo maior produtor de cítricos do mundo, ficando apenas atrás da China. Entretanto, a China se destaca na produção de tangerinas e o Brasil fica na posição de maior produtor mundial de laranjas doces e de suco concentrado de laranja (FNP, 2011; FAO, 2011). O cultivo é realizado em todas as regiões brasileiras, com destaque para os Estados de São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais, somando juntos mais de 90% da produção total do país (FNP, 2011).

Dentre os grupos de citros, os mais produzidos no Brasil são as laranjas doces; tangerinas, mandarinas e clementinas; limas e limões; e pomelos. A produção de cada um desses grupos em 2009 foi de 17.618.500 t, 1.094.430 t, 972.437 t e 66.895 t, respectivamente (FAO, 2011). Dentre as laranjas doces, as cultivares mais produzidas são 'Hamlin', 'Valência', 'Pêra' e 'Natal'.

Apesar da produção mundial de frutas cítricas ter aumentado, no Brasil a área plantada vem diminuindo desde 2009 e, conseqüentemente, a produção também.

Em 2008 a produção alcançou 20.654.150 t em 938.723 ha. Já no ano seguinte, houve uma redução para 19.752.262 t, em uma área plantada de 887.184 ha (FAO, 2011). Tal fato se deveu às diversas dificuldades que a cultura apresenta no país, com destaque para o constante surgimento de doenças devastadoras e à vulnerabilidade às oscilações internacionais de oferta e demanda. Em São Paulo, o principal Estado produtor do Brasil, mesmo com a redução da área plantada na última década, o aumento da produtividade e a migração da produção para a região sudoeste sustentaram a produção do Estado, contribuindo para que a produção não reduzisse na mesma intensidade que a área plantada (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, 2009).

Assim como muitas cadeias produtivas do mercado brasileiro, o histórico da citricultura mostra recorrentes flutuações, ou seja, fases de prosperidade e de decadência (BOTEON; NEVES, 2005). Entretanto, a diversificação do mercado consumidor pode ser uma das atuais alternativas para os produtores, juntamente com o crescimento do embasamento técnico e científico na área para auxiliar o controle de doenças e o aumento da produtividade da citricultura brasileira.

2.2 Tristeza dos citros

Diversas doenças têm sido constatadas com a expansão da cultura, desde o início do plantio comercial de citros. Algumas dessas doenças são altamente destrutivas e limitantes para o cultivo, acarretando grande impacto econômico em diversas regiões do mundo. Entre essas doenças, destaca-se a tristeza dos citros, conhecida historicamente como uma das doenças mais importantes na citricultura (BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989).

A tristeza dos citros está disseminada por todas as regiões produtoras de citros do mundo, principalmente, na América do Sul, Estados Unidos, Espanha e Israel (BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989; BORDIGNON et al., 2003).

Foi registrada pela primeira vez no início do século passado na África do Sul. Os pesquisadores observaram que laranja doce (*Citrus sinensis*) enxertada sobre laranja azeda (*C. aurantium*) apresentava taxa de crescimento reduzido, atribuindo tal fato à incompatibilidade entre copa e porta-enxerto. O mesmo foi observado também em outras regiões produtoras de citros do mundo (CAMBRA et al., 1988).

No Brasil, a doença foi detectada em 1937 na região do Vale do Paraíba, e foi nomeada Tristeza (BITANCOURT, 1940; MOREIRA, 1942). Atingiu 90% dos pomares, dizimando a maioria deles e causando, inclusive, uma escassez de produtos cítricos no país. Tal ocorrência se deu principalmente pelo fato do porta-enxerto mais utilizado na época ser a laranja azeda, variedade suscetível ao vírus. A doença foi manejada com a substituição da laranja azeda pelo porta-enxerto limão 'Cravo' (*C. limonia*), tolerante ao vírus causador da tristeza.

Embora a doença tenha causado quase o aniquilamento da citricultura na década de 1940, após 10 anos de recuperação do desastre causado pelo vírus, com a implantação de novos pomares utilizando limão 'Cravo' como porta-enxerto e clones pré-imunizados, o crescimento da produção de laranja no Brasil foi reiniciado (MÜLLER; COSTA, 1977; DONADIO et al., 2005). Atualmente todas as laranjeiras se encontram infectadas pelo CTV no Brasil.

A natureza viral da doença foi constatada quando Meneghini (1946) conseguiu transmitir o patógeno utilizando centenas de afídeos (*Toxoptera citricida*) por planta. O vírus causador da doença é um dos mais complexos vírus de plantas, pertence ao gênero *Closterovirus* e é denominado *Citrus tristeza virus* (CTV). O CTV é constituído de partículas flexuosas longas em forma de bastão, que medem em torno de 10 a 12 nm de diâmetro e 2000 nm de comprimento, com peso molecular de $6,5 \times 10^6$. Contêm um genoma não-segmentado composto por uma molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva. Duas proteínas encapsulam o material genético, sendo uma maior (p25) e outra menor (p27), o que torna o vírus estruturalmente polar. O vírus tende a infectar e a se restringir a tecidos floemáticos e é eficiente no movimento de longa distância na planta (COSTA; GRANT; MOREIRA, 1949; KITAJIMA et al., 1964; GARNSEY; LEE, 1989; MULLER et al., 2005; HERRON et al., 2006). O genoma do CTV possui de 19.226 a 19.296 nucleotídeos, com 12 ORFs (*Open Reading Frames*), além das regiões não traduzidas (UTR), codificando pelo menos 19 produtos protéicos finais. Muitas dessas ORFs são conservadas entre os membros da família Closteoviridae (PAPPU et al., 1994; HILF et al., 1995; KARASEV et al., 1995; LÓPEZ et al., 2000; SUASTIKA et al., 2001; SATYANARAYANA et al., 2004, 2011; MÜLLER et al., 2005).

O vírus da tristeza pode ser transmitido facilmente por material propagativo infectado, o que acentua a importância da doença, já que o método comercial mais

comum de propagação das plantas cítricas é a enxertia (MULLER et al., 2005). A transmissão natural do CTV é feita de forma semi-persistente e não-circulativa por diferentes espécies de afídeos, como *Aphis gossypii* e *Aphis spiraecola*, e com destaque para o *Toxoptera citricida* ou pulgão preto dos citros, vetor com maior eficiência de transmissão e considerado o responsável pela disseminação da doença (ROCHA-PEÑA et al., 1995; MULLER et al., 2005). A transmissão semi-persistente do CTV por *T. citricida* sugere que o vírus deve se acumular no canal alimentar do afídeo. A aquisição do vírus pelo afídeo necessita de um período de alimentação de 30 minutos a 24 horas. Após aquisição do vírus, o afídeo pode permanecer virulífero por um período de 24 a 36 horas (RACCAH; LOEBENSTEIN; BAR-JOSEPH, 1976; WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1993; MÜLLER; COSTA, 1993; MURPHY et al., 1995; MICHAUD, 1998). Alguns relatos mostram taxa variável de eficiência de transmissão do CTV por apenas um afídeo, chegando até 50%. Tal eficiência é elevada com o aumento do número de insetos por planta (COSTA; GRANT, 1951; YOKOMI et al., 1994; BROADBENT; BRLANSKY; INDSTO, 1996).

Para o caso específico de pesquisas com plantas transgênicas de citros para resistência ao CTV, o desafio das plantas para avaliar a resistência ao vírus tem sido feita por enxertia de material vegetal infectado ou por afídeos virulíferos. A última opção simula melhor o que ocorre naturalmente no meio ambiente ou pomar citrícola, sendo que os afídeos mais utilizados são *A. gossypii* e *T. citricida* (DOMÍNGUEZ et al., 2002b; FAGOAGA et al., 2006; HERRON et al., 2006; BATUMAN; MAWASSI; BAR-JOSEPH, 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; CERVERA et al., 2010; MUNIZ et al., 2012).

Rotineiramente, a presença do CTV pode ser diagnosticada no campo pela observação dos sintomas. Outra maneira de diagnosticar a doença é a indexação biológica, empregando o limão 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) como planta indicadora (FEICHTENBERGER et al., 2005; MÜLLER et al., 2005). No laboratório, estruturas virais características, como corpos de inclusão, podem ser observados em microscópio de luz com corantes específicos ou no microscópio eletrônico (BRLANSKY; LEE; GARNSEY, 1988; ZHOU et al., 2002). Existem também técnicas imunológicas utilizando anticorpos mono ou policlonais específicos para o CTV que são capazes de detectar a presença das partículas virais em plantas infectadas. Tais técnicas são rápidas e confiáveis para o diagnóstico da doença. Dentre esses métodos, o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) apresenta maior

destaque. Esse método utiliza um anticorpo conjugado a uma enzima que, na presença de um substrato específico, produz uma reação colorimétrica capaz de ser quantificada (ROISTACHER, 1991; STACH-MACHADO et al., 1998). Recentemente, foram desenvolvidos protocolos baseados na técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como a técnica de RT-PCR (NIBLETT et al., 2000; SAMBADE et al., 2003; HILF; MAVRODIEVA; GARNSEY, 2005) e de Real Time PCR (qPCR), para determinar a presença relativa ou o acúmulo absoluto de partículas virais em tecidos vegetais (RUIZ-RUIZ et al., 2007). Tais técnicas apresentam alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

Atualmente, existem diversas estirpes de CTV causando os mais variados danos como rápido declínio, caneluras no lenho, amarelecimento e clareamento das nervuras (ROCHA-PEÑA et al., 1995). Os diferentes sintomas são causados, provavelmente, por variantes de um único vírus ou por combinação de estirpes (MCCLEAN, 1975).

2.3 Transformação genética de citros

A evolução das cultivares atuais de citros, desde seus ancestrais selvagens, levou milhares de anos. No entanto, essa evolução tornou a cultura dos citros a mais cultivada entre as frutíferas no mundo, sendo produzida em centenas de países (KHAN; KENDER, 2007).

O desenvolvimento de novas cultivares melhoradas de citros é muito desejável visto a necessidade de diversificação da base genética e de potencialização das cultivares já amplamente utilizadas, sempre incluindo copa, porta-enxerto e o resultado final da interação entre eles.

Alcançar esse objetivo por métodos de melhoramento convencional é um processo laborioso. A transformação genética de citros pode ser uma boa alternativa para tentar superar algumas das complicações encontradas no melhoramento convencional de citros, como incompatibilidade entre indivíduos, heterozigosidade, lento crescimento e maturação, poliembrionia e apomixia (MACHADO et al., 2005).

Os primeiros trabalhos de transformação genética de citros foram realizados no final da década de 1980, utilizando cultivares de laranja doce (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989; HIDAKA et al., 1990). Desde então, diversas cultivares e espécies de citros transgênicas já foram obtidas através de diferentes métodos de

transformação e regeneração de tecidos como transformação de protoplasto via polietileno glicol (PEG) (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989; VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990; FLEMING et al., 2000; GUO et al., 2005), bombardeamento de partículas (YAO et al., 1996) e transformação via *Agrobacterium* (MOORE et al., 1992; GUTIÉRREZ-E.; LUTH; MOORE, 1997; PEÑA et al., 1997; CERVERA et al., 1998a; DOMÍNGUEZ et al., 2000; 2002a; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; MUNIZ et al., 2012). Entretanto, o sistema via *Agrobacterium* é o mais utilizado atualmente para citros, já que é considerado o mais eficiente (MACHADO et al., 2005; SINGH; RAJAM, 2009; FEBRES et al., 2011).

A transformação via *Agrobacterium* já mostrou bons resultados para diversos híbridos e espécies de citros tais como *C. sinensis* (MUNIZ et al., 2012), *C. aurantium* (GHORBEL et al., 2000), *C. aurantifolia* (DOMINGUEZ et al., 2000), *C. paradisi* (FEBRES; LEE; MOORE, 2008), *Poncirus trifoliata* (ZOU et al., 2008), *C. paradisi* x *P. trifoliata* (VIEIRA et al., 2005), e *C. sinensis* x *P. trifoliata* (MIYATA et al., 2011). A eficiência de transformação pode chegar até a 45% (FEBRES et al., 2011). Entretanto, a metodologia se mostrou mais eficiente para *P. trifoliata* e híbridos *P. trifoliata* x *C. sinensis* do que para variedades de *C. sinensis* (PEÑA et al., 1995).

Diversos tipos de explantes têm sido utilizados em protocolos de transformação genética de citros, tais como calos (LI; SHI; DENG, 2002), sementes (KHAWALE et al., 2006), segmentos de epicótilo (MUNIZ et al., 2012) e de ramos (MOORE et al., 1992). Apesar do grande interesse na utilização de explantes provenientes de tecidos adultos para superar características relacionadas à fase juvenil, os explantes provenientes de tecidos mais jovens são preferíveis, já que normalmente apresentam maior eficiência de regeneração e transformação. Tal fato, provavelmente, se deve a maior divisão celular do tecido jovem, sendo mais adequado para integração do DNA exógeno e para regeneração de brotos, e também aos diferentes componentes da parede celular e dos exsudados no tecido mais velho, resultando em menores adesão bacteriana e ativação de genes de virulência (BOND; ROOSE, 1998). Além disso, tecidos adultos possuem baixa capacidade morfogênica e podem gerar maior dificuldade na fase de assepsia (CERVERA et al., 1998b, 2008).

Outros fatores que afetam a eficiência da transformação genética de citros são a estirpe da *Agrobacterium* e o co-cultivo do explante com a bactéria. Foi

observada eficiência de transformação variável em experimentos utilizando sete diferentes cultivares de citros e três diferentes estirpes de *Agrobacterium* (BOND; ROOSE, 1998). Um aumento no período de co-cultivo está associado a um aumento de brotos regenerados e transformados, mas longos períodos de cultivo podem levar ao crescimento exagerado e indesejável da bactéria, reduzindo a regeneração dos brotos. Sendo assim, o co-cultivo deve estar entre dois e três dias (CERVERA et al., 1998a; COSTA; OTONI; MOORE, 2002).

Com os grandes avanços na área da genômica, diversos genes têm sido disponibilizados para clonagem e transformação, sendo alguns de interesse agrônomico. O gene *hal2*, isolado de levedura, e os genes *leafy* e *apetala1*, isolados de *Arabidopsis*, já foram introduzidos em citrange 'Carrizo' para resistência à salinidade e para aceleração do florescimento e redução do período juvenil, respectivamente (CERVERA et al., 2000; PEÑA et al., 2001). Outros exemplos são o gene *gna*, introduzido em *C. paradisi* para resistência a afídeos (YANG et al., 2000), o gene da enzima pectina-metil-esterase, para melhorar qualidade do suco de laranja 'Valência' (GUO et al., 2005) e o gene *cs-acs1*, introduzido em diversas cultivares para resistência a baixas temperaturas (WONG et al., 2001).

Em função do grande impacto econômico causado pelas doenças de plantas, muitos programas de melhoramento vegetal se dedicam a obtenção de plantas resistentes a doenças, utilizando genes de resistência derivados de genomas vegetais bem estudados ou do genoma do próprio patógeno (FEBRES et al., 2011).

Os trabalhos de transformação genética de citros utilizando a resistência derivada do patógeno se iniciaram no final do último século com a introdução do gene do capsídeo do CTV em *C. aurantium* e *C. aurantifolia* (GUTIÉRREZ-E.; LUTH; MOORE, 1997). Desde então, diversos grupos de pesquisa na área de biotecnologia de citros tentam obter plantas transgênicas de citros resistentes a diferentes patologias, introduzindo diversas seqüências derivadas do genoma dos patógenos. São exemplos plantas transgênicas de *C. aurantifolia* contendo o gene maior da capa protéica do CTV (*p25*) (DOMÍNGUEZ et al., 2000, 2002a, 2002b); *C. aurantifolia* transformadas com variadas formas do gene *p23* do CTV (FAGOAGA et al., 2005; 2006); *C. paradisi* contendo o gene *Ctv* de resistência ao CTV (RAI, 2006) ou o gene do capsídeo do CTV nas versões traduzível ou não-traduzível (FEBRES et al., 2003; FEBRES; LEE; MOORE, 2008); limão 'Cravo' e laranjas azeda e doce com o gene ou fragmentos do gene da capa protéica do CTV (SCHINOR, 2006;

MUNIZ et al., 2012); *C. paradisi* com diferentes construções contendo a região 3' do genoma do CTV (ANANTHAKRISHNAN et al., 2007); laranja doce contendo o gene da capa protéica do *Citrus psorosis virus* (CPsV) ou construções hairpin do mesmo gene ou dos genes de 54k ou de 24k (ZANEK et al., 2008; REYES et al., 2011); laranja doce transgênica para resistência ao cancro, contendo o gene truncado *pthA* da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (YANG et al., 2011). Dessas plantas, as que já foram desafiadas com os diversos patógenos apresentaram resultados contrastantes, já que algumas plantas mostraram sintoma de imunidade e outras, derivadas da mesma linhagem, apresentaram sintomas característicos da doença.

Outra estratégia para obtenção de plantas resistentes a doenças é o uso de genes que estimulam o sistema de defesa em plantas e/ou que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade. Tais genes têm a capacidade de desencadear mecanismos de defesa naturais da planta, como as respostas de hipersensibilidade, a morte celular programada e a resistência sistêmica adquirida. São exemplos dessa estratégia plantas de limão 'Cravo' contendo o gene *bO* derivado de *Halobacterium halobium* para resistência a *Phytophthora nicotianae* (AZEVEDO et al., 2006); laranja doce transgênica para resistência ao cancro contendo o gene *hrpN* derivado de *Erwinia amylovora* (BARBOSA-MENDES et al., 2009); *C. paradisi* e *C. sinensis* contendo o gene *NPR1* clonado de *Arabidopsis* mostrando uma resistência à bactéria do cancro diretamente proporcional ao nível de expressão do transgene (ZHANG et al., 2010); laranja doce cv. Pineapple expressando o gene *PR-5* derivado de tomateiro mostrando redução das lesões causadas por *Phytophthora citrophthora* (FAGOAGA et al., 2001).

Outra abordagem encontrada em trabalhos utilizando transformação genética de citros para resistência a doenças é o uso de genes que codificam peptídeos antibacterianos que não são de origem vegetal. Entre esses peptídeos, citam-se as cecropinas e as atacinas, isoladas de insetos. Já foram obtidas plantas transgênicas de laranja doce com diferentes genes que codificam para peptídeos do grupo das cecropinas ou atacinas para resistência a bactérias, principalmente a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causadora do cancro cítrico (BESPALHOK FILHO et al., 2001; BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; CARDOSO et al., 2010).

