UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

EVELINE CARLA DA ROCHA TAVANO

Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus* Liberibacter spp.

Piracicaba 2013

EVELINE CARLA DA ROCHA TAVANO

Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus* Liberibacter spp.

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz M. Januzzi Mendes

Piracicaba 2013 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Tavano, Eveline Carla da Rocha

Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus* Liberibacter spp. / Eveline Carla da Rocha Tavano; orientadora Beatriz Madalena Januzzi Mendes. - - Piracicaba, 2013.

86 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Genes de insetos 2. Genética molecular vegetal 3. Greening (Doença de plantas) 4. Laranja 5. Plantas transgênicas 6. Regulação gênica 7. Resistência genética vegetal I. Título

CDU (631.528.6 + 634.31) : 632.9

Aos meus pais Luiz Carlos e Maria Benedita, à minha irmã Elisangela Claudia e ao meu irmão Luiz Carlos Junior pelo amor incondicional, carinho, conselhos e incentivo recebido.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar os meus passos, conceder-me vida, saúde e disposição para trabalhar.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de cursar o doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente.

À profa. Dra. Beatriz M. J. Mendes pela oportunidade, confiança e excelente orientação.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. Francisco de Assis A. Mourão Filho pela importante coloraboração durante o desenvolimento deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava pelo constante apoio, colaboração e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

À profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira por autorizar a utilização do vetor de expressão contendo o gene atacina A.

Ao prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira pelas sugestões e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Dra Helaine Carrer e ao prof. Dr. Daniel S. Moura pela oportunidade de realizar o estágio de docência na disciplina Biologia Molecular.

À Profa. Dra Adriana P.M. Rodriguez pelo apoio e convívio.

Ao Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" pelo fornecimento de frutos de laranja doce.

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Vegetal Renata Beatriz Cruz e Marcelo Favaretto Correa pelo importante apoio nos trabalhos de laboratório, pelo convívio e amizade.

À Liliane Stipp pelo auxílio durante o desenvolvimento das construções gênicas.

À Fabiana Muniz, Lísia Borges, Thaísa T. Pinheiro e Danielle Caldas pela ajuda na análise de RT-qPCR.

Aos colegas do Laboratório Melhoramento de Plantas, especialmente à Danielle Scoton pela constante colaboração.

À secretária Suzineide Maniesco (CENA/USP) pela disponibilidade e auxílio.

À bibliotecária Marília Henyei (CENA/USP) pela revisão das referênicas e formatação final da tese.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduaçao CENA/USP pelo auxílio.

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

Aos colegas do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP), especialmente ao João Geraldo Brancalion pelo serviço de computação gráfica.

À estagiária Flavia Piacentini Romano pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos grandes companheiros dos laboratórios de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP) e Biotecnologia de Plantas Hortículas (ESALQ/USP): Renata, Marcelo, Leonardo, Fabiana, Perla, Carolina, Lívia, Alessandra, Ana Paula, Bianca, Isabela, Mônica, Hilo, Camila, Karina, Sylvia, Sandra, Lili, Luzia, Lísia, Tatiane, Pâmela, Rafaella, Marina, Alessandra, Rodrigo, Filipi e Ernani pelo auxílio no trabalho, amizade e por todos os momentos passamos juntos.

À D. Nair G. Lacerda pela confiança em ceder sua casa para eu morar, pela amizade e companheirismo.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

A doença Huanglongbing (HLB) associada a bactéria *Candidatus* Liberibacter spp., que coloniza os vasos do floema, é considerada uma das mais graves doenças de citros. Uma importante estratégia para o controle desta doença consiste na produção plantas transgênicas, expressando genes que codificam peptídeos de antibacterianos especificamente no local de colonização do patógeno. O objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de laranja doce, expressando o gene que codifica o peptídeo antibacteriano atacina A (attA) dirigido por promotores específicos para a expressão gênica no floema. O trabalho foi iniciado com a elaboração de construções gênicas contendo o gene attA (associado ou não ao peptídeo sinal), sob o controle dos promotores AtSuc2 (transportador de sacarose), AtPP2 (proteína de floema 2), clonados de Arabidopsis thaliana, ou CsPP2 (proteína de floema 2), clonado de Citrus sinensis. Os experimentos de transformação genética foram realizados com C. sinensis cv. 'Hamlin', 'Valência', 'Pêra' e 'Natal', via Agrobacterium tumefaciens, utilizando-se segmento de epicótilo como explante. A identificação de plantas transgênicas foi realizada por meio da análise de PCR. Plantas PCR+ foram aclimatizadas e transferidas para casa-de-vegetação específica para o cultivo de plantas transgênicas. Análises de Southern e Northern blot foram realizadas em plantas aclimatizadas, confirmando-se a integração e transcrição do gene attA, respectivamente. A expressão do gene attA também foi confirmada pela análise de RT-gPCR. Plantas de laranja 'Hamlin' contendo o gene attA (associado ou não ao peptídeo sinal), sob o controle dos promotores AtSuc2 ou AtPP2 foram propagadas por enxertia, para futura avaliação da resistência a Candidatus Liberibacter asiaticus.

Palavras-chave: HLB. Transgenia. Citros. Resistência a doenças. Peptídeo antibacteriano. Promotor tecido-específico.

ABSTRACT

TAVANO, E. C. R. Genetic transformation of *Citrus sinensis* (L) Osbeck for resistance to *Candidatus* Liberibacter spp. 2013. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Huanglongbing (HLB) associated to Candidatus Liberibacter spp., which colonizes the phloem, is considered one of the most serious diseases of citrus. One important strategy to control this disease consists of producing transgenic plants expressing, in the bacteria colonization tissue, genes encoding antibacterial peptides. The objective of this work was to produce transgenic sweet orange plants expressing genes encoding the antibacterial peptide attacin A (attA) driven by phoem-specific promoters. The work started with the development of the gene constructs, containing the attacin A gene (with or without signal peptide) controlled by either sucrose transporter gene (AtSuc2) or phloem protein 2 gene promoters (AtPP2) from Arabidopsis thaliana, or phloem protein 2 gene promotor (CsPP2) from Citrus sinensis. The genetic transformation of C. sinensis 'Hamlin', 'Valencia', 'Pera' and 'Natal' cultivars was done via Agrobacterium tumefaciens. Epicotyls segments collected from in vitro germinated seedlings were used as explants. Transgenic plants were identified by PCR analyses. PCR positive plants were acclimatized and transferred to specific greenhouse. Integration and transcription of the attA gene was confirmed in acclimatized transgenic plants by Southern and Northern blot analysis, respectively. The attA gene expression was validated by RT-gPCR analysis. 'Hamlin' transgenic cultivars containing the AtSuc2 or AtPP2 promoters controlling the expression of attA (with or without signal peptide) were propagated by grafting, for future evaluation of Candidatus Liberibacter asiaticus resistance.

Keywords: HLB. Transgenic. Citrus. Disease resistance. Antibacterial peptides. Tissue-specific promoters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da região de transferência (T-DNA) dos plasmídeos utilizados na elaboração das construções gênicas	34
Figura 2 -	Construção do vetor de expressão pCAtSuc2/attA-PS	49
Figura 3 -	Clonagem do gene <i>att</i> A nos plasmídeos AtSuc2/ pCAMBIA1201 e AtPP2/pCAMBIA1201	51
Figura 4 -	Transferência do promotor AtSuc2 associado ao gene <i>att</i> A para o plasmídeo pCAMBIA 2201, produzindo o vetor de expressão pCAtSuc2/ <i>att</i> A.	52
Figura 5 -	Transferência do promotor AtPP2 associado ao gene <i>att</i> A para o plasmídeo pCAMBIA 2201, produzindo o vetor de expressão pCAtPP2/ <i>att</i> A.	53
Figura 6 -	Construção do vetor de expressão pCCsPP2/attA	55
Figura 7 -	Sequenciamento dos vetores de expressão pCAtSuc2/attA-PS e pCAtSuc2/attA	56
Figura 8 -	Sequenciamento do vetor de expressão pCAtPP2/attA	57
Figura 9 -	Sequenciamento do vetor de expressão pCCsPP2/attA	57
Figura 10 -	Esquema da região de transferência (T-DNA) dos vetores de expressão utilizados nos experimentos de transformação genética.	58
Figura 11 -	Transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> com construções gênicas contendo o gene atacina A (associado ou não peptídeo sinal), sob o controle de promotores específicos de floema	60
Figura 12 -	Análise de Southern blot em plantas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pCAtSuc2/attA-PS e pCAtSuc2/attA	65
Figura 13 -	Análise de <i>Southern blot</i> em plantas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAtPP2/ <i>att</i> A	65
Figura 14 -	Análise de Southern blot em plantas de laranja 'Valência' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAtPP2/attA ou pCAtSuc2/attA	66
Figura 15 -	Análise Northern blot em plantas transgênica de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pCAtSuc2/attA, pCAtSuc2/attA-PS e pCAtPP2/attA	67

Figura 16 -	Expressão do gene <i>att</i> A, em relação ao gene de referência 18S rRNA, em plantas transgênicas de laranja 'Hamlin'	68
Figura 17 -	Propagação das plantas transgênicas	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cv. 'Hamlin', com a construção gênica pCAtSuc2/ <i>att</i> A-PS	61
Tabela 2 -	Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cv. 'Hamlin', 'Pêra', 'Valência' e 'Natal', com a construção gênica pCAtSuc2/ <i>att</i> A	61
Tabela 3 -	Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cv. 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência', com a construção gênica pCAtPP2/ <i>att</i> A	62
Tabela 4 -	Experimentos de transformação genética de <i>Citrus sinensis</i> cv. 'Hamlin' e 'Valência', com a construção gênica pCCsPP2/ <i>att</i> A	63
Tabela 5 -	Resumo dos resultados dos experimentos de transformação genética	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Aspectos gerais da citricultura	19
2.2 Huanglongbing (HLB)	21
2.3 Transformação genética de citros	24
2.4 Transformação genética para resistência a doenças	28
2.5 Promotores tecido-específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Material vegetal	33
3.2 Construções gênicas	34
3.2.1 Construção do vetor de expressão contendo o gene <i>att</i> A-PS (associado ao peptídeo sinal), dirigido pelo promotor AtSuc2 (pCAtSuc2/ <i>att</i> A-PS)	35
3.2.2 Construção dos vetores de expressão com o gene <i>att</i> A (sem o peptídeo sinal), dirigido pelos promotores AtSuc2 ou AtPP2 (pCAtSuc2/ <i>att</i> A e pCAtPP2/ <i>att</i> A)	36
3.2.3 Construção do vetor de expressão com o gene <i>att</i> A (sem o peptídeo sinal), dirigido pelo promotor CsPP2 (pCCsPP2/ <i>att</i> A)	38
3.3 Transferência dos vetores de expressão para Agrobacterium tumefaciens	40
3.4 Sequenciamento das construções gênicas	40
3.5 Transformação genética	41
3.5.1 Cultura e manutenção dos isolados de Agrobacterium tumefaciens	41
3.5.2 Transformação genética de citros via Agrobacterium tumefaciens	42
3.5.3 Seleção, regeneração e enxertia in vitro das gemas adventícias	42
3.5.4 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR	43
3.6 Caracterização Molecular	43

3.6.1 Análise de Southern blot	43
3.6.2 Análise de Northern blot	45
3.6.3 Análise de RT-qPCR	46
3.7 Propagação das plantas transgênicas	47
4 RESULTADOS	48
4.1. Construções gênicas	48
4.1.1 Construção gênica pCAtSuc2/ <i>att</i> A-PS	48
4.1.2 Construções gênicas pCAtSuc2/attA e pCAtPP2/attA	50
4.1.3 Construção gênica pCCsPP2/ <i>att</i> A	54
4.1.4 Sequenciamento das construções gênicas	55
4.2 Transformação genética	58
4.3 Caracterização molecular das plantas obtidas	63
4.4 Propagação das plantas transgênicas	69
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB) associado à bactéria *Candidatus* Liberibacter spp., que coloniza os vasos do floema, é considerado atualmente a doença mais ameaçadora para a citricultura, causando perdas expressivas nas principais regiões produtoras. Até o momento, não foram encontrados métodos curativos para esta doença, desta maneira seu controle é baseado em medidas preventivas como o uso de mudas sadias, eliminação de plantas doentes e controle do inseto vetor. A obtenção de variedades resistente ao HLB é de grande interesse para a citricultura, no entanto, a aplicação dos métodos convencionais de melhoramento genético, em *Citrus*, é limitada, em função de fatores relacionados a aspectos biológicos e reprodutivos deste gênero, e devido a ausência de espécies resistentes ao HLB. Sendo assim, a transformação genética representa uma importante ferramenta biotecnológica que pode ser aplicada na tentativa de produzir variedades resistentes a esta doença.

Uma abordagem empregada para a transformação genética visando resistência a doenças causadas por bactérias consiste na produção de plantas expressando peptídeos antibacterianos, como as atacinas. Esta classe de peptídeos já foi utilizada para a transformação genética de diferentes espécies frutíferas, como pera, maçã e citros, promovendo redução da suscetibilidade de vários patógenos (REYNOIRD et al., 1999; KO et al., 2000; BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010; MONDAL et al., 2012).

Na maioria dos trabalhos de transformação genética de citros, os genes introduzidos estão sob o controle de promotores constitutivos, sendo utilizado principalmente o promotor CaMV 35S (DOMÍNGUEZ et al., 2000; FAGOAGA et al., 2001; BOSCARIOL et al., 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; CARDOSO et al., 2010; YANG et al., 2011; MUNIZ et al., 2012). Poucos trabalhos relatam a expressão controlada dos transgenes por intermédio de promotores induzidos pelo patógeno ou promotores tecido-específico. O promotor CsPP do gene da fenilalanina-amônia-liase de citros, foi em introduzido em laranja 'Valência' para dirigir a expressão do gene *cecropin* MB39 no xilema, local de colonização da bactéria *Xyllela fastiosa*,

causadora da clorose variegada dos citros (CVC) (PAOLI et al., 2007). O promotor *gst1*, clonado do gene que codifica a proteína glutationa S-transferase em batata foi utilizado para dirigir a expressão do gene *hrp*N (harpina), em plantas de laranja 'Hamlin' (BARBOSA-MENDES et al., 2009).

Obter plantas transgênicas expressando genes que possam influenciar na resistência a doenças especificamente no local de colonização do patógeno é uma importante estratégia para o controle de doenças. No caso do HLB, expressar peptídeos antibacterianos no floema, local de colonização da bactéria *Candidatus* Liberibacter spp., consiste em uma abordagem promissora para a obtenção plantas resistentes a essa doença.

Recentemente, foram divulgados trabalhos relacionados com a produção de plantas transgênicas de *Citrus aurantifolia* e *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valencia' contendo transgenes associados a promotores para a expresssão gênica no floema (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012). Os promotores estudados foram o AtSuc2 (transportador de sacarose) e o AtPP2 (proteína de floema 2) clonados de *Arabidopsis thaliana*, o CsPP2 (proteína de floema 2) clonado de *Citrus sinensis* (CsPP2), o RSs1 (sacarose sintase I) clonado de *Oryza sativa*, o *rol*C clonado de *Agrobacterium rhizogenes* e o RTBV clonado de vírus (*rice tungro bacilliform virus*). Este promotores foram capazes de dirigir eficientemente a expressão do gene *uid*A (GUS) no floema, conforme demostrado por análises histoquímicas, histológicas e moleculares (DUTT et al., 2012; MIYATA et al., 2012), indicando que são adequados para dirigir a expressão de genes capazes de influenciar no estabelecimento de patógenos que colonizam o floema.

Em continuidade ao estudo de Miyata et al. (2012) o objetivo deste trabalho foi produzir plantas transgênicas de *C. sinensis* expressando o gene que codifica o peptídeo antibacteriano (*att*A), sob o controle dos promotores específicos de floema (AtSuc2, AtPP2 ou CsPP2), visando resistência a *Candidatus* Liberibacter spp.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da citricultura

As plantas cítricas pertencem família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae* sendo a maioria das espécies de importância econômica pertencentes ao gênero *Citrus*. Outras espécies cultivadas comercialmente estão incluídas nos gêneros *Fortunella* e *Poncirus* (DAVIES; ALBRIGO, 1994). O gênero *Citrus* é composto por apenas três espécies verdadeiras: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e toranja (*Citrus grandis* L.), os outros genótipos são derivados de hibridações entre estas espécies verdadeiras (SCORA, 1975; BARRETT; RHODES, 1976; NICOLOSI et al., 2000).

Os citros são originários do continente asiático, exceto pomelo que é nativo da Ilha de Barbados no Caribe (DONADIO; MOURÃOFILHO; MOREIRA, 2005). A partir do centro de origem, as plantas cítricas foram distribuídas para diversos países do Oriente e do Ocidente, desenvolvendo-se principalmente em regiões tropicais e subtropicais, a uma latitude de 40° ao norte e ao sul do Equador (DAVIES; ALBRIGO, 1994). Os principais países produtores de citros são China, Brasil e Estados Unidos. Juntos estes países detém aproximadamente 50% da produção mundial de citros, incluindo laranjas, limões, limas, tangerinas e pomelos (FAO, 2012).

