

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

**Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa* Wells et al.**

**Luis Gustavo de Paoli**

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

**Piracicaba**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Luis Gustavo de Paoli**

**Biólogo**

**Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa***

**Wells et al.**

Orientador:

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

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

**Piracicaba**

**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Paoli, Luis Gustavo de

Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa* Wells et al. / Luis Gustavo de Paoli. - - Piracicaba, 2007.  
64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Agrobacterium 2. Clorose variegada dos citros 3. Engenharia genética 4. Laranja  
5. Plantas transgênicas 6. Resistência genética vegetal 7. Transferência de genes  
I. Título

CDD 634.31

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

**DEDICO**

Aos meus pais

***OSCAR LUIS e REGINA***

pela educação, amor e ajuda que me deram  
em todos os momentos da minha vida

À minha irmã ***THAÍS***

pela amizade e conselhos nos momentos difíceis

**OFEREÇO**

À minha companheira ***THAISE***

pelo amor e paciência durante este

período e ao meu filho ***LUIS FELIPE***

que me enche de alegria todos os dias

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre iluminar minha vida nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, confiança e ensinamentos durante este período.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela constante ajuda e conselhos cedidos na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico de São Paulo) pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, Matê e Fernanda do Laboratório de Insetos Vetores (ESALQ/USP) pela constante ajuda nos experimentos de avaliação com *Xylella fastidiosa*.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelos ensinamentos ministrados nas disciplinas do mestrado.

Aos professores e amigos da Universidade Metodista de Piracicaba que colaboraram com a minha formação como Biólogo.

Aos amigos Dr. Fernando A. de Azevedo e Dr. Evandro Schinor pela amizade, apoio e ensinamentos sobre transformação genética.

Aos amigos Amâncio, Suane, Rosely, Leandro, Monita, Alexandra, Dayse e Júnior pelos bons momentos vividos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ/USP), amizade e apoio constante.

Às amigas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP) Lili, Renata, Alessandra, Jannayna e Fabiana pelos agradáveis momentos e constante ajuda nas análises moleculares.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) Sr. José, Davi, Éder e Aparecido pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À secretária do curso Maria Solizete pela paciência e constante ajuda.

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

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

E a todas as pessoas que de algum modo, tenham contribuído na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Aspectos gerais do gênero <i>Citrus</i> e da citricultura.....	15
2.2 <i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al. e clorose variegada dos citros (CVC).....	17
2.3 Transformação genética em citros.....	20
2.4 Peptídeos antibacterianos.....	22
2.5 Expressão gênica específica no xilema.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Transformação genética.....	26
3.1.1 Material vegetal.....	26
3.1.2 Genes e vetores de expressão.....	27
3.1.3 Manutenção e cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	29
3.1.4 Inoculação e co-cultivo.....	29
3.1.5 Seleção e regeneração de gemas adventícias.....	29
3.1.6 Microenxertia e aclimatização das plantas.....	30
3.1.7 Teste histoquímico GUS e análises moleculares.....	30
3.2 Avaliação da resistência a <i>Xylella fastidiosa</i> em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene <i>cecropin</i> MB39.....	31
3.2.1 Seleção e produção das mudas.....	31
3.2.2 Preparação do isolado bacteriano e inoculação das plantas.....	32
3.2.3 Isolamento primário e quantificação bacteriana.....	33
3.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção da <i>Xylella fastidiosa</i> .....	34
3.2.5 Avaliação sintomática foliar.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

4.1	Transformação genética.....	36
4.2	Avaliação da resistência a <i>Xylella fastidiosa</i> em plantas transformadas com o gene <i>cecropin</i> MB39.....	43
5	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO.....	61

## RESUMO

### **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa* Wells et al.**

A obtenção de plantas geneticamente modificadas tornou-se uma ferramenta biotecnológica de grande valor, contribuindo nos programas de melhoramento. Plantas transgênicas contendo genes de peptídeos antibacterianos são uma boa alternativa nos programas visando resistência às bactérias. A cecropina é um peptídeo isolado de inseto que apresenta ação antibacteriana contra diversas bactérias, entre elas, a *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros (CVC). Com isso, este trabalho teve dois objetivos: 1) obter plantas transgênicas dos cultivares copa de laranja 'Hamlin' e laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 dirigido pelos promotores do gene da fenilalanina amônia-liase (PAL) clonado de citros (CsPP) e de *Arabidopsis thaliana* (AtPP), que conferem expressão gênica nos vasos do xilema. Obter plantas transgênicas de laranja 'Hamlin' e laranja 'Valência' com o gene GUS dirigido pelo promotor AtPP. 2) avaliar plantas de laranja 'Valência' transformadas com o gene *cecropin* MB39 inoculadas com *Xylella fastidiosa*. As transformações genéticas foram realizadas através do co-cultivo de explantes, coletados de plantas cultivadas *in vitro* (segmentos de epicótilo) ou em casa de vegetação (segmentos internodais), com *Agrobacterium tumefaciens*. Para isso, utilizou-se a estirpe EHA-105 de *A. tumefaciens* contendo os vetores binários CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 ou AtPP-GUS/2201. A seleção das gemas transformadas foi feita em meio de cultura contendo o antibiótico canamicina, e para confirmação da transformação foram realizados teste histoquímico GUS e análises moleculares de PCR e 'Southern blot'. As gemas regeneradas foram microenxertadas em citrange 'Carrizo' ou laranja 'Hamlin' não transgênicos. Foi possível a obtenção de gemas transformadas para todos os cultivares, porém a regeneração de plantas ocorreu para laranja 'Hamlin' transformada com os vetores CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 e AtPP-GUS/2201. Para a avaliação da resistência de plantas transgênicas a *Xylella fastidiosa* foram selecionadas nove plantas de laranja 'Valência' transformadas com o gene *cecropin* MB39, sendo que em quatro plantas o gene está sendo dirigido pelo promotor CsPP e nas outras cinco plantas pelo promotor CaMV 35S. Essas plantas foram multiplicadas por borbúlia e inoculadas mecanicamente com *Xylella fastidiosa*. Foram realizados isolamentos primários e quantificações bacterianas aos quatro e dez meses após a inoculação da bactéria para verificar a eficiência da inoculação e movimentação sistêmica da bactéria. Avaliações sintomáticas foliares também foram feitas aos oito meses após a inoculação. Os resultados dos isolamentos aos quatro meses mostraram que a inoculação da bactéria foi eficiente, já que houve crescimento bacteriano na maioria das placas com meio de cultura. A movimentação sistêmica da bactéria pôde ser detectada no isolamento aos dez meses. Das nove plantas avaliadas, uma planta transgênica apresentou crescimento populacional menor do que a da planta controle, indicando uma resistência ao patógeno. Nas avaliações sintomáticas foliares, as plantas transgênicas não diferiram do controle.

Palavras-chave: *Agrobacterium tumefaciens*; Citros; Clorose variegada dos citros

## ABSTRACT

### **Genetic transformation of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with the *cecropin* MB39 gene and evaluation of transgenic plants inoculated with *Xylella fastidiosa* Wells et al.**

The production of genetically modified plants has become an important biotechnological tool, contributing with breeding programs. Transgenic plants expressing antibacterial peptides genes are a good alternative for breeding programs aiming to obtain bacterial resistance. Cecropin is a peptide isolated from an insect, which presents antibacterial effect against several bacteria including the citrus variegated chlorosis in which the causal agent is *Xylella fastidiosa*. This work had two objectives: 1) genetically transform 'Hamlin' and 'Pêra' sweet oranges scions with the *cecropin* MB39 gene under the control of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene promoter, cloned from citrus (CsPP) and from *Arabidopsis thaliana* (AtPP). This promoter confers gene expression within the xylem vessels. Obtain transgenic plants of 'Hamlin' and 'Valência' sweet oranges with the GUS gene under the control of the AtPP promoter. 2) Evaluate the resistance to *Xylella fastidiosa* of 'Valência' sweet orange plants transformed with the *cecropin* MB39 gene. Co-culture of explants with *Agrobacterium tumefaciens* was used to genetically transform *in vitro* plants (epicotyl segments) and greenhouse plants (internodal segments). *A. tumefaciens* strain EHA-105 containing the CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 or AtPP-GUS/2201 binary vectors were used for transformation. Culture medium containing the antibiotic kanamycin was used for selection of transformed buds. Confirmation of transgenesis was carried out by GUS assays, PCR and Southern blot analysis. Regenerated buds were *in vitro* grafted on non-transgenic 'Carrizo' citrange or 'Hamlin' sweet orange rootstocks. Transformed buds were obtained for all cultivars, however plant regeneration was only obtained for 'Hamlin' sweet orange transformed with vectors CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 and AtPP-GUS/2201. Nine 'Valência' sweet orange plants transformed with the *cecropin* MB39 gene were selected for the *Xylella fastidiosa* resistance experiment. Four transgenic lines were controlled by the CsPP promoter and the other five lines were controlled by the CaMV 35S promoter. These transgenic lines were graft propagated and mechanically inoculated with *Xylella fastidiosa*. Primary isolations and bacterial quantifications were conducted on the fourth and tenth month after inoculation in order to detect inoculation efficiency and bacterial systemic movement. Leaf symptom evaluations were executed eight months after inoculations. The bacterial isolation results from the fourth month indicated that inoculations were successful, since bacterial growth could be detected in the majority of culture mediums. Systemic movement of bacteria within the plants was detected after ten months. From the nine transgenic lines tested, one presented reduced pathogen growth when compared to controls indicating resistance. Transgenic lines did not differ from controls regarding leaf symptoms.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; Citrus; Citrus variegated chlorosis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Clone CsPPCEC/2201 contendo o gene <i>cecropin</i> MB39 sob o controle do promotor PAL de citros no vetor binário pCAMBIA 2201.....	27
Figura 2 -	Clone AtPPCEC/2201 contendo o gene <i>cecropin</i> MB39 sob o controle do promotor PAL de <i>A. thaliana</i> no vetor binário pCAMBIA 2201.....	28
Figura 3 -	Clone AtPP-GUS/2201 contendo o gene GUS sob o controle do promotor PAL de <i>A. thaliana</i> no vetor binário pCAMBIA 2201.....	28
Figura 4 -	Transformação genética de citros via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	37
Figura 5 -	Análise molecular das plantas de laranja ‘Hamlin’ regeneradas do experimento de transformação com o vetor AtPPCEC/2201.....	38
Figura 6 -	Análise da PCR das plantas regeneradas de laranja ‘Hamlin’.....	39
Figura 7 -	Análise molecular das plantas de laranja ‘Valência’ regeneradas dos experimentos de transformação genética com o gene <i>cecropin</i> MB39.....	44
Figura 8 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC/g de tecido) em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene <i>cecropin</i> MB39 aos 4 e 10 meses após a inoculação.....	46
Figura 9 -	Porcentagem de folhas sintomáticas em plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ aos 8 meses após a inoculação com <i>X. fastidiosa</i> .....	47
Figura 10 -	Plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de gemas adventícias e total de explantes de laranja ‘Hamlin’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação <sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas.....	36
Tabela 2 - Número de gemas adventícias e total de explantes de laranja ‘Hamlin’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor CsPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação <sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas.....	39
Tabela 3 - Número de gemas adventícias e total de explantes de laranja ‘Hamlin’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPP-GUS/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação <sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas.....	40
Tabela 4 - Número de gemas adventícias e total de explantes de laranja ‘Pêra’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor CsPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação <sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas.....	41
Tabela 5 - Número de gemas adventícias e total de explantes de laranja ‘Pêra’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação <sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas.....	41
Tabela 6 - Número de gemas adventícias e total de explantes de laranja ‘Valência’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPP-GUS/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação <sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas.....	42
Tabela 7 - Avaliação da infecção das plantas transgênicas de laranja ‘Valência’, contendo o gene <i>cecropin</i> MB39, 4 e 10 meses após a inoculação com <i>Xylella fastidiosa</i> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A importância da citricultura para a economia brasileira está relacionada não apenas à geração de empregos nas lavouras, barracões e indústrias, mas também devido à movimentação de recursos econômico-financeiros, já que os produtos cítricos (suco concentrado, farelo de polpa, óleo essencial, etc.) geram divisas, pelas exportações e/ou comercialização interna, que ultrapassam US\$ 3 bilhões/ano. Essa importância aumenta pelo fato do Brasil ser o maior produtor mundial de citros, com 20,39 milhões de toneladas em 2006. A China é responsável pela segunda maior produção com 16,3 milhões t, seguida pelos Estados Unidos com 11,5 milhões t e México com 6,6 milhões t. Esses países representam juntos mais de 50% da produção mundial de citros que é de, aproximadamente, 105,4 milhões de toneladas (FAO, 2007). O Brasil é também, o maior produtor e exportador de suco concentrado, sendo que de 1,4 milhão t produzida, 97% foi exportada, principalmente para a Europa e Estados Unidos (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2007).