Há ainda o uso dos genes maiores de resistência (genes *R*). Tais genes estão presentes no genoma da planta hospedeira e codificam um receptor específico que reconhece o elicitor codificado pelo gene de avirulência (*avr*) do patógeno. Esse

reconhecimento desencadeia uma rota de transdução de sinais que ativa os genes envolvidos na resposta de hipersensibilidade da planta (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). A transferência desses genes para outras espécies e gêneros pode permitir a resistência a diversos patógenos (SONG et al., 1995). Um exemplo é o gene *Xa21* isolado de uma espécie de *Oryza longistaminata* que foi introduzida em *C. sinensis* via PEG para resistência a bactéria causadora do cancro cítrico (OMAR; SONG; GROSSER, 2007; MENDES et al., 2010).

2.4 Transformação genética de plantas para resistência a vírus

A transformação genética se destaca como importante ferramenta para o melhoramento de plantas. Tal técnica permite a introdução de genes responsáveis por características específicas ao genoma das plantas, mantendo as qualidades já existentes e favorecendo enormemente a obtenção de novas plantas contendo características melhoradas.

O valor dessa técnica é destacado em trabalhos com culturas perenes. A transformação genética se enquadra como uma boa alternativa para contornar problemas comuns no melhoramento convencional dessas culturas, tais como longo período juvenil, complexa biologia reprodutiva e alta heterozigose (PRIETO, 2011).

A transformação genética de plantas envolve duas etapas. A primeira é a introdução do DNA de interesse no genoma da planta e a outra é a regeneração das células transgênicas em uma planta completa geneticamente transformada (SINGH; RAJAM, 2009). Para que o processo seja efetivo, o DNA deve ser introduzido em células vegetais aptas a regenerar plantas completas (SANTARÉM, 2000).

A *Agrobacterium tumefaciens*, espécie mais amplamente utilizada em trabalhos de transformação genética de plantas, contém um plasmídeo indutor de tumor (Ti – Tumor-inducing) que possui o T-DNA (Transferred DNA), região que é inserida no genoma vegetal. A partir desses conhecimentos, plasmídeos bacterianos modificados foram construídos, incluindo no T-DNA genes de interesse e retirando características de incompatibilidade biológica entre bactéria e planta. Dessa forma, com o auxílio de técnicas de cultura de tecidos, tornou-se possível a transferência de sequências de interesse presentes nesse novo plasmídeo para o genoma da planta, com boa eficiência para a maioria das plantas (FINER et al., 2006; FEBRES et al., 2011).

Apesar do grande número de diferentes técnicas existentes para a introdução de um gene exógeno na célula da planta, as que se mostraram mais eficientes e que são mais comumente utilizadas são o bombardeamento de partículas e a transformação via *Agrobacterium* (FINER et al., 2006). As principais vantagens do método via *Agrobacterium* em relação ao bombardeamento são o custo reduzido, a independência de equipamentos específicos e a maior consistência na integração dos eventos ao genoma vegetal (ZUPAN et al., 2000).

As fases entre a integração e a expressão do transgene ainda são pouco entendidas, mas devem conter detalhes responsáveis por aprimorar tanto as taxas de transformação quanto os níveis de expressão do transgene (FINER et al., 2006).

A transformação genética é muito utilizada na obtenção de plantas resistentes a doenças, desde o início de sua aplicação. Isso se deve principalmente ao fato de que o controle de doenças através do uso de variedades resistentes é de fácil utilização, possui boa eficiência e é econômico para o produtor, além de gerar menor agressão ao meio ambiente, agricultor e consumidor.

O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a vírus se tornou uma importante estratégia para o controle efetivo de viroses (GOTTULA; FUCHS, 2009). Existem, atualmente, diversas estratégias para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças. Tais estratégias visam introduzir genes que dificultam o estabelecimento do patógeno e o desenvolvimento da doença. Até o momento existe uma grande dificuldade na obtenção de plantas transgênicas resistentes a fungos e bactérias. Por outro lado, diversos resultados de pesquisas mostram que as estratégias para resistência de plantas transgênicas a vírus têm sido utilizadas com maior sucesso (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008).

No caso de obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus, estratégias baseadas no conceito de resistência derivada do patógeno (Pathogen-Derived Resistance – PDR) são amplamente utilizadas. Tal conceito foi descrito em 1985, relatando a obtenção de resistência através do uso de material genético do próprio patógeno como fonte do transgene a ser introduzido no genoma do hospedeiro de interesse (SANFORD; JOHNSTON, 1985).

O conceito de PDR foi validado pela primeira vez em tabaco transgênico. Essas plantas expressavam o gene da capa protéica do *Tobacco mosaic virus* (TMV) e, quando desafiadas com partículas do TMV, não apresentaram sintomas ou apresentaram um atraso na aparição de sintomas (POWELL-ABEL et al., 1986).

Além disso, experimentos complementares demonstraram que a resistência das plantas era proporcional à expressão da proteína viral (CLARK et al., 1990). Tal descoberta abriu caminho para a produção de grande número de plantas transgênicas resistentes a vírus. Muitas dessas apresentam bons resultados em nível de pesquisa, outras já estão na fase de testes de campo e algumas já foram liberadas para plantios comerciais (BEACHY; LOESCH-FRIES; TUMER, 1990; FITCHEN; BEACHY, 1993; BEACHY, 1997; GOTTULA; FUCHS, 2009).

O tomateiro foi a primeira cultura melhorada por transgenia utilizando PDR avaliada em testes de campo. Nos testes de desafio das plantas pela inoculação mecânica do TMV, 95% das plantas foram assintomáticas e apresentaram a mesma produção de frutos que as plantas não transgênicas e não inoculadas (NELSON et al., 1988). Alguns anos depois, foram obtidas plantas de mamão transgênicas contendo o gene da capa protéica do *Papaya ringspot virus* (PRSV), as quais se mostraram resistentes ao mesmo vírus e foram levadas para plantios comerciais, restabelecendo a cultura do mamoeiro no Havaí (FITCH et al., 1992). Diversas plantas de abobrinha expressando o gene do capsídeo viral do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e/ou do *Cucumber mosaic virus* (CMV) e/ou do *Watermelon mosaic virus* (WMV) também foram obtidas. Dessas, plantas expressando o gene da capa protéica do ZYMV e do WMV foram altamente resistentes tanto à inoculação mecânica quanto à por afídeos e foram aprovadas para a comercialização nos Estados Unidos (TRICOLI et al., 1995; GOTTULA; FUCHS, 2009). Na China, em 2008, foram liberadas para plantios comerciais plantas transgênicas de tomate e pimenta resistentes ao CWV (STONE, 2008). Recentemente, foi liberada nos Estados Unidos uma cultivar de ameixeira modificada para expressar a proteína do capsídeo do vírus *Plum pox virus* (PPV) e resistente ao mesmo vírus (Conselho de Informação sobre Biotecnologia, 2011; GOTTULA; FUCHS, 2009).

Com relação às pesquisas utilizando transformação genética de plantas aplicando a PDR, projetos com diferentes culturas e técnicas têm sido desenvolvidos por todo o mundo e diversos grupos conseguem obter plantas resistentes a vírus. São exemplos: citros para resistência ao CTV (DOMÍNGUEZ et al., 2000; 2002b; FAGOAGA et al., 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; ZANEK et al., 2008); tomateiro para resistência ao CMV (KANIEWSKI et al., 1999); maracujazeiro para resistência ao *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (MONTEIRO-HARA et al., 2011); feijoeiro para resistência ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (BONFIM et al.,

2007); e plantas de arroz resistentes ao *Rice tungro spherical virus* (RTSV) (SIVAMANI et al., 1999).

Diversas regiões derivadas do genoma dos patógenos, principalmente, as essenciais para o processo patogênico, têm potencial de gerar resistência quando introduzidos na planta de interesse (SANFORD; JOHNSTON, 1985). Tal fato foi confirmado por pesquisas com diferentes culturas e vírus desenvolvidas nos últimos 26 anos de uso da técnica, as quais mostram eficiência no uso das mais variadas seqüências virais como capa protéica, polimerase de RNA dependente de RNA, proteína do movimento, proteinases e extremidades 3' ou 5' não traduzidas (GOTTULA; FUCHS, 2009). Plantas resistentes de diversas culturas foram obtidas para quase todas as famílias de vírus (FUCHS; GONSALVES, 2007).

Muitos pesquisadores supõem que o mecanismo envolvido nessa resistência está relacionado com a competição pelos componentes celulares da planta infectada, assim como na resistência via premunização. Essa competição dificultaria a desencapsidação, a replicação e a propagação do patógeno. Outra hipótese seria as interações moleculares entre subunidades da capa protéica, ocasionando uma desestabilização da partícula viral. Nesses casos, a presença da proteína viral, muitas vezes modificada e disfuncional, seria essencial (BEACHY; LOESCH-FRIES; TUMER, 1990; BAULCOMBE, 1996; BENDAHMANE et al., 1997; GOLDBACH; BUCHER; PRINS, 2003; LINDBO; DOUGHERTY, 2005).

A proteína capsidial de vírus foi a primeira e mais amplamente utilizada para obtenção de resistência mediada pela proteína. A resistência mediada por essa proteína consiste na introdução no genoma da planta do gene ou de fragmento do gene responsável por codificar tal proteína pelo vírus que se pretende inibir. Esse gene está relacionado não somente com a encapsidação, mas em muitos outros aspectos da biologia viral como replicação, disseminação e movimentos célula-a-célula e sistêmico (CALLAWAY et al., 2001). Teoricamente, a capa protéica transgênica poderia encapsidar o ácido nucléico viral, havendo uma propagação de partículas virais disfuncionais. Além disso, a alta concentração dessa proteína na célula vegetal estaria inibindo a desmontagem na partícula viral (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Diversas plantas expressando a capa protéica de diferentes vírus mostraram efetiva resistência a esses vírus (GOTTULA; FUCHS, 2009). Essa resistência pode ser eficiente para várias estirpes de um mesmo vírus.

No entanto, na maioria das vezes não confere alto nível de resistência, mas sim um atraso no aparecimento dos sintomas (TEPFER, 2002).

Entretanto, muitos dos trabalhos utilizando PDR têm mostrado que não há a necessidade de tradução da proteína viral e que a resistência pode ser inversamente proporcional à presença dessa proteína. Nesse caso, a resistência seria mediada pelo RNA no mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS – Post-Transcriptional Gene Silencing). Sendo assim, existem duas estratégias aplicando PDR sendo utilizadas como princípios para desenvolver com sucesso plantas transgênicas resistentes a vírus. Uma age em nível de proteína e outra em nível de ácido nucléico (RNA ou DNA) (DOUGHERTY et al., 1994; FUCHS; GONSALVES, 2007; ARAGÃO; FARIA, 2007; GOTTULA; FUCHS, 2009).

Ao mesmo tempo em que as estratégias de PDR estavam sendo desenvolvidas, grupos distintos realizavam transformação genética de petúnias para superexpressar o gene que codifica a chalcone sintase, enzima chave na biossíntese de antocianinas, com o objetivo de obter coloração mais intensa das pétalas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990). Entretanto, as diferentes linhagens obtidas apresentaram níveis diferenciados de variegação, incluindo linhagens com flores totalmente sem cor. As análises moleculares mostraram que a cópia extra do gene inibiu a expressão do gene endógeno e do transgene, influenciando a biossíntese de antocianina, fenômeno nomeado co-supressão (BAULCOMBE, 2002; NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990).

Alguns anos depois, fenômeno semelhante foi observado por pesquisadores trabalhando com transformação genética de tabaco, tanto para resistência ao *Tobacco etch virus* (TEV), introduzindo o gene da proteína do capsídeo desse vírus no genoma das plantas (GOODWIN et al., 1996), como também para resistência ao *Potato virus X* com a introdução do gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (MUELLER et al., 1995; ANGELL; BAULCOMBE, 1997). Algumas linhagens transgênicas apresentaram resistência e outras não, sendo que as resistentes apresentavam pequena quantidade ou não apresentavam o RNA mensageiro e a proteína do transgene, ao contrário das suscetíveis. Contrariamente à resistência mediada pela proteína, dessa vez a resistência era observada na ausência da proteína, sem a necessidade de expressão do transgene (BAULCOMBE, 1996). Nesse caso a resistência viral é conferida via silenciamento gênico dependente de

homologia de seqüências. O silenciamento passou a ser a estratégia predominante e mais eficiente em trabalhos envolvendo resistência transgênica a vírus de plantas (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). Esta resistência mediada pelo RNA é específica para o vírus com seqüência homóloga ao transgene e pode conferir alto nível de resistência ou até a imunidade (TEPFER, 2002).

O fenômeno de silenciamento pode ser desencadeado como resultado da introdução de transgenes ou por um processo natural e universal, via infecção viral. Genes endógenos ou transgenes podem ser silenciados após a infecção viral, num processo de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS – Virus-Induced Gene Silencing) (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001; ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005). Tal fato sugere que o silenciamento gênico evoluiu como um processo genético de defesa contra viroses e transposons (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001). Após a infecção viral, a planta hospedeira inicia um breve desenvolvimento de sintomas sistêmicos seguido de recuperação devida à inativação do ciclo de replicação do vírus (AL-KAFF et al., 1998). Essa inativação se dá pela regulação da expressão de genes do patógeno, principalmente em nível pós-transcricional. Assim, no processo de PTGS ocorre a degradação do RNA após a sua transcrição, sem que ocorra a tradução da proteína (FAGARD; VAUCHERET, 2000).

O PTGS pode ser definido como uma série de processos celulares envolvidos na regulação da expressão gênica após a transcrição pela degradação de seqüências específicas de mRNA ou do bloqueio de sua tradução (LU et al., 2003; SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007). Tal mecanismo se inicia com a presença de um RNA dupla fita (dsRNA) no citoplasma. O dsRNA pode ter se originado da transcrição de um gene endógeno, de um transgene ou de um intermediário da replicação do vírus. Enzimas do tipo RNase III chamadas Dicers reconhecem essas formas estranhas de RNA e iniciam o processamento desse dsRNA em pequenas moléculas com aproximadamente 21 a 25 nucleotídeos, conhecidas como siRNAs (small interfering RNAs). Esses siRNAs são rearranjados num complexo ribonucleoprotéico chamado RISC (RNA-Induced Silencing Complex), onde servem de guia para a destruição e inibição da tradução do mRNA alvo. O RISC, composto por uma molécula guia (siRNA) e por proteínas da família Argonata, age clivando outros mRNAs que sejam homólogos ao siRNA. A especificidade do mecanismo é comprovada pelo acúmulo dos siRNAs de orientação

senso e anti-senso homólogos ao RNA silenciado, mostrando que essas pequenas moléculas são as guias para o processo de degradação (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999; WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001; BERNSTEIN et al., 2001; LU et al., 2003; VOINET, 2005; ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005; WATERHOUSE, 2006; SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007).

Uma característica marcante do PTGS é sua sistemicidade. No entanto, a natureza da molécula responsável pela característica sistêmica do PTGS ainda não está bem esclarecida. Entretanto tal fato já foi confirmado por diferentes trabalhos que mostram que o sinal do silenciamento é propagado a partir da célula onde o mecanismo foi inicialmente ativado (PALAUQUI et al., 1997; VOINET; BAULCOMBE, 1997; VOINET et al., 1998; WANG; METZLAFF, 2005). Além disso, outros indicam que o silenciamento de RNA é um processo gradual composto por quatro etapas distintas: iniciação, amplificação, sinalização sistêmica e manutenção (ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005).

Apesar de o silenciamento gênico aparentar ser um mecanismo altamente eficiente de resistência a patógenos em plantas, a co-evolução entre plantas e vírus desenvolveu mecanismos complementares de ataque e defesa entre esses dois organismos. Sendo assim, os vírus possuem um mecanismo para suprimir o silenciamento. São as proteínas supressoras do silenciamento, as quais podem interferir em diferentes etapas do mecanismo (ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005; WANG; METZLAFF, 2005). Essa é uma das razões para explicar o fato de que todas as plantas são hospedeiras de pelo menos um agente viral, o qual deve ser capaz de sobrepor ou evitar o sistema de defesa vegetal do tipo PTGS (WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001). Entre essas proteínas há a HC-Pro de potyvirus como o PVY e o TEV (MALLORY et al., 2002), a p19 do *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (SILHAVY et al., 2002), a 2b codificada pelo CMV (BRIGNETI et al., 1998) e a p23, a p20 e a CP do CTV (LU et al., 2004; FAGOAGA et al., 2006).

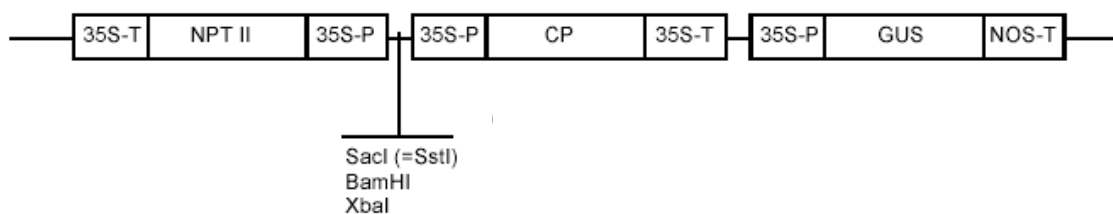
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação de plantas transgênicas para resistência ao CTV

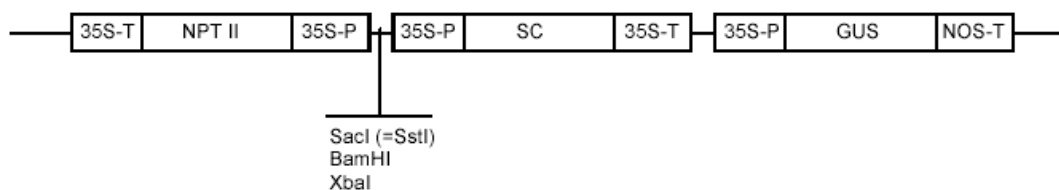
3.1.1 Material vegetal

Para os experimentos de avaliação da resistência ao CTV, o material vegetal foi constituído de 60 linhagens transgênicas de *Citrus sinensis* sendo 30 da cultivar 'Valência' e 30 da cultivar 'Hamlin'. As linhagens transgênicas contêm sequências gênicas que podem influenciar a resistência ao CTV, sendo que foram avaliadas 20 linhagens transgênicas de cada uma das três construções gênicas descritas a seguir, sendo 10 de cada cultivar.

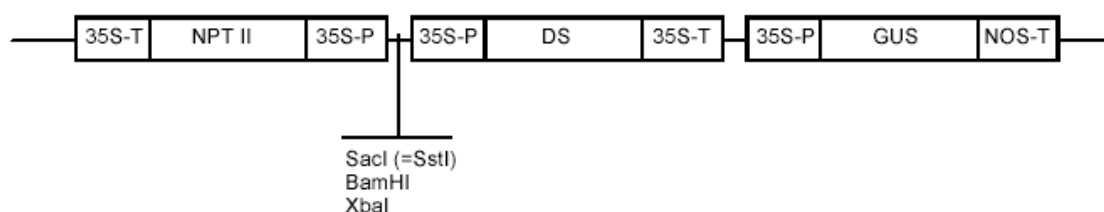
- pCTV-CP: contendo o gene maior da capa protéica do vírus da tristeza dos citros, com 684 pb, dirigido pelo promotor 35S, com o gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e o gene repórter *uidA* (GUS).