As laranjas são as principais frutas cítricas produzidas no mundo (69 milhões de toneladas) (FAO, 2012), sendo que as maiores regiões produtoras concentram-se no Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida) (FAO, 2012). A produção de laranja destes países destina-se principalmente ao processamento industrial para a produção de suco concentrado congelado (FCOJ - *Frozen Concentrated Orange Juice*) (BOTEON; NEVES, 2005). No Brasil, o mercado de suco de laranja é voltado para exportação principalmente para Europa e Estados Unidos, que além de ser um importante produtor também é um grande consumidor e comprador do suco de laranja brasileiro (AGRIANUAL, 2012).

A produção comercial de citros foi estabelecida no Brasil na década de 1960 e desde então é considerada uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro (BOTEON; NEVES, 2005). Ao longo dos anos o país consolidou-se como o maior produtor mundial de laranja (19 milhões de toneladas) (FAO, 2012) e maior produtor e exportador de suco concentrado de laranja (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Atualmente, o cultivo de laranja no país ocupa uma área de aproximadamente 800 mil hectares, sendo realizado em todas as regiões brasileiras (AGRIANUAL, 2012). Cerca de 70% da área cultivada com citros no Brasil está localizada no Estado de São Paulo. Outros Estados produtores de citros são Bahia (7,6%), Sergipe (7%), Minas Gerais (4%), Rio Grande do Sul (3,5%), Paraná (2,6%) e Pará (1,5%) (AGRIANUAL, 2012).

Desde o estabelecimento da citricultura no Brasil, os pomares vêm sendo atingidos por diversos problemas fitossanitários que tem limitado a sua produtividade e aumentado o custo de produção. A alta incidência de pragas e doenças em citros está associada, entre outras características, ao fato da citricultura estar apoiada em uma base genética estreita. Embora o gênero *Citrus* apresente uma alta diversidade genética, poucas espécies e clones são utilizados em plantios comerciais (MACHADO; CRISTOFANI-YALY; BASTIANEL, 2011).

Diversas doenças causadas por diferentes organismos como fungos, vírus e bactérias tem provocado sérios danos à cultura, como a gomose provocada por patógenos do gênero *Phytophthora*, a Tristeza dos citros, causada pelo vírus da tristeza do citros (CTV), o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e o o huanglongbing (HLB), associado a bactéria *Candidatus* Liberibacter spp. (MATTOS JUNIOR et al., 2005). O HLB é considerado umas das doenças de maior importância para a citricultura. Essa doença manifesta-se em todas as variedades de citros utilizadas comercialmente e têm causado perdas expressivas nas principais regiões produtoras, afetando a sustentabilidade econômica da cadeia citrícola.

2.2 Huanglongbing (HLB)

O huanglongbing (HLB) foi relatado pela primeira vez na China, em 1919, e disseminado, durante o século XX, para diversos países da Ásia, África e Oceania (BOVÉ, 2006). Recentemente, o HLB foi constatado no continente Americano atingindo as duas principais regiões produtoras de citros do mundo: Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida) (BOVÉ, 2006). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em março de 2004, na região centro e sul do Estado de São Paulo. Desde então, o HLB disseminou-se para as demais áreas produtoras deste Estado e está presente em diversas regiões citrícolas do Paraná e Minas Gerais (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

O HLB é associado a três espécies de bactérias gram-negativas, limitadas aos vasos do floema, pertencentes à subdivisão α das proteobactérias, denominadas *Candidatus* Liberibacter spp. Por serem de difícil cultivo, a identificação e classificação taxonômica destas espécies foi obtida com base em estudos de microscopia eletrônica (GARNIER; DANEL; BOVÉ, 1984) e de comparações de sequências da região 16S do DNA ribossomal (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994), sendo denominadas provisoriamente de *Candidatus* (MURRAY; SCHLEIFER, 1994), até que mais estudos comprovem sua classificação taxonômica. Recentemente, foi relatado o cultivo destas espécies de bactérias, mas os postulados de *Koch* ainda não foram completamente preenchidos para a confirmação destas espécies como único agente causal do HLB (SECHLER et al., 2009).

As três espécies de bactérias associadas ao HLB são: *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas), presente nos continentes asiático e americano (BOVÉ, 2006); *Candidatus* Liberibacter africanus (CLaf), presente na África (BOVÉ, 2006); *Candidatus* Liberibacter americanus (CLam) constatada apenas no Brasil (TEIXEIRA et al., 2005). Além destas espécies de bactéria, também foi detectada, no Brasil (São Paulo) e na China, a presença de um fitoplasma em plantas com sintomas de HLB (TEIXEIRA et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Quando a doença foi detectada no Brasil a espécie CLam apresentava maior incidência nos pomares, no entanto, a partir de 2008, observou-se uma mudança na prevalência das espécies e a CLas passou a ser predominante (LOPES et al., 2009a). Este aumento desproporcional de CLas nos pomares brasileiros pode ser explicado pela influencia da temperatura sobre o multiplicação da bactéria e desenvolvimento da doença. A espécie CLas é mais tolerante a altas temperaturas do que a espécie CLam. Em ambientes com temperatura elevadas (32-35 °C), observa-se menor taxa de multiplicação da bactéria CLam e ausência de sintomas da doença, enquanto que a multiplicação da bactéria CLas não é afetada (LOPES et al., 2009a). Este aumento na incidência de CLas também pode ser devido a maior concentração desta espécie de bactéria em plantas infectadas, aumentando as chances de aquisição e transmissão do patógeno pelo inseto vetor (LOPES et al., 2009b).

A transmissão da bactéria *C.* Liberibacter spp. ocorre por intermédio dos insetos vetores (psilídeos) *Diaphorina citri* e *Trioza erytreae*. A *Diaphorina citri* está presente na Ásia e na América e transmite as bactérias CLas e CLam. A espécie *Trioza erytreae*, ocorre na África e está associada a transmissão da bactéria CLaf (BOVÉ; AYRES, 2007). Experimentalmente a transmissão do patógeno pode ser realizada por meio da enxertia de borbulhas, obtidas de plantas infectadas (COLLETA FILHO et al., 2010) ou de forma indireta de citros para vinca (*Catharanthus roseus*) ou tabaco (*Nicotiana tabacum*), por intermédio da planta parasitária cuscuta (*Cuscuta campestris*) (GARNIER; BOVÉ, 1983).

Em plantas infectadas, a bactéria é transmitida sistemicamente do sítio de infecção para diferentes partes da planta, podendo ser detectada em folhas, raízes, flores, frutos e no tegumento das sementes (TATINENI et al., 2008). A bactéria é distribuída de forma irregular nos tecidos infectados, apresentando concentrações variadas nos diferentes tecidos (TATINENI et al., 2008).

Análises anatômicas mostram que as bactérias associadas ao HLB, estão presentes no floema como células individuais (KIM et al., 2009) e por serem pequenas movem-se livremente pelos elementos crivados (TATINENI et al., 2008), não formando agregados capazes de bloquear o floema (KIM et al., 2009). Entretanto, em plantas infectadas observa-se o bloqueio dos vasos do floema que é atribuído principalmente a deposição de calose nos poros da placa crivada e nos

plasmodesmos que conectam os elementos crivados a células companheiras (KIM et al., 2009; KOH et al., 2012). O bloqueio do floema é associado com a inibição do transporte de fotoassimilados, causando acúmulo de amido em células fotossintéticas, no parênquima vascular e em elementos do floema de folhas e pecíolo, enquanto que nas raízes o acúmulo de amido não é observado (ETXEBERRIA et al., 2009). Estas alterações na participação de carboidrato contribuem para o desenvolvimento dos sintomas da doença levando ao declínio e até mesmo a morte das plantas afetadas (ETXEBERRIA et al., 2009).

Os sintomas do HLB aparecem inicialmente em um ramo ou galho, normalmente setorizado na planta, o qual se destaca pela coloração amarelada das folhas. As folhas apresentam mosqueado irregular entre os lados da folha separados pela nervura central, normalmente espessa e saliente. Com o avanço da doença, há uma intensa desfolha dos ramos afetados, seca dos ponteiros e os sintomas podem aparecer em toda a copa. Os frutos dos ramos afetados são pequenos, irregulares, assimétricos, com coloração da casca irregular, possuem sementes abortadas e caem prematuramente (LARANJEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006).

Praticamente todas as espécies do gênero *Citrus* e gêneros relacionados são suscetíveis ao HLB. Existem diferenças entre os genótipos quanto à severidade dos sintomas produzidos. As laranjas doces, pomelos, tangerinas e tangelos são mais suscetíveis à infecção, desenvolvendo sintomas mais severos da doença, já nos limões, limas ácidas, laranja azeda e citrange 'Carrizo' os sintomas são mais atenuados (FOLIMONOVA et al., 2009). *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos apresentam pouco ou nenhum sintoma da doença e possuem menores títulos de bactéria em seus tecidos, sendo considerados tolerantes ao HLB (ALBRECHT; BOWMAN, 2011; 2012). Além dos citros, outras espécies da família *Rutaceae* como a planta ornamental murta (*Murraya exotica*), são hospedeiras da bactéria associada ao HLB e possuem o psilídeo *D. citri* como vetor. Nesta espécie, a incidência da doença e a multiplicação da bactéria (CLas e CLam) são menores em comparação com citros (LOPES et al., 2010).

Não existe um método curativo para o HLB. Seu controle é baseado em medidas de prevenção, como a utilização de mudas sadias, a eliminação das plantas doentes, para a redução da fonte de inóculo, e o controle da população do inseto vetor, para reduzir a transmissão do patógeno (BOVÉ, 2006). Estas práticas

culturais quando adotadas rigorosamente e em conjunto com produtores vizinhos ajudam no controle da doença, no entanto, estas medidas de controle são difíceis de serem adotadas em larga escala (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Considerando a gravidade e a constante disseminação do HLB, verifica-se que é necessário buscar uma solução mais definitiva para o seu controle.

2.3 Transformação genética de citros

Uma alternativa para o controle de problemas fitossanitários que afetam a citricultura consiste no desenvolvimento de variedades resistentes por meio de programas de melhoramento genético. Entretanto, os programas convencionais de melhoramento são difíceis de serem aplicados em citros, em função de características relacionadas a sua biologia como a alta heterozigose, apomixia, poliembrionia, esterilidade do pólen e do óvulo e longo período juvenil (MACHADO et al., 2005). A biotecnologia pode ser utilizada como uma alternativa para superar os fatores que limitam a aplicação dos métodos tradicionais de melhoramento genético. Dentre as técnicas empregadas destacam-se a hibridação somática por fusão de protoplasto e a transformação genética (SINGH; RAJAM, 2009).

O primeiro trabalho envolvendo transformação genética de citros foi divulgado em 1989, quando foi relatada a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce 'Trovita' (*C. sinensis*), via polietilenoglicol (PEG) (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). Desde então, diversas espécies e híbridos de citros já foram transformadas geneticamente, incluindo *C. sinensis* (BOSCARIOL et al., 2003; YU et al., 2002; CARDOSO et al., 2010; MIYATA et al., 2012), *C. aurantifolia* (DOMÍNGUEZ et al., 2000; 2004), *C. paradisi* (FEBRES et al., 2003; FEBRES; LEE; MOORE, 2008), *C. aurantium* (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; GHORBEL et al., 2000), *C. clementina* (CERVERA et al., 2008), *C. limonia* (AZEVEDO et al., 2006a) e os híbridos *C. paradisi* x *Poncirus trifoliata* (MOLINARI et al., 2004) e *C. sinensis* x *P. trifoliata* (PEÑA et al., 2001; MIYATA et al., 2011).

Vários métodos têm sido empregados para a transformação genética de citros, como a introdução direta de DNA via bombardeamento de partículas (YAO et al., 1996; BESPALHOK et al., 2003), a transformação genética de protoplastos mediada por PEG (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990; FLEMING et al., 2000; GUO et al., 2005; OMAR; GROSSER, 2008) e a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, sendo este o método mais utilizado para a obtenção de plantas transgênicas de citros (HIDAKA et al., 1990; KANEYOSHI et al., 1994; PEÑA et al., 1995; GHORBEL et al., 2001; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; MOLINARI et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2008; MIYATA et al., 2012).

Para a realização de experimentos de transformação genética é necessário primeiramente o estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração de plantas *in vitro* (SINGH; RAJAM, 2009). Diversos estudos têm sido realizados visando estabelecer as melhores condições para a regeneração via organogênese *in vitro* em diferentes espécies de citros, principalmente as mais recalcitrantes (TAVANO et al., 2009; SORIANO et al., 2012). Para a obtenção de plantas transgênicas é necessário que as células competentes para a regeneração e transformação genética tenham a mesma origem (PEÑA et al., 2004) e também que seja possível produzir plantas a partir das gemas adventícias desenvolvidas. Devido a dificuldade de enraizamento das brotações de citros obtidas no cultivo *in vitro*, as plantas normalmente são produzidas pela enxertia *in vitro* das brotações em porta-enxerto proveniente de sementes germinadas *in vitro* (PEÑA et al., 1995; DOMÍNGUEZ et al., 2000; FAGOAGA et al., 2001; YU et al., 2002; PEÑA, 2005; RODRÍGUEZ et al., 2008; CERVERA et al., 2008).

A transformação genética de citros mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, tem sido realizada principalmente com explantes derivados de tecido juvenil, tais como segmentos de epicótilo, obtidos de sementes germinadas *in vitro* (KANEYOSHI et al., 1994; MENDES et al., 2002; 2009; PEÑA et al., 2004; BALLESTER; CERVERA; PEÑA, 2008; DUTT; VASCONCELLOS; GROSSER, 2011, DUTT et al., 2012). Outros tipos de explantes derivados de tecidos jovens, tais como, ramos, segmentos de folha (KHAN; FU; LIU, 2012) e calos embriogênicos (BACHCHU et al., 2011) têm sido empregados com menor freqüência.

Para transformação genética de citros também tem sido utilizado explantes provenientes de tecido adulto, como o segmento internodal obtido a partir de plantas adultas mantidas em casa-de-vegetação (ALMEIDA et al., 2003; CERVERA, et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2008; FÁVERO et al., 2012). Há um grande interesse em realizar a transformação genética a partir de tecido adulto, visando superar a longa fase juvenil e obter plantas transgênicas adultas num menor período de tempo, para uma avaliação agronômica mais rápida, acelerando o processo de seleção de novos cultivares. No entanto, o tecido adulto tem se mostrado pouco eficiente para a regeneração *in vitro* e transformação genética, além de apresentar altas taxas de contaminação (FÁVERO et al., 2012), dificultando seu emprego para a transformação genética de citros.

Durante o processo de transformação genética é essencial à presença de um sistema de seleção, capaz de favorecer o desenvolvimento apenas de gemas adventícias obtidas a partir de células transformadas geneticamente. Este sistema de seleção normalmente é baseado na introdução de genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas. Em citros, o gene *npt*II que confere resistência ao antibiótico canamicina tem sido muito utilizado para este fim (MOLINARI et al., 2004; PEÑA, 2005; AZEVEDO et al., 2006a; 2006b; MENDES et al., 2009; DUTT et al., 2012). Mesmo com a presença de agentes seletivos a ocorrência de escapes é muito comum e tem sido relacionada à proteção das células não transformadas ao agente seletivo, pelas células transformadas adjacentes e pela persistência da *Agrobacterium tumefaciens* no tecido inoculado (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

O sistema de seleção baseado em genes que conferem resistência a antibióticos pode representar um obstáculo para a aceitação pública e futura comercialização de plantas transgênicas. Como alternativa ao sistema de seleção por antibiótico, tem sido proposto o uso de sistemas de seleção positiva. Uma das estratégias estudadas, em citros, é baseada na introdução de genes que conferem às células transgênicas a habilidade de metabolizar compostos que normalmente não são metabolizados pela planta, como o gene *ManA* que codifica a enzima fosfomanose-isomerase (PMI), permitindo que células transformadas sejam capazes de utilizar manose como fonte de carbono (BOSCARIOL et al., 2006; BALLESTER; CERVERA; PEÑA, 2008). Outro sistema de seleção estudado é baseado na introdução de genes de seleção positiva, como o gene *ipt* (que codifica a enzima

isopentenil transferase) em combinação com um sistema de recombinação sítioespecífica, capaz de remover o gene seletivo de células transgênicas após a transformação genética (BALLESTER; CERVERA; PEÑA, 2007; 2008).

A eficiência de transformação genética tem sido variável, dependendo da espécie estudada. Para a maioria das espécies e variedades de citros a transformação genética ocorre com relativa facilidade, enquanto algumas espécies como *C. aurantium* (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; GHORBEL et al., 2000) e *C. limonia* (AZEVEDO et al., 2006a) tem se mostrado recalcitrantes para transformação genética. Além da espécie, outros fatores influenciam o processo de transformação genética de citros via *Agrobacterium*. Diversos trabalhos têm sido realizados visando estudar os parâmetros que afetam o processo de transformação genética a fim estabelecer protocolos mais eficientes (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; MENDES et al., 2002; YU et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2008; DUTT; GROSSER, 2009). Entre os fatores estudados por estes autores, destacam-se a estirpe e concentração de *Agrobacterium*, tempo de inoculação e condições para co-cultivo, seleção e regeneração dos explantes.