A maioria dos estados brasileiros cultiva frutas cítricas, porém São Paulo domina com 81% da produção nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2005). Os principais cultivares copa de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) destinados à produção de suco são ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Hamlin’, tendo como principal porta-enxerto o limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck). Este uso restrito de cultivares copa/porta-enxerto pode acarretar muitos problemas, tais como o aumento na incidência de pragas e doenças devido à baixa variabilidade genética, colocando em risco a produtividade dos pomares e a qualidade dos frutos.

A disseminação de pragas e doenças acarreta perdas significativas na produtividade dos pomares brasileiros, assim como a depreciação do fruto para exportação. Dentre as doenças que atacam os pomares, a clorose variegada dos citros (CVC) constitui uma das mais importantes doenças no Brasil, pois seu progresso se tem dado de tal maneira que só encontra precedente na epidemia do vírus da tristeza dos citros (CTV) que devastou praticamente 10 milhões de plantas na década de 40 (LARANJEIRA et al., 2005). No Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro, a incidência da CVC em 1996 era de 22%, em 1999 esse número subiu para 36% e no ano 2005 chegou a 43% de plantas com sintomas (FUNDECITRUS, 2007).

A CVC é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al., atingindo todos os cultivares comerciais de laranja doce. Restrita ao xilema da planta, a bactéria provoca o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a copa da planta. A produção do pomar afetado cai rapidamente, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente. A perda de peso do fruto pode chegar a 75% (FUNDECITRUS, 2007).

O controle químico de doenças bacterianas, como a CVC, é praticamente inviável economicamente, já os tratamentos culturais ajudam na convivência com a doença, porém a utilização de variedades resistentes seria a forma mais barata e eficiente. A necessidade de aumentar as bases genéticas atuais dos citros, assim como a potencialização de germoplasma já existente, impõe a necessidade de desenvolver programas de melhoramento. Programas tradicionais de melhoramento genético apresentam limitações relacionadas à biologia do gênero *Citrus*. Sendo assim, a biotecnologia pode contribuir efetivamente no ganho ou potencialização de características desejáveis (MACHADO et al., 2005). Com isso, a obtenção de plantas geneticamente modificadas tornou-se uma ferramenta biotecnológica de grande valor, por oferecer vantagens sobre o melhoramento tradicional, já que permite a introdução de material genético em situações em que os organismos são incompatíveis (espécies, gêneros, famílias e até reinos), encurtando o período para se obter uma nova variedade, visto que essas modificações ocorrem em uma só etapa (BRASILEIRO; DUSI, 1999; MACHADO et al., 2005).

O sistema de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Towns. Conn tem se mostrado eficiente na regeneração de plantas transgênicas de citros (MOORE et al., 1992; MENDES et al., 2002). Entretanto, a maioria das plantas transgênicas de citros produzidas atualmente, foram regeneradas utilizando-se promotores constitutivos fortes como o CaMV 35S (PEÑA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2003; MOLINARI et al., 2004). Gerações futuras de transgênicos exigirão o uso de promotores apropriados, que confirmem expressão de genes em tecidos específicos, em momento e intensidade correta (HARAKAVA, 2000).

Como o agente causal da CVC está localizado nos vasos do xilema, o desenvolvimento de transgênicos resistentes a *Xylella fastidiosa* requer vetores que acumulam a expressão diferencial de proteínas nesses tecidos da planta. Uma alternativa seria a utilização de promotores cuja expressão de genes ocorresse, preferencialmente nos vasos do xilema. O parênquima do xilema mostra uma alta atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), a qual está envolvida na síntese de fenilpropanóides, precursores de lignina. Plantas transgênicas de tabaco e

citros mostraram expressões nos tecidos do xilema e em camadas superficiais do pecíolo quando dirigidas pelo promotor da PAL (AZEVEDO et al., 2006).

No caso de obtenção de resistência a doenças bacterianas, a expressão de genes de peptídeos tem se mostrado uma alternativa interessante (ZASLOFF, 2002). A cecropina, que é um peptídeo lítico isolado da hemolinfa de *Hyalophora cecropia* L. (STEINER; ANDREU; MERRIFIELD, 1988), vem sendo estudada, demonstrando atividade antibacteriana contra um grande número de bactérias (SHARMA et al., 2000). Com isso, esses genes tornam-se candidatos viáveis para aumentar a tolerância de plantas cítricas às doenças como a CVC, principalmente, quando são controlados por promotores que direcionem a expressão gênica para os vasos do xilema, como no caso do promotor da PAL.

Diante desses fatores, este trabalho teve como objetivos a transformação genética dos cultivares de laranja ‘Hamlin’ e laranja ‘Pêra’ com o gene *cecropin* MB39 dirigido pelos promotores PAL clonado de citros (CsPP) ou de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. (AtPP), das laranjas ‘Hamlin’ e ‘Valência’ com o gene GUS dirigido pelo promotor AtPP, e a avaliação de plantas transformadas com o gene *cecropin* MB39 inoculadas com *Xylella fastidiosa*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais do gênero *Citrus* e da citricultura

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae e tribo Citreae, sendo esta composta por três subtribos (SWINGLE; REECE, 1967). A subtribo Citrinae apresenta 13 gêneros e 65 espécies, contendo as principais de interesse comercial, como as do gênero *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus*. A classificação das espécies quanto ao gênero *Citrus* apresenta divergências, porém o sistema de classificação mais utilizado, proposto por Swingle (1943), reconhece 16 espécies, dentre as quais estão as espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco, *C. clementina* hort. ex Tan., *C. tangerina* hort. ex Tan.) e limões (*C. limon* L. Burm. f.) (SWINGLE; REECE, 1967, ARAÚJO; ROQUE, 2005). As espécies desse gênero possuem um conjunto básico cromossômico  $x = 9$ , sendo que a condição mais freqüente do gênero é a diploidia ( $2n = 2x = 18$ ), embora haja relatos em que existam alguns indivíduos triplóides e tetraplóides (MOREIRA; PIO, 1991).

Sua origem está atribuída ao sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão, e do leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE, 1967; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Outros centros de origem são apontados, como o norte da região Indo-Burma, assim como a região de Yunnan, no centro sul da China (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). A introdução dos citros no Brasil foi feita pelos portugueses, no começo do século XVI, através das expedições colonizadoras. A partir dessa data, sua expansão pelo litoral norte foi rápida, e o cultivo das plantas cítricas se expandiu por todo o país devido às condições ideais para crescer e produzir, tornando-se aparentemente nativos em certas áreas, como em Mato Grosso (MOREIRA; MOREIRA, 1991).

Dentre os principais grupos de frutas no mundo, os citros ocupam o primeiro lugar em volume de produção, com aproximadamente 105,4 milhões de toneladas, seguidas pelas culturas da banana, uva e maçã (FAO, 2007). Nas últimas décadas, o Brasil vem liderando a produção mundial de citros, tendo o Estado de São Paulo como o responsável por 81% dessa produção (IBGE, 2005). Em 2003, o sistema agroindustrial (SAG) citrícola no Brasil movimentou US\$ 3,23 bilhões, correspondendo a 1,87% da pauta total de exportações. Neste mesmo ano, gerou

400 mil empregos diretos, arrecadando US\$ 139,4 milhões em tributos (NEVES; LOPES, 2005). Embora ocupe uma posição de destaque no mercado, nossa produtividade média, em torno de 2,0 caixas/planta/ano, ainda é baixa, quando comparada com outras regiões produtoras, como por exemplo, a Flórida, que alcança uma média de 6,0 caixas/planta/ano. Essa baixa produtividade está associada, ao fato de grande parte da citricultura não ser irrigada, mas principalmente, a problemas fitossanitários e a ausência de maior número de cultivares copa e porta-enxerto (MACHADO et al., 2005).

As principais doenças que afetam a citricultura são pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), verrugose (*Elsinoe* spp.), melanose (*Diaporthe citri* Wolf), rubelose (*Erythricium salmonicolor* Berk. & Br. Burdsall), podridão floral (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) e a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), causadas por fungos. Dentre as doenças causadas por vírus, destacam-se a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*). As principais doenças bacterianas são a clorose variegada dos citros (CVC) (*Xylella fastidiosa* Wells et al.), o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al.), e mais recentemente o huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.), também conhecido como greening. Algumas doenças de etiologia ainda desconhecida também são importantes como no caso da morte súbita dos citros (MSC) e do declínio dos citros (FEICHTENBERGER, 2000; FUNDECITRUS, 2007).

A obtenção de novas variedades que apresentem tolerância ou resistência aos problemas fitossanitários auxiliaria no desenvolvimento da citricultura diminuindo as perdas nas produções assim como os gastos no manejo dos pomares. Entretanto, programas tradicionais de melhoramento genético via hibridação e seleção recorrente apresentam diversas dificuldades relacionadas à biologia reprodutiva do gênero, entre elas, a alta heteroziguidade, a esterilidade de pólen e óvulo, sistemas de incompatibilidade gametofítica, a ocorrência de apomixia facultativa via embrionia nucelar resultando na ocorrência de sementes poliembriônicas e o longo período juvenil, que pode variar de 2 a 13 anos, dependendo das condições ambientais e do genótipo (FROST; SOOST, 1968; MACHADO et al., 2005).

Na tentativa de sobrepor essas barreiras, técnicas modernas de biologia molecular, cultura *in vitro* e engenharia genética foram integradas aos programas de melhoramento. Dentre estas técnicas, destacam-se a hibridação somática por fusão de protoplastos, permitindo a combinação genética entre espécies taxonomicamente iguais ou distantes resultando na possível

expressão aditiva das características dos progenitores nos híbridos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; MENDES et al., 2001) e a transformação genética, permitindo a introdução de genes exógenos de interesse agrônomico e reduzindo o período para obtenção de uma nova variedade (PEÑA et al., 1995; BOSCARIOL et al., 2006). Esta última tem mostrado resultados promissores, principalmente visando resistência a doenças, tornando-se uma ótima ferramenta no melhoramento genético e na possível solução dos diversos problemas da citricultura.