- pCTV-SC: contendo uma seqüência conservada no sentido antisense, clonada de diferentes isolados do vírus da tristeza dos citros, contendo parte do gene *p23* e parte da região 3' não traduzida, entre os nucleotídeos 18668 a 19226 (559 pb) tendo o genoma da estirpe T36 do CTV como referência, dirigida pelo promotor 35S, com o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *uidA* (GUS).



- pCTV-dsCP: contendo repetições no sentido sense e antisense do gene maior da capa protéica do vírus da tristeza dos citros, com 684 pb, separadas por um íntron do gene da quitinase de citros, dirigidas pelo promotor 35S, com o gene de seleção *nptII* e o gene repórter *uidA* (GUS).



Tais construções foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo. As plantas transgênicas foram obtidas por transformação genética indireta de epicótilos de plântulas de laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’ cultivadas *in vitro* (SCHINOR, 2006; MUNIZ et al., 2012).

Como controles positivo e negativo foram utilizadas plantas de laranja ‘Valência’ e ‘Hamlin’ não transgênicas, fornecidas pelo Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis/SP.

A propagação das 60 linhagens transgênicas foi realizada por enxertia em T invertido em porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* (L.) Osb.), obtidos em viveiros comerciais, e em porta-enxertos de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), produzidos a partir de sementes da variedade ‘São Paulo’, obtidas na Empresa Citrograf. Foram propagadas 5 borbulhas de cada linhagem transgênica no porta-enxerto limão ‘Cravo’ e 5 no porta-enxerto laranja azeda, as quais foram utilizadas para a inoculação do CTV com o vetor *Toxoptera citricida*. Foram propagadas também 10 borbulhas no porta-enxerto limão ‘Cravo’ e 10 borbulhas no porta-enxerto laranja azeda das laranjas ‘Valência’ e ‘Hamlin’ não transgênicas, sendo 5 de cada cultivar, as quais foram utilizadas como controles positivo (inoculadas com o vírus) e negativo (não inoculadas com o vírus) nos experimentos.

As linhagens e as plantas propagadas foram mantidas em casa-de-vegetação, recebendo adubações periódicas com nitrato de cálcio (1 g L^{-1} a cada 15 dias) e com o produto comercial Osmocote (22-04-08) ($2,5 \text{ Kg m}^{-3}$ a cada 6 meses).

Além disso, foram feitas avaliações periódicas para detectar e controlar a presença de pragas e doenças e para realizar podas e retirada de brotações indesejáveis.

3.1.2 Inoculação com CTV

Foram inoculados com o inseto vetor seis clones de cada linhagem transgênica, sendo três enxertados em porta-enxerto de limão 'Cravo' e três em laranja azeda. Foram utilizados como vetores os afídeos da espécie *Toxoptera citricida* virulíferos. Indivíduos desta espécie foram coletados em pomares citrícolas para iniciar a colônia. Estes se desenvolveram e multiplicaram em plantas fontes de CTV, para obtenção de uma colônia infectada mantida na casa-de-vegetação. Os pulgões utilizados foram analisados e identificados como *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) sob a supervisão do pesquisador Dr. Valdir Yuki, do Instituto Agronômico de Campinas. O isolado de CTV utilizado foi o CTV-IAC. Apenas na quarta e última inoculação, os afídeos utilizados foram todos provenientes de pomares citrícolas e não de colônias mantidas na casa-de-vegetação.

Foi realizado um total de quatro inoculações. Para cada inoculação, aproximadamente 15 pulgões foram transferidos das plantas CTV positivas (colônias) para cada clone. Os pulgões foram mantidos nas plantas por um período de 48 horas e, em seguida, retirados com um forte jato de água. Esse processo foi repetido após 7 e 14 dias da inoculação, até que se confirmou 100% de infecção das plantas utilizadas como controle positivo, pelo teste de ELISA. Como controle positivo das inoculações foram utilizadas 24 plantas não transgênicas para cada inoculação, sendo 12 de laranja 'Valência' e 12 de 'Hamlin', 6 de cada cultivar enxertadas em porta-enxerto limão 'Cravo' e 6 em laranja azeda.

3.1.3 Avaliação das plantas inoculadas

A detecção da replicação do CTV nas plantas transgênicas foi feita por três diferentes métodos: teste serológico de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sanduíche indireto, RT-PCR (Reverse-transcription PCR) e qPCR (Real-time PCR).

3.1.3.1 Teste serológico de ELISA

Foram utilizados para a detecção do vírus um antissoro policlonal contra CTV e um anticorpo monoclonal contra a proteína da capa protéica do isolado CTV-IAC.

Para a extração da proteína, foram maceradas 0,3 g de nervuras de folhas em 1,5 mL tampão PBST (Phosphate buffer solution; TWEEN®), contendo 2% de polivinilpirolidona. Em seguida, o macerado foi centrifugado (4800 g, 20 min).

Para as análises de ELISA, as placas foram sensibilizadas por no mínimo 12 h, a 4 °C, com 100 µL, por poço, com antissoro policlonal e em seguida foram feitas três lavagens, com 300 µL por poço, com tampão PBST. As placas foram bloqueadas por 1 h, a 37 °C, com 200 µL por poço de leite desnatado em pó, diluído em tampão PBS (Phosphate buffer solution), o qual foi descartado em seguida por aspiração dos poços. Em seguida foram aplicados 100 µL, por poço, do sobrenadante obtido na extração e a placa foi incubada por no mínimo 12 h, a 4 °C. Nova seqüência de três lavagens com PBST foi realizada. Após, o anticorpo monoclonal foi aplicado numa quantidade de 100 µL, por poço, numa diluição de 1:1000, em tampão PBS, e a placa foi novamente incubada a 37 °C, por 2 h, passando por outra série de lavagens logo em seguida. Foram aplicados 100 µL, por poço, de anti-IgG de camundongo na diluição de 1:15000 em PBS, seguido de inocubação por 1 h, a 37 °C. Foi realizada nova seqüência de três lavagens com PBST. Para revelação foi utilizada uma solução de paranitro fenil fosfato (1 mg/mL) em tampão substrato (pH 9,82), com incubação de 1 h, à temperatura ambiente. Por fim, as placas foram avaliadas em leitor de ELISA (405 nm).

Foi determinada a presença do vírus pelo teste de ELISA quatro semanas após cada uma das quatro inoculações com o CTV. Na primeira inoculação foram analisados três clones de cada um dos controles positivos e negativos (laranjas doces 'Valência' e 'Hamlin' não transgênicas inoculados – controle positivo – e não inoculados – controle negativo) e de cada uma das linhagens transgênicas. Nas inoculações seguintes, foram inoculados e analisados apenas os clones que permaneceram negativos na inoculação anterior, além dos controles positivos e negativos.

3.1.3.2 Detecção de partículas virais

Para confirmar os resultados obtidos pelo ELISA na terceira inoculação, foram realizadas análises de RT-PCR e de Real-time PCR, técnicas mais sensíveis para a detecção de partículas virais.

A) RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)

A extração de RNA total da planta foi realizada utilizando-se o produto comercial TRIzol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Constatada a integridade e qualidade do RNA extraído, este foi quantificado por fluorometria (“Qubit™ Fluorometer”; kit “Quant-iT™ RNA assay kit”, Invitrogen). Em seguida, foi realizada a transcrição reversa (RT) das amostras de RNA com “primers” específicos para detecção do gene *p23* do vírus (primer senso: GCGTGGATTGTGGTAGAAAACA; primer antisenso: TGCGCCACCTCGTTCTG), seguida de amplificação por PCR (RT-PCR) com os mesmos primers. Tal gene não está presente em nenhuma das construções gênicas utilizadas. Para tanto, 5 µg de RNA foi tratado com a enzima “RQI RNase-free DNase” (Promega). Para a reação de transcrição reversa foram utilizadas as enzimas transcriptases reversa “SuperScript™ II Reverse Transcriptase” (Invitrogen) ou “ImProm-II™ Reverse Transcription System” (Promega) e para a amplificação, a enzima “Taq DNA Polymerase” (Invitrogen). Foram utilizados para a reação 1,8 µg de RNA total, tratado com DNase juntamente com os primers. O cDNA gerado a partir desta reação, em um volume de 1 µL da reação de transcrição reversa contendo 0,08 µg de RNA total, foi então submetido a reação de PCR e seu produto separado por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo foi visualizado e fotografado em transiluminadores UV.

B) qPCR (Real-time PCR)

As análises de Real-time PCR foram realizadas após a terceira inoculação para as plantas que não apresentaram vírus de acordo com o teste de ELISA e após a quarta inoculação para todas as plantas inoculadas. Para tal análise, foi feita a extração de RNA total utilizando-se o produto comercial TRIzol (Invitrogen),

seguindo as recomendações do fabricante. A análise realizada após a terceira inoculação foi desenvolvida na Universidade da Flórida/USA. A análise realizada após a quarta inoculação foi feita no Brasil.

Foram macerados 50 a 100 mg de tecido foliar de cada amostra em presença de nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TRIzol ao macerado e procedeu-se a homogeneização por vigorosa agitação do tubo, com o objetivo de lise celular e dissolução de componentes celulares. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas. Em seguida, procedeu-se a centrifugação (12.000 g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante contendo RNA foi transferido para novo tubo ao qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio para melhor isolamento do RNA. Após agitar vigorosamente, procedeu-se um repouso de 3 min em temperatura ambiente e nova centrifugação (12.000 g, 15 min, 4 °C). A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e 500 µL de álcool isopropílico foram adicionados ao tubo para precipitar o RNA. O material permaneceu em repouso por 10 min, seguindo-se uma nova centrifugação (12.000 g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado ao pellet para lavagem e retirada do excesso de álcool isopropílico. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos abertos por alguns minutos para secagem do excesso de etanol. Foram adicionados 100 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) aos tubos e os mesmos foram mantidos no banho-maria (55 °C, 10 min) para completa dissolução do pellet na água.

Em seqüência ao isolamento, as amostras de RNA passaram por tratamento com DNase seguido de um protocolo de limpeza usando o kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Sciences) para eliminar qualquer contaminação por DNA ou proteína.

A concentração do RNA foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). A pureza foi medida de acordo com o valor da OD_{260}/OD_{280} , sendo que amostras com valores maiores ou iguais a 1,80 foram consideradas suficientemente limpas e de boa qualidade para a síntese de cDNA.

Foi utilizado 1 µg de RNA purificado para cada 20 µL de reação de síntese de cDNA. A reação de 20 µL incluiu 2 µL de primer randômico na concentração de 50 µM (Ambion Inc, Applied Biosystem), 2 µL de dNTPs na concentração de 10 µM, 2 µL de tampão First Strand 10X (Ambion Inc, Applied Biosystem), 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (100U/µL, Ambion Inc, Applied Biosystem) e 1 µL de

RNase Inhibitor (40U/ μ L, Ambion Inc, Applied Biosystem). O volume foi completado com água livre de RNase fornecida pelo kit.

Primeiramente, RNA, primers, dNTPs e água foram incubados em banho-maria (80°C, 2 min) e em seguida acondicionados em gelo (3 min). Logo após foram adicionados tampão, RNase Inhibitor e transcriptase reversa. Essa reação de 20 μ L foi levada para termociclador usando o ciclo térmico de 1 h a 42°C e 10 min a 92 °C (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc.), para ocorrer a transcrição. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até serem usadas nas reações de Real-time PCR.

Através de reações de Real-time PCR foram avaliados genes virais com sequências externas às construções gênicas. Os níveis de expressão dos genes *p20* (primer senso: AATATAGAGGCGAAACTGCGAGTACT; primer antisenso: GCGCTGGTACAGAGCAGCTT, sonda: CTCGACATCATAAGACG) e *p23* (primer senso: GCGTGGATTGTGGTAGAAAACA; primer antisenso: TGCGCCACCTCGTTCTG; sonda: AACGTAAGTGTAAGGTCAAC) derivados do genoma do CTV tiveram sua expressão determinada por Real-Time PCR quantitativo, utilizando o sistema Step One Plus Real-time PCR (Applied Biosystems). O gene *18S* (primer senso: CGACTCTCGGCAACGGATA; primer antisenso: CGCATTTCGCTACGTTCTTCA; sonda: CTCGGCTCTCGCATC) foi utilizado como gene endógeno para controle das reações.

Para as reações foram usadas placas do tipo Fast Reaction Plate contendo 96 poços (0,1 mL) (MicroAmp, Applied Biosystems) e cada poço foi utilizado para uma reação de 20 μ L para um gene e uma amostra.

O cDNA foi diluído numa concentração final de 2,5 ng/ μ L e a amplificação do gene se deu a partir de 2 μ L dessa solução (5 ng). Cada reação foi composta por 2 μ L de cDNA diluído, 10 μ L de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems), 1 μ L de mix de reação TaqMan contendo primers e sonda (Applied Biosystems) e 7 μ L de água livre de RNase. O mix de reação foi composto da combinação de sondas específicas e dos primers senso e antisenso para cada gene. Para todos os genes de defesa de citros avaliados, a concentração final de cada primer foi de 900 nM e da sonda foi 250 nM. Como gene de referência foi utilizado o *18S*, com uma concentração final de primers de 250 nM e de sonda de 150 nM para cada reação.

Os experimentos de Real-Time PCR foram desenhados utilizando o software Step One versão 2.1 (Applied Biosystems), no qual o tipo de experimento foi definido como C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$), utilizando reagentes TaqMan e a velocidade de amplificação foi definida como rápida. A fluorescência repórter para os genes testados foi FAM e para o 18S foi VIC. O ciclo de PCR foi 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos.

Para cada placa os gráficos de amplificação de cada gene foram checados manualmente para correção da *threshold*. Para as análises comparativas do C_T a amostra de laranja 'Hamlin' não-transgênica e negativa no teste de ELISA foi selecionada como amostra de referência. Os valores de quantificação relativa (RQ) foram exportados para o Microsoft Office Excel para posterior confecção dos gráficos e análise.

3.2 Transformação genética de laranja azeda

3.2.1 Material vegetal

Os experimentos de transformação genética foram realizados com a variedade laranja azeda (*Citrus aurantium*) 'São Paulo', utilizando-se explantes coletados de plantas mantidas em casa-de-vegetação (segmento internodal), de plântulas cultivadas *in vitro* (segmento de epicótilo) ou de sementes germinadas *in vitro* (segmento de cotilédone associado ao hipocótilo).

Para o explante do tipo segmento internodal, foram coletadas brotações novas de plantas mantidas em casa-de-vegetação e podadas constantemente, as quais foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) diluída em água destilada (1:1), durante 15 minutos sob agitação, e lavadas (5x) em água destilada e esterilizada, em condições assépticas. Os segmentos utilizados como explante possuíam aproximadamente 1,0 cm de comprimento.

Para a coleta de segmentos de epicótilo, as sementes de frutos maduros coletados no banco ativo de germoplasma (BAG) de citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis/SP, foram germinadas *in vitro*. As sementes foram vigorosamente lavadas com água corrente para a retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente sobre papel filtro durante 48 h. Para a germinação, foi retirado

o tegumento de sementes viáveis e as mesmas foram desinfestadas, em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água na proporção de 2:1, durante 15 minutos sob agitação constante. Em seguida, foi realizada a lavagem das sementes (5x) em água destilada estéril, em condições assépticas. As sementes foram então introduzidas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com Phytigel TM (2,0 g L⁻¹) e sacarose (30 g L⁻¹), e pH 5,8. O material foi então incubado no escuro a 27 °C para germinação e alongamento do epicótilo e, antes da retirada dos explantes, os tubos foram transferidos para condições de fotoperíodo de 16 h, por 14 dias. Os segmentos de epicótilo também possuíam em torno de 1,0 cm de comprimento.

Para os explantes de segmentos de cotilédone associado ao hipocótilo foram utilizadas sementes introduzidas *in vitro* em magentas (65 x 65 x 80 mm) da mesma forma relatada para o explante de epicótilo, e a incubação foi feita a 27 °C, em ausência de luz durante 30 dias. Os explantes foram obtidos pelo corte dessas sementes germinadas em segmentos formados por parte do cotilédone mais o hipocótilo, formando explantes com aproximadamente 0,5 cm (TAVANO, 2008).

3.2.2 Manutenção e cultivo da *Agrobacterium tumefaciens*

A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada foi a EHA 105, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com a construção do tipo hairpin pCTV-dsCP, contendo repetições sense e antisense do gene da capa protéica do CTV (TAVANO, 2008).

Linhagens da bactéria foram mantidas em freezer a temperatura de -80 °C em solução de glicerol (50%) e meio de cultura YEP líquido (extrato de levedura 10 g L⁻¹, cloreto de sódio 5 g L⁻¹ e peptona 10 g L⁻¹), suplementado com canamicina (50 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹).

Para os experimentos de transformação genética, a bactéria foi transferida para meio de cultura YEP sólido com canamicina (50 mg L⁻¹) e rifampicina (50 mg L⁻¹) e mantida a 28 °C para crescimento. Após 72 h de cultivo, uma colônia isolada foi transferida para erlenmeyer contendo YEP líquido com igual concentração de antibióticos, e incubado por 16 - 20 h, em agitador orbital (28 °C, 180 rpm). Em seguida foi feita a leitura da densidade ótica da suspensão bacteriana. Quando apresentou leitura de 0,5 a 1,0 no espectrofotômetro (600 nm), a suspensão foi

centrifugada (4800 rpm, 15 min, 15 °C) e o precipitado formado foi ressuspenso em meio de cultura MS, obtendo concentração final de 5×10^8 UFC/mL.

3.2.3 Inoculação e co-cultivo

Os explantes foram inoculados com a suspensão da bactéria, em placa de Petri, durante 15 minutos. Em seguida, foram secos em papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactéria, e então introduzidos em meio de cultura de co-cultivo EME suplementado com BAP ($0,5$ ou $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) ou cinetina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), acetoseringona (100 mM L^{-1}), ácido ascórbico (5 mg L^{-1}), sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}) e pH ajustado para 5,5. A incubação foi realizada à temperatura de 24 °C , por 2 dias, em ausência de luz.

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção EME suplementado com a mesma concentração de BAP ou cinetina utilizada durante o período de co-cultivo, sacarose (25 g L^{-1}), ágar (8 g L^{-1}), ácido ascórbico (5 mg L^{-1}), canamicina (100 mg L^{-1}), timentin (400 mg L^{-1}), para controle do crescimento da *Agrobacterium*, e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram subcultivados a cada 15 ou 21 dias.