Com o estabelecimento de protocolos eficientes, a transformação genética de citros tem sido realizada com sucesso possibilitando a introdução de diversos genes de interesse agronômico em diferentes cultivares de citros. Podemos citar a obtenção de plantas transgênicas de pomelo contendo o gene *gna* promovendo resistência contra afídeos (YANG et al., 2000); a transformação genética de citrange 'Carrizo' com os genes *hal2* ou BADH relacionados com tolerância à salinidade (CERVERA et al., 2000; FU et al., 2011); a obtenção de plantas transgênicas de citrange 'Carrizo' contendo o gene mutante P5CSF129A, envolvido na biossíntese de prolina, promovendo resistência ao déficit hídrico (MOLINARI et al., 2004); o desenvolvimento de plantas transgênicas de laranja 'Valência' expressando o gene que codifica a enzima PME (pectin methylesterase) relacionada com a qualidade do fruto (GUO et al., 2005); a transformação genética de citrange 'Carrizo' com os genes *leafy* e *apetala1*, isolados de *Arabidopsis thaliana*, promovendo uma diminuição no período de juvenilidade e permitindo o florescimento das plantas transgênicas já no primeiro ano de cultivo (PEÑA et al., 2001).

2.4 Transformação genética para resistência a doenças

Os problemas fitossanitários são considerados fatores limitantes para as culturas causando perdas e aumentando o custo de produção. A transformação genética se destaca como uma importante ferramenta biotecnológica permitindo a introdução de genes capazes de promover a resistência a doenças sem alterar as características agronômicas da espécie.

Entre as estratégias utilizadas para a transformação genética de plantas visando resistência a doenças, tem-se a introdução de genes que codificam moléculas elicitoras de respostas de defesa nas plantas (GURR; RUSHTON, 2005); genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR) (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008); genes maiores de resistência (genes R) e genes que codificam peptídeos antibacterianos (GURR; RUSHTON, 2005; COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). Outra estratégia empregada envolve o conceito de resistência derivada do patógeno e tem sido utilizada principalmente para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças causadas por vírus (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008).

Estas abordagens têm sido aplicadas na produção de plantas transgênicas de citros e os genes introduzidos têm levado a redução dos sintomas provocados por doenças causadas por vírus, fungos e bactérias.

Muitos trabalhos de transformação genética de citros visando resistência a doenças têm sido realizados na tentativa de obter plantas transgênicas resistentes ao vírus da tristeza do citros (CTV). Baseado na abordagem de resistência derivada do patógeno, diferentes regiões do genoma do CTV têm sido introduzidas em citros, visando obter resistência mediada pela expressão do transgene ou induzida pelo silenciamento gênico (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; GHORBEL et al., 2000; DOMIGUEZ et al., 2000; LOPEZ et al., 2010; MUNIZ et al., 2012). Resultados positivos têm sido alcançados, com plantas transgênicas apresentando menor taxa de multiplicação viral, indicando uma possível resistência ao CTV (MUNIZ et al., 2012).

Entre os genes utilizados na transformação genética de citros visando resistência a doenças causadas por fungos e bactérias, podemos citar: os genes *bO*, *hrpN* e *NPR*1 relacionados com a ativação de mecanismos de defesa das plantas, expressos em limão 'Cravo' e laranja doce resultando na redução dos sintomas causados por *Phytophthora* e cancro cítrico, respectivamente (AZEVEDO et al., 2006a; BARBOSA-MENDES et al., 2009; ZHANG et al., 2010); o gene da proteína relacionada à patogênese *PR-5* expresso em laranja 'Pineapple' levando uma redução significativa no desenvolvimento de lesões causadas por *Phytophthora citrophthora* (FAGOAGA et al., 2001); o gene R *Xa21* expresso em cultivares de laranja doce, promovendo uma diminuição dos sintomas provocados pelo cancro cítrico (MENDES et al., 2009); os genes que codificam os peptídeos antibacterianos atacina A, shiva A, cecropina B e cecropina MB39 expresso em cultivares de laranja doce (BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; CARDOSO et al., 2010; HE et al., 2011), conferindo uma menor na suscetibilidade ao cancro cítrico (BOSCARIOL et al., 2010; HE et al., 2010; HE et al., 2006; CARDOSO et al., 2010; HE et al., 2011).

A produção de plantas transgênicas expressando peptídeos antimicrobianos consiste numa importante estratégia utilizada com o objetivo de promover a resistência a doenças causadas por bactérias. Os peptídeos antibacterianos são produzidos naturalmente por inúmeros organismos como insetos, vertebrados e plantas atuando na defesa contra diversos microorganismos patogênicos, incluindo bactérias e fungos (ZASLOFF, 2002). Dada sua atividade antimicrobiana, estes peptídeos tem grande potencial para serem empregados tanto na medicina como na agricultura (MARCOS et al., 2008).

As atacinas pertencem a uma classe de peptídeos antibacterianos de aproximadamente 20 kDa que são sintetizados pelo sistema imune de insetos (Lepidoptera) em resposta a infecções causadas por bactérias (HULTMARK et al., 1983). As atacinas, incluindo as formas básicas (A, B, C e D) e ácidas (E e F), atuam na membrana externa de bactérias gram-negativas alterando a permeabilidade e a síntese de proteínas (HULTMARK et al., 1983; ENGSTRÖM et al., 1984; CARLSSON et al., 1998). Genes que codificam este peptídeo têm sido isolados de insetos como *Hyalophora cecropia* L. - *attE* (SUN et al., 1991), *Drosophila melanogaster – att*A (ASLING; DUSHAY; HULTMARK, 1995) e *Trichoplusia ni - att*A (KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996).

O gene da atacina A (*att*A), isolado de *Trichoplusia ni* (acesso: U46130) possui 1601 pb, constituídos por dois íntrons e um peptídeo sinal (KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996). O peptídeo sinal atua no direcionamento da atacina A para o espaço extracelular. A eficiência do peptídeo sinal no direcionamento da atacina A foi comprovada pela transformação genética de células epidérmicas de cebola (*Allium cepa* L.), as quais mostraram acúmulo de fluorescência, em áreas adjacentes as células transformadas, indicando a secreção da atacina A para o apoplasto (BOSCARIOL et al., 2006).

Plantas transgênicas expressando diversos tipos de peptídeos antimicrobianos tem se mostrado eficientes em promover resistência a infecções causadas por bactérias e fungos. Linhagens transgênicas de laranja doce expressando o gene attA mostraram um aumento na resistência a Xanthomonas citri subsp. citri (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010). Planta transgênicas de maracujá amarelo expressando o gene attA, apresentaram redução dos sintomas provocados por Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae, em folhas destacadas (MONTEIRO, 2005). A expressão do gene attE em plantas de pera e maçã, conferiu maior resistência a Erwinia amylovora (REYNOIRD et al., 1999; KO et al., 2000), a integração e a expressão do gene attE, mostrou-se estável em plantas transgênicas de maçã, após um período de 12 anos de cultivo em campo, não afetando suas características horticulturais (BOREJSZA-WYSOCKA et al., 2010). Plantas transgênicas de pomelo expressando o gene *att*E apresentaram maior resistência ao fungo Elsinoë fawcettii (MONDAL et al., 2012). Os resultados dos trabalhos citados acima indicam que as atacinas tem potencial para serem utilizadas na transformação genética de Citrus sinensis a fim de produzir plantas resistentes a Candidatus Liberibacter spp.

2.5 Promotores tecido-específicos

Na maioria dos trabalhos relacionados à transformação genética de plantas, a expressão do transgene é controlada por promotores constitutivos, sendo utilizado principalmente o promotor CaMV 35S (DOMÍNGUEZ et al., 2000; FAGOAGA et al.,

2001; BOSCARIOL et al., 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; CARDOSO et al., 2010; YANG et al., 2011; MUNIZ et al., 2012).

Poucos trabalhos relatam a expressão controlada dos transgenes por intermédio de promotores induzidos pelo patógeno ou promotores tecido-específico. O promotor gst1, clonado a partir do gene que codifica a proteína glutationa Stransferase em batata, ativou a transcrição gênica em resposta a infecção por Venturia inaequalis e Erwinia amylovora, em plantas transgênicas de maçã (MALNOY et al., 20006). Em citros, esse mesmo promotor promoveu a expressão do gene uidA (GUS) em resposta a indução por ferimento ou pelo patógeno Xanthomonas citri subsp. citri (BARBOSA-MENDES et al., 2009). O promotor tecido específico CsPP, clonado a partir do gene que codifica a enzima fenilalaninaamonia-liase (PAL) de citros, demonstrou dirigir a expressão do gene uidA (GUS), preferencialmente no xilema em plantas transgênicas de tabaco e de laranja 'Valencia' (AZEVEDO et al., 2006b), esse promotor foi utilizado na transformação genética de citros para dirigir a expressão do gene da cecropina MB39, no xilema, local de colonização da bactéria Xylella fastidiosa e assim promover o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a clorose variegada dos citros (PAOLI et al., 2007).

Direcionar a expressão de peptídeos antibacterianos preferencialmente no floema pode ser uma boa alternativa para controlar a multiplicação da bactéria *Canditatus* Liberibacter spp., associada ao HLB, pois evitaria o acúmulo desnecessário do peptídeo antibacteriano em outras partes da planta. Diversos tipos de promotores limitados ao floema têm sido estudados em diferentes espécies de plantas. Podemos citar o promotor Suc2, clonado a partir do gene que codifica a proteína transportadora de sacarose de *Arabidopsis thaliana*, que demonstrou dirigir a expressão do gene *uidA*, em vasos do floema em *A. thaliana* (TRUERNIT; SAUER, 1995) e em morango (ZHAO; LIU; DAVIS, 2004). O promotor do gene da proteína de floema 2 (PP2) isolado de *Curcubita moschata* ativou a expressão gênica no floema em plantas transgênicas de tabaco (GUO et al., 2004). O promotor do gene da enzima sacarose sintase (*RSs*1) que foi isolado de milho (YANG; RUSSEL, 1990) e citros (SINGER; HILY; COX, 2011), demonstrando dirigir a expressão do gene *uid*A em vasos de floema em plantas de tabaco (YANG; RUSSEL, 1990; SINGER; HILY; COX, 2011) e *A. thaliana* (SINGER; HILY; COX, 2011).

A atividade de diversos promotores específicos de floema vem sendo estudada em citros. Estes trabalhos incluem estudos de expressão do gene *uid*A controlados por promotores derivados de genes que expressam especificamente no floema como o AtSuc2, AtPP2, CsPP2 e o RSs1 ou promotores derivados de microorganismos limitados ao floema (MIYATA et al., 2012; DUTT et al., 2012). O promotor homólogo (CsPP2) e os promotores heterólogos (AtSuc2 e AtPP2) mostraram-se eficientes em dirigir a expressão do gene *uid*A em vasos do floema em laranja doce, indicando que estes promotores são adequados para controlar a expressão de genes, na tentativa de inibir o crescimento de patógenos que colonizam o floema (MIYATA et al., 2012). Assim, direcionar a expressão do peptídeo antibacteriano atacina A, especificamente no floema, local de colonização da bactéria *Ca.* Liberibacter spp., representa, possivelmente, uma boa alternativa para obtenção de plantas resistentes a este patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), variedades 'Hamlin', 'Valência', 'Pêra' e 'Natal' foram extraídas de frutos maduros coletados no Banco Ativo de Germoplasma, do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira", ou no campo experimental de citros, da ESALQ/USP. As sementes foram lavadas para a retirada da mucilagem e secas à temperatura ambiente (24 h). Para a germinação, retirou-se o tegumento das sementes e realizou-se a desinfestação, em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água na proporção de 2:1 (15 min), sob agitação constante. Após o tratamento, as sementes foram lavadas (3x) em água destilada estéril, em condições assépticas e foram introduzidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), Phytagel [™] (2,0 g L⁻¹) e pH ajustado para 5,8. A incubação foi realizada a 27 °C, em ausência de luz para o alongamento do epicótilo. As plântulas foram transferidas para condições de fotoperíodo (16 h; 10 dias) e então foram utilizadas para a coleta dos explantes, formados por segmentos de epicótilo com aproximadamente 0,8 cm de comprimento.

Para a obtenção do explante do tipo segmento de cotilédone associado ao hipocótilo, sementes recém germinadas *in vitro* (20 dias) foram cortadas em segmentos formados pela região proximal do cotilédone mais o hipocótilo (TAVANO et al., 2009). Estes explantes foram incubados com a superfície abaxial em contato com meio de cultura.

3.2 Construções gênicas

Para a elaboração das construções gênicas contendo o gene *att*A (associado ou não ao peptídeo sinal) dirigido por promotores específicos de floema (AtSuc2, AtPP2 e CsPP2) foram realizadas subclonagens a partir dos seguintes plasmídeos: plasmídeo pCAMBIA 2300, contendo o gene *att*A associado ao peptídeo sinal (*att*A-PS), dirigido pelo promotor CaMV 35S duplicado, denominado pC*att*A 2300 (BOSCARIOL, 2004) (Figura 1a) e os plasmídeos AtSuc2/pCAMBIA1201, AtPP2/ pCAMBIA1201 e CsPP2/pCAMBIA1201, contendo o gene *uid*A dirigido pelos promotores específicos de floema, AtSuc2, AtPP2 e CsPP2 (Figuras 1b-d), cedidos pelo Dr. Ricardo Harakava, do Instituto Biológico de São Paulo. Para a obtenção dos vetores de expressão, o gene *att*A e os promotores específicos de floema foram clonados no plasmídeo pCAMBIA 2201 (Cambia, Canberra, Austrália), em substituição ao gene *uid*A.



Figura 1 - Esquema da região de transferência (T-DNA) dos plasmídeos utilizados na elaboração das construções gênicas. a) Plasmídeo pC*att*A 2300: T-DNA do vetor binário pCAMBIA 2300 contendo o gene *att*A-PS. b-d) Plasmídeos AtSuc2/pCAMBIA1201, AtPP2/pCAMBIA1201 e CsPP2/pCAMBIA1201: T-DNA do vetor binário pCAMBIA1201 contendo o gene *uid*A dirigido pelos promotores AtSuc2 (b) AtPP2(c) e CsPP2 (d). *npt*II: gene de resistência à neomicina fosfotransferase II; *hpt*II: gene de resistência a higromicina fosfotransferase II; 35S-P: promotor constitutivo CaMV 35S; 35S-T: terminador; NOS-T; terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita
3.2.1 Construção do vetor de expressão contendo o gene *att*A-PS (associado ao peptídeo sinal), dirigido pelo promotor AtSuc2 (pCAtSuc2/*att*A-PS)

O gene *att*A-PS presente no plasmídeo pC*att*A 2300 foi amplificado via PCR, utilizando os *primers* Att-Psc-F (5' ACATGTTCACCTACAAATTGAT 3') e Att-Bst-R (5' GGTCACCTACCACTTATTACCAAAAGAC 3'), contendo os sítios de restrição para as enzimas *Pscl* e *Bst*EII. A reação de PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: 94 °C por 3min, mais 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 4 min. O fragmento amplificado (773 pb) correspondente ao gene *att*A associado ao peptídeo sinal (gene *att*A-PS) foi isolado do gel de agarose (1%), purificado pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e clonado no vetor pGEM[®]-T (Promega, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a confirmação da clonagem, realizou-se a extração dos plasmídeos de colônias brancas de *Escherichia coli* com o kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega, Madison, USA), seguida pela digestão com as enzimas *Pscl* e *Bst*EII (1 h; 37 °C).

Na etapa seguinte, o vetor pGEM[®]-T contendo o gene *att*A-PS foi digerido com as enzimas de restrição *Psc*I e *Bst*EII (1 h; 37 °C), para a remoção do inserto (gene *att*A-PS), o qual foi clonado no plasmídeo AtSuc2/pCAMBIA1201 (vetor), em substituição ao gene *uid*A. O gene *uid*A foi removido do cassete de expressão, após digestão com as enzimas de restrição *Nco*I e *Bst*EII (1 h; 37 °C).

Os fragmentos correspondentes ao inserto e ao vetor, obtidos após a digestão com as enzimas de restrição foram isolados do gel de agarose e purificados pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany). Em seguida, os fragmentos foram submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA), utilizando-se 6 µl de inserto, 2 µl do vetor, 1 µl do tampão (10X) e 1 µl da enzima T4 DNA Ligase (16 h; 16 °C). A precipitação da reação foi realizada, utilizando-se 1 µl de acetato de sódio (3 M; pH 5,2) e 27,5 µl de etanol absoluto (15 min; -80 °C), seguindo-se de centrifugação (14000 rpm; 20 min; 4 °C). O precipitado foi lavado com 50 µl de etanol (70%) e centrifugado novamente (14000 rpm; 5 min; 4 °C). Após a secagem, o precipitado (produto da ligação) foi ressuspendido em 2 µL de água Milli-Q estéril e introduzido por eletroporação em

células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10B), preparadas segundo Sambrook e Russel (2001). As células foram transferidas para meio de cultura S.O.C. (1 ml) (S.O.C. medium – Invitrogen, Carlsbad, USA) e incubadas sob agitação (1 h; 180 rpm; 37 °C). Após este período, a suspensão (200 μL) foi plaqueada em meio de cultura LB (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, cloreto de sódio 10 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹), suplementado com o antibiótico cloranfenicol (25 mg mL⁻¹) e incubada (16 h; 37 °C) para o crescimento das colônias. As colônias obtidas foram analisadas por PCR, utilizando-se *primers* específicos para a detecção do fragmento do gene *att*A-PS. Para confirmar a transformação, realizou-se a extração dos plasmídeos de colônias PCR+ (kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' - Promega, Madison, USA) e digestão com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII (1 h; 37 °C).