## **2.2 *Xylella fastidiosa* Wells et al. e clorose variegada dos citros (CVC)**

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica, que possui forma de bastonete com 1 a 4 µm de comprimento por 0,25 a 0,50 µm de diâmetro, apresenta parede celular enrugada, não móvel (não possuem flagelo), com crescimento lento em meio de cultura a 26 e 28°C com pH ótimo entre 6,5 e 6,9 (WELLS et al., 1987). Esta bactéria encontra-se limitada aos vasos do xilema de seus hospedeiros, podendo bloquear o movimento de água e a translocação de seiva no seu interior, distribuindo-se de forma irregular nesses vasos (HILL; PURCELL, 1995). O termo bactéria limitada ao xilema (XLB) do inglês “xylem-limited bacteria” passou a ser utilizado para referir-se às bactérias parasitas endofíticas que vivem exclusivamente nas células do xilema ou elementos traqueais (PURCELL; HOPKINS, 1996). Este termo descreve as seguintes bactérias patogênicas: *Xylella fastidiosa* (WELLS et al., 1987), *Ralstonia syzygii* comb. nov. (ROBERTS et al., 1990; VANEECHOUTTE et al., 2004) e *Clavibacter xyli* (DAVIS et al., 1984). A *X. fastidiosa* é responsável pela causa de várias doenças em inúmeras espécies de plantas e também coloniza outras plantas sem mostrar sintomas aparentes (PURCELL; HOPKINS, 1996).

Primeiramente relatada na doença mal de Pierce em videira (*Vitis vinifera* L.) através de observações com microscopia eletrônica (HOPKINS; MOLLENHAUER, 1973), essa bactéria é responsável também pelas doenças em outras culturas como alfafa (*Medicago sativa* L.), amendoeira (*Prunus dulcis* Mill. D. A. Webb), pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch), ulmeiro (*Ulmus* sp.), ameixeira (*Prunus* sp.), amoreira (*Morus* sp.), espirradeira (*Nerium oleander* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), em citros (*C. sinensis* L. Osbeck), entre outras culturas (HOPKINS, 1989; PURCELL; HOPKINS, 1996). No Brasil, três doenças se destacam pela importância

econômica: a atrofia dos ramos do cafeeiro (ARC), escaldadura das folhas da ameixeira (EFA) e a clorose variegada dos citros (CVC).

Segundo Hopkins (1995), existem três teorias sobre o mecanismo de patogênese da *X. fastidiosa*: liberação de fitotoxinas, alterações na concentração de reguladores de crescimento e disfunções do sistema condutor de água devido à colonização e entupimento dos vasos xilemáticos pela bactéria. Esta última, de acordo com o quadro sintomatológico observado em plantas atacadas, parece ser a mais provável, já que em plantas de citros com CVC, um dos sintomas é a murcha de ramos. Machado et al. (1994) mostraram também que folhas de plantas de citros afetadas pela CVC apresentaram sintomas de deficiência hídrica associada à diminuição na fotossíntese, na transpiração, na condutividade estomática e no potencial hídrico. Essa diminuição na fotossíntese estava, possivelmente, relacionada com os baixos valores de condutividade estomatal, os quais podem ser associados à deficiência hídrica. Queiroz-Voltan e Paradela Filho (1999) analisaram características morfológicas de folhas de citros com CVC e detectaram não só uma redução no número de cloroplastos, mas também cloroplastos quase que totalmente destruídos, nas áreas cloróticas. Além disso, relataram uma grande concentração de cristais de hesperidina nas folhas afetadas, assim como deposição de goma nos vasos do xilema. Devido aos sintomas de clorose, seguidos de escaldadura marginal das folhas, em plantas de ameixa (FRENCH; KITAJIMA, 1978) e em amendoeira (MIRCETICH et al., 1976), entre outras plantas, o envolvimento de toxinas liberadas pela *X. fastidiosa* pode estar relacionada. Entretanto, Purcell e Hopkins (1996) descartam essa possibilidade com base na relação da população bacteriana e sintomas da doença e pelo fato de nenhuma substância tóxica ter sido isolada. Apesar de que foram identificadas similaridades de genes da bactéria com genes para produção de toxinas de outras bactérias (SIMPSON et al., 2000).

A movimentação sistêmica da *Xylella fastidiosa* de célula a célula do xilema é retido pela parede primária das pontuações, que permite a comunicação de um vaso do xilema a outro. Essa parede primária é constituída por celulose, hemicelulose, pectina e proteínas (BRLANSKY et al., 1982). Purcell e Hopkins (1996) sugerem que a bactéria poderia dissolver essa membrana da pontuação utilizando alguma enzima. Alves (2003), através de eletromicrografia de varredura em plantas cítricas com CVC, mostrou que a migração de bactérias presentes no interior das pontuações ocorreu após degradarem a parede da pontuação, produzindo células filhas que passavam para o vaso adjacente. A partir dessas células, iniciou-se a formação do biofilme no

lúmen do novo vaso colonizado. A velocidade da movimentação parece ser influenciada pela estirpe da bactéria, já que Fry e Milholland (1990) verificaram que estirpe virulenta, em pecíolos e ramos de videira, colonizou o 17º internódio acima do local de inoculação em apenas oito semanas, já a estirpe avirulenta permaneceu no 10º internódio. Quanto à distribuição da bactéria pela planta, Almeida et al. (2001) verificaram que a bactéria apresentou translocação ascendente e descendente, sendo encontrada nas raízes das plantas de citros quando inoculadas na parte aérea.

A CVC é caracterizada como uma doença vascular, já que a colonização do patógeno se dá nos vasos do xilema obstruindo a passagem de água. Foi constatada primeiramente em 1987, em pomares da região noroeste do Estado de São Paulo (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990). Inicialmente, suspeitou-se de desequilíbrio nutricional ou até mesmo de uma nova estirpe do vírus da tristeza dos citros, mas essas hipóteses foram descartadas quando constataram a presença da bactéria *X. fastidiosa* nas plantas afetadas (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990; LEITE JUNIOR; LEITE, 1991).

Os primeiros sintomas da CVC ocorrem nas folhas maduras da copa, caracterizados com pequenas manchas cloróticas na face superior da folha, que correspondem às lesões de cor palha da face abaxial. Com o avanço da CVC, ocorrem a desfolha dos ramos mais altos da planta (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990). Os sintomas nos frutos aparecem depois dos sintomas foliares, ocorrendo uma diminuição em seu tamanho, tornando-se duros e impróprios para o mercado de mesa e processamento de suco. Podem aparecer lesões marrom-escuras, devido ao fato dos frutos apresentarem casca mais fina (LARANJEIRA, 1997). A produção é afetada, ocorrendo uma diminuição em termos de peso e número de frutos, já que plantas sadias produziram entre 30 e 35% a mais que plantas doentes (PALAZZO; CARVALHO, 1993).

A transmissão e disseminação da *X. fastidiosa* entre as plantas cítricas ocorrem por insetos vetores conhecidos como cigarrinhas (Hemíptera: Cicadellidae), que se alimentam nos vasos do xilema das plantas hospedeiras (PURCELL; HOPKINS, 1996). As espécies de cigarrinhas comprovadas como vetoras são: *Acrogonia citrica* Marucci & Caviocchioli, *Oncometopia facialis*, *Bucephalogonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Plesiommata corniculata* (Young), *A. virescens* Metcalf, *Macugonalia leucomelas*, *Homalodisca ignorata* (Walker), *Sonesimia grossa*, *Ferraniana trivittata* (Signoret) e *Parathona gratiosa* Blanchard (KRÜGNER et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002).

A CVC está presente em quase todas as áreas citrícolas do país, com intensidades diferentes. Além do Brasil, outros países como a Argentina, Paraguai e Costa Rica já constataram plantas afetadas pela doença (LARANJEIRA et al., 2005). No Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro, foram constatadas 43,28% de plantas com sintomas de CVC, a incidência em cada região foi a seguinte: 69,74% (norte), 56,25% (noroeste), 9,50% (oeste), 51,96% (centro) e 4,72% (sul) (FUNDECITRUS, 2007).

A CVC tornou-se uma das principais doenças da citricultura brasileira causando grandes prejuízos devido à queda da produtividade, além da necessidade de reestruturação das técnicas de produção de mudas, podas de ramos com sintomas iniciais e/ou erradicação de plantas sintomáticas e o controle dos vetores da doença (cigarrinhas) nas regiões mais afetadas (LARANJEIRA, 1997). O desenvolvimento de variedades novas resistentes é muito importante para a citricultura, já que é a forma mais econômica e eficiente de controlar doenças como a CVC (COLETTA FILHO; MACHADO, 2002).

### **2.3 Transformação genética em citros**

Embora a transformação genética seja uma técnica conhecida e útil para a obtenção de novas variedades com importância agrícola, o primeiro relato envolvendo citros só foi feito no final da década de 80, por Kobayashi e Uchimiya (1989), quando utilizaram polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja 'Trovia'. Entretanto não houve a regeneração de plantas. A primeira laranja transgênica regenerada foi obtida a partir de células embriogênicas em suspensão da variedade 'Washington Navel' co-cultivadas com *Agrobacterium tumefaciens* (HIDAKA et al., 1990). Vários métodos de transformação genética já foram descritos para citros, como a introdução direta de DNA em protoplastos (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989; VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990; GUO et al., 2005), transformação via *A. tumefaciens* (MOORE et al., 1992; FLEMING et al., 2000; BOND; ROOSE, 1998; CERVERA et al., 1998; LUTH; MOORE, 1999; MENDES et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003), o bombardeamento de partículas em células vivas (KLEIN et al., 1987; YAO et al., 1996) e por eletroporação de protoplastos (HIDAKA; OMURA, 1993; NIEDZ et al., 2003).

Dentre os trabalhos publicados com transformação genética em citros, muitos envolvem o estabelecimento e otimizações de novas metodologias, avaliando diversos fatores que afetam a eficiência do processo (DURÁN-VILA et al., 1992; PEÑA et al., 1995a, 1995b; BOND; ROOSE, 1998). Outros envolvem a introdução de genes de interesse agrônômico, como o gene da capa protéica do vírus da tristeza do citros (CVC) (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997; DOMINGUEZ et al., 2000; SCHINOR, 2006), genes que conferem resistência à salinidade (CERVERA et al., 2000), resistência a fungos (PEÑA; NAVARRO, 1999) resistência a bactérias (BOSCARIOL, 2004; AZEVEDO, 2005) entre outros.

O sistema de transformação genética via *A. tumefaciens* é, atualmente, o método mais utilizado para obtenção de plantas transformadas, porém muitos trabalhos têm mostrado baixas eficiências de transformação, como para citrange ‘Carrizo’ com 2% (MOORE et al., 1992), 7,9% em laranja doce (PEÑA et al., 1995a) e 6% para laranja ‘Valência’ (ALMEIDA et al., 2003). Diversos fatores podem afetar a eficiência de transformação, como o cultivo (CERVERA et al., 1998; PEÑA et al., 1997), a estirpe de *Agrobacterium* (HOLFORD; HERNANDEZ; NEWBURY, 1992; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997), o tipo de explante (MOORE et al., 1992; FLEMING et al., 2000; MENDES et al., 2002), o genótipo utilizado (ALMEIDA et al., 2003), e as condições de incubação no co-cultivo (BARBOSA, 2002; MENDES et al., 2002). Trabalhos mais recentes vêm mostrando um considerável aumento na eficiência de transformação, como 20,6% a 80% para citrange ‘Carrizo’ (PEÑA et al., 1995b; YU et al., 2002), 15% a 18,6% para laranja ‘Hamlin’ (MENDES et al., 2002; BOSCARIOL, 2004) e 87,7% para *Poncirus trifoliata* (KANEYOSHI et al., 1994).