3.2.4 Seleção e regeneração

A identificação das gemas transgênicas foi feita pelo teste histoquímico GUS, sendo que foram considerados transgênicos todo e qualquer tecido que apresentasse células com coloração azul, após incubação por 24 h em solução de X-Gluc.

As gemas identificadas como transgênicas no teste GUS foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo' germinadas *in vitro* e foram incubadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com PhytigelTM ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) e sacarose (30 g L^{-1}), e pH 5,8 sob fotoperíodo de 16 h, a 27 °C para pegamento da enxertia e desenvolvimento das plântulas. Após o desenvolvimento das plântulas foi realizada a transferência para vaso plástico contendo substrato autoclavado e a aclimatização em casa-de-vegetação. Nessa fase, a análise de PCR para amplificação do fragmento gene da capa protéica do CTV (684 pb) foi realizada, para confirmar a transgenia das plantas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da resistência à infecção do CTV em plantas transgênicas

As linhagens transgênicas avaliadas nesse trabalho foram caracterizadas molecularmente quanto à presença e transcrição dos transgenes em trabalhos anteriores (SOUZA, 2008; MUNIZ, 2008; MUNIZ et al., 2012). Estas plantas também tiveram sua resistência ao CTV avaliada com inoculação por enxertia. Os resultados obtidos mostraram que o vírus se multiplicou em clones de todas as linhagens transgênicas. Apenas alguns clones apresentaram uma baixa concentração de vírus. Com base nesse resultado, concluiu-se que o inóculo utilizado para tal avaliação foi muito forte, muito diferente da realidade de campo. Portanto, a concentração viral pode ter sobreposto a resistência das plantas transgênicas (SOUZA, 2008; MUNIZ, 2008; MUNIZ et al., 2012).

Com o objetivo de melhor reproduzir as condições naturais em que as plantas são infectadas com o vírus, cada uma das 60 linhagens transgênicas foram propagadas por enxertia sobre os porta-enxertos de limão 'Cravo' e de laranja azeda para proceder a análise da resistência das plantas transgênicas pela inoculação do CTV via inseto vetor.

A variedade limão 'Cravo' foi escolhida como porta-enxerto devido ao grande vigor que impõe à copa, reduzindo o tempo para a propagação das plantas, e por ser amplamente utilizada na citricultura brasileira. A variedade laranja azeda também impõe grande vigor à copa, e, apesar de também impor boa qualidade aos frutos, perdeu lugar como porta-enxerto na citricultura brasileira, durante a década de 1940, por ser intolerante ao CTV.

Após 25 a 30 dias da enxertia, foi realizada a poda da parte aérea dos porta-enxertos, para estimular a brotação das borbulhas, juntamente com a retirada dos fitilhos protetores. O "pegamento" das borbulhas foi de 90 a 100%.

A colônia do vetor *Toxoptera citricida* foi mantida em constante desenvolvimento e multiplicação em plantas contaminadas com CTV dentro da casa-de-vegetação. Foram necessários aproximadamente dois meses para alcançar a quantidade necessária de indivíduos para a inoculação de todas as plantas.

Após quatro meses de desenvolvimento dos clones das linhagens transgênicas, foram iniciadas as inoculações com o patógeno. As inoculações foram

feitas por afídeos virulíferos para o CTV e foram utilizadas plantas não transgênicas para controle da inoculação. A Figura 1 mostra uma planta transgênica colonizada pelos afídeos após a inoculação.



Figura 1 - Planta de *Citrus sinensis* transgênica, mostrando colonização por afídeos virulíferos da espécie *Toxoptera citrida*

As plantas inoculadas foram avaliadas aproximadamente quatro semanas após cada inoculação, pelo teste ELISA sanduíche indireto, utilizando para a detecção do vírus um antissoro policlonal contra CTV e um anticorpo monoclonal contra a proteína da capa protéica do isolado CTV-IAC. Esta técnica é bastante sensível, pois ao se usar antissoro policlonal para sensibilizar a placa há uma alta concentração da proteína a ser detectada pelo anticorpo monoclonal. O teste de ELISA é o mais comum para detecção do CTV em função da sua confiabilidade, rapidez e baixo custo relativo. Tal método pode utilizar anticorpo policlonal e/ou monoclonal para fornecer resultados rápidos, econômicos e seguros (BAR-JOSEPH et al., 1979; CAMBRA et al., 1990; SAPONARI; MANJUNATH; YOKOMI, 2008). Entretanto, o ELISA baseado no reconhecimento de epitopos específicos apenas por anticorpos mono ou policlonais pode não detectar alguns isolados de um mesmo vírus devido a variabilidade da capa protéica entre estirpes, necessitando de uma mistura dos dois tipos de anticorpos (CAMBRA et al., 1990), como é feito do teste de ELISA sanduíche indireto.

As Figuras 2 e 3 mostram a resposta de seis clones de cada uma das 60 linhagens transgênicas após a primeira inoculação com CTV, sendo três enxertados sobre limão 'Cravo' e três sobre laranja azeda, juntamente com os controles não transgênicos. As Figuras 2A, 2B, 3A e 3B mostram os valores de absorbância das plantas não transgênicas inoculadas simultaneamente com os clones transgênicos.

As 12 plantas de laranja 'Hamlin' e as 12 de 'Valência' não transgênicas enxertadas sobre laranja azeda ou sobre limão 'Cravo' e utilizadas como controle da primeira inoculação apresentaram elevados valores de absorvância. Altos valores de absorvância a 405 nm indicam alta concentração de vírus, confirmando a eficiência da primeira inoculação.

A Figura 2 mostra os resultados do teste de ELISA para os clones das linhagens transgênicas 'Hamlin'. Seis linhagens transgênicas enxertadas sobre laranja azeda (CP3, CP5, CP9, CP10, SC2, SC3 e DS6) e quatro sobre limão 'Cravo' (CP2, CP9, SC7 e SC9) apresentaram baixos títulos de vírus em seus três clones. Todas as outras linhagens apresentaram pelo menos um clone com alto valor de absorvância. Para as plantas enxertadas sobre laranja azeda, as linhagens transgênicas CP1, CP4, CP6, SC1, DS8, DS9 e DS10 apresentaram dois clones com baixos valores de absorvância e as linhagens CP2, CP7, CP8, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC9, SC10, DS1, DS2, DS3, DS4 e DS5 apresentaram apenas um clone com baixo título viral. Apenas a linhagem DS7 não apresentou clones com baixos valores de absorvância. Já para as plantas enxertadas sobre limão 'Cravo', as linhagens CP4, CP7, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, DS1, DS2, DS5, DS7, DS8, DS9 e DS10 apresentaram dois clones com baixos valores de absorvância, as linhagens CP1, CP5, CP6, CP10, SC1, SC10, DS3, DS4 e DS6 apenas um clone com baixo título viral e as linhagens CP3, CP8 e SC8 não apresentaram clones sem vírus.

A Figura 3 mostra os resultados da primeira inoculação para as 30 linhagens transgênicas de laranja 'Valência'. Sete linhagens enxertadas sobre laranja azeda (CP2, CP4, SC7, DS3, DS4, DS8 e DS9) e quatro sobre limão 'Cravo' (CP6, SC4, DS2 e DS9) apresentaram todos os seus três clones com baixos valores de absorvância. As outras 49 linhagens apresentaram partículas do vírus em pelo menos em um de seus três clones. As linhagens transgênicas CP6, CP7, CP9, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC8, SC9, DS5 e DS10 enxertadas sobre laranja azeda e CP4, CP7, CP8, CP9, SC1, SC2, SC5, SC6, SC7, SC10, DS3, DS4, DS5, DS6, DS7 e DS10 enxertadas sobre limão 'Cravo' apresentaram dois clones indicando baixo título viral. Já as linhagens CP1, CP3, CP5, CP8, CP10, SC1, SC10, DS1, DS2, DS6 e DS7 enxertadas sobre laranja azeda e CP1, CP2, CP3, CP5, CP10, SC3, SC8 e DS8 enxertadas sobre limão 'Cravo' apresentaram apenas um clone com baixos valores de absorvância. Apenas as linhagens SC9 e DS1 enxertadas sobre limão 'Cravo' não apresentaram clones com baixos valores de absorvância.

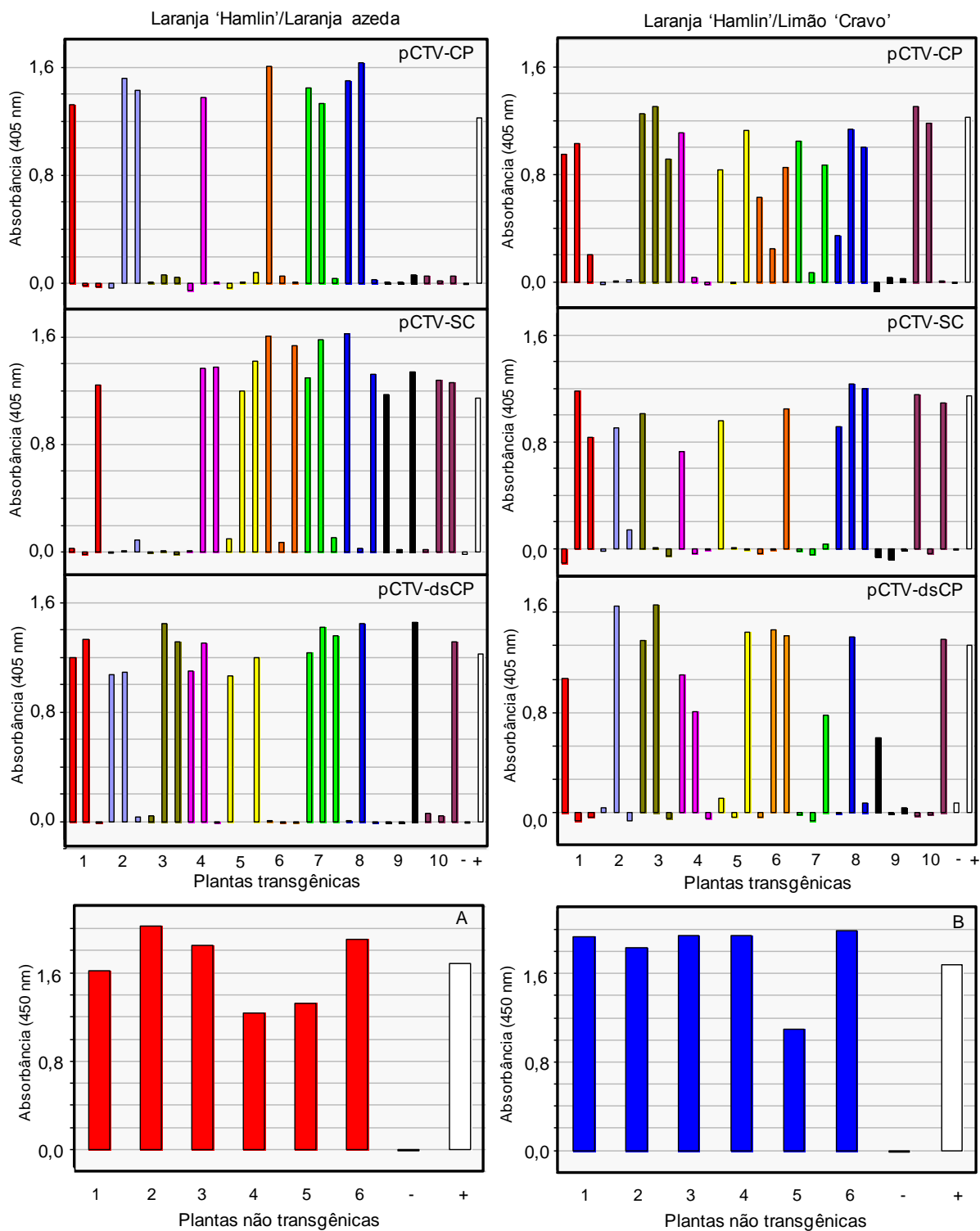


Figura 2 - Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da primeira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Hamlin' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação

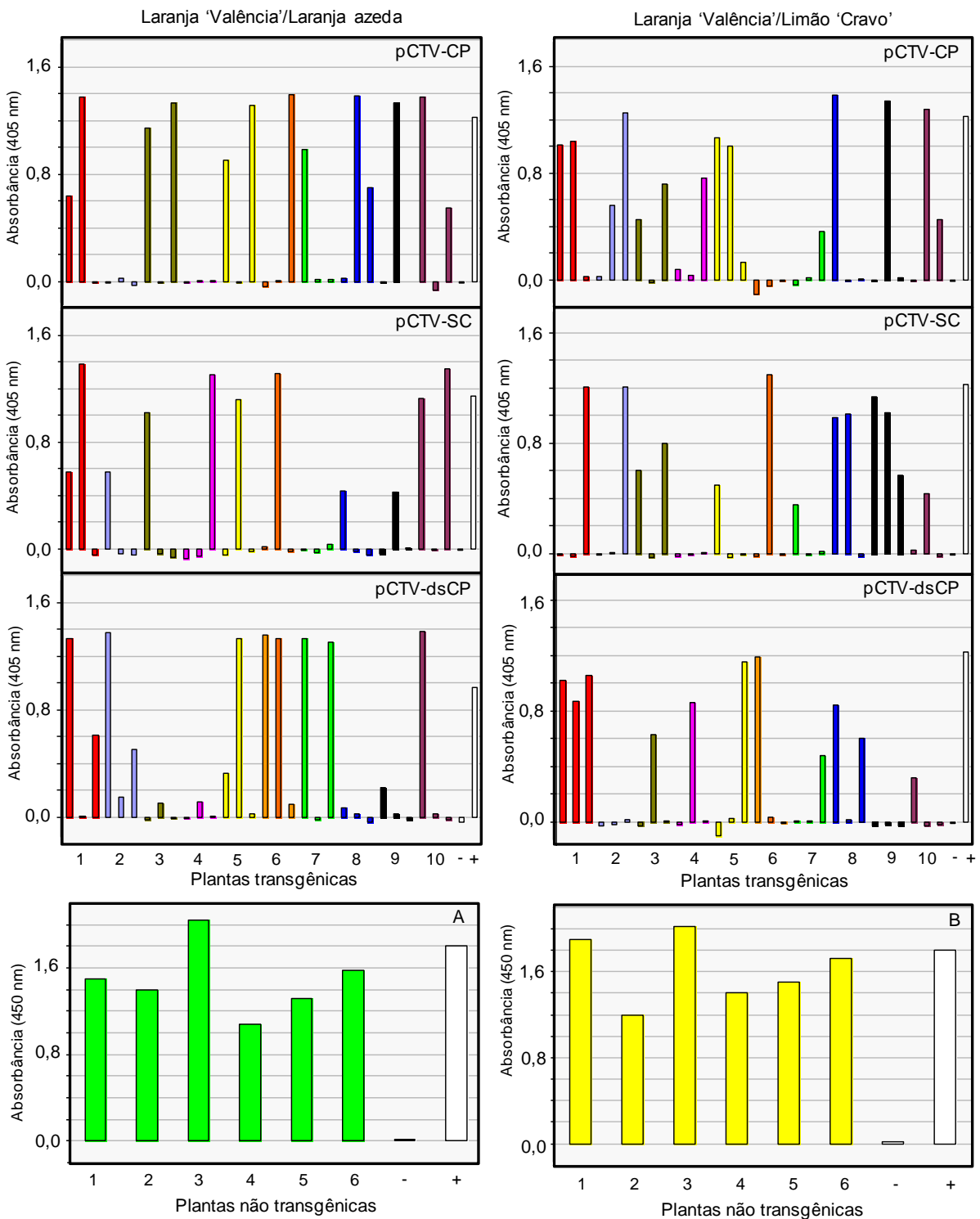


Figura 3 - Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da primeira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Valência' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação

Todos os clones das linhagens transgênicas 'Hamlin' e 'Valência' que apresentaram baixos valores de absorvância no teste de ELISA foram mantidos em casa-de-vegetação com adubações e irrigações constantes e manejo de pragas e doenças periódico.

Após oito meses da primeira inoculação do CTV pelo *T. citricida*, os clones que apresentaram baixo título viral na primeira inoculação e os respectivos controles foram inoculados novamente, seguindo o mesmo procedimento adotado na primeira inoculação. Aproximadamente um mês após essa segunda inoculação com o vetor, foi realizado um novo teste de ELISA.

As Figuras 4A, 4B, 5A e 5B mostram que todos os clones não transgênicos, tanto de laranja 'Hamlin' quanto de laranja 'Valência', utilizados como controles da segunda inoculação apresentaram elevados valores de absorvância, mostrando que a inoculação foi realizada de forma eficiente.

De acordo com a Figura 4 pode-se verificar que alguns clones mantiveram baixa concentração do vírus. Para os clones das linhagens transgênicas de laranja 'Hamlin' foram observadas pelo menos um clone com altos títulos de vírus de cada uma das linhagens. Entre as linhagens enxertadas sobre laranja azeda, foi observada uma contendo dois clones com baixos valores de absorvância (CP3) e cinco com apenas um clone com baixos teores virais (CP4, CP10, SC1, SC9 e DS4). Já para as enxertadas sobre limão 'Cravo', quatro apresentaram dois clones (CP2, CP9, DS9 e DS10) e 13 com um clone com baixo título viral (CP4, CP10, SC2, SC4, SC5, SC9, DS1, DS2, DS3, DS4, DS5, DS6 e DS8).

A Figura 5 mostra os resultados do teste de ELISA aproximadamente um mês após a segunda inoculação com o CTV para as linhagens transgênicas de laranja 'Valência'. Para as linhagens enxertadas sobre laranja azeda, foram observadas três (CP2, SC8 e DS3) com dois clones e 21 (CP1, CP3, CP4, CP5, CP6, CP7, CP9, SC1, SC2, SC4, SC5, SC6, SC7, SC9, DS4, DS5, DS6, DS7, DS8, DS9 e DS10) com um clone apresentando baixos valores de absorvância. Já para as linhagens enxertadas sobre limão 'Cravo', a CP6 e a DS9 apresentaram seus três clones com baixa presença de vírus. Entre as outras linhagens, foram observadas 10 (SC1, SC2, SC4, SC5, SC6, SC7, SC10, DS3 e DS6) com dois clones e 12 (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP7, CP8, CP9, CP10, DS1, DS3, DS10) com apenas um clone com baixo título viral.