Na etapa final, o plasmídeo pCAMBIA 1201, apresentando o promotor AtSuc2 e o gene *att*A-PS, foi digerido com as enzimas de restrição *Hind*III e *Bst*EII (1 h; 37 °C), para liberação de um fragmento de 1791 pb correspondente ao conjunto formado pelo promotor AtSuc2 e o gene *att*A-PS. Este conjunto foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA 2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene *uid*A, que foi retirado do cassete de expressão pela digestão com as mesmas enzimas. Para esta etapa da clonagem seguiu-se os mesmos procedimentos citados acima. A confirmação da clonagem foi realizada por meio de PCR de colônias, amplificandose o gene *att*A-PS, seguida pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+, com as enzimas *Hind*III/*Nco*I e *Hind*III/*Bst*EII (1 h; 37 °C).

3.2.2 Construção dos vetores de expressão contendo o gene *att*A (sem o peptídeo sinal), dirigido pelos promotores AtSuc2 ou AtPP2 (pCAtSuc2/*att*A e pCAtPP2/*att*A)

Para a obtenção dos vetores de expressão pCAtSuc2/attA e pCAtPP2/attA, inicialmente o gene attA-PS, presente no plasmídeo pCattA 2300 foi amplificado utilizando os *primers* Att-Psc2-F (5' ACATGTCCCGTTATTTGGTCTTTGAA 3') e Att-Bst-R (5' GGTCACCTACCACTTATTACCAAAAGAC 3'), contendo os sítios de restrição para as enzimas *Psc*I e *Bst*EII, utilizando-se o programa descrito no item 3.2.1. Esta reação permitiu a amplificação de um fragmento (725 pb) correspondente

ao gene atacina A sem o peptídeo sinal, denominado *att*A. Este fragmento foi isolado do gel de agarose (1%), purificado e clonado no vetor $pGEM^{®}$ -T. A confirmação da clonagem foi realizada por análise de PCR de colônias brancas de *E. coli*, seguida pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+, com as enzimas *Psc*I e *Bst*EII (1h; 37 °C).

O vetor pGEM[®]-T contendo o gene *att*A foi digerido com as enzimas *Psc*I e BstEll (1h; 37 °C), para a liberação do gene attA o qual foi transferido para os vetores AtSuc2/pCAMBIA1201 e AtPP2/pCAMBIA1201 em substituição ao gene uidA, que foi liberado do cassete de expressão após a digestão com as enzimas de restrição Ncol e BstEII (1h; 37 °C). Para esta etapa, os fragmentos correspondentes ao inserto e aos vetores obtidos após a digestão com as respectivas enzimas de restrição foram isolados do gel de agarose, purificados e quantificados por fluorometria (Quanti-iT[™] DNA Assay - Invitrogen, Carlsbad, USA), utilizando o Kit Quant-iT[™] dsDNA Br Assay (Invitrogen, Carlsbad, USA). Em seguida, os fragmentos foram submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA) na proporção 3:1 (inserto:vetor). Para determinar o volume de inserto e vetor utilizado na reação, aplicou-se a fórmula: (ng do vetor x tamanho do inserto em kb/tamanho do vetor em kb) x (proporção inserto:vetor) = ng do inserto. A reação de ligação e a transformação de células de *E.coli* foi realizada seguindo os mesmos procedimentos citados no item 3.2.1. Para a confirmação da transferência do gene attA para os plasmídeos AtSuc2/pCAMBIA1201 e AtPP2/pCAMBIA1201, as colônias obtidas foram submetidas à análise de PCR, utilizando-se primers específicos para a detecção do gene attA, seguida pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+ com as enzimas EcoRI e BstEII (1h; 37 °C).

O plasmídeo pCAMBIA 1201 contendo promotor AtSuc2 mais o gene *att*A foi digerido com as enzimas *Hind*III e *Bst*EII, para a liberação de um fragmento de 1743 pb, correspondente ao promotor mais o gene *att*A (inserto). Este foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA 2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene *uid*A, que foi removido do cassete de expressão com o auxílio das mesmas enzimas utilizadas para a obtenção do inserto. Para a confirmação da clonagem do promotor AtSuc2 e o gene *att*A no plasmídeo pCAMBIA 2201, realizou-se análise de PCR e digestão com as enzimas *Nco*I e *Hind*III (1h; 37 °C).

Para a construção do vetor de expressão pCAtPP2/attA, primeiramente o conjunto formado pelo promotor AtPP2 e o gene attA, inseridos no plasmídeo primers pCAMBIA 1201, foi amplificado utilizando-se OS AtPP2-Sac-F (5'GAGCTCTATGCAACACATGATTG 3') e Att-Bst-R (5' GGTCACCTACCACTTATT ACCAAAAGAC 3'), contendo o sítio de restrição para as enzimas Sacl e BstEII, seguindo o programa: 1 ciclo inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 2,5 min, e uma extensão final de 72 °C por 4 min. A sequência amplificada foi clonada no vetor pGEM[®]-T. Para a confirmação da clonagem do promotor AtPP2 e o gene attA no plasmídeo pGEM[®]-T, realizou-se a análise de PCR de colônias brancas, para a amplificação do fragmento correspondente ao promotor AtPP2 e o gene attA, seguida pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+, com as enzimas Sacl/BstEII e HindIII/BstEII (1h; 37 °C).

O conjunto formado pelo promotor AtPP2 e o gene *att*A foi transferido do vetor pGEM[®]-T para plasmídeo pCAMBIA 2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene *uid*A. Os fragmentos correspondentes ao inserto e ao vetor foram obtidos após a digestão com as enzimas *Sac*I e *Bst*EII (1h; 37 °C). Os procedimentos utilizados nestas duas etapas foram os mesmos já descritos neste mesmo item. A confirmação da transferência do promotor AtPP2 e o gene *att*A para o plasmídeo pCAMBIA 2201 foi obtida por análise de PCR, amplificando-se o mesmo fragmento citado no parágrafo acima, e pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+, com as enzimas *Sacl/Bst*EII e *Eco*RI/*Bst*EII (1h; 37 °C).

3.2.3 Construção do vetor de expressão contendo o gene *att*A (sem o peptídeo sinal), dirigido pelo promotor CsPP2 (pCCsPP2/*att*A)

O gene *att*A-PS clonado no plasmídeo pC*att*A 2300 foi amplificado, utilizando os *primers* Att-F (5'-AAGCTTAAAACATGTCCCGTTATTTGGT-3') e Att-R (5'-CACGTGCTACCACTTATTACCAAAAGAC-3'), contendo os sítios de restrição para as enzimas *Hind*III/*Pscl* (*primer* Att-F), e *Eco*72I (*primer* Att-R). A reação de PCR foi realizada seguindo o programa: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por

4 min. O fragmento de 735 pb correspondente ao gene da atacina A sem o peptídeo sinal (*attA*) foi isolado em gel de agarose (1%), purificado pelo kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e clonado no vetor pGEM[®]-T (Promega, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para confirmar a clonagem realizou-se extração dos plasmídeos de colônias brancas de *E. coli* com o kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' (Promega, Madison, USA), seguida pela digestão com as enzimas *Hind*III e *Eco*72I (1h; 37 °C).

O gene *att*A clonado no vetor pGEM[®]-T, foi transferido para o plasmídeo CsPP2/pCAMBIA1201, em substituição ao gene *uid*A. Para a obtenção dos fragmentos correspondentes ao inserto (gene *attA*) e ao vetor (plasmídeo CsPP2/pCAMBIA1201, sem o gene *uid*A), realizou-se digestão com as enzimas de restrição *Pscl/Eco*72I e *Ncol/Eco*72I(1h; 37 °C), respectivamente. O vetor foi desfosforilado, adicionando-se a enzima *Shrimp Alkaline Phsophatase* (Promega, Madison, USA) ao final da reação de digestão (15 min a 37 °C, seguido de 15 min a 65 °C, para desativá-la). Os fragmentos obtidos foram isolados do gel de agarose, purificados pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificação, os fragmentos foram submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4DNA Ligase (Promega, Madison, USA), seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.2. A confirmação da transferência do gene *attA* para o plasmídeo CsPP2/pCAMBIA1201 foi realizada pela digestão de plasmídeos extraídos de colônias recombinantes com a enzima *Bst*EII (1h; 37 °C).

O conjunto formado pelo promotor CsPP2 e gene *att*A foi transferido do plasmídeo pCAMBIA 1201 para o plasmídeo pCAMBIA 2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene *uid*A. Para a obtenção dos fragmentos correspondentes ao inserto (promotor CsPP2 mais o gene *att*A) e ao vetor (plasmídeo pCAMBIA 2201, sem o promotor CaMV 35S e o gene *uid*A) realizou-se digestão dos respectivos plasmídeos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*72I (1h; 37 °C). Os procedimentos utilizados para as etapas de ligação dos fragmentos e clonagem foram os mesmos citados no item 3.2.2. A confirmação da transferência, do promotor mais o gene *att*A para o plasmídeo pCAMBIA 2201, foi obtida por meio da digestão dos plasmídeos extraídos das colônias recombinantes, com a enzima *BstE*II (1h; 37 °C) ou com as enzimas *Bam*HI/*Eco*72I (1h; 37 °C).

3.3 Transferência dos vetores de expressão para Agrobacterium tumefaciens

Os vetores de expressão denominados pCAtSuc2/attA-PS, pCAtSuc2/attA, pCAtPP2/attA e pCCsPP2/attA foram introduzidos na estirpe EHA 105 de A. tumefaciens, pelo método do choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). Após este procedimento, a suspensão celular de A. tumefaciens foi incubada em meio de cultura S.O.C. (2 h; 28 °C), e em seguida foi plaqueada em meio de cultura YEP (peptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹, cloreto de sódio 5 g L⁻¹, ágar 10 g L^{-1}), contendo os antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (25 mg L^{-1}), para a seleção das colônias transformadas. Para a confirmação da transferência destes plasmídeos para A. tumefaciens, realizou-se análise de PCR de colônias e a digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+. Para a confirmação da transferência dos plasmídeos pCAtSuc2/attA-PS e pCAtSuc2/attA, realizou-se digestão com as enzimas HindIII/BstEII e Ncol/HindIII (1h; 37 °C), respectivamente. Para comprovar a transferência do plasmídeo pCAtPP2/attA para A. tumefaciens realizou-se digestão com a enzima Ncol (1h; 37 °C). A confirmação da transferência do vetor pCCsPP2/attA para Agrobacterium foi realizada pela digestão dos plasmídeos extraídos das colônias obtidas, com as enzimas de restrição BstEll ou BamHI/Eco72I (1h; 37 °C). As colônias de A. tumefaciens, contendo os respectivos plasmídeos, foram armazenadas (-80 °C) em solução contendo glicerol (50%) e meio de cultura YEP líquido, conforme descrito no item 3.5.1.

3.4 Sequenciamento das construções gênicas

Os vetores de expressão pCAtSuc2/attA-PS, pCAtSuc2/attA, pCAtPP2/attA e pCCsPP2/attA foram isolados de *A. tumefaciens* e foram submetidos à análise de PCR para a obtenção dos fragmentos a serem seqüenciados.

Para o seqüenciamento dos vetores de expressão pCAtSuc2/attA-PS e pCAtSuc2/attA, obteve-se os fragmentos correspondentes ao gene attA associado ou não ao peptídeo sinal, pela amplificação por PCR, conforme descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. O fragmento correspondente ao promotor AtSuc2, foi

obtido utilizando-se os *primers* F: 5'-AAGCTTCACACCACATTTAAATAGTTTA-3' e R: 5'-CCATGGTTGACAAACCAAGAAAGTAA-3', seguindo o programa: um ciclo inicial de 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 2 min e 30 s; e uma extensão final de 72 °C por 4min. Para o seqüenciamento da construção gênica pCAtPP2/*att*A, o fragmento correspondente ao conjunto formado pelo promotor AtPP2 e o gene *att*A foi amplificado, conforme descrito no item 3.2.2.

Para a avaliação da integridade da construção gênica pCCsPP2/attA, obtevese o fragmento correspondente ao promotor CsPP2, utilizando-se os *primers* CsPP2-F (5'-AAGCTTATCTGGAGAAGAAGCATTA-3') e CsPP2-R (5'ACATGTTTCCAT GGATTTAATCTGAAG-3'), a reação de PCR foi realizada seguindo o programa: 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e uma extensão final de 72 °C por 4 min. O fragmento correspondente ao gene *att*A foi obtido empregando-se os *primers* Att-F (5'-AAGCTTAAAACATGTCCCGT TATTTGGT-3') e Att-R (5'CACGTGCTACCACTTATTACCAAAAGAC-3'), seguindo o mesmo programa utilizado para a amplificação do promotor CsPP2.

Os fragmentos amplificados foram isolados do gel de agarose (1%), purificados pelo Kit Quiaex II gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany), quantificados por fluorometria (Quanti-iT DNA Assay - Invitrogen, Carlsbad, USA) (100 ng) e enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen (Seoul, Korea). As sequencias obtidas foram analisadas pelo programa BLAST.

3.5 Transformação genética

3.5.1 Cultura e manutenção dos isolados de Agrobacterium tumefaciens

Os isolados de *A. tumefaciens (*EHA 105) contendo os vetores de expressão pCAtSuc2/*att*A-PS, pCAtSuc2/*att*A, pCAtPP2/*att*A e pCCsPP2/*att*A foram conservados (-80 °C) em solução contendo glicerol (50%) e meio de cultura YEP, suplementado com canamicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (25 mg L⁻¹). Para os experimentos de transformação genética, a suspensão bacteriana em estoque

(-80 °C) foi transferida para meio de cultura YEP sólido, com os mesmos antibióticos e cultivada a 27 °C, por 72 h. Para o preparo do inóculo, uma colônia isolada foi transferida para o meio de cultura YEP líquido, contendo os mesmos antibióticos, e incubada em agitador orbital (16 h; 28 °C; 180 rpm). Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada (4800 rpm; 15 min; 15 °C), e o precipitado foi ressuspendido em meio de cultura MS, na concentração de 5 x 10⁸ a 10⁹ UFC ml⁻¹.

3.5.2 Transformação genética de citros via Agrobacterium tumefaciens

A transformação genética foi realizada com as variedades de laranja doce 'Hamlin', 'Valência', 'Pêra' e 'Natal' utilizando-se segmentos de epicótilo obtidos de sementes germinadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados com a suspensão bacteriana, em placa de Petri (15 min). Em seguida, os explantes foram secos em papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactéria, e transferidos para meio de cultura de co-cultivo EME (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), suplementado com BAP (1,0 mg L⁻¹), acetoseringona (100 mM L⁻¹), sacarose (25 g L⁻¹), ágar (8 g L⁻¹), ¹), e pH ajustado para 5,5. A incubação foi realizada à temperatura de 24 °C, por 2-3 dias, em ausência de luz.

3.5.3 Seleção, regeneração e enxertia in vitro das gemas adventícias

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção EME, suplementado com a mesma concentração de BAP utilizada durante o período de co-cultivo, sacarose (25 g L⁻¹), ágar (8 g L⁻¹), ácido ascórbico (50 mg L⁻¹), canamicina (100 mg L⁻¹), cefotaxima sódica (500 mg L⁻¹) para controle do crescimento da *Agrobacterium*, e pH ajustado para 5,8. Os explantes foram subcultivados a cada 15 dias.

As gemas adventícias desenvolvidas foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo', limão 'Cravo' ou de laranja 'Valência' obtidas de sementes germinadas *in vitro*, e foram incubadas (27 °C), sob o fotoperíodo (16 h), para pegamento da enxertia e desenvolvimento das plantas.

3.5.4 Identificação de plantas transgênicas por análise de PCR

A identificação de plantas transgênicas foi realizada pela análise de PCR, em plantas desenvolvidas após o co-cultivo com *Agrobacterium*, contendo os vetores de expressão pCAtSuc2/attA-PS, pCAtSuc2/attA, pCAtPP2/attA ou pCCsPP2/attA. O DNA foi extraído de folha de plantas enxertadas *in vitro*, pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). A análise de PCR foi realizada para a detecção do gene *att*A associado ou não ao peptídeo sinal, seguindo o protocolo descrito nos itens 3.2.1 (*att*A-PS) ou 3.2.2 (*att*A).

As plantas identificadas como PCR+ foram transferidas para aclimatização. Durante esta fase, as plantas foram mantidas em um vaso plástico contendo substrato autoclavado e foram incubadas em condições da alta umidade relativa. As plantas aclimatizadas foram transferidas para casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas (ESALQ/USP).