As estirpes de *A. tumefaciens* mais utilizadas são a EHA105 e EHA101, sendo essas as que mostraram melhores resultados (PEÑA et al., 1995b; MENDES et al., 2002). A frequência de transformação da estirpe EHA105 é 22 vezes maior que a da estirpe C58 (GHORBEL et al., 2001). Quando a estirpe LBA4404 foi testada para laranja doce e citrange ‘Carrizo’ não houve regeneração de plantas transformadas (BOND; ROOSE, 1998). Diversos explantes já foram utilizados em transformações de citros, sendo que os mais utilizados são segmentos de epicótilo (CERVERA et al., 2000; YANG et al., 2000; MENDES et al., 2002) e segmentos internodais coletados de tecido juvenil (PEÑA et al., 1995b; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997).

Nos trabalhos de transformação genética em citros, é bastante comum a utilização do gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, assim como a utilização do gene repórter GUS (DOMÍNGUEZ et al., 2000; PEÑA et al., 2001; MENDES et al., 2002; MOLINARI et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006) ou GFP (GHORBEL et al., 1999; FLEMING et al., 2000). Entretanto, muitos trabalhos relatam um grande número de escapes (gemas adventícias regeneradas não transformadas), indicando que a canamicina restringe mas não inibe completamente a regeneração de escapes (PEÑA et al., 1997). Uma alternativa ao uso desse gene de seleção baseado na resistência a antibióticos seria a seleção feita pelo açúcar manose utilizando o gene *manA*, utilizados em transformações de laranja ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Hamlin’(BOSCARIOL et al., 2003).

A maioria das construções gênicas utilizadas nas transformações em citros, possui o gene de interesse dirigido pelo promotor constitutivo 35S, obtido a partir do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (FLEMING et al., 2000; BESPALHOK FILHO et al., 2001; MOLINARI et al., 2004; DOMÍNGUEZ et al., 2004). Esse promotor é caracterizado pela alta expressão nos tecidos das plantas, porém não apresenta especificidade. O uso de promotores, que confirmam expressões dos genes em locais, tempo e intensidade específicos serão pré-requisitos nas futuras gerações de transgênicos (HARAKAVA, 2000), como o caso do promotor da fenilalanina amônia-liase (PAL) que confere uma expressão em células do parênquima do xilema (OHL et al., 1990; HARAKAVA, 2000).

## **2.4 Peptídeos antibacterianos**

Visando aumentar a resistência de plantas a doenças bacterianas, várias estratégias têm sido utilizadas por engenharia genética. Entre essas estratégias, destacam-se a produção de peptídeos antibacterianos, a inibição de fatores de virulência e o aumento das defesas naturais e morte celular programada no local da infecção (BESPALHOK FILHO et al., 2001). O uso de peptídeos antibacterianos tem-se mostrado com grande potencial para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a doenças, tendo sido descritos mais de 500 tipos de peptídeos com essas características, procedentes de uma grande variedade de organismos: bactérias, fungos, insetos, plantas, vertebrados e etc (ZASLOFF, 2002).

Os insetos possuem um eficiente sistema de defesa contra bactérias e outros parasitas. Esse sistema, que foi bastante estudado em *Hyalophora cecropia*, é responsável pela produção de peptídeos com potente atividade antibacteriana, tais como as cecropinas (BESPALHOK FILHO et al., 2001). As cecropinas pertencem a uma família de pequenos peptídeos, isolados da hemolinfa de insetos, que exibem atividade lítica e antibacteriana contra muitas bactérias (BOMAN; HULTMARK, 1987). Esses pequenos peptídeos (35 a 37 aminoácidos) são  $\alpha$ -Helicoidal, com uma região N-terminal bastante básica e uma longa seqüência hidrofóbica na região C-terminal, características necessárias para a formação de canais de íons nas membranas plasmáticas bacterianas, dissipando o potencial de membrana devido à liberação de prótons e, conseqüentemente, a morte celular (CHRISTENSEN et al., 1988).

O uso de peptídeos antibacterianos em transformações genéticas de plantas tem sido amplamente utilizado nesses últimos anos. Resultados positivos foram encontrados em transformações com batata utilizando-se genes que conferem produção da cecropina contra *Ralstonia solanacearum* Smith Yabuuchi et al. (MONTANELLI; NASCARI, 1991). Jaynes et al. (1993), utilizando o gene *Shiva-1* (um análogo sintético da cecropina), obtiveram alta expressão em plantas transgênicas de fumo que mostraram um aumento de resistência a *R. solanacearum*. Entretanto, Florack et al. (1995) transformaram fumo com genes da cecropina B, mas não conseguiram aumentar a resistência contra *R. solanacearum* e *P. syringae* pv. *tabaci* Wolf & Foster, apontando a rápida degradação da cecropina por proteases endógenas como a causa da baixa expressão. Os resultados até agora obtidos indicam que a transformação com peptídeos antibacterianos tem grande potencial para ser usada no melhoramento vegetal, principalmente através do uso de construções gênicas capazes de expressar esses peptídeos extracelulares e, também, visando conseguir uma maior estabilidade frente à degradação por proteases endógenas (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Assim, o uso de análogos do gene que apresentam uma estrutura mais estável é mais adequado. Harakava (2000) utilizou um gene análogo da cecropina B (*cecropin* MB39) para construção de um vetor para transformação de plantas, sendo este mais estável à ação de enzimas da planta.

Experimentos *in vitro* têm mostrado que a cecropina e seus análogos são altamente tóxicas para várias bactérias patogênicas, sendo que, geralmente, concentrações menores que 5  $\mu$ M são suficientes para inibir o crescimento de bactérias pertencentes aos seguintes gêneros: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (NORDEEN et

al., 1992). Ishida, Andersen e Leite (2004) demonstraram que a cecropina B apresentou uma grande atividade antibacteriana contra pequenos agregados de *Xylella fastidiosa* em experimentos *in vitro*. Resultados também encontrados por Andersen et al. (2004) ao avaliarem a influência da cecropina A e B sobre o crescimento de *X. fastidiosa*. Esses resultados tornam a cecropina um forte candidato nos experimentos de transformação genética em citros resistentes à CVC.

Experimentos com o peptídeo sarcotoxina (grupo das cecropinas), isolado de larvas de *Sarcophaga peregrina*, mostraram maior resistência à bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* em plantas cítricas (BESPALHOK FILHO et al., 2001). Azevedo (2005) transformou os principais cultivares de laranja doce com o gene *cecropin* MB39, revelando em testes preliminares, uma maior tolerância à bactéria *X. axonopodis* pv. *citri*. Outro peptídeo antibacteriano utilizado em experimentos de transformação é a atacina, demonstrando em plantas transgênicas de maçã uma maior resistência a *Erwinia amylovora* (NORELLI et al., 1994), e em plantas de citros a *X. axonopodis* pv. *citri* (BOSCARIOL, 2004).

## 2.5 Expressão gênica específica no xilema

Nos últimos anos, a maioria das plantas cítricas modificadas geneticamente apresentava, freqüentemente, algo em comum: o uso de um promotor constitutivo forte, como é o caso do promotor CaMV 35S (PEÑA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2003; MOLINARI et al., 2004). Esse promotor confere uma alta expressão gênica por todos os tecidos da planta, não possuindo especificidade. O uso de promotores que conferem uma expressão em tecidos ou células específicas evita uma expressão desnecessária do gene e reduz a possibilidade de interferência no desenvolvimento da planta, além de que essa expressão é voltada aos tecidos onde o patógeno coloniza (HARAKAVA, 2000).

O fato de a bactéria *Xylella fastidiosa* colonizar somente os vasos do xilema, requer construções que acumulem a expressão de proteínas nesses tecidos da planta. Poucas proteínas são encontradas nos vasos do xilema e a produção de algumas está localizada nas raízes, dificultado seu uso como genes promotores específicos para o xilema (SAKUTA et al., 1998). Uma alternativa seria a utilização de promotores cuja expressão de genes ocorresse, preferencialmente nos vasos do xilema (HARAKAVA, 2000).

Em plantas, a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) catalisa os primeiros passos das reações do metabolismo de fenilpropanóides, sendo estes importantes no desenvolvimento vegetal e na proteção contra fatores ambientais e bióticos adversos (GIACOMIN; SZALAY, 1996). As moléculas de fenilpropanóides servem também como constituintes nas paredes celulares das células vegetais, como o caso da lignina que proporciona o desenvolvimento do sistema vascular dando rigidez aos vasos, já que o parênquima do xilema mostra uma alta atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL).

Foi encontrada a existência de múltiplas isoformas da enzima PAL, garantindo uma flexibilidade da expressão dessa enzima, sendo que cada gene expressa em lugares e intensidades diferentes. Quatro genes que codificam a enzima PAL foram encontrados no genoma da *Arabidopsis thaliana* (PAL1, PAL2, PAL3 e PAL4), sendo que análises filogenéticas mostram que a PAL1 está mais próxima da PAL2, enquanto que a PAL3 aproxima-se mais da PAL4 (RAES et al., 2003).

Entre as diferenças na expressão dos genes, o promotor da PAL2 contendo o gene GUS mostrou uma expressão específica nos vasos do xilema, enquanto que o GUS expresso pelo promotor PAL3 foi detectado apenas numa camada de células que cerca o sistema vascular (SHUFFLEBOTTOM et al., 1993). O promotor PAL3 também mostrou atividade em resposta a ferimentos e no tratamento com células de *E. carotovora*. Azevedo et al. (2006) mostraram expressão do gene GUS em plantas de tabaco e de citros com o promotor PAL clonado de citros (CsPP), e mostrou uma expressão preferencialmente, mas não exclusivamente, nas células do xilema para as plantas de tabaco, e uma expressão em células da camada superficial dos pecíolos foliares nas plantas de citros.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Transformação genética

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), ambos da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

##### 3.1.1 Material vegetal

Sementes de frutos maduros de laranjas ‘Pêra’, ‘Hamlin’ e ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram extraídas, lavadas para a retirada da mucilagem e secas por 24 horas. Em seguida foram retirados seus tegumentos e desinfestadas em solução 3:1 de água:hipoclorito de sódio (2,5%), durante 20 minutos. Após este período, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas e, incubadas *in vitro* em tubos de ensaio (25x125 mm), contendo 10 mL do meio de cultura MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com 2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>TM</sup> e 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e pH ajustado para 5,8. A incubação foi realizada em ausência de luz durante 4-6 semanas, à temperatura de 27°C, para germinação e alongamento do epicótilo. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 horas por 10-15 dias, quando foram utilizadas como explantes, que se constituíram de segmentos de epicótilo de 0,8-1,0 cm de comprimento.

Em alguns experimentos foram utilizados como fonte de explantes segmentos internodais de ramos de plantas juvenis de laranja ‘Pêra’ cultivadas em casa de vegetação (PEÑA et al., 2004). As plantas foram mantidas em sacolas plásticas (35 X 20 cm) contendo substrato Rendmax Citrus<sup>TM</sup>, sobre bancadas de concreto de 30 cm de altura. As plantas foram podadas, preservando a haste principal, para a formação de ramos laterais novos que foram coletados como fonte de explantes. A assepsia dos ramos foi realizada em solução 2:1 de água:hipoclorito de sódio (2,5%), durante 20 minutos. Os ramos foram lavados três vezes em água destilada estéril, em condições assépticas. Utilizaram-se os segmentos internodais de 0,8-1,0 cm como explantes, descartando as gemas laterais dos ramos.