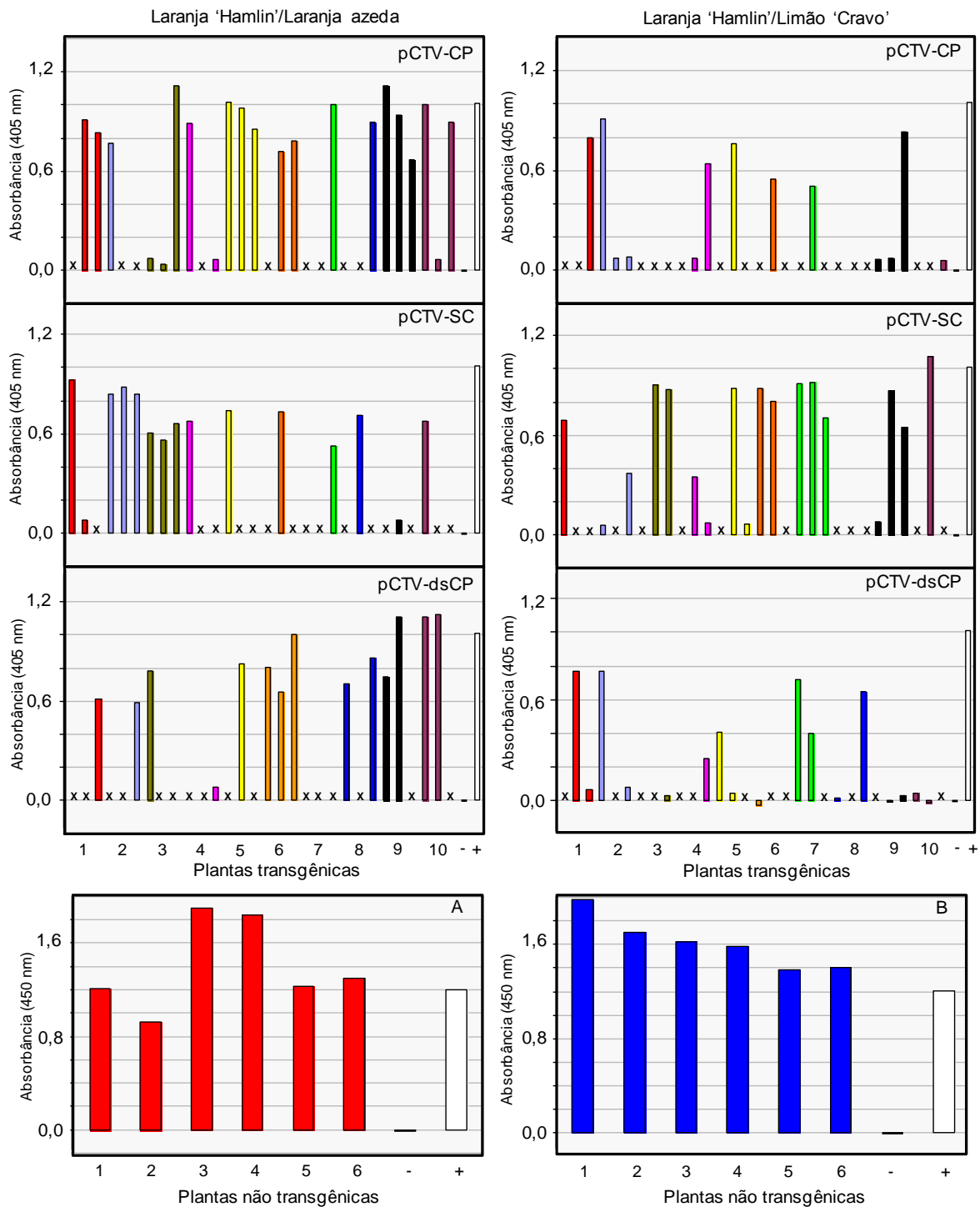


Figura 4 - Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da segunda inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Hamlin' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira inoculação e não avaliados na segunda inoculação

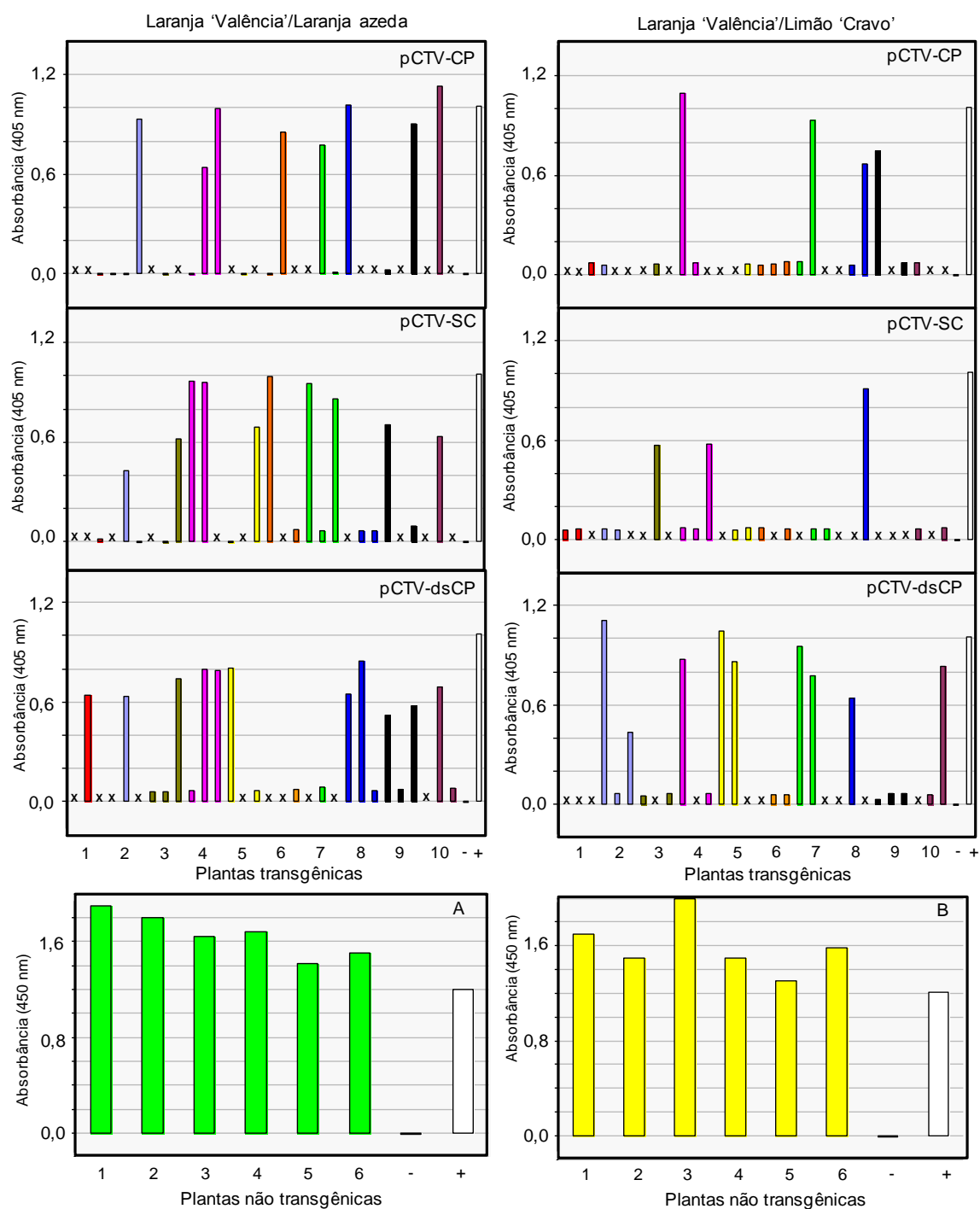


Figura 5 - Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da segunda inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Valência' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira inoculação e não avaliados na segunda inoculação

Os clones que permaneceram com baixos valores de absorvência no ELISA foram mantidos em casa-de-vegetação, recebendo todos os tratamentos necessários para seu bom desenvolvimento. Após dez meses dessa segunda fase de inoculações, os clones que apresentaram baixos valores de absorvência na segunda inoculação e as respectivas testemunhas foram novamente desafiados com inoculações por afídeos virulíferos, da mesma forma que nas duas inoculações anteriores, e, após aproximadamente quatro semanas, foi realizada a extração de proteína total de amostras de folhas desses clones e precedeu-se o teste de ELISA.

De acordo com as Figuras 6A, 6B, 7A e B, a inoculação foi eficiente, já que todas as plantas utilizadas como controle, tanto 'Hamlin' quanto 'Valência', apresentaram elevada absorvência no teste de ELISA.

A Figura 6 mostra os resultados do ELISA quatro semanas após a terceira inoculação para as linhagens transgênicas de laranja 'Hamlin'. Entre todos os clones enxertados sobre laranja azeda, apenas um apresentou baixo título de vírus, sendo este um clone da linhagem DS4 (construção gênica pCTV-dsCP). Com relação aos clones contendo as construções gênicas pCTV-CP e pCTV-SC, todos apresentaram altos valores de absorvência. Já para os clones enxertados sobre limão 'Cravo', observou-se clones de cinco linhagens transgênicas diferentes com baixa concentração de vírus, sendo um de cada uma das linhagens CP2, CP9 (construção gênica pCTV-CP), SC9 (construção gênica pCTV-SC), DS3 e DS10 (construção gênica pCTV-dsCP).

A Figura 7 mostra os resultados da leitura de absorvência do teste de ELISA para as linhagens transgênicas de laranja 'Valência' após a terceira inoculação. Alguns clones permaneceram com baixa concentração do vírus após a terceira inoculação. Para os enxertados em laranja azeda, as linhagens CP2 (construção gênica pCTV-CP) e DS3 (construção gênica pCTV-dsCP) apresentaram dois clones com baixos valores de absorvência. Já as linhagens CP1, CP4, CP9 (construção gênica pCTV-CP), SC1, SC2, SC8 (construção gênica pCTV-SC), DS4 e DS10 (construção gênica pCTV-dsCP) apresentaram apenas um clone com baixo título de vírus. Entre os enxertados em limão 'Cravo', a linhagem transgênica CP6 (construção gênica pCTV-CP) manteve seus três clones com baixos valores de absorvência. As linhagens SC6, SC7, SC10 (construção gênica pCTV-SC) e DS3 (construção gênica pCTV-dsCP) apresentaram dois clones com baixos valores de absorvência. As linhagens CP2, CP3, CP7, CP9 (construção gênica pCTV-CP),

SC1, SC4, SC5 (construção gênica pCTV-SC), DS2, DS4, DS6 e DS10 (construção gênica pCTV-dsCP) apresentaram um clone com baixo valor de absorvância.

Foi observado um maior número de clones transgênicos com baixos títulos virais para laranja 'Valência'. Entre os 180 clones transgênicos de laranja 'Valência' que foram inicialmente inoculados, 34 se mantiveram com baixos valores de absorvância mesmo após a terceira inoculação. Já para os 180 clones transgênicos de laranja 'Hamlin', apenas seis apresentaram baixos valores de absorvância após a terceira inoculação.

Entre os 40 clones transgênicos que apresentaram baixo título de vírus após a terceira inoculação, foi observado um maior número de clones enxertados sobre limão 'Cravo', tanto para laranja 'Hamlin' como para laranja 'Valência'. Entre os clones que apresentaram baixos valores de absorvância, 28 estavam enxertados sobre limão 'Cravo' e 12 sobre laranja azeda.

Foi observada nas avaliações da presença do CTV após as inoculações variações na concentração do vírus entre clones de uma mesma linhagem transgênica, os quais receberam a mesma inoculação. Tal fato é comumente observado em outros experimentos de resistência de plantas transgênicas ao CTV (DOMÍNGUEZ et al., 2002b; FAGOAGA et al., 2006; LÓPEZ et al., 2010; CERVERA et al., 2010). Para explicar essa resposta variável ao desafio com o CTV entre propagações clonais são aceitas as teorias de que a variação é reflexo da dose variável de vírus recebida por cada planta, da distribuição aleatória do CTV nas plantas infectadas, do nível aleatório de expressão do transgene e do estado fisiológico de cada clone. Além disso, para as plantas cítricas transgênicas contendo construções que desencadeiam o silenciamento gênico, a variação entre os clones pode ser um resultado da complexa interação entre o PTGS ativo nas plantas e a contra-resposta ao silenciamento desempenhada pelo CTV com auxílio dos seus três genes supressores de silenciamento (*p20*, *p23* e *p25*) (LU et al., 2004; FOLIMONOVA et al., 2008).

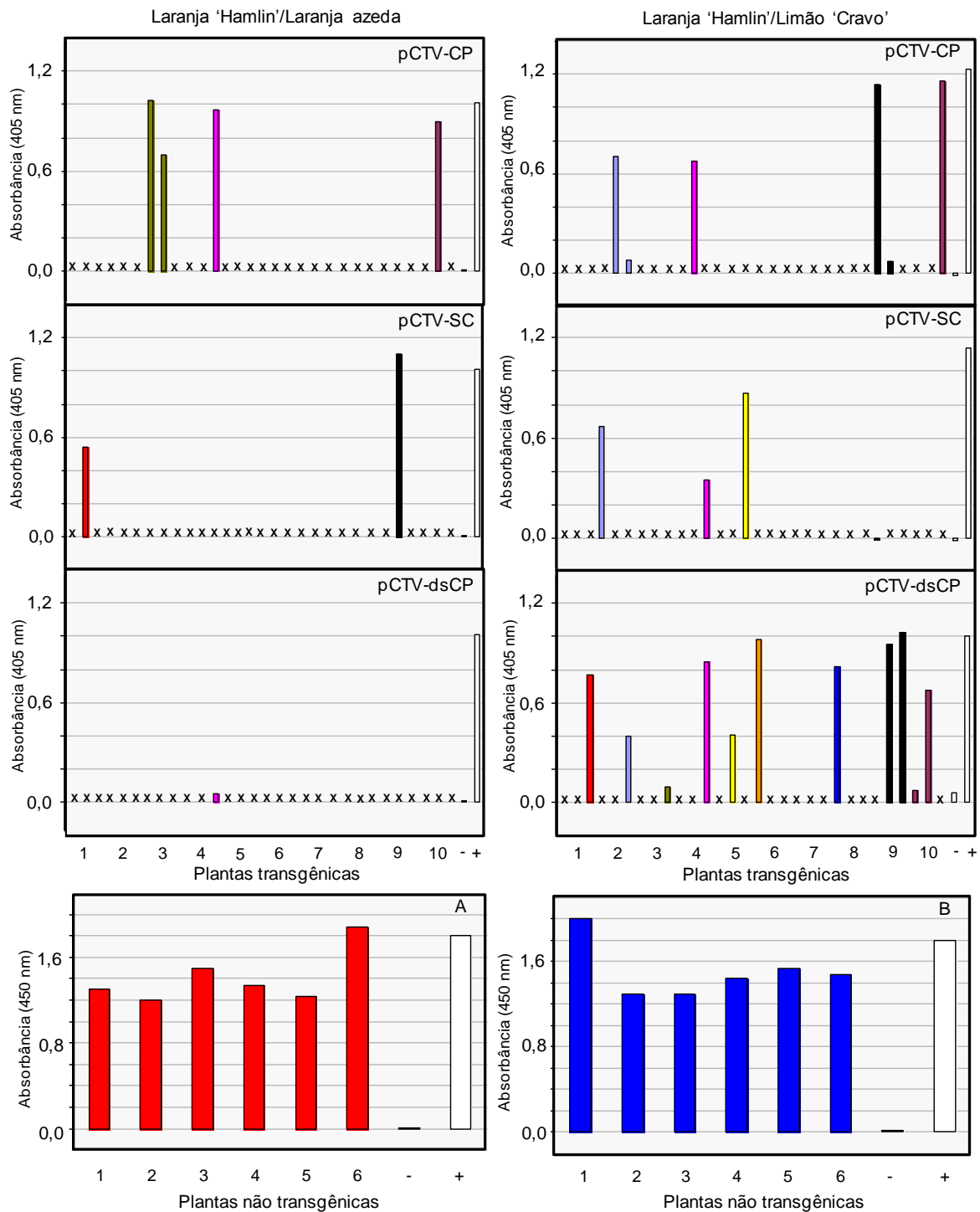


Figura 6 - Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da terceira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Hamlin' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Hamlin' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Hamlin' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira ou segunda inoculações e não avaliados na terceira inoculação

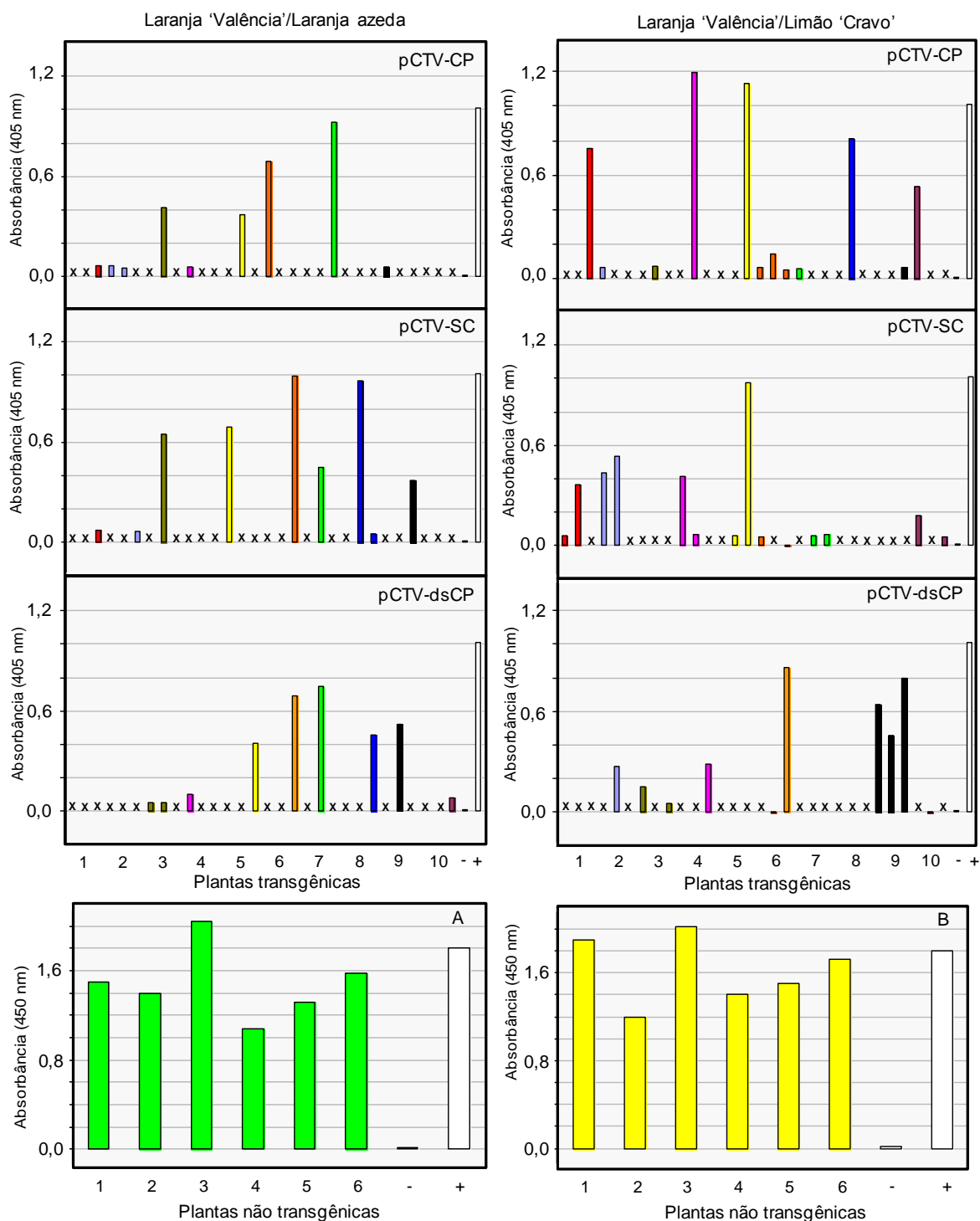


Figura 7 - Avaliação da concentração de vírus por análises de ELISA, após 4 semanas da terceira inoculação com o CTV, de três clones de cada uma das linhagens transgênicas de laranja doce 'Valência' contendo as construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC ou pCTV-DS, enxertadas sobre laranja azeda ou limão 'Cravo'. - = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica não inoculada com CTV (controle negativo); + = planta de laranja doce 'Valência' não transgênica inoculada com CTV por enxertia de borbulha (controle positivo); A = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre laranja azeda utilizadas como controle da inoculação; B = plantas de laranja doce 'Valência' enxertadas sobre limão 'Cravo' utilizadas como controle da inoculação; X = clones infectados pelo CTV na primeira ou segunda inoculações e não avaliados na terceira inoculação