3.6 Caracterização Molecular

3.6.1 Análise de Southern blot

A análise de Southern blot foi realizada em plantas identificadas como transgênicas por PCR, mantidas em casa-de-vegetação específica para o cultivo de transgênicos. Foram analisadas plantas de laranja 'Hamlin' provenientes de experimentos de transformação genética utilizando-se as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS, pCAtSuc2/*att*A e pCAtPP2/*att*A e plantas de laranja 'Valência' obtidas a partir de experimentos com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A e pCAtPP2/*att*A. Esta análise também foi realizada em plantas não transgênicas, utilizadas como controle negativo. O DNA total foi extraído de folhas jovens (1,4 g) pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e quantificado por fluorometria (QuantiiT DNA Assay - Invitrogen, Carlsbad, USA), utilizando o Kit Quant-iT[™] dsDNA Br Assay (Invitrogen, Carlsbad, USA). Após a quantificação, 20 a 60 µg de DNA foram submetidos à reação de digestão, utilizando a enzimas *Bam*HI (construções gênicas pCAtSuc2/*att*A). Estas enzimas foram escolhidas por cortar apenas uma vez a região do T-DNA, fora do gene *att*A. Para a digestão, utilizou-se 5 unidades de enzima por µg de DNA. A reação de digestão foi realizada por 16 h, a 30 °C (*Bam*HI) ou 37 °C (*Hind*III). Após este período, os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), transferidos para membrana de nylon 'Amersham HybondTM - N+' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e fixados em alta temperatura (80 °C; 2 h).

A membrana foi hibridizada (16 h; 60 °C) com 150 ng de sonda marcada com a enzima Fosfatase Alcalina (Kit 'AlkPhos Direct Labelling Reagents', GE Healthcare, Little Chalfont, UK), para a detecção do gene *att*A. A sonda foi preparada amplificando-se o gene *att*A, a partir do plasmídeo pCAtSuc2/*att*A-PS, extraído de *E. coli* (kit 'Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System' – Promega, Madison, USA). Os fragmentos amplificados foram purificados com o auxilio do kit 'QIAEX® II Gel Extration' (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificados por fluorometria.

A reação de detecção foi realizada com auxílio do kit 'CDP - StarTM Detection Reagent' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), conforme as instruções do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi introduzida no cassete fotográfico (Hypercassette[™] - Amersham Life Science, Little Chalfont, UK) com uma chapa fotográfica (Hyperfilm[™] MP - GE Healthcare, Little Chalfont, UK) por um período de 1 - 2 h. Após o tempo de exposição, a chapa fotográfica foi revelada, utilizando-se revelador e reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA), por 4 min, lavada em água (1 min), em seguida transferida para fixador e reforçador Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA), por 14 min, e lavada em água (1 min).

3.6.2 Análise de Northern blot

A análise de *Northern blot* foi realizada em plantas transgênicas de laranja 'Hamlin', com resultado positivo para análise de *Southern blot*. Foram analisadas plantas obtidas a partir de experimentos com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS (2 plantas), pCAtSuc2/*att*A (5 plantas) e pCAtPP2/*att*A (5 plantas). Para esta análise foi incluída uma planta transgênica de laranja 'Hamlin', contendo o gene *att*A controlado pelo promotor constitutivo CaMV 35S (construção gênica pC*att*A 2300, Figura 1), obtida por BOSCARIOL (2004), e uma planta de laranja 'Hamlin' não transgênica utilizada como controle negativo.

O RNA total foi extraído da nervura principal de folhas das amostras utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® - Thermo Scientific, Wilmington, USA) e sua pureza foi medida de acordo com o valor de OD260/OD280, sendo consideradas de boa qualidade amostras com valores entre 1,80 e 2,00. Após a quantificação, 20 - 40 µg de RNA foi separado por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) e foi transferido por capilaridade em solução SSC 10X para uma membrana de nylon 'Amersham Hybond[™]-N+' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A fixação do RNA na membrana foi realizada por exposição a radiação UV (UVC 500 UV Crosslinker - Hoefer, Holliston, USA).

O RNA fixado na membrana foi hibridizado com a sonda do gene *att*A. A hibridização foi realizada com sonda de DNA, seguindo os mesmos procedimentos utilizados para a análise de *Southern blot* (Item 3.6.1) ou foi realizada com sonda de RNA, utilizando-se o kit DIG Northern Starter (Roche, Mannheim, Germany), conforme as instruções do fabricante.

Para a revelação seguiu-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.6.1 ou as instruções contidas no kit DIG Northern Starter (Roche, Mannheim, Germany). Após a revelação a membrana foi lavada e re-hibridizada com a sonda do gene constitutivo 18S rRNA. Para o preparo desta sonda, o DNA foi amplificado de plantas não transgênicas utilizando o *primer* F: CGACTCTCGGCAACGGATA e o *primer* R: CGCATTTCGCTACGTTCTTCA. Os fragmentos amplificados foram

purificados com o auxilio do kit 'QIAEX® II Gel Extration' (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificados por fluorometria. O preparo da sonda, hibridização e detecção foi realizado seguindo os mesmo procedimentos utilizados para a análise de *Southern blot* (3.6.1).

3.6.3 Análise de RT-qPCR

A análise de RT-qPCR foi realizada com as mesmas plantas analisadas por *Northern blot.* O RNA foi extraído a partir da nervura principal de folhas das amostras, utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA). Em seguida o RNA foi purificado (RNeasy Plant Mini Kit - Qiagen, Hilden, Germany) e tratado com DNase (RNase-Free DNase Set- Qiagen, Hilden, Germany), para remover qualquer contaminação por DNA. Após este procedimento, o RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® - Thermo Scientific, Wilmington, USA) e a pureza foi determinada pelo razão de OD260/OD280 (1,80- 2,00).

Para a síntese do cDNA, pipetou-se 1 μ g de RNA, 1 μ l de oligo dT (10 μ M) e 1 μ l de mix de dNTP (10 mM) e adicionou-se água para um volume final de 12 μ l. A solução foi incubada em banho-maria (65 °C; 5 min), e depois acondicionada em gelo (3 min). Em seguida, adicionou-se 4 μ l de tampão First Strand (5x), 2 μ l de DDT (0,1 M) e 1 μ l de RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, USA), incubando-se a solução em banho-maria (37 °C; 2 min). Finalmente pipetou-se 1 μ l da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, USA) e a reação foi incubada a 37 °C (50 min). Posteriormente, a reação foi mantida a 70 °C (15 min) para inativação.

O cDNA obtido foi utilizado para a análise de RT-qPCR, no equipamento 7500 Fast™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA), do laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP). Para a amplificação foi utilizada placa de 96 poços (0,1 ml; MicroAmp - Applied Biosystems, Foster City, USA). As reações foram realizadas adicionando-se primers desenhados para amplificar a sequência correspondente ao (primer F: TCGTCACCAAGAACATGCCTGACT gene attA е primer R: AAGAATGGAGTGTTTGCCATGCCG) ou 18S rRNA (primer 0 gene F: CGACTCTCGGCAACGGATA e primer R: CGCATTTCGCTACGTTCTTCA).

As reações foram preparadas utilizando-se 10 µl do cDNA diluído (2,5 ng/ µl), 0,6 µl do conjunto de *primer* (5 µM), 7,5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) e 1,9 µl de água. Foram realizadas 3 réplicas técnicas para cada planta e gene analisado. Para a amplificação utilizou-se o programa padrão do equipamento, no modo FAST, conforme descrito a seguir: 95 °C por 20s, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s. Ao final da reação foi determinado o ponto de fusão médio dos amplicons, por meio da análise de Melting, submetendo as amostras a 95 °C por 15 s, aquecendo-as gradativamente de 60-95 °C, com taxa de aquecimento de 0,3 °C s⁻¹ e em seguida, mantendo-as a 60 °C (15 s).

Os dados dos níveis de fluorescência foram submetidos ao programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), para o cálculo do ciclo de quantificação (Cq) e eficiência das curvas de amplificação. O cálculo da expressão gênica foi realizado, pelo método comparativo, utilizando-se o programa GenEx (versão 5.3.6.170). O gene 18S rRNA foi utilizado como gene de referência para a normalização da expressão gênica. Como calibrador, utilizou-se uma planta de laranja 'Hamlin' não transgênica.

3.7 Propagação das plantas transgênicas

Para a propagação foram selecionadas plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' com resultado positivo para análise de *Southern blot*. Foram multiplicadas plantas obtidas a partir de experimentos com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS (2 plantas), pCAtSuc2/*att*A (5 plantas) e pCAtPP2/*att*A (5 plantas). Uma planta de laranja 'Hamlin' não transgênica também foi propagada para ser utilizada como controle negativo. A propagação foi realizada por meio da enxertia de borbulhas em limão 'Cravo' (*C. limonia*). Foram produzidos 10 clones de cada planta transgênica selecionada e 10 clones da planta não transgênica. As mudas produzidas estão sendo mantidas em casa-de-vegetação específica para o cultivo de plantas transgênicas, no Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP).

4 RESULTADOS

4.1. Construções gênicas

O trabalho foi iniciado com a elaboração de construções gênicas, constituídas pelo plasmídeo pCAMBIA 2201, contendo na região do T-DNA o gene atacina A sendo controlado por promotores específicos de floema. Foram desenvolvidas 4 construções gênicas, sendo uma contendo o gene *att*A associado ao peptídeo sinal sob o controle do promotor AtSuc2 (pCAtSuc2/*att*A-PS) e as outras contendo o gene *att*A sem o peptídeo sinal, dirigido pelos promotores AtSuc2, AtPP2 ou CsPP2 (pCAtSuc2/*att*A, pCAtPP2/*att*A ou pCCsPP2/*att*A).

4.1.1 Construção gênica pCAtSuc2/attA-PS

A elaboração da construção gênica pCAtSuc2/*att*A-PS foi iniciada com a amplificação de um fragmento de 773 pb correspondente ao gene *att*A, associado ao peptídeo sinal (*att*A-PS), a partir do plasmídeo pC*att*A 2300, seguida por sua clonagem no vetor pGEM[®]-T. A clonagem foi confirmada pela digestão dos plasmídeos, extraídos de colônias brancas de *E. coli*, com as enzimas *Psc*I e *Bst*EII produzindo um fragmento de 773 pb, referente ao gene *att*A-PS (Figura 2a).

O gene *att*A-PS, clonado no pGEM[®]-T, foi transferido para a plasmídeo AtSuc2/pCAMBIA1201, em substituição ao gene *uid*A. A confirmação desta clonagem foi obtida por análise de PCR (Figura 2b) e por digestão dos plasmídeos extraídos de colônias de *E.coli* PCR+, com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII (Figura 2c).

Na etapa seguinte, o conjunto formado pelo promotor AtSuc2 e o gene *att*A-PS presente no plasmídeo pCAMBIA 1201 foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA 2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene *uid*A, obtendo-se o plasmídeo denominado pCAtSuc2/*att*A-PS. A análise de PCR de colônias de *E. coli* (Figura 2d) e os perfis de restrição obtidos dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+ com as enzimas *Hind*III/*Nco*I (Figura 2e) e *Hind*III/*Bst*EII (Figura 2f), confirmaram a transferência do promotor AtSuc2 e o gene *att*A-PS para o plasmídeo pCAMBIA 2201.

O plasmídeo pCAtSuc2/attA-PS foi transferido para a estirpe EHA 105 de Agrobacterium tumefaciens. A confirmação da transferência ocorreu por análise de PCR das colônias obtidas (Figura 2g) e por digestão com as enzimas Ncol/HindIII (Figura 2h) e HindIII/BstEII (Figura 2i).



Figura 2 - Construção do vetor de expressão pCAtSuc2/attA-PS. a) Digestão do plasmídeo extraído de colônia branca de E.coli com as enzimas Pscl e BstEII, produzindo um fragmento de 773 pb, referente ao gene attA-PS, confirmando sua transferência para o plasmídeo pGEM[®]-T. b) Análise de PCR de colônias de *E. coli* (1-7) mostrando a amplificação de um fragmento (773 pb) correspondente ao gene attA-PS, comprovando sua clonagem no plasmídeo AtSuc2/pCAMBIA1201; C+: controle positivo (plasmídeo pGEM®-T contendo o gene attA-PS). c) Digestão do plasmídeo AtSuc2/pCAMBIA1201 apresentando o gene attA-PS (1-4), com as enzimas EcoRI e BstEII, gerando um fragmento de 1281 pb correspondente ao promotor AtSuc2 e parte do gene attA-PS e outro de 561 pb relacionado a outra parte do gene attA-PS. d) Análise de PCR de colônias de E. coli (1-6) mostrando a amplificação do gene attA-PS (773 pb), comprovando a clonagem do promotor e o gene attA-PS no plasmídeo pCAMBIA 2201; C+: controle positivo (plasmídeo AtSuc2/pCAMBIA1201 apresentando o gene attA-PS). e) Digestão do plasmídeo pCAMBIA 2201 contendo o promotor AtSuc2 e o gene attA-PS (pCAtSuc2/attA-PS) com as enzimas HindIII e Ncol, produzindo um fragmento de 1109 pb correspondente ao promotor CaMV 35S do gene nptll e uma região do plasmídeo até o início do promotor AtSuc2, e um fragmento de 1637 pb correspondente ao promotor AtSuc2 e parte do gene attA. f) Digestão desse mesmo plasmídeo com as enzimas HindIII e BstEll, gerando um fragmento de 1791 pb correspondente ao promotor AtSuc2 mais o gene attA-PS. g) Análise de PCR de colônias de A. tumefaciens (1-12) mostrando a amplificação de um fragmento de 773 pb referente ao gene attA-PS; coluna C+: controle positivo (plasmídeo pCAtSuc2/attA-PS). h-i) Digestão do plasmídeo extraído de A. tumefaciens com as enzimas HindIII/Ncol (h) e HindIII/BstEII (i), produzindo fragmentos semelhante aos já descritos nas letras e e f, respectivamente. M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); M* = marcador de peso molecular de 1kb Plus (Invitrogen); C-: controle negativo (água).

4.1.2 Construções gênicas pCAtSuc2/attA e pCAtPP2/attA

Para a obtenção das construções gênicas pCAtSuc2/attA e pCAtPP2/attA, primeiramente, o gene attA clonado no plasmídeo pCattA 2300 foi amplificado utilizando primers desenhados para a obtenção de uma sequência correspondente ao gene attA sem peptídeo sinal (attA), esta sequência foi clonada no vetor pGEM[®]-T, conforme pode ser demonstrado por análise de PCR de colônias brancas de *E. coli* e pela digestão com as enzimas *Psc*I e *Bst*EII (Figura 3a-b).

O gene *att*A clonado no vetor pGEM[®]-T foi transferido para os plasmídeos AtSuc2/pCAMBIA1201 e AtPP2/pCAMBIA1201, em substituição ao gene *uid*A. A confirmação da transferência do gene *att*A para estes plasmídeos foi realizada por PCR, amplificando-se um fragmento de 725 pb correspondente ao gene *att*A (Figura 3c) e por digestão de plasmídeos extraídos de colônias PCR+ com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII (Figura 3d-e).

Para a obtenção da construção gênica pCAtSuc2/attA, o conjunto formado pelo promotor AtSuc2 mais o gene attA, clonado no plasmideo pCAMBIA 1201 foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA 2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene uidA. Os fragmentos correspondentes ao inserto e ao vetor foram obtidos após a digestão com as enzimas HindIII e BstEII. A confirmação da transferência do promotor AtSuc2 e o gene attA para o plasmídeo pCAMBIA 2201 foi obtida pela análise de PCR das colônias de E. coli (Figura 4a) e pela digestão dos plasmídeos extraídos de colônias recombinantes com as enzimas Ncol e HindIII (Figura 4b). O plasmídeo pCAMBIA 2201 contendo o promotor AtSuc2 e o gene attA (pCAtSuc2/attA) foi transferido para a estirpe EHA 105 de Agrobacterium tumefaciens. A presença deste plasmídeo nas colônias obtidas foi confirmada por análise de PCR, utilizando-se *primers* que amplificam uma sequência correspondente ao gene attA e pela digestão com as enzimas Ncol e HindIII (Figura 4c-d).

Para a obtenção da construção gênica pCAtPP2/*att*A, o conjunto formado pelo promotor AtPP2 e o gene *att*A presente no pCAMBIA 1201, foi amplificado e clonado no vetor pGEM[®]-T, conforme pode ser verificado por análise de PCR e digestão com as enzimas *Sacl/Bst*EII e *Hind*III/*Bst*EII (Figura 5a-c). Na etapa seguinte, o promotor AtPP2 e gene *att*A foram transferidos do vetor pGEM[®]-T para

plasmídeo pCAMBIA 2201. A confirmação da clonagem do promotor AtPP2 e gene *att*A no plasmídeo pCAMBIA 2201 foi realizada pela amplificação de um fragmento de 1711 pb correspondente ao promotor AtPP2 e o gene *att*A, a partir das colônias obtidas e a digestão dos plasmídeos extraídos de colônias recombinantes com as enzimas *Sacl/Bst*EII e *Eco*RI/*Bst*EII (Figura 5d-e).

A transferência do plasmídeo pCAtPP2/*att*A para a estirpe EHA 105 de *A. tumefaciens* foi confirmada por análise de PCR das colônias obtidas amplificando um fragmento de 1711 pb referente ao promotor AtPP2 e o gene *att*A (Figura 5f), e por digestão com a enzima *Nco*I (Figura 5g).