### 3.1.2 Genes e vetores de expressão

As construções gênicas utilizadas nos ensaios de transformação foram cedidas pelo Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico - São Paulo) e elaboradas sobre o vetor binário pCAMBIA 2201.

O clone CsPPCEC/2201 contém o gene *cecropin* MB39, dirigido pelo promotor da fenilalanina amônia-liase (PAL) clonado de *Citrus sinensis* e o terminador NOS, o gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e o gene repórter GUS (Figura 1).

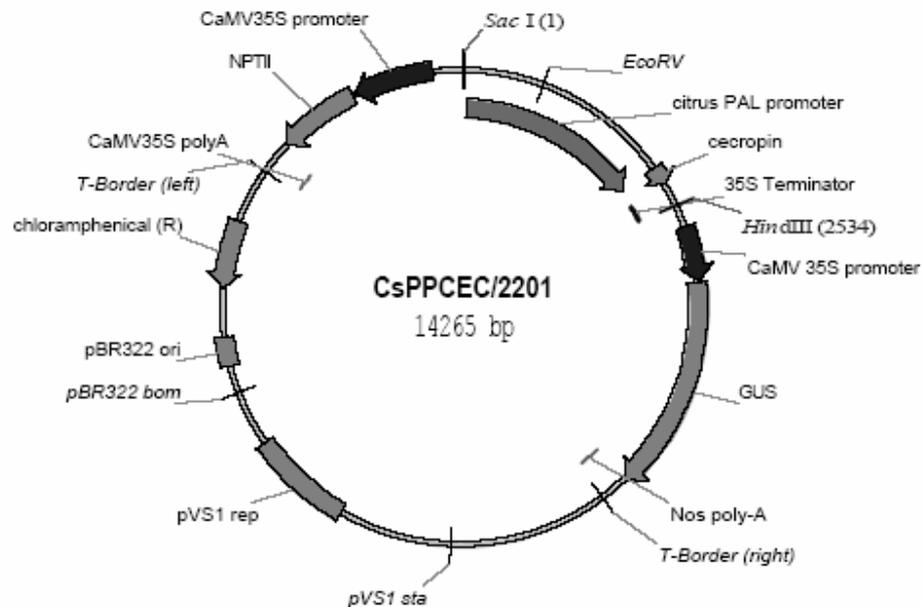


Figura 1 - Clone CsPPCEC/2201 contendo o gene *cecropin* MB39 sob o controle do promotor PAL de citros no vetor binário pCAMBIA 2201

O clone AtPPCEC/2201 contém o gene *cecropin* MB39, dirigido pelo promotor PAL clonado de *Arabidopsis thaliana* e o terminador NOS, o gene de seleção *nptII* e o gene repórter GUS (Figura 2). O clone AtPP-GUS/2201 contém o gene GUS, dirigido pelo promotor PAL clonado de *A. thaliana* e o terminador NOS, e o gene de seleção *nptII* (Figura 3).

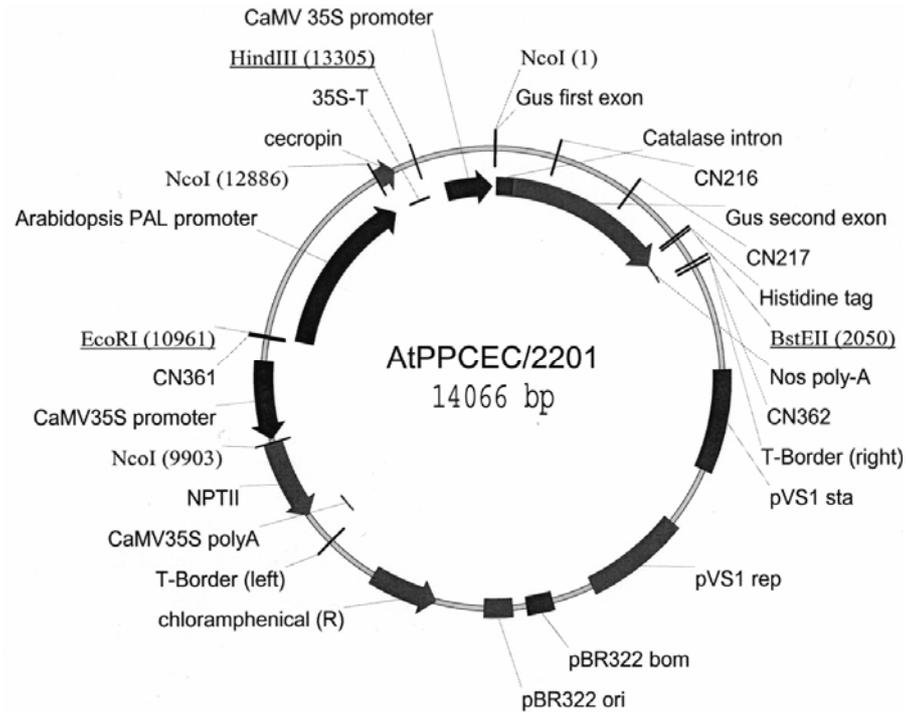


Figura 2 - Clone AtPPCEC/2201 contendo o gene *cecropin* MB39 sob o controle do promotor PAL de *A. thaliana* no vetor binário pCAMBIA 2201

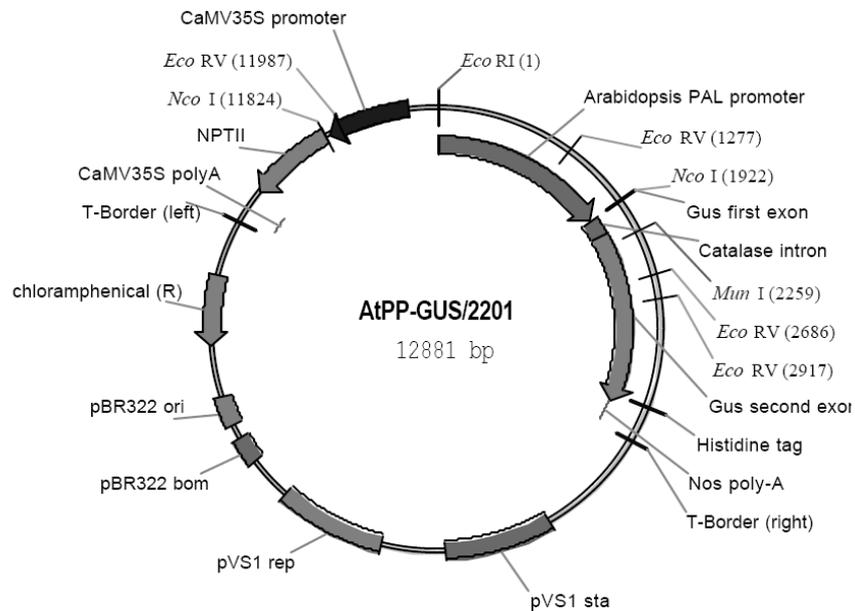


Figura 3 - Clone AtPP-GUS/2201 contendo o gene *GUS* sob o controle do promotor PAL de *A. thaliana* no vetor binário pCAMBIA 2201

Os clones CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 e AtPP-GUS/2201 foram introduzidos em estirpes desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e utilizadas como vetores para o sistema de transformação.

### **3.1.3 Manutenção e cultivo de *Agrobacterium tumefaciens***

As estirpes de *A. tumefaciens* foram conservadas em solução de glicerol (50%) a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e um estoque de trabalho em tubos contendo 1 mL de meio de cultura YEP sólido foi mantido a  $4^{\circ}\text{C}$ . A partir do estoque de trabalho, as estirpes foram cultivadas em meio de cultura YEP sólido, suplementado com os antibióticos canamicina ( $50\text{ mg.L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50\text{ mg.L}^{-1}$ ), por 48 horas a  $27^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, colônias isoladas foram transferidas para meio de cultura YEP líquido suplementado com os antibióticos, incubados por 16 horas em agitador orbital (180 rpm) a  $27^{\circ}\text{C}$ . A suspensão bacteriana foi quantificada em espectrofotômetro (600 nm), centrifugada a 4.800 rpm ( $22^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$ ) e ressuspensa em meio de cultura MT líquido para uma concentração de  $5 \times 10^8$  UFC/mL.

### **3.1.4 Inoculação e co-cultivo**

Os explantes provenientes de segmentos de epicótilo ou internodais após cortados (0,8-1,0 cm), foram imersos na solução bacteriana ( $5 \times 10^8$  UFC.mL $^{-1}$ ) por um período de 20 minutos. Em seguida, foram secos à temperatura ambiente em papel de filtro estéril e transferidos para placas de Petri (90x15 cm) com meio de cultura MT sólido suplementado com  $1\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (6-benzilaminopurina). O material foi mantido no escuro a  $24^{\circ}\text{C}$  durante três dias, para o co-cultivo.

### **3.1.5 Seleção e regeneração de gemas adventícias**

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para o mesmo meio do co-cultivo adicionado de antibióticos canamicina ( $100\text{ mg.L}^{-1}$ ) e cefotaxima ( $500\text{ mg.L}^{-1}$ ) para a seleção de brotos transformados e inibição do crescimento de *Agrobacterium*, respectivamente. As placas com os explantes foram incubadas a  $27^{\circ}\text{C}$ , no escuro, até o desenvolvimento de gemas

adventícias, quando foram então transferidas para fotoperíodo de 16 horas de luz. Os explantes foram mantidos neste meio de cultura com sub-cultivos a cada duas semanas, até que as gemas se desenvolvessem e emitissem os primeiros pares de folhas.

### 3.1.6 Microenxertia e aclimatização das plantas

As gemas desenvolvidas de laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’ foram microenxertadas em plântulas de citrange ‘Carrizo’, já as gemas de laranja ‘Pêra’ foram microenxertadas em laranja ‘Hamlin’, ambas germinadas *in vitro*. Para a microenxertia, foram removidos os cotilédones e o ápice dos porta-enxertos, e as gemas provenientes da transformação foram microenxertadas na região terminal removida do porta-enxerto. As plantas microenxertadas foram mantidas *in vitro* e incubadas sob fotoperíodo de 16 horas, a 27°C. Após 45 dias, as plantas foram transferidas para vasos plásticos contendo substrato autoclavado (Plantmax™) e incubadas em condições de alta umidade até a completa aclimatização para condição ambiente. As plantas analisadas e identificadas como possíveis transgênicas foram transferidas para vasos maiores e mantidas em casa de vegetação.

### 3.1.7 Teste histoquímico GUS e análises moleculares

Para o teste histoquímico GUS, pequenos segmentos de folhas dos brotos foram cortados e incubados em solução X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronideo) a 37°C, no escuro por 16 horas. Após este período, o material foi lavado com etanol (70%) para a retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul do tecido vegetal.