Análises semelhantes às realizadas neste trabalho também foram realizadas por outros autores, utilizando plantas de citros transgênicas para resistência ao CTV. Nesses trabalhos também foi realizada inoculação do vírus por enxertia e/ou vetores e resultados semelhantes foram obtidos. Da mesma forma, as plantas também foram avaliadas por ELISA e apenas alguns clones das linhagens avaliadas foram considerados resistentes (DOMÍNGUEZ et al. 2002b; FAGOAGA et al., 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; LÓPEZ et al., 2010; CERVERA et al., 2010). Foram inoculadas por enxertia de borbulhas contaminadas com o CTV 42 linhagens transgênicas de *C. aurantifolia* que expressavam o gene *p25* da capa protéica do vírus. Para avaliar a resistência foi observado o desenvolvimento de sintomas juntamente com o teste ELISA após a inoculação. Alguns clones foram resistentes ao CTV ou apresentaram atraso no acúmulo de vírus e no aparecimento de sintomas (DOMÍNGUEZ et al. 2002b). Clones de plantas transgênicas da mesma espécie transformadas com o gene *p23* do CTV silenciado foram inoculados por afídeos virulíferos ou por enxertia de borbulhas contaminadas e foram avaliados por ELISA. Foram observados alguns clones imunes, outros moderadamente resistentes e os restantes susceptíveis à infecção viral, assim como observado (FAGOAGA et al., 2006). Outro grupo inoculou por enxertia de borbulhas infectadas pelo vírus da tristeza dos citros plantas transgênicas de *C. paradisi* contendo construções derivadas do CTV. As avaliações foram feitas por ELISA e RT-PCR e foi observada resistência ao vírus em algumas plantas (FEBRES; LEE; MOORE, 2008). Plantas de *C. aurantifolia* foram transformadas com uma construção hairpin derivada da extremidade 3' do genoma viral para resistência ao vírus da tristeza. Após inoculação por enxertia e avaliação por ELISA, alguns clones mostraram resistência e outros susceptibilidade ao vírus (LÓPEZ et al., 2010). A mesma espécie também foi transformada para expressar fragmentos de anticorpos específicos para o CTV, propagadas em citrange 'Carrizo' e desafiadas utilizando enxertia de borbulhas infectadas com uma estirpe agressiva do CTV. O nível de infecção foi avaliado por "Tissue print" e severidade de sintomas. Todas as linhagens transgênicas apresentaram resistência parcial, com atraso da infecção (CERVERA et al., 2010).

Os 40 clones que mostraram baixos valores de absorvância no ELISA foram numerados e organizados de acordo com a Tabela 1. Para confirmar os resultados obtidos no ELISA com relação à presença do CTV nestes clones, foram extraídas

amostras de RNA desses clones e foram realizadas análises de RT-PCR para avaliação da expressão do gene *p23* do CTV (Figura 8).

Tabela 1 - Clones transgênicos que permaneceram com baixos valores de absorbância no ELISA após a terceira inoculação

Número	Cultivar	Porta-enxerto	Construção	Linhagem *	Clone **	OD ***
1	Hamlin	Azeda	pCTV-dsCP	DS-4	3	0,051
2	Hamlin	Cravo	pCTV-CP	CP-2	3	0,080
3	Hamlin	Cravo	pCTV-CP	CP-9	2	0,070
4	Hamlin	Cravo	pCTV-SC	SC-9	1	-0,008
5	Hamlin	Cravo	pCTV-dsCP	DS-3	3	0,195
6	Hamlin	Cravo	pCTV-dsCP	DS-10	1	0,170
7	Valência	Azeda	pCTV-CP	CP-1	3	0,062
8	Valência	Azeda	pCTV-CP	CP-2	1	0,065
9	Valência	Azeda	pCTV-CP	CP-2	2	0,053
10	Valência	Azeda	pCTV-CP	CP-4	1	0,061
11	Valência	Azeda	pCTV-CP	CP-9	1	0,057
12	Valência	Azeda	pCTV-SC	SC-1	3	0,075
13	Valência	Azeda	pCTV-SC	SC-2	3	0,162
14	Valência	Azeda	pCTV-SC	SC-8	3	0,053
15	Valência	Azeda	pCTV-dsCP	DS-3	1	0,055
16	Valência	Azeda	pCTV-dsCP	DS-3	2	0,053
17	Valência	Azeda	pCTV-dsCP	DS-4	1	0,104
18	Valência	Azeda	pCTV-dsCP	DS-10	3	0,079
19	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-2	1	0,067
20	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-3	2	0,075
21	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-6	1	0,068
22	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-6	2	0,143
23	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-6	3	0,051
24	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-7	1	0,057
25	Valência	Cravo	pCTV-CP	CP-9	3	0,068
26	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-1	1	0,056
27	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-4	2	0,068
28	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-5	2	0,055
29	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-6	1	0,054
30	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-6	3	-0,002
31	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-7	2	0,059
32	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-7	3	0,068
33	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-10	1	0,178
34	Valência	Cravo	pCTV-SC	SC-10	3	0,051
35	Valência	Cravo	pCTV-dsCP	DS-2	2	0,275
36	Valência	Cravo	pCTV-dsCP	DS-3	1	0,149
37	Valência	Cravo	pCTV-dsCP	DS-3	3	0,053
38	Valência	Cravo	pCTV-dsCP	DS-4	3	0,286
39	Valência	Cravo	pCTV-dsCP	DS-6	2	-0,004
40	Valência	Cravo	pCTV-dsCP	DS-10	2	-0,008

* Linhagem = Planta transgênica regenerada em experimento de transformação genética.

** Clone = Planta propagada a partir da linhagem transgênica.

*** OD = Valores de absorbância a 450 nm de acordo com o teste serológico de ELISA.

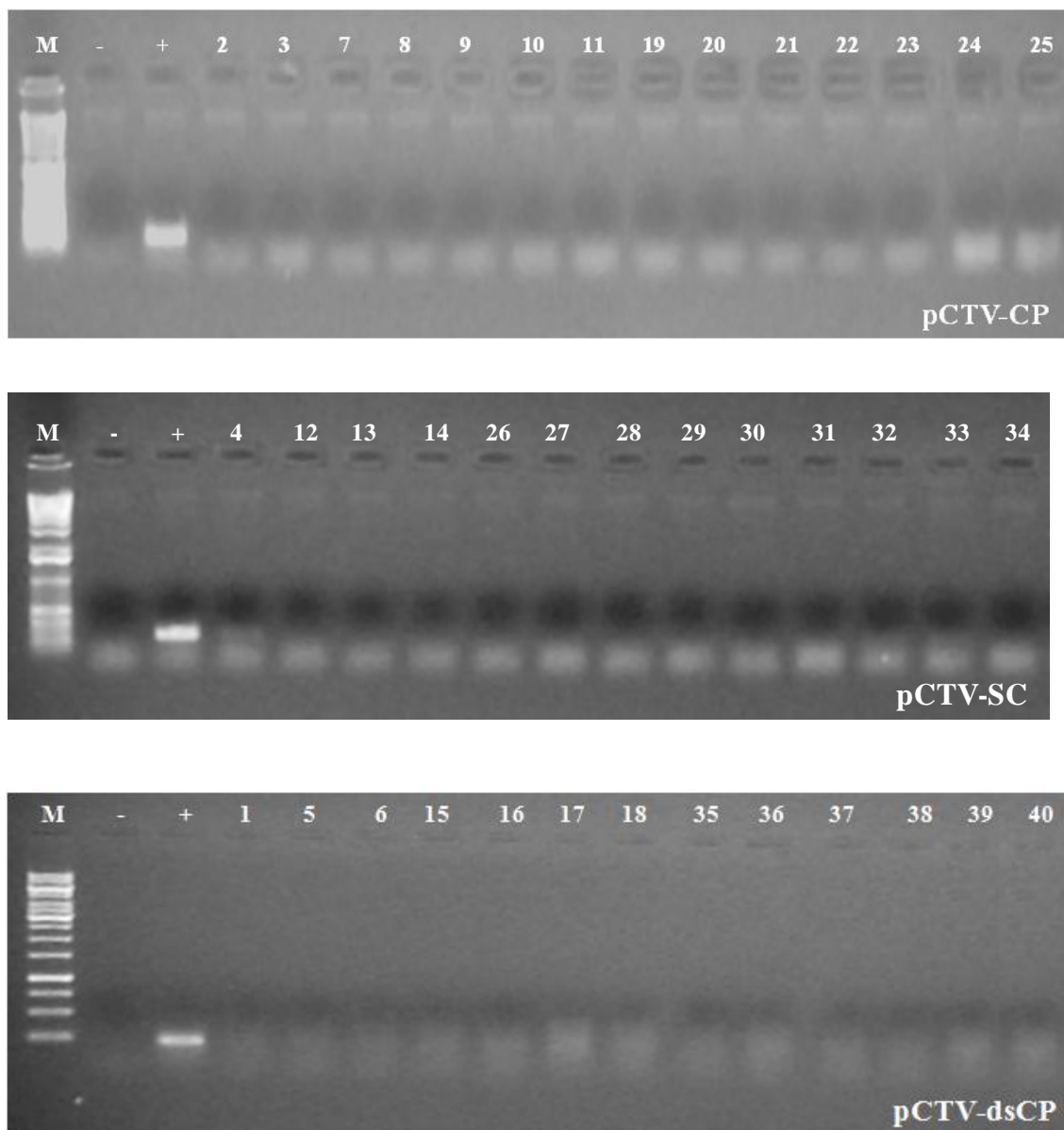


Figura 8 - Análises de RT-PCR para o gene *p23* de 40 clones transgênicos. M = marcador; - = controle negativo constituído de cDNA de planta de laranja 'Valência' não transgênica não inoculada com o CTV; + = controle positivo constituído de cDNA de planta de laranja 'Valência' não transgênica inoculada com o CTV; 1 - 40 = Clones transgênicos que permaneceram com baixos valores de absorbância no ELISA após a terceira inoculação, numerados de acordo com a Tabela 1

A técnica de RT-PCR convencional é mais sensível que o ELISA e é útil para detecção do CTV até mesmo em amostras em que o título viral é baixo para ser detectado em métodos serológicos (SAPONARI; MANJUNATH; YOKOMI, 2008). Os géis mostraram a ausência de amplificação do gene *p23* do CTV nos 40 clones

transgênicos, confirmando o baixo título viral detectado pelo ELISA nesses clones (Figura 8).

Para avaliar melhor a presença do vírus nesses 40 clones que além de apresentarem baixos valores de absorvância no ELISA também não amplificaram o gene viral por RT-PCR convencional, 8 meses após a inoculação foram extraídas novas amostras de RNA desses clones e os genes virais que codificam para as proteínas p20 e p23 tiveram sua expressão avaliada por Real-Time PCR. Essa técnica ganhou destaque sobre a PCR tradicional já que, além de possibilitar a utilização de número reduzido de ciclos e etapas, também não requer manipulação das amostras após a reação nem a utilização de géis de eletroforese. Conseqüentemente, evita a utilização de corantes de géis, os quais são considerados tóxicos, e a necessidade de manipular os géis para documentar os resultados. Além disso, a Real-time PCR tem maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade e menor risco de contaminações já que a amplificação dos genes é monitorada em tubos fechados, utilizando marcadores específicos (HEID et al., 1996; RUIZ-RUIZ et al., 2007; SAPONARI; MANJUNATH; YOKOMI, 2008).

A Figura 9 mostra que ambos os genes foram eficientes para avaliar a presença ou ausência de CTV, sendo que ambos se amplificaram nas mesmas amostras, as quais foram consideradas positivas para a presença do CTV. O gene *p23* se mostrou mais sensível, com amplificação mais elevada que o *p20*.

A proteína p20 se acumula em inclusões amorfas de células infectadas pelo CTV. Já a proteína p23, não possui homólogos em outros closterovírus e está envolvida na regulação do balanço de RNA durante a replicação (FAGOAGA et al., 2006). Ambas estão relacionadas com a supressão do silenciamento de RNA (LU et al., 2004; FAGOAGA et al., 2006).

A técnica de Real-time PCR se mostrou mais sensível que o teste serológico de ELISA para detecção do CTV. Dentre os 40 clones considerados negativos para a presença do vírus de acordo com o ELISA, 26 não apresentaram amplificação do gene, sendo considerados negativos para a presença do vírus de acordo com as análises de Real-time. Além disso, a técnica se mostrou mais prática e consumiu menos tempo que o ELISA e o RT-PCR tradicional.

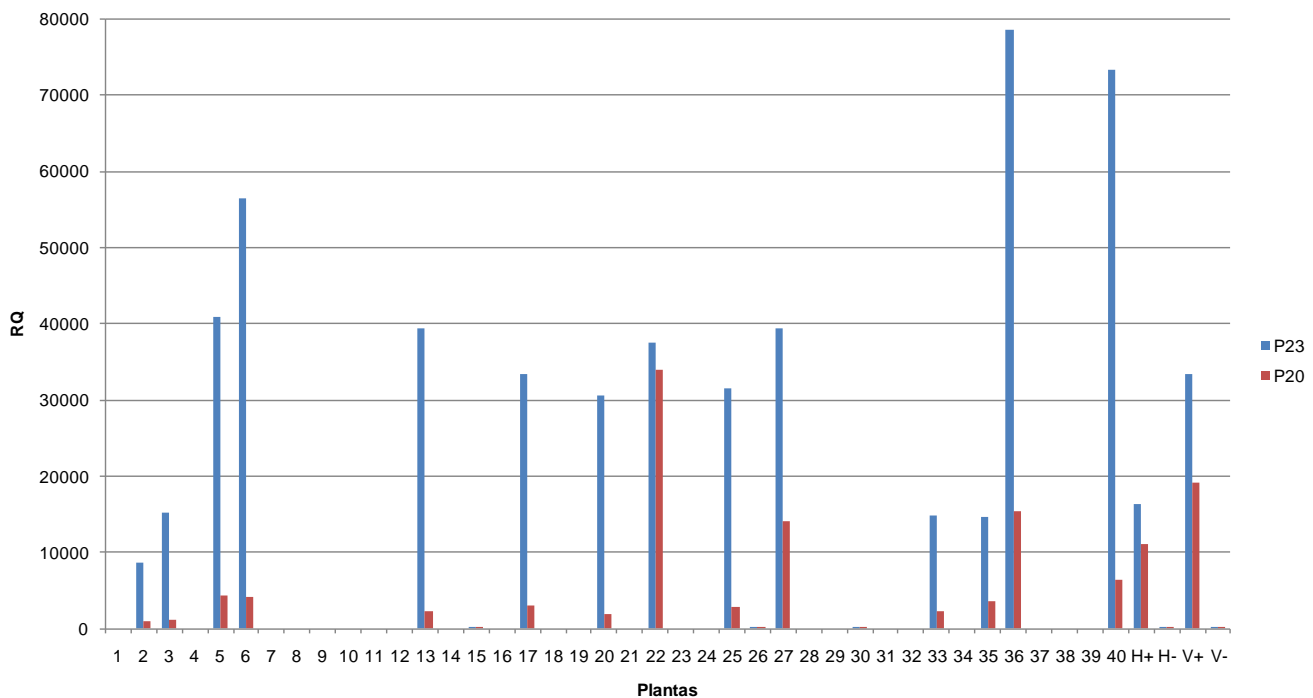


Figura 9 - Detecção do CTV através da expressão dos genes *p20* e *p23* constituintes do genoma do vírus por Real-time PCR em plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' e cv. 'Valência', sendo duas plantas não-transgênicas não inoculadas (H-, V-), duas não-transgênicas inoculadas (H+, V+) e 40 clones previamente selecionados para baixa concentração ou ausência de CTV após três inoculações com *Toxoptera citricida* (1 a 40), numerados de acordo com a Tabela 1

Com relação às linhagens transgênicas 'Hamlin', um clone da linhagem DS4 (construção gênica pCTV-dsCP) enxertado sobre laranja azeda e um clone da linhagem SC9 (construção gênica pCTV-SC) enxertado sobre limão 'Cravo', não amplificaram os genes virais. Já para as linhagens transgênicas 'Valência' enxertadas sobre laranja azeda, dois clones de cada uma das linhagens CP2 (construção gênica pCTV-CP) e DS3 (construção gênica pCTV-dsCP) e um clone de cada uma das linhagens CP1, CP4, CP9 (construção gênica pCTV-CP), SC1, SC8 (construção gênica pCTV-SC) e DS10 (construção gênica pCTV-dsCP) não apresentaram amplificação dos genes dos vírus. Para as enxertadas sobre limão 'Cravo', dois clones das linhagens CP6 (construção gênica pCTV-CP), SC6 e SC7 (construção gênica pCTV-SC) e um clone das linhagens CP2, CP7 (construção gênica pCTV-CP), SC1, SC5, SC10 (construção gênica pCTV-SC), DS3, DS4 e DS6 (construção gênica pCTV-dsCP) não amplificaram os genes do CTV.