Figura 3 - Clonagem do gene *att*A nos plasmídeos AtSuc2/pCAMBIA1201 e AtPP2/pCAMBIA1201. a) Análise de PCR de colônias de *E. coli* (1-18) mostrando a amplificação de um fragmento de 725 pb referente ao gene *att*A, confirmando sua clonagem no vetor pGEM[®]-T. b) Digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+ com as enzimas *Pscl* e *Bst*EII (1-2) gerando um fragmento de 725 pb correspondente ao gene *att*A. c) Análise de PCR de colônias de *E. coli* (1-17) mostrando a amplificação do gene *att*A (725 pb), confirmando a transferência do gene *att*A para os plasmídeos AtSuc2/pCAMBIA1201 e AtPP2/pCAMBIA1201; C+: controle positivo (plasmídeo pGEM[®]-T mais o gene *att*A). d-e) Digestão dos plasmídeos extraídos de colônias PCR+ de *E. coli* com as enzimas *Eco*RI e *Bst*EII, mostrando a formação dos fragmentos de 1201 e 561 pb referentes a clonagem do gene *att*A no plasmídeo AtPP2/pCAMBIA1201(d) e os fragmentos 1233 pb e 561, confirmando a inserção do gene *att*A no plasmídeo AtSuc2/pCAMBIA1201 (e). M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); C-: controle negativo (água).



Figura 4 - Transferência do promotor AtSuc2 associado ao gene *att*A para o plasmídeo pCAMBIA 2201, produzindo o vetor de expressão pCAtSuc2/*att*A. a) Análise de PCR das colônias de *E. coli* (1-12), mostrando a amplificação do fragmento de 725 pb correspondente ao gene *att*A, confirmando a transferência do conjunto formado pelo promotor AtSuc2 mais o gene *att*A para o plasmídeo pCAMBIA 2201, produzindo o plasmídeo pCAtSuc2/*att*A; C+: controle positivo (plasmídeo CAMBIA1201 contendo o promotor AtSuc2 e o gene *att*A). b) Confirmação desta clonagem pela digestão dos plasmídeos obtidos com as enzimas *Ncol* e *Hind*III, produzindo um fragmento de 1109 pb correspondente ao promotor CaMV 35S do gene *npt*II e uma região do plasmídeo até início do promotor AtSuc2 e um fragmento de 1589 pb referente ao promotor AtSuc2 e parte do gene *att*A. c) Análise de PCR de colônias (1-12) mostrando a amplificação dos plasmídeo pCAtSuc2/*att*A para *A. tumefaciens* (EHA 105); C+: controle positivo (pCAtSuc2/*att*A). d) Digestão dos plasmídeos extraídos de colônias de *A. tumefaciens*, PCR+ com as enzimas *Ncol* e *Hind*III. M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); C-: controle negativo (água).



Figura 5 - Transferência do promotor AtPP2 associado ao gene attA para o plasmídeo pCAMBIA 2201, produzindo o vetor de expressão pCAtPP2/attA. a) Análise de PCR de colônias de E.coli (1-12), mostrando a amplificação de um fragmento de 1711 pb, referente ao promotor e o gene attA, confirmando sua clonagem no plasmídeo pGEM[®]-T; C+: controle positivo (plasmídeo AtPP2/pCAMBIA1201 contendo o gene attA). b-c) Confirmação da clonagem pela digestão com as enzimas Sacl e BstEII (b) gerando um fragmento de 1711 pb (promotor AtPP2 mais gene attA) e com as *Hind*III e *Bst*EII (c), produzindo um fragmento de 948 pb, correspondente a uma parte do promotor AtPP2 e ao gene attA. d) Análise de PCR, confirmando a transferência do promotor AtPP2 mais o gene attA para o plasmídeo pCAMBIA 2201, produzindo o plasmídeo denominado pCAtPP2/attA; C+: controle positivo (plasmídeo pGEM[®]-T contendo o promotor AtPP2 e o gene attA). e) Digestão do plasmídeo pCAtPP2/attA com as enzimas Sacl e BstEll (coluna 1), produzindo um fragmento (1711 pb) correspondente ao promotor e ao gene, e com as enzimas EcoRI e BstEII (coluna 2), gerando um fragmento de 1150 pb referente ao promotor e parte do gene e um fragmento de 561 pb correspondente a outra parte do gene attA. f) Confirmação da transferência do plasmídeo pCAtPP2/attA para Agrobacterium tumefaciens (EHA 105) por análise de PCR de colônias, mostrando a amplificação de um fragmento de 1711 pb correspondente ao promotor AtPP2 e o gene attA (1-8); C+: controle positivo (plasmídeo pCAtPP2/attA). g) Digestão do plasmídeo extraído de Agrobacterium (1-3) com a enzima Ncol produzindo um fragmento de 2666 pb correspondente região entre o início do promotor CaMV 35S do gene nptll até e uma parte do gene attA; Coluna 4 plasmídeo pCAtPP2/attA extraído de E. coli e digerido com a mesma enzima. M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); C-: controle negativo (água).

4.1.3 Construção gênica pCCsPP2/attA

A elaboração da construção gênica pCCsPP2/attA iniciou-se com a amplificação da gene attA, a partir do plasmídeo pCattA 2300. O fragmento de 735 pb (correspondente ao gene attA sem o peptídeo sinal), contendo sítios de restrição para as enzimas HindIII/PscI (5') e Eco72I (3'), foi clonado no vetor pGEM[®]-T, conforme verificado pela digestão de plasmídeos extraídos de colônias recombinantes com as enzimas HindIII e Eco72I (Figura 6a). Em seguida, o gene pGEM[®]-T clonado vetor foi transferido para plasmídeo attA no 0 CsPP2/pCAMBIA1201, em substituição ao gene uidA, utilizando-se os sítios de restrição para as enzimas Pscl/Eco72I (inserto) e Ncol/Eco72I (vetor). Para a confirmação desta clonagem, plasmídeos extraídos das colônias recombinantes foram digeridos com a enzima BstEll, produzindo um fragmento de 1004 pb referente parte do promotor mais gene attA (Figura 6b).

O conjunto formado pelo promotor CsPP2 e o gene *att*A (inserto) foi extraído do plasmídeo pCAMBIA1201, pela digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*72I, e foi transferido para o plasmídeo pCAMBIA2201, em substituição ao promotor CaMV 35S e o gene *uid*A, que foi liberado, empregando-se as mesmas enzimas usadas para a obtenção do inserto. Os perfis de restrição obtidos dos plasmídeos extraídos de colônias recombinantes com as enzimas *BstE*II ou com as enzimas *Bam*HI e *Eco*72I comprovaram a transferência do promotor CsPP2 e o gene *att*A para o plasmídeo pCAMBIA2201, produzindo o vetor de expressão denominado pCCsPP2/*att*A (Figura 6c).

O vetor de expressão pCCsPP2/attA foi transferido para a estirpe EHA 105 de *A. tumefaciens*, conforme pode ser demonstrado pela digestão de plasmídeos com as enzimas de restrição *BstE*II ou *Bam*HI/*Eco*72I (Figura 6d).



Figura 6 - Construção do vetor de expressão pCCsPP2/attA. a) Confirmação da clonagem do gene attA no vetor pGEM[®]-T, pela digestão com as enzimas *Hind*III e *Eco*72I, resultando num fragmento de 735 pb, correspondente ao gene attA. b) Confirmação da transferência do gene attA para o plasmídeo CsPP2/pCAMBIA1201, pela digestão de plasmídeos extraídos de colônias de *E. coli* com a enzima *Bst*EII, produzindo um fragmento de 1004 pb referente parte do promotor mais o gene attA. c) Comprovação da transferência do promotor CsPP2 mais o gene attA para o pCAMBIA 2201 (produzindo o vetor de expressão pCCsPP2/attA) por meio de digestão com a enzima *Bst*EII (colunas 1-4), produzindo o mesmo fragmento já descrito no item b, ou digestão com as enzimas *Bam*HI/*Eco*72I (colunas 5-6), produzindo um fragmento de 1280 pb correspondente ao promotor CsPP2 mais o gene attA. d) Confirmação da transferência do vetor de expressão pCCsPP2/attA para *A. tumefaciens,* por meio de digestões do plasmídeo extraído de *Agrobacterium* com as enzimas *Bst*EII (coluna 1) ou *Bam*HI/*Eco*72I (coluna 2), produzindo os fragmentos já descritos no item c; C-: controle negativo (água).

4.1.4 Sequenciamento das construções gênicas

O sequenciamento das construções gênicas foi realizado para confirmar a presença dos promotores (AtSuc2, AtPP2, CsPP2) e do gene de interesse (*att*A-PS ou *att*A) nos vetores de expressão elaborados (pCAtSuc2/*att*A-PS, pCAtSuc2/*att*A, pCAtPP2/*att*A e pCCsPP2/*att*A), isolados de *Agrobacterium tumefaciens*. As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas pelo programa BLAST e apresentaram identidade elevada com sequências correspondentes depositadas no banco de dados, comprovando a clonagem dos respectivos fragmentos nos vetores de expressão.

Nas análises dos vetores de expressão pCAtSuc2/attA-PS e pCAtSuc2/attA, a sequência correspondente ao promotor AtSuc2 apresentou de 96 a 99% de identidade com sequências depositadas no banco de dados, relacionadas ao transportador de sacarose (Suc2), isolado de *Arabidopsis thaliana* (Figura 7a). As sequências correspondentes ao gene *att*A (associado ou não ao peptídeo sinal) apresentaram 100% de identidade com a sequência do gene atacina A isolado de *Trichoplusia ni* (Figuras 7b).

Sequences producing significant alignments:									
Accession	Description	Max score	<u>Total score</u>	Query coverage	<u> E value</u>	<u>Max ident</u>			
AC003979.2	Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T22J18 sequence, complete	<u>1563</u>	1563	92%	0.0	98%			
<u>X79702.1</u>	A.thaliana AtSUC2 gene	<u>1550</u>	1550	92%	0.0	97%			
DQ108678.1	Arabidopsis thaliana clone 104329 mRNA sequence	566	566	32%	1e-157	99%			
<u>NM 102118.3</u>	Arabidopsis thaliana SUC2 (SUCROSE-PROTON SYMPORTER 2); carbc	<u>204</u>	204	12%	1e-48	98%			
BT000684.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL08-12-P05 (R11198) putative sucrose	<u>204</u>	204	12%	1e-48	98%			
XM 002893200.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata sucrose-proton symporter 2 (SUC2),	<u>148</u>	148	8%	5e-32	97%			
AY091774.1	Arabidopsis thaliana At1g22710/T22J18_12 mRNA, complete cds	84.2	84.2	5%	2e-12	96%			



Figura 7 - Sequenciamento dos vetores de expressão pCAtSuc2/*att*A-PS e pCAtSuc2/*att*A. a-b) Análise das sequências de nucleotídeos correspondente ao promotor AtSuc2 (a) e ao gene *att*A (b) pelo programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Na análise do vetor de expressão pCAtPP2/*att*A, a sequência correspondente ao promotor AtPP2 mais o gene *att*A apresentou de 94 a 100% de similaridade com sequências do gene da proteína PP2 de floema de *Arabidopsis thaliana* e 100% de identidade com o gene *att*A de *Trichoplusia ni* (Figura 8).

Na análise do vetor de expressão pCCsPP2/attA, a sequência correspondente ao promotor CsPP2 foi alinhada com a sequência do promotor do gene da proteína PP2 isolado de citros, obtida pelo nosso grupo de pesquisa (Dr. Ricardo Harakava -Instituto Biológico de São Paulo), visto que esta sequência ainda não está disponível no banco de dados, o resultado obtido foi de 100% de identidade entre as sequências de nucleotídeos que foram comparadas (Figura 9a). A sequência correspondente ao gene *att*A apresentou 100% de identidade com a sequência do gene da atacina A isolado de *Trichoplusia ni* (Figuras 9b).

Sequences produ	Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	Query coverage	<u> E value</u>	<u>Max ident</u>		
AL161551.2	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, contig fragment No. 51	1555	1555	57%	0.0	96%		
AL024486.1	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, BAC clone T16H5 (ESSAII p	1555	1555	57%	0.0	96%		
BX828086.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	<u>691</u>	691	24%	0.0	97%		
<u>NM 118103.3</u>	Arabidopsis thaliana immunophilin / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trar	<u>671</u>	897	32%	0.0	98%		
AJ242482.1	Arabidopsis thaliana mRNA for FKBP like protein (fkbp25I gene)	<u>671</u>	897	32%	0.0	98%		
<u>U46130.1</u>	Trichoplusia ni preproattacin A gene, complete cds	556	1236	41%	1e-154	100%		
BT024613.1	Arabidopsis thaliana At4g19830 mRNA, complete cds	<u>538</u>	764	28%	5e-149	98%		
XM 002867872.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothetical protein, mRNA	<u>438</u>	648	28%	5e-119	96%		
AK117814.1	Arabidopsis thaliana At4g19830 mRNA for unknown protein, complete	<u>294</u>	521	18%	1e-75	98%		
BX828660.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	292	498	18%	4e-75	96%		
BX828630.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	209	391	15%	4e-50	94%		
<u>NM 118104.4</u>	Arabidopsis thaliana ATPP2-A1; carbohydrate binding (ATPP2-A1) mF	<u>113</u>	113	3%	3e-21	100%		
AY090355.1	Arabidopsis thaliana AT4g19840/T16H5_200 mRNA, complete cds	<u>108</u>	108	3%	2e-19	100%		
AY085730.1	Arabidopsis thaliana clone 17437 mRNA, complete sequence	<u>108</u>	108	3%	2e-19	100%		
BX829358.1	Arabidopsis thaliana Full-length cDNA Complete sequence from clone	<u>76.8</u>	76.8	2%	4e-10	100%		

Figura 8 - Sequenciamento do vetor de expressão pCAtPP2/*att*A. Análise da sequência de nucleotídeos correspondente ao promotor AtPP2 mais o gene *att*A, programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Sequ	iences pro	ducing significant alignments:						
A	ccession	Description	Max score	Total score	Query coverage	🛆 <u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
5939	93	Promotor CsPhP2	<u>968</u>	968	99%	0.0	100%	

b)

a)

CCGTTATTGGTTTTGAAGATCTTGAAGGAGAATCTTATCTCGTACCCAATCAAGCAGAAGATGAACAGGTTCTGGAAGGAGAACCTTTTTACGAGAAGATGCTGTTCAGCTAGCCAGTCCTAGGGTACGCA GGCAAGCGCAAGGAAGCGTCACTTTGAATTCTGATGGGTCAATGGGTTTGGGAGCAAAAGTACCCATCGTTGGCAATGAGAAGAATGTTTTAAGTGCCCTTGGTTCGGTCGACCGAC								
Sequences pro Accession	ducing significant alignments: Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>∧ E value</u>	<u>Max ident</u>	Links	
<u>U46130.1</u>	Trichoplusia ni preproattacin A gene, complete cds	<u>542</u>	1303	100%	2e-150	100%		

Figura 9 - Sequenciamento do vetor de expressão pCCsPP2/*att*A. a-b) Análise das sequências de nucleotídeos correspondente ao promotor CsPP2 (a) e ao gene *att*A (b) pelo programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.2 Transformação genética

A transformação genética foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105), com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS, pCAtSuc2/*att*A, pCAPP2/*att*A e pCCsPP2/*att*A, isto é, cassete de expressão contendo o promotores de floema (AtSuc2, AtPP2 ou CsPP2) e o gene *att*A associado ou não ao peptídeo sinal, respectivamente (Figura 10).



Figura 10 - Esquema da região de transferência (T-DNA) dos vetores de expressão utilizados nos experimentos de transformação genética. a) Vetor de expressão pCAtSuc2/attA-PS: gene attA, associado ao peptídeo sinal, dirigido pelo promotor AtSuc2, clonado no plasmídeo pCAMBIA 2201. b-d) Vetores pCAtSuc2/attA (b), pCAtPP2/attA (c) e pCCsPP2/attA (d): Gene attA, sem o peptídeo sinal, dirigido pelos promotores específicos de floema AtSuc2, AtPP2 e CsPP2 clonado no plasmídeo pCAMBIA 2201. *npt*II: região codificadora do gene de resistência a canamicina; 35S-P: promotor constitutivo CaMV 35S; 35S-T: terminador; NOS-T: Terminador; LB: borda esquerda; RB: borda direita.

Os experimentos foram realizados com as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) 'Hamlin', 'Valência', 'Pêra' e 'Natal', utilizando-se principalmente segmento de epicótilo como explante (Figura 11a). Os explantes foram mantidos em meio cultura contendo o antibiótico canamicina e regulador de crescimento BAP para a seleção e regeneração de gemas adventícias, respectivamente. Os brotos que se desenvolveram a partir destas gemas foram enxertados *in vitro*, principalmente em

plantas de citrange 'Carrizo' obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes (Figura 11b-d). Plantas obtidas após o pegamento da enxertia, contendo 3-5 folhas, foram analisadas por PCR para a identificação das prováveis plantas transgêncas (Figura 11e). Fragmentos de 773 pb ou 725 pb correspondente ao gene da atacina associado ou não ao peptídeo sinal (*att*A-PS ou *att*A) foram amplificados em várias linhagens de plantas (Figura 11h). Plantas PCR+ foram aclimatizadas para condições de casa-de-vegetação (Figuras f-g).