DNA das plantas GUS positivas (GUS+) foi extraído pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com a maceração de folhas com nitrogênio líquido, e analisado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se ‘primers’ específicos para a detecção do transgene. A amplificação foi realizada utilizando-se 2 µL de DNA (50-100 ng), 0,2 µL dNTPs (10 mM), 0,8 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,0 µL de tampão (10X), 0,3 µL Taq polimerase (5 U/µL) e 0,3 µL dos ‘primers’ (10 µM). Para o gene *cecropin* MB39, foram utilizados os ‘primers’: CEC-F (5’ - ATG GGT AAG AAG TCT CAT ATT 3’) e CEC-R (5’ TCA ACC CAA AGC CTT AG - 3’) e as reações foram submetidas no termociclador (PTC-100™, MJ Research, Inc.) com o programa:

94°C/2min, 40 ciclos de (94°C/15s, 52°C/30s, 72°C/30s) e 72°C/4min, amplificando um fragmento de 189 pb. A amplificação do gene GUS foi obtida utilizando-se os ‘primers’: GUS-F (5’ – CAA CGA ACT GAA CTG GCA G – 3’) e GUS-R (5’- CAT CAC CAC GCT TGG GTG – 3’), utilizando o programa: 94°C/2min, 40 ciclos de (94°C/15s, 60°C/30s, 72°C/40s) e 72°C/4min, amplificando um fragmento de 620 pb. O produto da PCR foi separado por eletroforese, em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>).

As plantas PCR positivas (PCR+) foram analisadas por ‘Southern blot’ para confirmar a integração estável do transgene no genoma da planta. DNA foi extraído de folhas jovens das plantas pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) acrescentando-se uma lavagem com fenol e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para uma melhor purificação. Aproximadamente 60 µg de DNA foram digeridos com a enzima de restrição *Hind*III, separados em gel de agarose (1%) por eletroforese e transferidos para membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences). A sonda para o gene *cecropin* MB39 foi preparada por PCR e os fragmentos amplificados foram purificados e submetidos à marcação com o kit “AlkPhos Direct Labelling Reagents” (Amersham Biosciences). As hibridizações foram realizadas a 60°C e a reação de detecção foi feita com o kit “CDP-Star<sup>TM</sup> Detection Reagent” (Amersham Biosciences).

### **3.2 Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene *cecropin* MB39**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Insetos Vetores (LIV) no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e casas de vegetação do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) na Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba-SP.

#### **3.2.1 Seleção e produção das mudas**

Foram selecionadas nove plantas de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) transformadas com o gene *cecropin* MB39, sendo que em quatro plantas o gene é dirigido pelo promotor PAL de citros (CsPP) e nas outras cinco pelo promotor constitutivo CaMV 35S. Foram realizadas análises de PCR e ‘Southern blot’ para confirmar a integração do gene *cecropin* MB39

nessas plantas, de acordo com a metodologia descrita em item anterior. Essas plantas foram multiplicadas por borbulhia, em que gemas de ramos maduros foram enxertadas em porta-enxerto de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck). Quinze plantas de cada transgênico foram produzidas seguindo o sistema de produção de mudas certificadas do Estado de São Paulo. Outras 20 plantas foram produzidas a partir de laranja ‘Valência’ (não transgênica) para servirem de controle, totalizando 155 plantas. As plantas foram cultivadas em sacos plásticos (35x20 cm) contendo substrato Rendmax Citrus™ e mantidas em casa de vegetação protegidas com telas antiafídicas durante todo o experimento. As plantas foram podadas três meses antes da inoculação para uniformizar as brotações e foram submetidas ao estresse hídrico, com no mínimo 24 horas sem irrigação, para absorção eficiente do inóculo.

### **3.2.2 Preparação do isolado bacteriano e inoculação das plantas**

Para o experimento de inoculação, utilizou-se a estirpe CCT 6570 de *Xylella fastidiosa* isolada de citros, cedida pelo Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes do Laboratório de Insetos Vetores do Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ-USP), mantidas em tampão de preservação succinato citrato fosfato (SPC) acrescido de 30% de glicerol à temperatura de -80°C. Os isolados foram então retirados deste tampão e repicados duas vezes em placas de Petri contendo meio de cultura sólido ‘periwinkle wilt gelrite’ (PWG) (HILL; PURCELL, 1995a) a 28°C durante 15-20 dias. Após esse período, realizou-se uma suspensão bacteriana com o tampão fosfato salino (PBS) (HILL; PURCELL, 1995b). Essa suspensão foi diluída em série até 10<sup>9</sup> e 40 µL dessas diluições foram plaqueadas em meio de cultura PWG sólido para posterior quantificação. A incubação dessa placas foi feita a 28°C durante 15 dias, quando então foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias utilizando estereoscópio, determinando uma concentração equivalente a 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Foram marcados dois pontos de inoculação por planta nos ramos. A inoculação foi realizada mecanicamente depositando-se 5 µL da suspensão bacteriana em cada ponto, e perfurando-se o local por 10 vezes com alfinete entomológico nº0. Foram inoculadas todas as plantas produzidas a partir de plantas transgênicas. Assim como quinze plantas produzidas a partir de plantas não transgênicas para servirem como controles positivos. As outras cinco plantas

provenientes de plantas não transgênicas foram inoculadas apenas com tampão PBS, para servirem de controle negativo.

### **3.2.3 Isolamento primário e quantificação bacteriana**

No isolamento primário e quantificação da população bacteriana das plantas de citros inoculadas, utilizou-se o método de isolamento em meio de cultura descrito por Hill e Purcell (1995b) adaptado por Almeida et al. (2001).

Os isolamentos foram realizados com quatro e dez meses após a inoculação. Aos quatro meses foram coletadas duas folhas na região do ponto de inoculação para avaliação da eficiência de inoculação e a população bacteriana e aos dez meses foram coletadas duas folhas 50 cm acima do ponto de inoculação para observação da população e movimentação bacteriana. As folhas foram limpas com etanol (92,8%), o pecíolo e parte da nervura central de cada amostra foram destacados com uma lâmina e pesados em balança semi-analítica (10-20 mg por amostra). Em câmara de fluxo laminar, cada amostra passou por cinco banhos de imersão de dois minutos em recipientes contendo álcool (92,8%) (uma vez), hipoclorito de sódio (2%) (uma vez), e água destilada estéril (três vezes) para desinfestação superficial. Após a desinfecção, as amostras foram cortadas em segmentos de 1-2 mm sobre papel filtro estéril, com o auxílio de uma lâmina esterilizada, e colocadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão PBS autoclavado. As amostras dentro dos tubos foram trituradas em homogeneizador tipo Turrax<sup>®</sup> (modelo MA102, Marconi S.A.) por 15 segundos, com a rotação da haste giratória de aproximadamente 25.000 rpm. A cada trituração, a haste foi desinfetada por imersão em recipientes contendo água destilada estéril (5 segundos), álcool 92,8% (15 segundos) e novamente água destilada estéril (5 segundos). Duas alíquotas de 20 µL da suspensão homogeneizada de cada amostra e duas alíquotas de 20 µL da suspensão diluída 10 vezes em tampão PBS foram plaqueadas em meio de cultura PWG sólido. As placas foram acondicionadas a 28°C durante 15-20 dias, sendo posteriormente avaliadas em estereoscópico quanto ao número médio de unidades formadoras de colônias (UFC) nas duas alíquotas. Para confirmação da identidade da bactéria *X. fastidiosa*, análises de PCR foram realizadas em 30% das colônias desenvolvidas no isolamento.

A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC por grama de tecido vegetal (UFC/g), foi calculada com base na massa inicial das amostras foliares e nas diluições do

material vegetal em tampão PBS, utilizando-se a fórmula:  $C = 100 \cdot (1/p) \cdot \text{UFC} \cdot (10)^n$ , onde p é o peso da amostra foliar (g) e n é o fator de diluição. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada planta transgênica foi considerada como um tratamento com 15 repetições (uma planta por parcela). Os dados da quantificação bacteriana obtidas no isolamento foram transformados para Log UFC/g de tecido e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

### 3.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Xylella fastidiosa*

A extração de DNA foi baseada no protocolo desenvolvido por Murray e Thompson (1980). Retirou-se a parte restante da nervura central das mesmas folhas usadas no isolamento aos quatro meses e maceradas com a ajuda de um pistilo em cadinho no próprio tampão de extração.

Para a amplificação do DNA extraído, foram utilizados os ‘primers’ CVC-1 (5’AGA TGA AAA CAA TCA TGC AA 3’) e 272-2-int (5’GCC GCT TCG GAG AGC ATT CCT 3’) (POOLER; HARTUNG, 1995), que amplificam um fragmento de 500 pb e são específicos para *X. fastidiosa* de citros (COLETTA FILHO; MACHADO, 2001). A reação da PCR foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (10x), 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  Taq polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  dos ‘primers’ (10  $\mu\text{M}$ ) e 3  $\mu\text{L}$  de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador com o programa: 94°C/4min, 30 ciclos de (94°C/1min, 62°C/1,5min, 72°C/1,5min) e 72°C/10min (POOLER; HARTUNG, 1995). Foi realizada uma PCR das colônias crescidas no isolamento, selecionadas aleatoriamente, para a confirmação da identidade de *X. fastidiosa*. Colônias de cinco placas de cada tratamento foram retiradas com alça de platina estéril e diluídas em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE. A partir dessa suspensão, utilizou-se 2  $\mu\text{L}$  para reação da PCR, seguindo o mesmo procedimento da amplificação de DNA de folha. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e visualizado em luz ultravioleta.

### **3.2.5 Avaliação sintomática foliar**

As avaliações dos sintomas nas folhas, características de plantas com CVC, foram visuais contando-se o número de folhas com sintomas de cada repetição. As plantas foram avaliadas com quatro, seis e oito meses a partir da inoculação, no momento em que os sintomas começaram a se manifestar. A incidência da doença foi determinada pela proporção de plantas sintomáticas em relação ao total de plantas por tratamento. A porcentagem de folhas sintomáticas para cada planta foi determinada aos oito meses após a inoculação da seguinte forma: (nº. de folhas sintomáticas/ nº. total de folhas) x 100.

As folhas que apresentavam sintomas que não correspondiam aos da CVC como deficiência de nutrientes, ferimentos causados por espinhos ou até mesmo manchas cloróticas causadas pela aplicação de defensivos agrícolas, não foram consideradas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Transformação genética

Foram realizados 39 experimentos de transformação genética, para os cultivares de laranja ‘Hamlin’ e laranja ‘Pêra’ com os vetores CsPPCEC/2201 e AtPPCEC/2201 e os cultivares de laranja ‘Hamlin’ e laranja ‘Valência’ com o vetor AtPP-GUS/2201. Gemas transformadas geneticamente foram obtidas pelo protocolo de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando-se como fonte de explantes tecidos juvenis de plantas germinadas *in vitro* (segmentos de epicótilo) e mantidas em casa de vegetação (segmentos internodais) (Figura 4). A eficiência de transformação foi obtida pelo cálculo da porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética.

Nas transformações genéticas com laranja ‘Hamlin’, foram obtidas quatro gemas GUS+ utilizando o vetor AtPPCEC/2201 (Tabela 1). Estas gemas foram microenxertadas em citrange ‘Carrizo’, regeneradas e aclimatizadas para condições de casa de vegetação. A confirmação da inserção do gene *cecropin* MB39 no genoma vegetal dessas plantas foi feita por PCR, amplificando um fragmento esperado de 189 pb (Figura 5). Após o crescimento dessas plantas, análises de ‘Southern blot’ confirmaram a integração estável do transgene no genoma das plantas através da hibridização da sonda do gene *cecropin* MB39. Em duas plantas transgênicas ocorreram a integração de no mínimo uma cópia do transgene, já para as outras duas plantas ocorreram a integração de no mínimo três cópias (Figura 5).