Tais resultados corroboram com outros pesquisadores que conseguiram detectar por Real-Time PCR transcritos do CTV numa concentração menor que 1 fg

em amostras consideradas negativas para os testes de ELISA e de RT-PCR convencional (SAPONARI; MANJUNATH; YOKOMI, 2008). Além disso, Ruiz-Ruiz et al. (2007) mostraram a maior sensibilidade do Real-Time PCR para detectar o CTV ao detectarem diferentes concentrações do vírus em variados tecidos vegetais, o que não foi obtido utilizando o ELISA (RUIZ-RUIZ et al., 2007).

Assim, dois clones de laranja 'Hamlin' e 24 de laranja 'Valência' foram inoculados pela quarta vez. Após essa quarta inoculação com CTV, amostras de RNA dos 26 clones foram extraídas para avaliação da expressão dos genes *p20* e *p23* por Real-time PCR (Figura 10). Além desses clones, também foram avaliadas plantas de laranja 'Hamlin' e 'Valência' não transgênicas, sendo uma de cada cultivar inoculada com o CTV e outra não inoculada e oito plantas de pomares citrícolas que foram fonte dos afídeos utilizados na inoculação.

A Figura 10 mostra os resultados da avaliação de qPCR realizada nos clones que não apresentaram CTV em seus tecidos na análise anterior para verificar a expressão dos dois genes virais. Todas as plantas utilizadas como fonte de afídeos mostraram expressão dos genes virais e, conseqüentemente, apresentavam CTV em seus tecidos. As plantas não transgênicas inoculadas juntamente com as transgênicas também apresentaram vírus, confirmando a eficiência da inoculação.

Dentre os 26 clones inoculados, 20 permaneceram negativos para a presença do CTV de acordo com as análises de Real-time PCR. Dentre eles, apenas a linhagem SC9 (construção gênica pCTV-SC) de laranja 'Hamlin' enxertado sobre limão 'Cravo' apresentou um clone sem o vírus. Para os clones de laranja 'Valência' enxertados sobre laranja azeda, um clone de cada uma das linhagens transgênicas CP1, CP2, CP4, CP9 (construção gênica pCTV-CP), SC1, SC8 (construção gênica pCTV-SC), DS3 e DS10 (construção gênica pCTV-dsCP) não apresentaram amplificação dos genes dos vírus. Para os enxertados sobre limão 'Cravo', dois clones das linhagens CP6 (construção gênica pCTV-CP), SC6 e SC7 (construção gênica pCTV-SC) e um clone de cada uma das linhagens CP7 (construção gênica pCTV-CP), SC1, SC5, SC10 (construção gênica pCTV-SC) e DS3 (construção gênica pCTV-dsCP) não amplificaram os genes do CTV. Tal fato pode caracterizar um melhor desempenho contra o vírus das plantas de laranja 'Valência'.

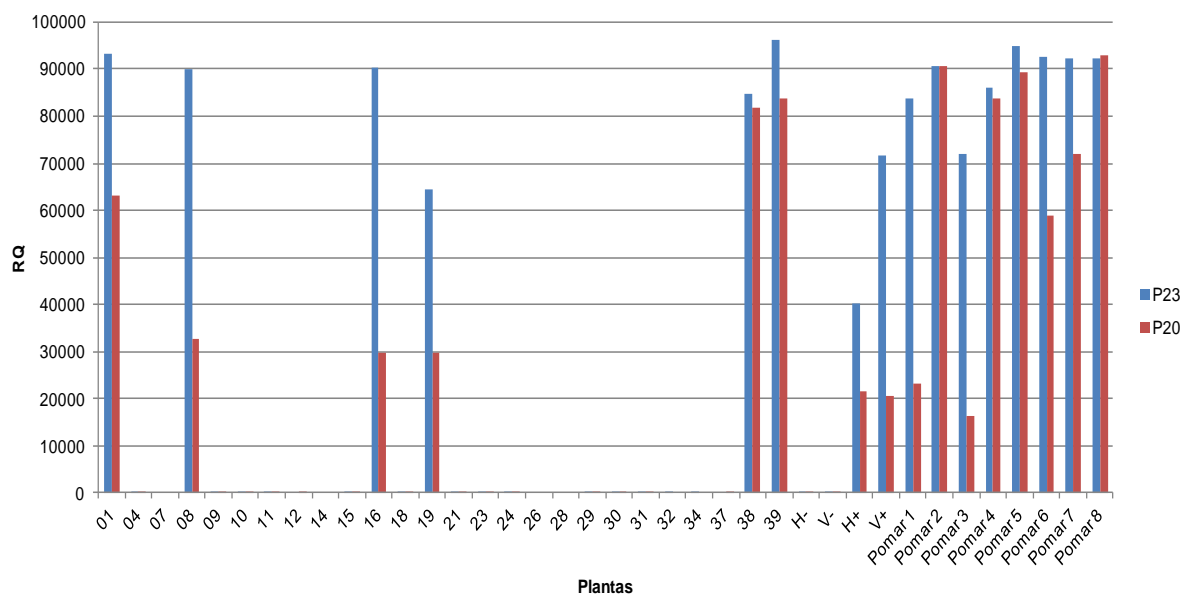


Figura 10 - Detecção do CTV após a quarta inoculação com *Toxoptera citricida* através da expressão dos genes *p20* e *p23* constituintes do genoma do vírus por Real-time PCR em plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' e cv. 'Valência', sendo duas plantas não-transgênicas não inoculadas (H-, V-), duas não-transgênicas inoculadas (H+, V+), oito não-transgênicas cultivadas em pomares cítricos e fontes do vetor virulífero (Pomar 1 a Pomar 8) e 26 clones previamente selecionados para baixa concentração ou ausência de CTV e numerados de acordo com a Tabela 1 (1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 38 e 39)

A maioria dos clones (nove clones) que não apresentou o vírus em seus tecidos contém a construção gênica pCTV-SC, sendo um de laranja 'Hamlin' enxertado sobre limão 'Cravo' (SC9) e oito de laranja 'Valência', sendo dois enxertados sobre laranja azeda (SC1 e SC8) e seis sobre limão 'Cravo' (SC1, SC5 e dois clones das linhagens SC6 e SC7), mostrando maior eficiência dessa construção no controle do CTV.

Esperava-se que as plantas transgênicas contendo a construção pCTV-dsCP produzissem longas moléculas de RNA de fita dupla que seriam reconhecidas pelo sistema de defesa da planta, ativando o silenciamento gênico antes mesmo da infecção viral para evitar a multiplicação do CTV. Entretanto, o CTV é um vírus extremamente complexo e desenvolveu um eficiente mecanismo de supressão do sistema de defesa do hospedeiro contra vírus. A baixa eficiência para controle da multiplicação do vírus apresentada pelas plantas transgênicas de laranja doce contendo essa construção pode estar relacionada aos supressores de silenciamento codificados pelo CTV (proteínas p20, p23 e p25) (LU et al., 2004; FAGOAGA et al.,

2006; FOLIMONOVA et al., 2008). Tal fato é evidenciado quando plantas cítricas contendo construções hairpin de versões completas dos genes do CTV supressores do silenciamento gênico (*p20*, *p23* e *p25*) apresentaram total resistência à infecção viral (SOLER et al., 2012).

4.2 Transformação genética de laranja azeda

A Tabela 2 mostra os resultados dos 30 experimentos de transformação genética de laranja azeda realizados. A análise dos resultados permite verificar que o número de explantes responsivos é baixo independente do explante utilizado.

Para o experimento utilizando segmento internodal, verificou-se que de um total de 257 explantes inoculados com a *A. tumefaciens*, apenas três explantes apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias (1,17%). Estas gemas não se desenvolveram o que impossibilitou a realização do teste GUS (Tabela 2).

Nos experimentos de transformação genética utilizando segmento de epicótilo (nove experimentos), observou-se 75 explantes com desenvolvimento de gemas adventícias de um total de 2182 explantes inoculados com a suspensão bacteriana (3,44%) (Tabela 2). Tais gemas não apresentaram desenvolvimento suficiente para realização do teste histoquímico GUS.

Já para os experimentos utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo como explante (18 experimentos), foram observadas 354 explantes com desenvolvimento de gemas adventícias num total de 1594 explantes inoculados (19,95%). A Figura 11 mostra este explante (Figura 11A) e a região de desenvolvimento de gemas adventícias do mesmo (Figura 11B). O teste histoquímico GUS foi realizado em 236 gemas, sendo que duas gemas provenientes de um mesmo experimento mostraram reação positiva (1,43% de eficiência de transformação genética) (Tabela 2) (Figura 11C). As gemas positivas foram enxertadas *in vitro* sobre citrange 'Carrizo' e após 14 dias de incubação foi verificado que apenas uma gema se desenvolveu. Após o desenvolvimento desta planta, a análise de PCR para o gene da capa proteica do CTV foi realizada. De acordo com a Figura 11D, foi possível verificar amplificação do fragmento de 684 pb, correspondentes ao gene de interesse. A planta transgênica obtida foi aclimatizada em casa-de-vegetação (Figura 11E), mas não sobreviveu.

Tabela 2 – Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*), utilizando segmento de epicótilo, segmento internodal ou segmento de cotilédone associado ao hipocótilo como explantes

Segmento internodal	Explantes responsivos/ total de explantes	Gemas GUS ⁺ / gemas avaliadas	Eficiência de transformação (%)
1	3/257	-	-
Total	3/257	-	-
Segmento de epicótilo	Explantes responsivos / total de explantes	Gemas GUS ⁺ / gemas avaliadas	Eficiência de transformação (%)
1	7/184	-	-
2	3/187	-	-
3	9/278	-	-
4	16/151	-	-
5	0/125	-	-
6	15/320	-	-
7	15/331	-	-
8	10/360	-	-
9	0/246	-	-
Total	75/2182	-	-
Segmento de cotilédone associado ao hipocótilo	Explantes responsivos / total de explantes	Gemas GUS ⁺ / gemas avaliadas	Eficiência de transformação (%)
1	3/89	0/1	0
2	23/165	0/16	0
3	17/147	0/12	0
4	45/140	0/19	0
5	66/140	2/64	1,43
6	16/121	-	-
7	16/72	0/9	0
8	28/76	-	-
9	34/121	-	-
10	2/40	0/2	0
11	5/30	-	-
12	14/83	0/17	0
13	15/63	0/24	0
14	26/78	0/48	0
15	14/69	0/10	0
16	11/70	0/14	0
17	3/54	-	-
18	5/36	-	-
19	8/118	0/11	0
20	12/108	0/19	0
Total	363/1820	2/266	0,11

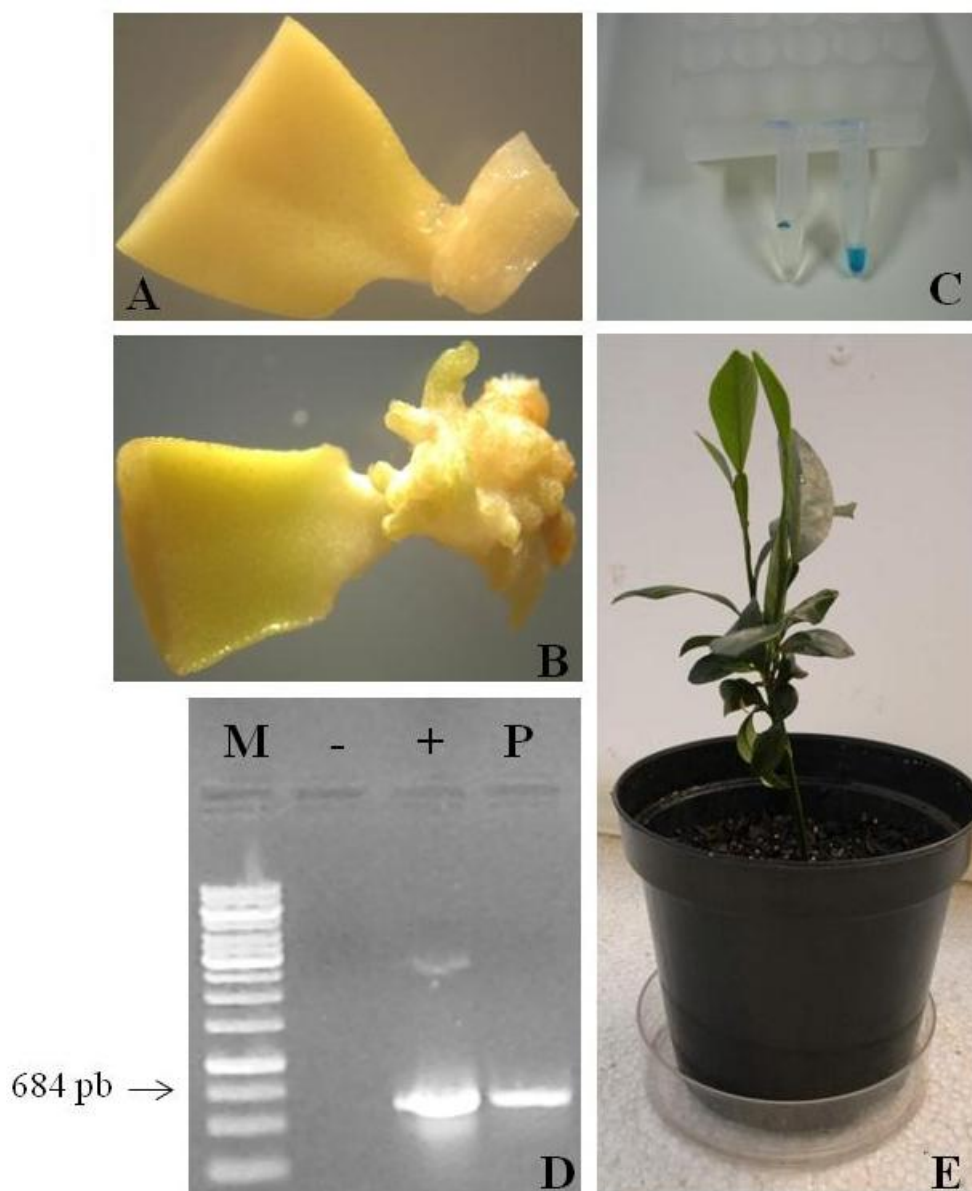


Figura 11 – Transformação genética de laranja azeda (*Citrus aurantium*) via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2201, com o gene da capa protéica do CTV em construção *hairpin* (pCTV-dsCP). **A)** Explante contendo segmento de cotilédone associado a hipocótilo. **B)** Desenvolvimento de gemas adventícias na região do hipocótilo deste explante. **C)** Teste histoquímico de GUS mostrando expressão do gene *uidA*. **D)** Análise de PCR para o gene da capa protéica do CTV, mostrando resultado positivo para a planta GUS positiva. M = marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); - = controle negativo constituído da reação de PCR sem DNA; + = controle positivo constituído do plasmídeo da bactéria *E. coli* com a construção pCTV-dsCP; P = planta PCR positiva de laranja azeda, confirmando presença do gene da capa protéica do CTV, correspondente à 684 pb. **E)** Planta transgênica de laranja azeda aclimatizada

A eficiência de transformação genética obtida foi diferente da eficiência encontrada em outros trabalhos de transformação genética de *C. aurantium*. Tavano (2008) obteve 3,22% de eficiência utilizando segmento de cotilédone associado ao hipocótilo como explante e 0,54% utilizando segmento de epicótilo. Outros autores utilizando segmento internodal alcançaram de 1,2 e 2,4% (GUTIÉRREZ-E.; LUTH; MOORE, 1997) e de 3,6 e 6,6% de eficiência de transformação (GHORBEL et al., 2000).

Apesar de a transformação genética via *Agrobacterium* já ter mostrado bons resultados para diferentes espécies de citros (DOMINGUEZ et al., 2000; GHORBEL et al., 2000; ALMEIDA et al., 2003; VIEIRA et al., 2005; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; ZOU et al., 2008; MIYATA et al., 2011), a influência na eficiência de transformação genética da espécie e variedade cítricas, do explante, da estirpe da bactéria e das características específicas de cada fase da metodologia evidencia a necessidade de ajustes no protocolo para cada caso específico.

Para o caso da laranja azeda, a transformação genética tem se mostrado recalcitrante (GUTIÉRREZ-E.; LUTH; MOORE, 1997; AZEVEDO et al., 2006). Tal fato pode estar relacionado com a eficiência da organogênese *in vitro* dessa espécie, a qual normalmente não alcança elevados números de explantes responsivos, o que reflete diretamente na eficiência da transformação genética (TAVANO et al., 2009).

Fato de ocorrência constante nos experimentos foi o desenvolvimento de gemas não transgênicas (escapes). A seleção ineficiente de gemas transformadas pode estar associada à proteção contra o agente de seleção, nesse caso a canamicina, das células não transformadas pelas células transformadas adjacentes e também à persistência da *Agrobacterium* no tecido inoculado por longos períodos após o co-cultivo (DOMINGUEZ et al., 2004).

5 CONCLUSÕES

A multiplicação do CTV foi baixa em clones isolados de linhagens transgênicas de laranja 'Hamlin' e 'Valência', sendo que alguns clones não foram infectados com o vírus mesmo após a quarta inoculação utilizando vetores *Toxoptera citricida* virulíferos, indicando uma possível resistência ao patógeno.

A transformação genética de laranja azeda é um processo difícil provavelmente associado à baixa eficiência da organogênese *in vitro* dessa espécie. Entretanto, duas gemas transgênicas de laranja azeda foram obtidas a partir de explantes de cotilédone associado ao hipocótilo.

REFERÊNCIAS

AL-KAFF, N.S.; COVEY, S.N.; KREIKE, M.M.; PAGE, A.M.; PINDER, R.; DALE, P.J. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. **Science**, Washington, v. 279, p. 2113-2114, 1998.

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**, Washington, v. 164, p. 203-211, 2003.

ANANTHAKRISHNAN, G.; ORBOVIĆ, V.; PASQUALI, G.; ČALOVIĆ, M.; GROSSER, J.W. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Heidelberg, v. 43, p. 593-601, 2007.

ANGELL, S.M.; BAULCOMBE, D.C. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.16, p. 3675-3684, 1997.

ARAGÃO, F.J.L.; FARIA, J.C. Avanços no desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência a doenças no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 45-68, 2007.

AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA, J.M.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the *b0* (Bacterio-Opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.24, p. 185-196, 2006.

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

BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R.F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 291-316, Sept. 1989.

BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D.E.; CLARK, M.F.; LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Citrus tristeza virus*. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 69, p. 190-194, 1979.

BATUMAN, O.; MAWASSI, M.; BAR-JOSEPH, M. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to *Citrus tristeza virus*

sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. **Virus Genes**, New York, v. 33, p. 319-327, 2006.

BAULCOMBE, D.C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. **Plant Cell**, Bethesda, v. 8, p. 1833-1844, 1996.

_____. RNA silencing. **Current Biology**, London, v. 12, p. 82-84, 2002.

BEACHY, R.N. Mechanisms and applications of pathogen derived resistance in transgenic plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 8, p. 215-220, 1997.