Com a construção gênica pCAtSuc2/attA-PS foram realizados 4 experimentos, utilizando-se laranja 'Hamlin', totalizando 1127 explantes inoculados com a suspensão bacteriana, deste total 225 desenvolveram gemas adventícias (Tabela 1). As gemas obtidas foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo'. Trinta e nove plantas foram analisadas por PCR, sendo que 27 mostraram-se PCR+ para o gene *att*A. A média da eficiência de transformação genética foi de 2,4%.

Com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A, foram realizados experimentos com laranja 'Hamlin' (6 experimentos), laranja 'Pêra' (4 experimentos), laranja 'Valência' (5 experimento) e laranja 'Natal' (2 experimentos). No total, o número de explantes inoculados com a suspensão bacteriana foi de 2695 de laranja 'Hamlin', 1163 de laranja 'Pêra', 1084 de laranja 'Valência' e 444 de laranja 'Natal', tendo sido obtidos gemas adventícias em 351, 187, 365 e 27, explantes, respectivamente (Tabela 2). O número de plantas analisadas por PCR foi 18 de laranja 'Hamlin', 28 de laranja 'Pêra', 17 de laranja 'Valência' e 5 de laranja 'Natal', sendo confirmadas como PCR+ 7 plantas de laranja 'Hamlin', 3 de laranja 'Pêra', 3 de laranja 'Valência' e 1 de 'Natal' (Tabela 2). A média da eficiência de transformação genética para os experimentos realizados com estas variedades variou de 0,1-0,3%.

Com a construção gênica pCAtPP2/*att*A foram realizados 2 experimentos com laranja 'Hamlin' (total de 957 explantes), 7 com laranja 'Pêra' (total de 1582 explantes) e 2 com laranja 'Valência' (total de 385 explantes). Do total de explantes inoculados com a suspensão bacteriana, 323 explantes de 'Hamlin', 150 explantes de 'Pêra' e 74 explantes de 'Valência' (Tabela 3) desenvolveram gemas adventícias, em meio de cultura de seleção. Análise de PCR foi realizada em 100 plantas, sendo 57 de laranja 'Hamlin', 20 de laranja 'Pêra' e 23 'Valência'. O número de plantas identificadas como PCR+ foi de 36 de laranja 'Hamlin', 4 de 'Pêra' e 15 de laranja

'Valência'. A média da eficiência de transformação genética para os experimentos com laranja 'Hamlin', 'Pêra e 'Valência' foi de 3,6, 0,6 e 4,2%, respectivamente (Tabela 3).



Figura 11 - Transformação genética de *Citrus sinensis* com construções gênicas contendo o gene atacina A (associado ou não peptídeo sinal), sob o controle de promotores específicos de floema. a) Explante inicial (segmento de epicótilo); b-d) Desenvolvimento de gemas adventícias em segmentos de epicótilo mantidos em meio de cultura de seleção, após o co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. e) Planta desenvolvida após a enxertia *in vitro* em citrange 'Carrizo'. f) Planta em fase de aclimatização. g) Plantas transgênicas aclimatizadas. h) Análise de PCR de plantas obtidas: colunas 1-8: plantas avaliadas; coluna 9: planta não transgênica; C+: controle positivo (plamídeo pCAMBIA 2300 contendo o gene *att*A); C-: controle negativo (água); M: marcador de peso molecular 1 Kb. Seta: fragmento 725 pb correspondente ao gene *att*A.

experimentos	explantes responsivos/ total de explantes	plantas PCR+/ plantas avaliadas	eficiência de transformação (%) ^a	
1	23/317	2/2	0,6	
2	36/246	12/13	4,8	
3	125/318	12/17	3,8	
4	41/246	1/7	0,4	
total	225/1127	27/39	2,4 ^b	

Tabela 1 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin', com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A-PS.

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

^b Média da eficiência de transformação genética de todos os experimentos.

Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin', 'Pêra', 'Valência' e 'Natal', com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A.

experimentos	variedade	explantes responsivos/ total de explantes	plantas PCR+/ plantas avaliadas	eficiência de transformação (%) ^d
1	'Hamlin'	10/80	0/1	0
2	'Hamlin'	107/611	7/11	1,1
3	'Hamlin'	43/749	0/1 ^b	0
4	'Hamlin'	135/602	0/3 ^b	0
5	'Hamlin'	36/500	0/1	0
6	'Hamlin'	20/153	0/1	0
total ^e		351/2695	7/18	0,2
1	'Pêra'	87/372	1/2 ^c	0,2
2 ^a	'Pêra'	42/136	0/12 ^b	0
3	'Pêra'	9/439	0/0	0
4	'Pêra'	49/216	2/14	0,9
total ^e		187/1163	3/28	0,3
1	'Valência'	57/149	0/1	0
2	'Valência'	82/248	2/3	0,8
3	'Valência'	71/161	1/1	0.6
4	'Valência'	151/403	0/12 ^b	0
5	'Valência'	4/123	0/0	0
total ^e		365/1084	3/17	0,3
1	'Natal'	2/140	0/2	0
2	'Natal'	25/304	1/3	0,3
total		27/444	1/5	0,15

^a Experimento realizado com o explante constituído pela região proximal do cotilédone associado ao hipocótilo, obtido de semente germinada *in vitro* (20 dias).

^b Brotos enxertados sobre o citrange 'Carrizo' ou laranja 'Valência'.

^c Brotos enxertados sobre limão 'Cravo' ou laranja 'Valência'

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

^e Média da eficiência de transformação genética dos experimentos realizados com a variedade.

experimentos	variedade	explantes responsivos/ total de explantes	plantas PCR+/ plantas avaliadas	eficiência de transformação (%) ^e
1	'Hamlin'	85/442	8/17 ^b	1,8
2	'Hamlin'	238/515	28/40 ^b	5,4
total ^f		323/957	36/57	3,6
1	'Pêra'	30/345	0/0 ^d	0
2	'Pêra'	43/351	0/0 ^d	0
3	'Pêra'	20/395	0/0 ^d	0
4	'Pêra'	16/258	1/2	0,4
5 ^a	'Pêra'	20/66	0/8 ^c	0
6 ^a	'Pêra'	17/93	1/6	1
7 ^a	'Pêra'	4/74	2/4	2,7
total ^f		150/1582	4/20	0,6
1	'Valência'	53/160	13/21 ^b	7,5
2	'Valência'	21/225	2/2	0,9
total ^f		74/385	15/23	4,2

Tabela 3 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin', 'Pêra' e 'Valência', com a construção gênica pCAtPP2/*att*A.

^a Experimento realizado com o explante constituído pela região proximal do cotilédone associado ao hipocótilo, obtido de semente germinada *in vitro* (20 dias).

^b Brotos enxertados sobre o citrange 'Carrizo' ou laranja 'Valência'.

^cBrotos enxertados sobre limão 'Cravo' ou laranja 'Valência'.

^d Brotos enxertados sobre limão 'Cravo', nenhum sobreviveu.

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

^fMédia da eficiência de transformação genética de todos os experimentos.

Com a construção gênica pCCsPP2/attA foram realizados 3 experimentos com laranja 'Hamlin' e 4 com laranja 'Valência', o total de explantes inoculados com a suspensão bacteriana foi 1088 e 1148, respectivamente. O número de explantes que desenvolveram gemas adventícias foi 141 para laranja 'Hamlin' e 227 para laranja 'Valência' (Tabela 4). Foram avaliadas por PCR 92 plantas de laranja 'Hamlin' e 55 de 'Valência', sendo identificadas como PCR+ 20 plantas de laranja 'Hamlin' e 19 de laranja 'Valência'.

As plantas identificadas como PCR+ foram transferidas para vaso, para aclimatização em condições de casa-de-vegetação. Algumas plantas não sobreviveram a esta fase. No total foram aclimatizadas 104 plantas PCR+ (Tabela 5), as quais estão sendo mantidas em casa-de-vegetação específica para o cultivo de plantas transgênicas. Até o momento, todas as plantas têm se desenvolvido adequadamente, não apresentando alterações fenotípicas quando comparadas com plantas não transgênicas (Figura 11g).

experimentos	variedade	explantes responsivos/ total de explantes	plantas PCR+/ plantas avaliadas	eficiência de transformação (%)ª
1	'Hamlin'	26/261	0/28	0
2	'Hamlin'	40/456	3/7	0,65
3	'Hamlin'	75/371	17/57	4,5
total ^b		141/1088	20/92	1,7
1	'Valência'	72/260	11/26	4,2
2	'Valência'	27/243	3/12	1,2
3	'Valência'	3/158	0/3	0
4	'Valência'	125/487	7/13	1,0
total ^b		227/1148	19/55	1,3

Tabela 4 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' e 'Valência', com a construção gênica pCCsPP2/*att*A

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

^b Média da eficiência de transformação genética de todos os experimentos.

Tabela 5 – Resumo dos resultados dos experimentos de transformação genética. Número total de plantas PCR+ aclimatizadas para cada construção gênica e variedade estudadas

	'Hamlin'	'Valência'	'Pêra'	'Natal'	total
pCAtSuc2/ attA-PS	17 (4)	-	-	-	17
pCAtSuc2/ attA	4 (6)	3 (5)	3 (4)	1 (2)	11
pCAtPP2/ <i>att</i> A	30 (2)	10 (2)	3 (4)	-	43
pCCsPP2/ attA	16 (3)	17 (4)	-	-	33
Total	67	30	6	1	104

- variedade não estudada com a construção gênica.

() Número de experimentos realizados.

4.3 Caracterização molecular das plantas obtidas

Plantas PCR+ aclimatizadas em casa-de-vegetação foram selecionadas para a análise de *Southern blot* para confirmar a integração do gene *att*A e identificar o número de cópias inseridas no genoma das plantas. Foram avaliadas plantas de laranja 'Hamlin' e 'Valência' obtidas a partir dos experimentos com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS, pCAtSuc2/*att*A e pCAtPP2/*att*A. As plantas analisadas foram escolhidas em função do tamanho adequado para a retirada de folhas utilizadas para a extração de DNA. No total, foram avaliadas 34 plantas de laranja 'Hamlin', das quais 17 foram obtidas com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A-PS (Figura 12a-b), 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 12c) e 15 com a construção gênica pCAtPP2/*att*A (Figura 13a-b), e 9 plantas de laranja 'Valência', sendo 7 com a construção gênica pCAtPP2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, colunas 1-7) e 2 com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, coluna 8-9). As demais plantas não foram analisadas devido a dificuldade de coletar folhas em tamanho apropriado para a extração de DNA.

O DNA genômico das plantas analisadas foi digerido com as enzimas restrição *Bam*HI (construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS e pCAtSuc2/*att*A) ou *Hind*III (construção gênica pCAtPP2/*att*A) que cortam uma vez na região do T-DNA fora do gene de interesse (*att*A), seguida pela hibridização com sonda do gene *att*A. O resultado da análise mostrou sinais de hibridização que indicam os eventos de inserção do T-DNA no genoma das plantas analisadas (Figuras 12-14). A maioria das plantas avaliadas apresentaram inserções de T-DNA em diferentes posições do genoma, confirmando que estas foram obtidas a partir de eventos independentes de transformação genética. O número de eventos de inserção no genoma das plantas analisadas variou de 1 a 6 (Figuras 12-14). Duas plantas de laranja 'Valência' obtidas com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A (Figura 14, coluna 8-9) apresentaram a inserção do gene *att*A na mesma posição, indicando que provavelmente correspondem ao mesmo evento de transformação genética (plantas comos). Nenhum sinal de hibridização foi observado em plantas não transgênicas, utilizadas como controle negativo.

Uma planta de laranja 'Hamlin' obtida com a construção gênica pCAtSuc2/attA-PS (Figura 12a, coluna 7) e 2 plantas obtidas com a construção gênica pCAtPP2/attA (Figura 13b, colunas 13-14) não apresentam sinal de hibridização. A ocorrência de plantas negativas para a análise de *Southern blot* pode ser atribuída a não integração do T-DNA no genoma da planta ou a alguma falha durante a análise. Para comprovar o resultado estas plantas devem ser analisadas novamente.



Figura 12 - Análise de *Southern blot* em plantas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS (a-b) pCAtSuc2/*att*A (c) a-b) Colunas 1-17: DNA de plantas PCR+ (pCAtSuc2/*att*A-PS), digerido com a enzima *Bam*HI. c) Colunas 1-2: DNA de plantas PCR+ (pCAtSuc2/*att*A), digerido com a enzima *Bam*HI. C+: Controle positivo - fragmento amplificado do gene *att*A-PS (773 pb) (a-b) ou do gene *att*A (725 pb) (c). C-: Controle negativo - DNA de planta de laranja 'Hamlin' não transgênica, digerido com a enzima *Bam*HI.



Figura 13 - Análise de *Southern blot* em plantas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAtPP2/attA. Colunas 1-15: DNA de plantas PCR+, digerido com a enzima *Hind*III. C+: Controle positivo - fragmento amplificado do gene *att*A (725 pb). C-: Controle negativo - DNA de planta de laranja 'Hamlin' não transgênica, digerido com a enzima de restrição *Bam*HI.



Figura 14 - Análise de *Southern blot* em plantas de laranja 'Valência' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAtPP2/attA ou pCAtSuc2/attA. Colunas 1-7: DNA de plantas PCR+ (pCAtPP2/attA), digerido com a enzima *Hind*III. Colunas 8-9: DNA de plantas PCR+ (pCAtSuc2/attA), digerido com a enzima *Bam*HI C+: Controle positivo - fragmento amplificado do gene *att*A (725 pb). C-: Controle negativo - DNA de planta de laranja 'Valência' não transgênica, digerido com a enzima de restrição *Hind*III.

A transcrição do gene *att*A foi confirmada pelas análises de *Northern blot* e RT-qPCR. Para estas análises foram selecionadas plantas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A-PS (5 plantas), pCAtSuc2/*att*A (2 plantas), e pCAtPP2/*att*A (5 plantas). A fim de comparar o nível de expressão do gene *att*A, também foi incluída nestas análises uma planta de laranja 'Hamlin' contendo o gene *att*A (associado ao peptídeo sinal) sob o controle do promotor constitutivo CAMV 35S, denominada pC*att*A 2300, obtida por Boscariol (2004).

A Figura 15 mostra os resultados obtidos nas análises de Northern blot. Não foi possível detectar a transcrição do transgene quando o RNA foi extraído da lâmina foliar (Figura 15a). Nas análises realizadas com RNA extraído da nervura central a maioria das plantas analisadas mostraram a transcrição do transgene (Figura 15b-d), indicando que o gene está sendo expresso preferencialmente no tecido vascular. A intensidade da banda de hibridização variou em função da construção gênica. Plantas obtidas com a construção gênica pCAtSuc2/attA-PS mostraram bandas com intensidade semelhante as plantas obtidas com a construção gênica pCattA 2300 (Figura 15c). Plantas obtidas com as construções gênicas pCAtSuc2/attA e pCAtPP2/attA, isto é, gene attA sem o peptídeo sinal, apresentaram menor intensidade de hibridização (Figura 15b-d). Não foi notado sinal de hibridização em 2 plantas transgênicas, uma obtida com a construção gênica pCAtSuc2/attA-PS (Figura 15c, coluna 4) e outra obtida com a construção gênica pCAtSuc2/attA (Figura 15b, coluna 2). Plantas não transgênicas (controle negativo) não apresentaram sinal de hibridização do gene attA (Figura 15a-d).

Para a análise de *Northern blot* foram escolhidas plantas contendo 1-2 eventos de inserção do gene *att*A, conforme verificado por *Southern blot*. O resultado obtido na análise de *Northern blot* indica que não houve correlação entre o número de cópias do transgene e o nível de transcrição. Para a validação da análise de *Northern blot*, a membrana contendo o RNA das plantas analisadas foi rehibridizada com sonda correspondente ao gene constitutivo 18S rRNA, a banda de hibridização obtida indica a quantidade de RNA carregada em cada amostra.



Figura 15 – Análise de *Northern blot* em plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A (a-b), pCAtSuc2/*att*A-PS (c) e pCAtPP2/*att*A (d). a) Análise de *Northern blot* com RNA extraído da na lâmina foliar. b-d) Transcrição do gene *att*A ou do gene 18S rRNA na nervura principal das plantas analisadas. C-: controle negativo (RNA de planta não transgênica). 35S: RNA de planta transgênica expressando o gene *att*A sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S. a-d) Colunas numeradas: RNA das plantas analisadas, hibridizado com sonda de DNA, nas colunas 3-5 (d) o RNA foi hibridizado com sonda de RNA. As plantas analisadas por *Northern blot* correspondem as plantas analisadas por *Southern blot* conforme indicado a seguir: a-b) colunas 1 (= Figura 12c, coluna 2). c) coluna 1 (= Figura 12b, coluna 9); coluna 2 (= Figura 12a, coluna 5); coluna 3 (= Figura 12b, coluna 7); coluna 4 (= Figura 12b, coluna 5); coluna 5 (= Figura 12a, coluna 3). d) coluna 1 (=Figura 13b, coluna 7); coluna 2 (= Figura 13a, coluna 5); coluna 3 (= Figura 13b, coluna 6); coluna 4 (= Figura 13a, coluna 2).