Tabela 1 - Número de gemas adventícias e total de explantes (segmentos de epicótilo) de laranja ‘Hamlin’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação<sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas

<b>Experimentos</b>	<b>Número de gemas/ total de explantes (%)</b>	<b>Gemas GUS+</b>	<b>Eficiência de transformação (%)</b>	<b>Plantas aclimatizadas</b>
1	18/600 (3)	4	0,67	4
2	16/600 (2,6)	0	0	0
3	40/300 (13,3)	0	0	0
4	128/600 (21,3)	0	0	0
5	95/600 (15,8)	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>297/2700</b>	<b>4</b>		<b>4</b>

<sup>(1)</sup> Porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética

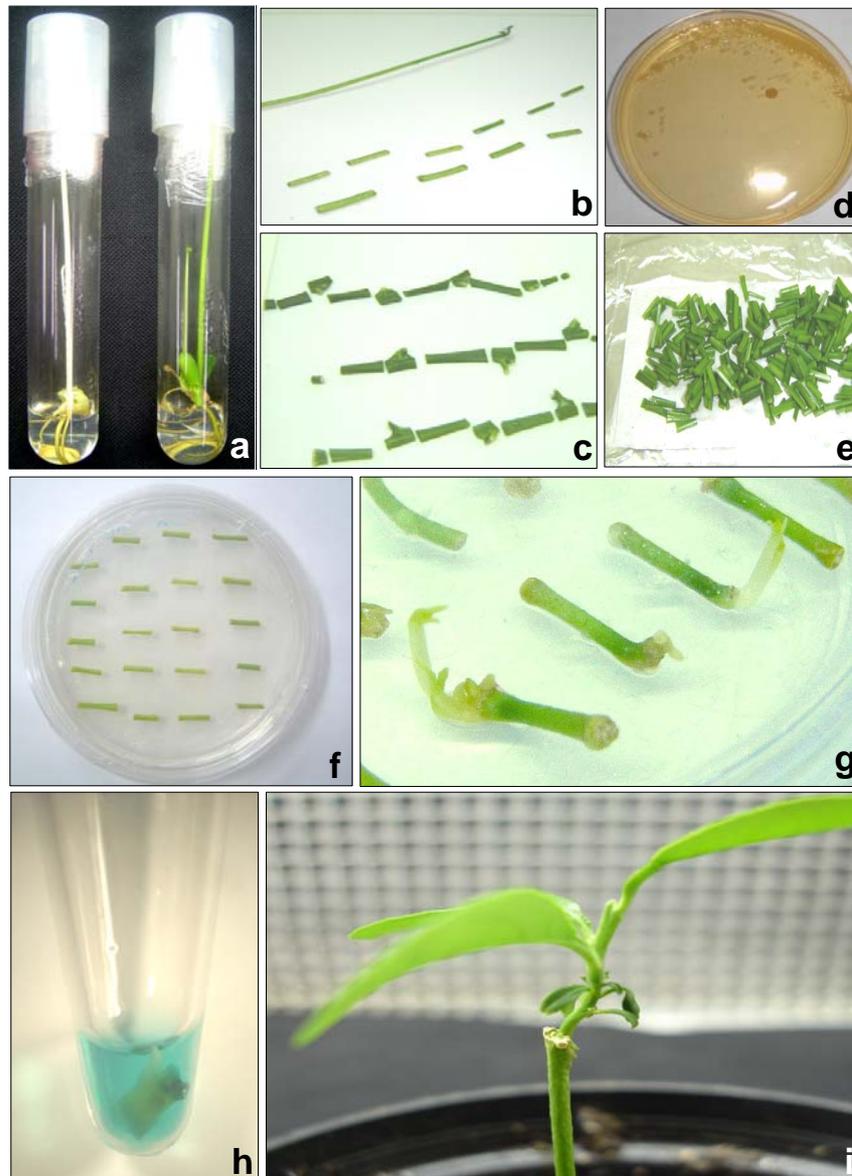


Figura 4 – Transformação genética de citros via *Agrobacterium tumefaciens*. **a.** Plântulas germinadas *in vitro* na ausência de luz (esquerda) para estiolamento do epicótilo e após 15 dias (direita) em fotoperíodo de 16 h de luz; **b.** Segmentos de epicótilo (0,8 a 1,0 cm) utilizados como fonte de explantes; **c.** Segmentos internodais (0,8 a 1,0 cm) utilizados como fonte de explantes; **d.** Meio de cultura com crescimento de colônias de *Agrobacterium tumefaciens*; **e.** Secagem dos explantes após inoculação com *A. tumefaciens* a temperatura ambiente em papel filtro estéril; **f.** Plaqueamento dos explantes em meio de cultura para o co-cultivo; **g.** Regeneração de gemas adventícias em meio de cultura seletivo; **h.** Resultado positivo do teste histoquímico GUS; **i.** Gema transgênica microenxertada e aclimatizada

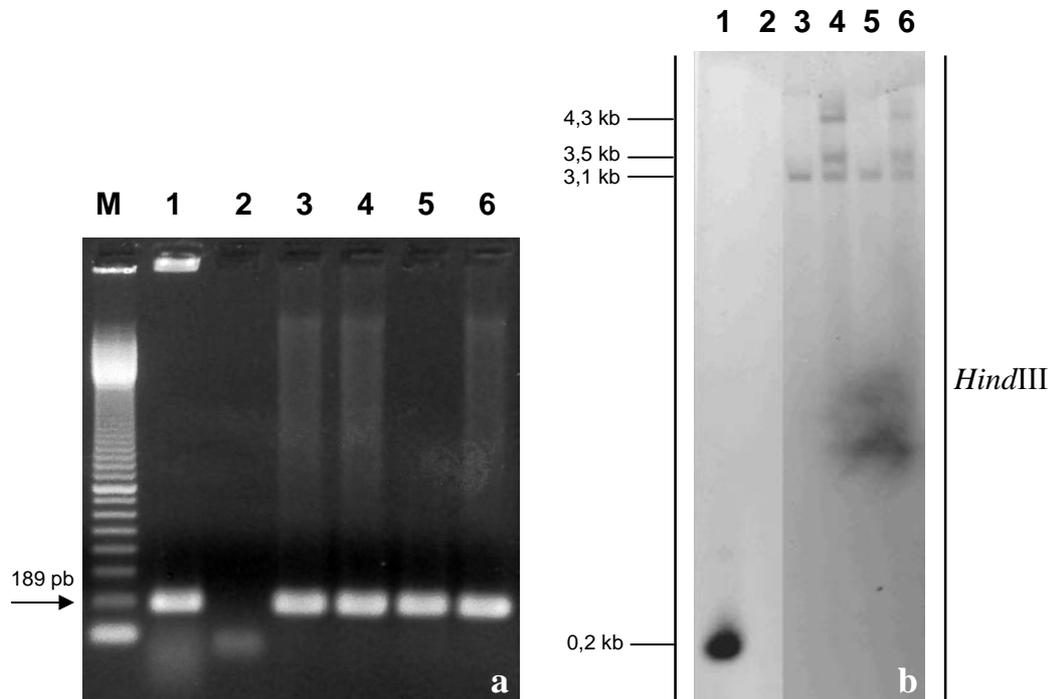


Figura 5 – Análise molecular das plantas de laranja ‘Hamlin’ regeneradas do experimento de transformação com o vetor AtPPCEC/2201 **a.** Análise da PCR com ‘primers’ específicos para o gene *cecropin* MB39: M= marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); 1= controle positivo (vetor AtPPCEC/2201); 2= controle negativo (planta não transgênica); 3 a 6= plantas transgênicas **b.** Análise de ‘Southern blot’ utilizando sonda do gene *cecropin* MB39: 1= controle positivo (fragmento do gene *cecropin* MB39 amplificado por PCR); 2= controle negativo (planta não transgênica); 3 a 6= DNA de plantas transgênicas digerido com a enzima *HindIII*

Utilizando-se o vetor CsPPCEC/2201 (Tabela 2), sete gemas GUS+ de laranja ‘Hamlin’ foram obtidas. Quatro gemas foram microenxertadas em citrange ‘Carrizo’ e aclimatizadas para condições de casa de vegetação. As outras três gemas obtidas não se desenvolveram o suficiente para a microenxertia. As plantas regeneradas foram confirmadas transgênicas por meio da PCR amplificando um fragmento de 189 pb (Figura 6).

Nas transformações genéticas de laranja ‘Hamlin’ com o vetor AtPP-GUS/2201 (Tabela 3), seis gemas GUS+ foram constatadas, das quais duas foram microenxertadas em citrange ‘Carrizo’ e aclimatizadas. A confirmação da inserção do gene GUS foi obtida pela PCR amplificando um produto de 817 pb (Figura 6). Essas plantas serão submetidas às análises histológicas para uma melhor localização da expressão do produto do gene GUS no tecido vegetal, não podendo ser feito até agora pelo tamanho ainda reduzido das plantas.

Tabela 2 - Número de gemas adventícias e total de explantes (segmentos de epicótilo) de laranja ‘Hamlin’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor CsPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação<sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas

Experimentos	Número de gemas/ total de explantes (%)	Gemas GUS+	Eficiência de transformação (%)	Plantas aclimatizadas
1	19/600 (3,1)	0	0	0
2	85/300 (28,3)	0	0	0
3	3/315 (0,9)	0	0	0
4	8/335 (2,4)	0	0	0
5	8/306 (2,6)	1	0,32	0
6	20/518 (3,8)	0	0	0
7	48/510 (9,4)	2	0,39	1
8	64/360 (17,7)	1	0,27	0
9	22/446 (4,9)	1	0,22	1
10	21/364 (5,7)	0	0	0
11	39/332 (11,7)	1	0,30	1
12	31/410 (7,5)	1	0,24	1
<b>TOTAL</b>	<b>368/4796</b>	<b>7</b>		<b>4</b>

<sup>(1)</sup> Porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética

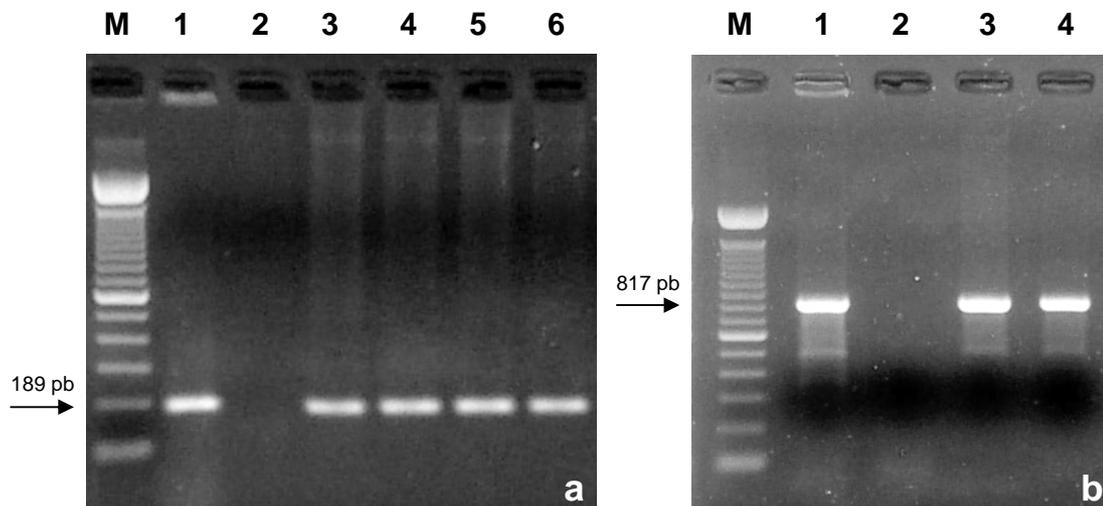


Figura 6 – Análise da PCR das plantas regeneradas de laranja ‘Hamlin’ **a.** PCR com ‘primers’ específicos para o gene *cecropin* MB39: M= marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); 1= controle positivo (vetor CsPPCEC/2201); 2= controle negativo (planta não transgênica); 3 a 6= plantas transgênicas **b.** PCR com ‘primers’ específicos para o gene GUS: M= marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); 1= controle positivo (vetor AtPP-GUS/2201); 2= controle negativo (planta não transgênica); 3 a 4= plantas transgênicas