BEACHY, R.N.; LOESCH-FRIES, S.; TUMER, N.E. Coat protein mediated resistance against virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 451-474, 1990.

BENDAHMANE, M.; FITCHEN, J.H.; ZHANG, G.; BEACHY, R.N. Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, p. 7942-7950, 1997.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, London, v. 409, p. 363-366, 2001.

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 28, p. 229-234, 2001.

BITANCOURT, A.A. A doença dos citros no Vale do Paraíba. **O Biológico**, São Paulo, v. 6, p. 268-269, 1940.

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

BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, E.A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, p.717-726, 2007.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; MULLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. **Bragantia**, Campinas, v. 62, p. 345-355, 2003.

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplucia ni* reduces

susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, p. 530-536, 2006.

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

BRIGNETI, G.; VOINET, O.; LI, W.X.; JI, L.H.; DING, S.W.; BAULCOMBE, D.C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 17, p. 6739-6746, 1998.

BRLANSKY, R.H.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M. *In situ* immunofluorescence for the detection of citrus tristeza inclusion bodies. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, p.1039-1041, 1988.

BROADBENT, P.; BRLANSKY, R.H.; INDSTO, J. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmission. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 329-333, 1996.

CALLAWAY, A.; GIESMAN-COOKMEYER, D.; GILLOCK, E.T.; SIT, T.L.; LOMMEL, S.A. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 419-460, 2001.

CAMBRA, M.; SERRA, J.; VILALBA, D.; MORENO, P. Present situation of the *Citrus tristeza virus* in the Valencian community. In: PROCEEDINGS OF THE 10TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside: IOCV, 1988. p. 1-7.

CAMBRA, M.; GARNSEY, S.M.; PERMAR, T.A.; HENDERSON, C.T.; GUMPF, D.; VELA, C. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 80, p. 103, 1990.

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 Reports**, v. 28, p. 185-192, 2010.

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**, Oxford, v. 28, p. 55-66, 2008.

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

CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 18, p. 271-278, 1998a.

CERVERA, M.; ESTEBAN, O.; GIL, M.; GORRIS, M.T.; MARTÍNEZ, M.C.; PEÑA, L.; CAMBRA, M. Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to *Citrus tristeza virus* confers virus resistance. **Transgenic Research**, London, v. 19, p.1001-1015, 2010.

CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L., PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, London, v. 7, p. 51-59, 1998b.

Conselho de Informação sobre Biotecnologia. Disponível em:
< <http://www.cib.org.br>>. Acesso em: 28 out. 2011.

CLARK, W.G.; REGISTER III, J.C.; NEJIDAT, A.; EICHHOLTZ, D.A.; SANDERS, P.R.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Tissue-specific expression of the TMV coat protein in transgenic tobacco plants affects the level of coat protein-mediated virus protection. **Virology**, Amsterdam, v. 179, p. 640–647, 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**, Amsterdam, v. 121, p. 217-231, 2008.

COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector, *Aphid citricidus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 41, p. 105-113, 1951.

COSTA, A.S.; GRANT, T.J.; MOREIRA, S. Investigações sobre a tristeza dos citrus II: conceitos e dados sobre a reação das plantas cítricas à tristeza. **Bragantia**, Campinas, v.9, p.59-80, 1949.

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

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 54 p.

DOMÍNGUEZ, A.; FAGOAGA, C.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. **Molecular Genetics Genomics**, Heidelberg, v. 267, p. 544-556, 2002a.

DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2000.

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

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

DOUGHERTY, W.G.; LINBDO, J.A.; SMITH, H.A.; PARKS, T.D.; SWANEY, S.; PROEBSTING, W.M. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 7, p. 544-552, 1994.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 167-194, 2000.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, p. 435-445, 2005.

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

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU1, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 175–185, 2001.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 27 set. 2011.

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, 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: InTech, 2011. p. 101-122.

FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 21, p. 421-428, 2003.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças de citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FINER, J.J.; BECK, S.L.; BUENROSTRO-NAVA, M.T.; CHI, Y.; LINGS, P.P. Monitoring gene expression in plant tissues. In: DUTTA-GUPTA, S.; IBAKARI, Y. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. v. 6, p. 31-46.

FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J.L.; SANFORD J.C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. **Nature Biotechnology**, London, v. 10, p. 1466-1472, 1992.

FITCHEN, J.H.; BEACHY, R.N. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 47, p. 739-763, 1993.

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 & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 36, p. 450-455, 2000.

FNP. Disponível em: <<http://www.informaecon-fnp.com>>. Acesso em: 27 set. 2011.

FOLIMONOVA, S.Y.; FOLIMONOV, A.S.; TATINENI, S.; DAWSON, W.O. *Citrus tristeza virus*: survival at the edge of the movement continuum. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, p. 6546–6556, 2008.

FUCHS, M.; GONSALVES, D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 173-202, 2007.

GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Tristeza. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases**, St. Paul, p. 48-50, 1989.

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

GOLDBACH, R.; BUCHER, E.; PRINS, M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. **Virus Research**, Amsterdam, v. 92, p. 207-212, 2003.

GOODWIN, J.; CHAPMAN, K.; SWANEY, S.; PARKS, T.D.; WERNSMAN, E.A.; DOUGHERTY, W.G. Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 95-105, 1996.

GOTTULA, J.; FUCHS, M. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. In: LOEBENSTEIN, G.; CARR, J.P. (Ed.). **Advances in virus research: natural and engineered resistance to plant viruses**. London: Academic Press, 2009. v. 75, p. 161-183.

GUO, W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia

sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 24, 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**, Heidelberg, v. 16, p. 745-753, 1997.

HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, v. 286, p. 950-952, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogen. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, p. 986-994, 1996.

HERRON, C.M.; MIRKOV, T.E.; GRAÇA, J.V.; LEE, R.F. *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: in vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 134, p. 205–211, 2006.

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. **Japan Journal of Breeding**, Mishima, v. 40, p. 199-207, 1990.

HILF, M.E.; MAVRODIEVA, V.A.; GARNSEY, S.M. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 909-917, 2005.

HILF, M.E.; KARASEV, A.V.; PAPPU, D.J.; GUMPF, H.R.; NIBLETT, C.L.; GARNSEY, S.M. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. **Virology**, Amsterdam, v. 208, p. 576–582, 1995.

KANIEWSKI, W.; ILARDI, V.; TOMASSOLI, L.; MITSKY, T.; LAYTON, J.; BARBA, M. Extreme resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, p. 111-119, 1999.

KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON W. O. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. **Virology**, Amsterdam, v. 208, p. 511–520, 1995.

- KHAN, I.A.; KENDER, W.J. Citrus breeding: introduction and objectives. In: KHAN, I.A. (Ed.). **Citrus genetics, breeding and biotechnology**. Oxfordshire: CBAI, 2007. p. 1-8.
- KHAWALE, R.N.; SINGH, S.K.; GARG, G.; BARANWAL, V.K.; AJIRLO, S.A. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Current Science**, Bangalore, v. 91, p. 1700-1705, 2006.
- KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. **Nature**, London, v. 201, p. 1011-1012, 1964.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 64, p. 91-97, 1989.
- LI, D.D.; SHI, W.; DENG, X.X. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 21, p. 153-156, 2002.
- LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Plant pathology and RNAi: a brief history. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 191-204, 2005.
- LÓPEZ, C.; CASTILLO-NAVAS, J.; GOWDA, S.; MORENO, P.; FLORES, R. The 23-KDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus Tristeza Virus* is an RNA-binding protein. **Virology**, Amsterdam, v. 269, p. 462-470, 2000.
- LÓPEZ, C.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant Pathology**, St. Paul, v. 11, p. 33-41, 2010.
- LU, R.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; PEART, J.R.; MALCUIT, I.; BAULCOMBE, D.C. Virus-induced gene silencing in plants. **Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 296-303, 2003.
- LU, R.; FOLIMONOV, A.; SHINTAKU, M.; LI, W.X.; FALK, B.W.; DAWSON, W. O.; DING, S.W. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-Kb viral RNA genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 15742-15747, 2004.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. p. 223-277.
- MALLORY, A.C.; REINHART, B.J.; BARTEL, D.; VANCE, V.B.; BOWMAN, L.H. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short

interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, p. 15228-15233, 2002.

MCCLEAN, A.P.D. Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 7, p. 109-114, 1975.

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

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. **Plant Pathology**, Amsterdam, v. 59, p. 68-75, 2010.

MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença "tristeza" dos citros. **O Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 285-287, 1946.

MICHAUD, J.P. A review of the literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 81, p. 37-61, 1998.

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

MONTEIRO-HARA, A.C.B.A.; JADÃO, A.S.; MENDES, B.M.J.; REZENDE, J.A.M.; TREVISAN, F.; MELLO, A.P.O.A.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; PIEDADE S.M.S. Genetic transformation of passionflower and evaluation of R1 and R2 generations for resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, p. 1021-1025, 2011.

MOORE, G.A.; JACOMO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 11, p. 238-242, 1992.

MOREIRA, S. Observação sobre a tristeza dos citros ou podridão das radículas. **O Biológico**, São Paulo, v. 8, p. 269-272, 1942.

MUELLER, E.; GILBERT, J.; DAVENPORT, G.; BRIGNETTI, G.; BAULCOMBE, D.C. Homology-dependent resistance – transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. **Plant Journal**, Oxford, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Lake Alfred, v. 3, p. 868-872, 1977.

_____. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: ROSSETTI, V.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. (Ed.). **Doenças dos citros causadas por algas, bactérias, fungos e vírus**. Campinas: Fundação Cargill, 1993. v. 2, p. 55-84.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A. de; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. p. 567-604.

MUNIZ, F.R. **Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**. 2008. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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, p. 162-166, 2012.

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.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. Virus taxonomy-classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, Paris, v. 10, p. 497, 1995.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Bethesda, v. 2, p. 279-289, 1990.

NELSON, R.S.; MCCORMICK, S.M.; DELANNAY, X.; DUBE, P.; LAYTON, J.; ANDERSON, E.J.; KANIEWSKIA, M.; PROKSCH, R.K.; HORSCH, R.B.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. **Biotechnology**, Dickson Act, v. 6, p. 403-409, 1988.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. O contexto histórico e os benefícios de 40 anos de atividades no Brasil. In: NEVES, M.F.; JANK, M.S. (Org.). **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015**. São Paulo: Atlas, 2006. p. 6-15.

NIBLETT, C.L., GENC, H., CEVIK, B., HALBERT, S., BROWN, L., NOLASCO, G., BONACALZA, B., MANJUNATH, K.L., FEBRES, V.J., PAPPU, H.R., LEE, R.F. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of *Citrus* tristeza disease. **Virus Research**, Amsterdam, v. 71, p. 97-106, 2000.

OMAR, A.A.; SONG, W.Y.; GROSSER, J.W. Introduction of *Xa21*, a *Xanthomonas*-resistance gene from rice, into Hamlin sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 82, p. 914-923, 2007.

PALAUQUI, J.C.; ELMAYAN, T.; POLLIEN, J.M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 16, p. 4738-4745, 1997.

PAOLI, L.G.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB23. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1663-1666, 2007.

PAPPU, H.R.; KARASEV, A.V.; ANDERSON, E.J.; PAPPU, S.S.; HILF, M.E.; FEBRES, V.J.; ECKLOFF, R.M.G.; MACCAFFERY, M.; BOYKO, V.; GOWDA, S.; DOLJA, V.V.; KOONIM, E.V.; GUMPF, D.J.; CLINE, K.C.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. Nucleotide sequence and organization of eight 3' *opne reading frames* of the citrus tristeza closterovirus genome. **Virology**, Amsterdam, v. 199, p. 35-46, 1994.

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

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

PEÑA, L.; MARTIN-TRILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, London, v. 19, p. 263-267, 2001.

POWELL-ABEL, P.; NELSON, R.S.B.; HOFFMANN, N.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T.; BEACHY, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat-protein gene. **Science**, Washington, v. 232, p. 738-743, 1986.

PRIETO, H. Genetic transformation strategies in fruit crops. In: ALVAREZ, M.A. (Ed.). **Genetic transformation**. Rijeka: InTech, 2011. p. 81-100.

RACCAH, B.; LOEBENSTEIN, G.; BAR-JOSEPH, M. Transmission of Tristeza virus by the melon aphid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, p.1102-1104, 1976.

RAI, M. Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant

lines with candidate resistance genes in this region. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 399-414, 2006.

REYES, C.A.; DE FRANCESCO, A.; PEÑA, E.J.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; SENDIN, L.; CASTAGNARO, A.P.; GARCIA, M.L. Resistance to *Citrus psorosis virus* in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-rna silencing. **Journal of Biotechnology**, Missouri, v. 151, p. 151-158, 2011.

ROCHA-PEÑA, M.A.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; OCHOA-CORONA, F.M.; LASTRA, R.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 437-445, 1995.

ROISTACHER, C.N. **Graft-transmissible diseases of citrus**: handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO, 1991. 286 p.

RUIZ-RUIZ, S.; MORENO, P.; GUERRI, J.; AMBRÓS, S. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 145, p. 96-105, 2007.

SAMBADE, A., LÓPEZ, C., RUBIO, L., FLORES, R., GUERRI, J., MORENO, P. Polymorphism of a specific region in the gene *p23* of *Citrus tristeza virus* allows differentiation between mild and severe isolates. **Archives of Virology**, Paris, v. 148, p. 2281-2291, 2003.

SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 113, p. 395-405, 1985.

SANTARÉM, E.R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência & Tecnologia**. Piracicaba, v. 15, p. 81-90, 2000.

SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R.K. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 147, p. 43-53, 2008.

SATYANARAYANA, T.; GOWDA, S.; AYLLÓN, M.A.; DAWSON, W.O. Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 799–804, 2004.

SATYANARAYANA, T.; ROBERTSON, C.J.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, p. 17366-17371, 2011.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. Com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola

Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SILHAVY, D.; MOLNAR, A.; LUCIOLI, A.; SZITTYA, G.; HORNYIK, C.; TAVAZZA, M.; BURGIAN, J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide doublestranded RNAs. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 21, p. 3070-3080, 2002.

SINGH, S.; RAJAM, M.V. Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Palo Alto, v. 15, p. 3-22, 2009.

SIVAMANI, E.; HUET, H.; SHEN, P.; SHEN, P.; ONG, C.A.; DE KOCHKO, A.; FAUQUET, C.; BEACHY, R.N. Rice plants (*Oryza sativa* L.) containing rice tungro spherical virus (RTSV) coat protein transgenes are resistant to virus infection. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, p. 177-185, 1999.

SOLER, N.; PLOMER, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of *Citrus tristeza virus* confers complete resistance to the virus. **Plant Biotechnology Journal**, Indianapolis, v. 10, p. 1-12, 2012.

SONG, W-Y.; WANG, G-L.; CHEN, L-L.; KIM, H-S.; PI, L-Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W-X.; ZHU, L-H.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science**, Washington, v. 270, p. 1804-1806, 1995.

SOUZA, A.J. **Reação à infecção pelo vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) expressando seqüências gênicas do CTV**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SOUZA, A.J.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 645-656, 2007.

STACH-MACHADO, D.R.; TARGON, M.L.P.N.; ARRUDA, G.; BARBOSA, R.A.; WAGNER, G.A.; MACHADO, M. A. Monoclonal antibodies to recombinant coat proteins of severe Brazilian isolates of *Citrus tristeza virus* (CTV). In: PROCEEDINGS OF THE 14TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, Campinas: UNICAMP, 1998. p. 139.

STONE, R. China plans \$3.5 billion GM crops initiative. **Science**, Washington, v. 321, p. 1279, 2008.

SUASTIKA, G.; NATSUAKI, T.; TERUI, H.; KANO, T.; IEKI, H.; OKUDA, S. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. **Journal of General Plant Pathology**, London, v. 67, p. 73-77, 2001.

TAVANO, E.C.R. **Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*)**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

TEPFER, M. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 467-491, 2002.

TRICOLI, D.M.; CARNEY, K.J.; RUSSEL, P.F.; MCMASTER, J.R.; GROFF, D.W.; HADDEN, K.C.; HIMMEL, P.T.; HABBARD, J.P.; BOESHORE, M.L.; REYNOLDS, J.F.; QUEMADA, H.D. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus. **Nature Biotechnology**, London, v. 13, p. 1458-1465, 1995.

VAN DER KROL, A.R.; MUR, L.A.; BELD, M.; MOL, J.N.M.; STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 291-299, 1990.

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

VIEIRA, J.G.Z.; FARIA, R.T.; VIEIRA, L.G.E.; MOLINARI, H.B.C. Transformação genética de citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) com o gene marcador fosfomanose isomerase (*pmi*). **Acta Scientiarum – Agronomy**, Maringá, v. 27, p. 541-547, 2005.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 206-220, 2005.

VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Systemic signalling in gene silencing. **Nature**, London, v. 389, p. 553, 1997.

VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, Cambridge, v. 95, p. 177-187, 1998.

WANG, M.; METZLAFF, M. RNA silencing and antiviral defense in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 8, p. 216-222, 2005.

- WATERHOUSE, P.M. Defense and counterdefense in the plant world. **Nature Genetics**, London, v. 38, p. 138-139, 2006.
- WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defence against viruses. **Nature**, London, v. 411, p. 834-842, 2001.
- WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M; TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Saint Paul: APS Press. 1993. 128 p.
- WONG, W.S.; LI, G.G.; NING, W.; XU, Z.F.; HSIAO, W.L.W.; ZHANG, L.Y.; LI, N. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. **Plant Science**, Washington, v. 161, p. 969-977, 2001.
- YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *PthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 75, p. 11-23, 2011.
- 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**, Heidelberg, v. 19, p. 1203-1211, 2000.
- YAO, J.; WU, J.; GLEAVE, A.P.; MORRIS, B.A.M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, Washington, v. 113, p. 175-183, 1996.
- YOKOMI, R.K.; LASTRA, R.; STOETZEL, M.B.; DAMSTEEGT, D.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; GOTTWALD, T.R.; ROCHA-PÉÑA, M.A.; NIBLETT, C.L. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of the citrus tristeza virus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, p. 1078-1085, 1994.
- 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 coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 57-66, 2008.
- ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 191-244, 2005.
- ZHANG, X.D.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIC, V.; TRIPLETT, E.W.; MOU, Z.L. Over-expression of the *Arabidopsis NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 128, p. 91-100, 2010.
- ZHOU, C.L.E.; AMMAR, E.; SHETA, H.; KELLEY, S.; POLEK, M.; ULLMAN, D.E. *Citrus tristeza virus* ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis*

and *Citrus aurantifolia*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 80, p. 512-525, 2002.

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

ZUPAN, J.; MUTH, T.R.; DRAPER, O.; ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 11-28, 2000.