Os resultados obtidos pela análise de RT-qPCR foram semelhante aos resultados obtidos por *Northern blot*, no entanto, algumas diferenças foram observadas em função da maior sensibilidade da técnica. Para a análise de RT-qPCR, utilizou o gene 18S rRNA como referência para normalizar o nível de expressão do gene *att*A e a planta não transgênica foi utilizada como calibrador.

Como verificado pela análise de *Northern blot*, o nível de transcrição variou em função da construção gênica. Plantas obtidas com a construção gênica pCAtSuc2/*att*A-PS apresentaram maior nível de transcrição, sendo comparável ao nível de transcrição obtido pela planta contendo o gene *att*A sob o controle do promotor CaMV 35S (pC*att*A 2300). Plantas obtidas com as construções gênicas pCAtSuc2/*att*A e pCAtPP2/*att*A apresentaram menor nível de transcrição. Dada a maior sensibilidade da técnica de RT-qPCR foi possível observar transcrição do transgene nas plantas que não apresentaram sinal de hibridização por *Northern blot* (Figura 16, colunas 7 e 11).



Plantas transgênicas

Figura 16 - Expressão do gene *att*A, em relação ao gene de referência 18S rRNA, em plantas transgênicas de laranja 'Hamlin'. Coluna 1-5: construção gênica pCAtPP2/*att*A; colunas 6-7: construção gênica pCAtSuc2/*att*A; colunas 8-12: construção gênica pCAtSuc2/*att*A-PS; coluna 13: planta contendo o gene *att*A sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S; coluna 14: planta não transgênica utilizada como calibrador. A ordem das colunas, para cada construção gênica, corresponde a ordem da Figura 15.

4.4 Propagação das plantas transgênicas

Plantas de laranja 'Hamlin' contendo o gene *att*A, associado ou não ao peptídeo sinal, sob o controle dos promotores AtSuc2 ou AtPP2 foram multiplicadas vegetativamente, pela enxertia de borbulhas no porta-enxerto limão 'Cravo' (*Citrus limonia*) (Figura 17a-c). As plantas selecionadas para a propagação foram as mesmas utilizadas para a análise da expressão gênica. As mudas produzidas serão utilizadas para inoculação da bactéria CLas e avaliação da resistência.



Figura 17 - Propagação das plantas transgênicas. a) Plantas de limão 'Cravo' recém-enxertadas. b) Detalhe da enxertia da borbulha, protegida pelo fitilho. c) Desenvolvimento do clone transgênico 40 dias após a enxertia da borbulha.

5 DISCUSSÃO

A transformação genética de citros vem sendo estudada desde 1989 (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989) com a produção de plantas transgênicas de diferentes espécies e variedades de citros (PEÑA et al., 1995; DOMÍNGUEZ et al., 2000; CERVERA et al., 2008; MENDES et al., 2010). Os primeiros trabalhos tinham como objetivo a otimização de protocolos com construções gênicas contendo apenas genes de seleção e repórter (MOORE; JACANO; NEIDIGH, 1992; MENDES et al., 2002). Recentemente, estudos envolvendo genes de interesse agronômico, principalmente para resistência a doenças têm sido relatados (BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2010; ANANTHAKRISHNAN et al., 2007). No entanto, a maioria destes trabalhos é realizada com construções gênicas contendo promotores constitutivos para controlar a expressão do transgene (DOMÍNGUEZ et al., 2002; FAGOAGA et al., 2006; MUNIZ et al., 2012). O uso de promotores tecido-específicos ou induzidos pelo patógeno permite controlar o local e o momento da expressão do transgene, diminuindo a expressão em outras partes da planta, incluindo os frutos que são utilizados para o consumo humano (DUTT et al., 2012).

A detecção do HLB nas principais áreas produtoras de citros do mundo e a necessidade de buscar diferentes estratégias para o controle da doença, estimulou o estudo de transformação genética de citros associada a promotores que favorecem a expressão gênica nos tecidos do floema. A eficiência dos promotores testados neste trabalho em favorecer a expressão gênica no floema já foi comprovada em citros para citrange 'Carrizo' (MIYATA et al., 2011) e para as variedades de laranja doce 'Hamlin', 'Valência' e 'Pêra' (MIYATA et al., 2012). A associação do gene atacina A, o qual também já se mostrou eficiente na redução da suscetibilidade de variedades de laranja doce a Xanthomonas citri subsp. citri, a promotores que favorecem a expressão gênica no floema apresenta-se como uma estratégia promissora para o controle da bactéria Candidatus Liberibacter spp., que coloniza preferencialmente tecidos do floema, evitando a expressão da proteína em todos os tecidos da planta. No entanto, este gene está associado a uma sequencia de 53 pb correspondente a um peptídeo sinal responsável pelo direcionamento da proteína para o espaço extracelular (BOSCARIOL et al., 2006). Considerando que a bactéria Candidatus Liberibacter spp., associada ao HLB, apresenta colonização intracelular
(BOVÉ, 2006), para a transformação genética de citros visando resistência a este patógeno é mais interessante concentrar a expressão do transgene no interior da célula. Sendo assim, neste trabalho foram desenvolvidas construções gênicas contendo o gene *att*A sem o peptídeo sinal sob o controle dos promotores AtSuc2, AtPP2 e CsPP2, para que a proteína permaneça no mesmo local de colonização do patógeno. Também foi desenvolvida uma construção gênica contendo o gene *att*A associado ao peptídeo sinal sob o controle do promotor AtSuc2, possibilitando uma futura avaliação da influência da expressão tecido específica do gene *att*A, associado ou não ao peptídeo sinal, sobre a multiplicação da bactéria CLas.

A eficiência de transformação genética de citros é genótipo dependente. Citrange 'Carrizo' é considerado o genótipo mais favorável ao processo com eficiência de transformação genética na faixa de 47-80% (YU et al., 2002; DUTT; GROSSER, 2009). Citrus limonia e Citrus aurantium estão entre os genótipos mais recalcitrantes com eficiência de transformação genética menor do que 2,5% (GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997; AZEVEDO et al., 2006a). Entre as variedades de laranja doce a eficiência de transformação genética varia de 14-18% para a variedade 'Hamlin' (BOSCARIOL et al., 2006; MENDES et al., 2010) a 3% para a varidade 'Pêra' (CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010). Ao lado do genótipo, a eficiência de transformação genética também é influenciada pela construção gênica utilizada. Neste trabalho, os resultados mostram uma eficiência de transformação genética de citros inferior ao relatado na literatura para as variedades estudadas. Para a variedade 'Hamlin', que dentre as variedades de laranja doce tem apresentado os melhores resultados em relação a eficiência de transformação genética (BOSCARIOL et al., 2006; DUTT; GROSSER et al., 2009), os máximos valores obtidos, neste trabalho, foram de 5,4% com o uso da construção gênica pCAtPP2/attA e 4,5% com o uso da construção gênica pCCsPP2/attA. Esta redução na eficiência da transformação genética foi maior com o uso da construção gênica pCAtSuc2/attA, onde a eficiência máxima foi de 1,1%. Esta queda na eficiência de transformação genética também foi verificada para as demais variedades estudadas e fez com que fosse necessário a realização de um maior número de experimentos, com maior quantidade de explantes do que o previsto. A influência da construção gênica na transformação genética também foi verificada por Barbosa-Mendes et al. (2009), trabalhando com o promotor gst1 (induzido pelo patógeno) e o gene hrpN

(harpina). Miyata et al. (2012) trabalhando com as mesmas variedades de laranja doce ('Hamlin', 'Valência' e 'Pêra') e construções gênicas contendo os promotores de floema AtSuc2, AtPP2 e CsPP2 obteve valores máximos de eficiência de transformação genética de 6% para a variedade 'Hamlin' e o promotor CsPP2. Mesmo trabalhando com citrange 'Carrizo', o genótipo mais favorável ao processo de transformação genética, Miyata et al. (2011) relataram eficiência de transformação genética de 6-8%.

Mesmo considerando as dificuldades do processo, neste trabalho foram identificadas 104 plantas transgênicas (aclimatizadas) das quais 43 já possuiam desenvolvimento adequado para a realização da análise de *Southern blot*, que permite confirmar a integração do transgene e determinar o número de cópias inseridas no genoma da planta. Tem sido relatada uma influência do número de cópias sobre a expressão do transgene, sendo que um elevado número de cópias pode resultar no silenciamento gênico (SCHUBERT et al., 2004). Desta maneira, têm sido dada preferência para estudos com plantas contendo baixo número de cópias do transgene (WEN; TAN; GUO, 2012; LOPÉZ et al., 2010). Neste trabalho, a maioria das plantas analisadas apresentaram sinal de hibridização do gene *att*A, com 76% das plantas analisadas contendo de 1-2 eventos de inserção do transgene, em diferentes padrões de integração.

A análise de *Northern blot* permitiu confirmar a transcrição do transgene na maioria das plantas analisadas. Dutt et al. (2012) estudando a expressão do gene *uid*A associada a diferentes promotores de floema verificaram que o nível de expressão do transgene varia em função do promotor utilizado. Promotores derivados de plantas (AtSuc2 e Rs1) foram comparativamente mais fracos em dirigir a expressão do transgene no floema em relação aos promotores clonados de vírus e bactéria. No nosso trabalho, o nível de transcrição do transgene também variou em função da construção gênica. No entanto, a variação detectada foi devido a presença ou ausência do peptídeo sinal associado ao gene atacina A. Plantas transgênicas contendo a construção gênica pCAtSuc2/*att*A-PS, apresentaram nível de expressão do transgene semelhante às plantas contendo a construção gênica pC*att*A 2300, onde o gene atacina é dirigido pelo promotor CaMV 35S. O nível de expressão do transgene não foi influenciado pelo número de cópias inseridas no genoma da planta (1-2 cópias).

A variação no nível de expressão do gene atacina associado ou não ao peptídeo sinal foi confirmada pela análise de RT-qPCR. A maior sensibilidade da técnica permitiu detectar a expressão do transgene em todas as plantas analisadas, incluindo aquelas não apresentaram sinal de hibridização na análise de *Northern blot*.

A importância das diferenças no nível de expressão do transgene será definida apenas após a inoculação das plantas com o patógeno. Sabe-se que na presença do peptídeo sinal a maior parte da proteína produzida é exportada para o apoplasto e a bactéria *Ca.* Liberibacter asiaticus coloniza o interior da célula. Assim, o ideal seria obter um nível de expressão do transgene que influenciasse o desenvolvimento do patógeno, mas que não fosse alto a ponto de acarretar restrições ao consumo do produto (DUTT et al., 2012).

As plantas obtidas neste trabalho serão avaliadas para resistência a *Candidatus* Liberibacter asiaticus. O resultado destas análises permitirá verificar a eficiência da expressão do gene atacina A, no floema, em inibir o desenvolvimento do patógeno.

6 CONCLUSÕES

Foi possível obter plantas transgênicas de *Citrus sinensis* contendo o gene *att*A (associado ao não ao peptídeo sinal), dirigido por promotores específicos de floema.

O gene attA foi transcrito no tecido vascular das plantas transgênicas.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário estatístico da agricultura brasileira. FNP Consultoria & Comércio. São Paulo. 2012. 482 p.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the trifoliate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulate* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. **Hortscience**, Saint Joseph, v. 46, n. 1, p. 16–22, 2011.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus* Liberibacter asiaticus. **Plant Science**, Amsterdam, v. 185–186, p. 118–130, 2012.

ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; PINO, L.E.; BOSCARIOL, R.L.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 203-211, 2003.

ANANTHAKRISHNAN, G.; ORBOVIĆ, V.; PASQUALI, G.; ĆALOVIĆ, M; GROSSER, J.W. Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant, Oxon, v. 43, n. 6; p. 593–601, 2007.

ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; HULTMARK. D. Identification of early genes in the Drosophila immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 511-518, 1995.

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 *bO* (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 24, p. 185-196, 2006a.

AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.M.J.; HARAKAVA, R.; GABRIEL, D.W.; LEE, R.F. *GUS* gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valência' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 11, p. 1623-628, 2006b.

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

BALLESTER, A.; CERVERA, M.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 1, p. 39–45, 2007.

BALLESTER, A.; CERVERA, M.; PEÑA, L. Evaluation of selection strategies alternative to *npt*II in genetic transformation of citrus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 6, p. 1005–1015, 2008.

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 *hrp*N gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p. 109-115, 2009.

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

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

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

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; GALVÃO, R.M.; VIEIRA, L.G.E. Transient gene expression of β -glucuronidase in citrus thin epicotyl transversal sections using particle bombardment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 1, p. 1-6, 2003.

BOREJSZA-WYSOCKA, E.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; MALNOY, M. Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period. **BMC Biotechnology**, London, v. 10, n. 41, 2010. doi: 10.1186/1472-6750-10-41.

BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com os genes** *manA, atacina A e Xa21*. 2004. 87 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

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

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros.** Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap. 2, p. 21-34.

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

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

CARDOSO, S.C.; BARBOSA-MENDES, J.M.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M.L.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the attacin A gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Report**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 185–192, 2010.

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

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

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

CHEN, J.; PU, X.; DENG, X.; LIU, S.; LI, H.; CIVEROLO, E. A phytoplasma related to '*Candidatus* Phytoplasma asteris' detected in citrus showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 236-242, 2009.

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F.; ALVES, K.C.S.; PEREIRA, M.A.R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; DE SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. In planta multiplication and graft transmission of *'Candidatus* Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 1, p. 53–60, 2010.

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

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

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,** New York, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

ETXEBERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 76–83, 2009.

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

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

FAO. Disponível em: < http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: 16/05/2012.

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

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**, New York, v. 21, n. 5, p. 421-428, 2003.

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

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

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

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

GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 10, p. 1358-1363, 1983.

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

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

GHORBEL, R.; LÓPEZ, C.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 1, p. 27-36, 2001.

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

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

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

GURR, S.J.; RUSHTON, P.J. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? **Trends in Biotechnology**, London, v. 23, n. 6, p. 275-282, 2005.

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

HE, Y.; CHEN, S.; PENG, A.; ZOU, X.; XU, L.; LEI, T.; LIU, X.; YAO, L. Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (Shiva A and Cecropin B) via a novel *Agrobacterium*-mediated transformation of mature axillary buds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 99-107, 2011.

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

HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; ANDERSSON, K.; STEINER, H.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Insect immunity attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. **The EMBO Journal**, London, v. 2, n. 4, p. 571-576, 1983.

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

KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 10, p. 541-545, 1994.

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

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

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

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

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

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

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. cap. 6, p. 103-104.

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

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: *'Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, *'Ca.* L. americanus' is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n.3, p. 257-262, 2009a.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of *'Candidatus* Liberibacter americanus' and *'Ca.* Liberibacter asiaticus' in citrus plants. **Phytophatology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009b.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; CAMARGO, L.E.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; BASSANEZI, R.B.; BEATTIE, G.A.C.; AYRES, A.J. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology**, London, v. 59, n. 6, p. 1044-1053, 2010.

LÓPEZ, C.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAimediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant pathology**, Saint Paul, v. 11, n. 1, p. 33–41, 2010.

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

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

MALNOY, M.; REYNOIRD, J.P.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; ALDWINCKLE, H.S. Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus x domestica*). **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 15, p. 83-93, 2006.

MARCOS, J.F.; MUÑOZ, A.; PÉREZ-PAYÁ, E.; MISRA, S.; LÓPEZ-GARCÍA, B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 273–301, 2008.

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

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

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; 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**, London, v. 59, p. 68-75, 2009.

MIYATA, L. Y.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; SCARPARE FILHO, J. A.; ZAMBON, F. T.; 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.

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

MOLINARI, H.B.C.; BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 379–385, 2004.

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

MONTEIRO, M. Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. 2005. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.; FREITAS JUNIOR, W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with *Citrus tristeza virus* (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 162-166, 2012.

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

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

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 8, p. 1155-1166, 2000.

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

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

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

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

PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany**, London, v. 94, n. 1, p. 67-74, 2004.

PEÑA, L. Transgenic plants: methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 286, p. 176-187, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

SINGH, S.; RAJAM, M.V. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 15, n. 1, p. 3-22, 2009.

SORIANO, L.; TAVANO, E.C.R.; BEHLING, A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of rangpur lime. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 349-355, 2012.

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

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 5, p. 5992-599, 2008.

TAVANO, E.C.R.; 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, n. 2, p. 395-399, 2009.

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

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD,S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus Huanglongbing symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 9, p. 977-984, 2008.

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

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 199-206, 1990.

WEN, L.; TAN, B.; GUO, W.W. Estimating transgene copy number in precocious trifoliate orange by TaqMan real-time PCR. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 363-371, 2012.

YANG, N.S.; RUSSEL, D. Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell specific expression of Gus gene in transgenic tobacco plants. **Genetics**, Bethesda, v. 87, p. 4144-4148, 1990.

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

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pth*A-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 75, n.1-2, p. 11–23, 2011.

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

YU, C.; HUANG, S.; CHEN, C.; DENG, Z.; LING, P.; GMITTER JUNIOR., F.G. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 2, p. 147–155, 2002.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZHANG, X.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIÉ, V.; TRIPLETT, E.W.; MOU, Z. Over-expression of the *Arabidopsis NPR*1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128, n. 1, p. 91–100, 2010.

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