Tabela 3 - Número de gemas adventícias e total de explantes (segmentos de epicótilo) de laranja ‘Hamlin’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPP-GUS/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação<sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas

<b>Experimentos</b>	<b>Número de gemas/ total de explantes (%)</b>	<b>Gemas GUS+</b>	<b>Eficiência de transformação (%)</b>	<b>Plantas aclimatizadas</b>
1	45/412 (10,9)	1	0,24	1
2	24/330 (7,27)	3	0,90	1
3	12/372 (3,2)	0	0	0
4	52/125 (41,6)	2	1,60	0
<b>TOTAL</b>	<b>133/1239</b>	<b>6</b>		<b>2</b>

<sup>(1)</sup> Porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética

Foi possível a obtenção de plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ com todos os vetores propostos inicialmente, porém com uma eficiência de transformação bastante baixa quando comparadas com plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com outros genes. Mendes et al. (2002) transformaram laranja ‘Hamlin’ com o gene GUS e conseguiram uma eficiência de 34%. A maior eficiência de transformação para laranja ‘Hamlin’ obtida neste trabalho (1,6%) foi nas transformações com o vetor AtPP-GUS/2201 que contém apenas o gene GUS. Nas transformações genéticas de laranja ‘Hamlin’ com o gene *cecropin* MB39, a maior eficiência (0,67%) foi obtida com o vetor AtPPCEC/2201. Azevedo (2005) obteve uma eficiência de 3% quando transformou laranja ‘Hamlin’ com o gene *cecropin* MB39 dirigido pelo promotor CaMV 35S. Altas taxas na eficiência de transformação para laranja ‘Hamlin’ foram também obtidas quando transformadas com o gene da atacina (14%) (BOSCARIOL, 2004). Apesar da alta porcentagem de gemas regeneradas em alguns experimentos (41,6%), muitas dessas gemas foram consideradas escapes (gemas adventícias regeneradas não transformadas).

Para as transformações genéticas de laranja ‘Pêra’, foram obtidas três gemas GUS+ quando utilizado o vetor CsPPCEC/2201 (Tabela 4). Porém, nenhuma planta foi aclimatizada já que as gemas microenxertadas em laranja ‘Hamlin’ (cultivada *in vitro*) não sobreviveram durante a aclimatização. As maiores porcentagens de regeneração de gemas (23,9%) foram obtidas nas transformações com explantes a partir de segmentos de epicótilo obtidos de plantas germinadas *in vitro*. Explantes oriundos de segmentos internodais apresentaram baixa regeneração de gemas.

Tabela 4 - Número de gemas adventícias e total de explantes (segmentos de epicótilo) de laranja 'Pêra' utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor CsPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação<sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas

<b>Experimentos</b>	<b>Número de gemas/ total de explantes (%)</b>	<b>Gemas GUS+</b>	<b>Eficiência de transformação (%)</b>	<b>Plantas aclimatizadas</b>
1	9/600 (1,5)	0	0	0
2	14/380 (3,6)	0	0	0
3	151/630 (23,9)	0	0	0
4 <sup>(2)</sup>	5/274 (1,8)	0	0	0
5	27/228 (11,8)	1	0,43	0
6 <sup>(2)</sup>	3/340 (0,8)	0	0	0
7	15/292 (5,1)	2	0,68	0
<b>TOTAL</b>	<b>224/2744</b>	<b>3</b>		<b>0</b>

<sup>(1)</sup> Porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética

<sup>(2)</sup> Experimentos de transformação genética que teve como fonte de explantes segmentos internodais de plantas mantidas em casa de vegetação

Nas transformações genéticas de laranja 'Pêra' utilizando o vetor AtPPCEC/2201, foi obtida apenas uma gema GUS+ que não se desenvolveu o suficiente para a microenxertia (Tabela 5). Para este vetor, explantes provenientes de segmentos internodais apresentaram uma grande regeneração de gemas (38,3%), porém a maioria não se desenvolveu o suficiente para a microenxertia.

Tabela 5 - Número de gemas adventícias e total de explantes (segmentos de epicótilo) de laranja 'Pêra' utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPPCEC/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação<sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas

<b>Experimentos</b>	<b>Número de gemas/ total de explantes (%)</b>	<b>Gemas GUS+</b>	<b>Eficiência de transformação (%)</b>	<b>Plantas aclimatizadas</b>
1	46/600 (7,6)	0	0	0
2	31/400 (7,7)	0	0	0
3	0/250 (0)	0	0	0
4	35/453 (7,7)	0	0	0
5 <sup>(2)</sup>	11/241 (4,5)	0	0	0
6 <sup>(2)</sup>	115/300 (38,3)	1	0,33	0
7	14/320 (4,3)	0	0	0
8	7/300 (2,3)	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>259/2864</b>	<b>1</b>		<b>0</b>

<sup>(1)</sup> Porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética

<sup>(2)</sup> Experimentos de transformação genética que teve como fonte de explantes segmentos internodais de plantas mantidas em casa de vegetação

Na tentativa de melhorar o desenvolvimento dessas gemas, sub-cultivos foram realizados a cada quinze dias, retirando o antibiótico canamicina e acrescentando regulador para alongamento (1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico). O antibiótico canamicina pode influenciar no desenvolvimento de gemas (MOLINARI et al., 2004), entretanto não houve mudanças no desenvolvimento.

Foram realizadas transformações em laranja ‘Valência’ com o vetor AtPP-GUS/2201 obtendo apenas uma gema GUS+ (Tabela 6), mas que também não se desenvolveu para a microenxertia. Plantas transformadas com esse vetor seriam importantes para estudar a expressão do gene GUS sob o promotor PAL clonado de *A. thaliana* (AtPP). Azevedo et al. (2006) transformaram laranja ‘Valência’ com o gene GUS dirigido pelo promotor PAL de citros (CsPP) e observaram a expressão do GUS em células da camada superficial de pecíolos foliares, mas não especificamente nos vasos do xilema. Plantas transformadas de tabaco com o gene GUS dirigido pelo promotor AtPP (OHL et al., 1990; HARAKAVA, 2000) demonstraram expressão do GUS em células do parênquima do xilema, sugerindo que o promotor PAL clonado de *A. thaliana* seja mais indicado nas transformações visando resistência a *X. fastidiosa*.

Tabela 6 - Número de gemas adventícias e total de explantes (segmentos de epicótilo) de laranja ‘Valência’ utilizados nos experimentos de transformação genética com o vetor AtPP-GUS/2201, total de gemas GUS+, eficiência de transformação<sup>(1)</sup> e total de plantas aclimatizadas

<b>Experimentos</b>	<b>Número de gemas/ total de explantes (%)</b>	<b>Gemas GUS+</b>	<b>Eficiência de transformação (%)</b>	<b>Plantas aclimatizadas</b>
1	13/336 (3,8)	0	0	0
2	8/252 (3,2)	1	0,39	0
3	10/250 (4)	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>31/838</b>	<b>1</b>		<b>0</b>

<sup>(1)</sup> Porcentagem de gemas GUS+ em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética

A eficiência da transformação em citros varia muito conforme o genótipo utilizado, ou até mesmo, com o mesmo genótipo, sendo encontrados valores de 2% (MOORE et al., 1992), 20,6% (PEÑA et al., 1995b) e até 80% (YU et al., 2002) para citrange ‘Carrizo’; 3,6-6,6% para laranja azeda, quando utilizados vetores diferentes (GHORBEL et al., 2000); 6,7% para lima ácida ‘Galego’ (PEÑA et al., 1997) e 7,9% para laranja ‘Pineapple’ (PEÑA et al., 1995a). Entre os cultivares de laranja doce também ocorrem variações na eficiência de transformação. Boscariol (2004) utilizando o gene *Xa21*, conseguiu uma eficiência de 18,6% para laranja

‘Hamlin’, 11,3% para laranja ‘Valência’, 7,3 a 9,3% para laranja ‘Natal’ e 2 a 4% para laranja ‘Pêra’. Azevedo (2005) utilizando o gene *cecropin* MB39 obteve uma eficiência de 3,3 a 4,5% para laranja ‘Valência’, 2,5 a 3% para laranja ‘Hamlin’, 1,6 a 2% para laranja ‘Natal’ e 0,5% para laranja ‘Pêra’. O cultivar ‘Pêra’ tem-se mostrado um genótipo mais difícil de regenerar plantas transformadas, independente do gene utilizado. Schinor (2006) realizou transformações genéticas de laranja ‘Pêra’ com o gene da capa protéica do vírus da tristeza do citros (CTV) e não obteve gemas transformadas, e para laranja ‘Hamlin’, conseguiu em média uma eficiência de transformação de 0,84% utilizando construções contendo seqüências gênicas do CTV relatando um grande número de escapes.

Neste trabalho também foi observado um alto número de escapes, para os três cultivares transformados, sendo que em laranja ‘Hamlin’ foi o cultivar com maior regeneração de gemas não transformadas. Um dos problemas encontrados na transformação genética de citros é, justamente, a ocorrência de uma alta porcentagem de regeneração de escapes e brotos quiméricos (PEÑA et al., 1995a; GUTIÉRREZ; LUTH; MOORE, 1997). Alguns trabalhos relatam a ocorrência de escapes para 95% dos brotos regenerados de citrange ‘Carrizo’, citrumelo ‘Swingle’, lima ácida ‘Galego’ e 92% de laranja ‘Pineapple’ (MOORE et al., 1992; PEÑA et al., 1995a). A seleção ineficiente de brotos transformados, gerando a ocorrência de escapes, pode ser atribuída à proteção que as células transformadas fazem às células não-transformadas da ação do agente seletivo, além disso, a persistência da *A. tumefaciens* por um longo período no tecido da planta após o co-cultivo induz à falsos positivos (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

#### **4.2 Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* em plantas transformadas com o gene *cecropin* MB39**

As quatro plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ contendo o promotor PAL de citros avaliadas quanto a resistência a *X. fastidiosa* constituem os tratamentos CsPP2, CsPP3, CsPP4 e CsPP5. As demais cinco plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ com o promotor CaMV 35S constituem os tratamentos 35S1, 35S3, 35S7, 35S12 e 35S13.

A confirmação da inserção do gene *cecropin* MB39 nas plantas de laranja ‘Valência’ foi através das análises de PCR, amplificando um fragmento de 189 pb (Figura 7). Análises de ‘Southern blot’ utilizando sonda para o gene *nptII* confirmou a integração estável do transgene

para três plantas transformadas com o promotor CsPP (CsPP3, CsPP4 e CsPP5), já utilizando sonda para o gene *cecropin* MB39 foi possível confirmar a integração do transgene em uma planta transformada com o promotor CaMV 35S (35S3) (Figura 7).

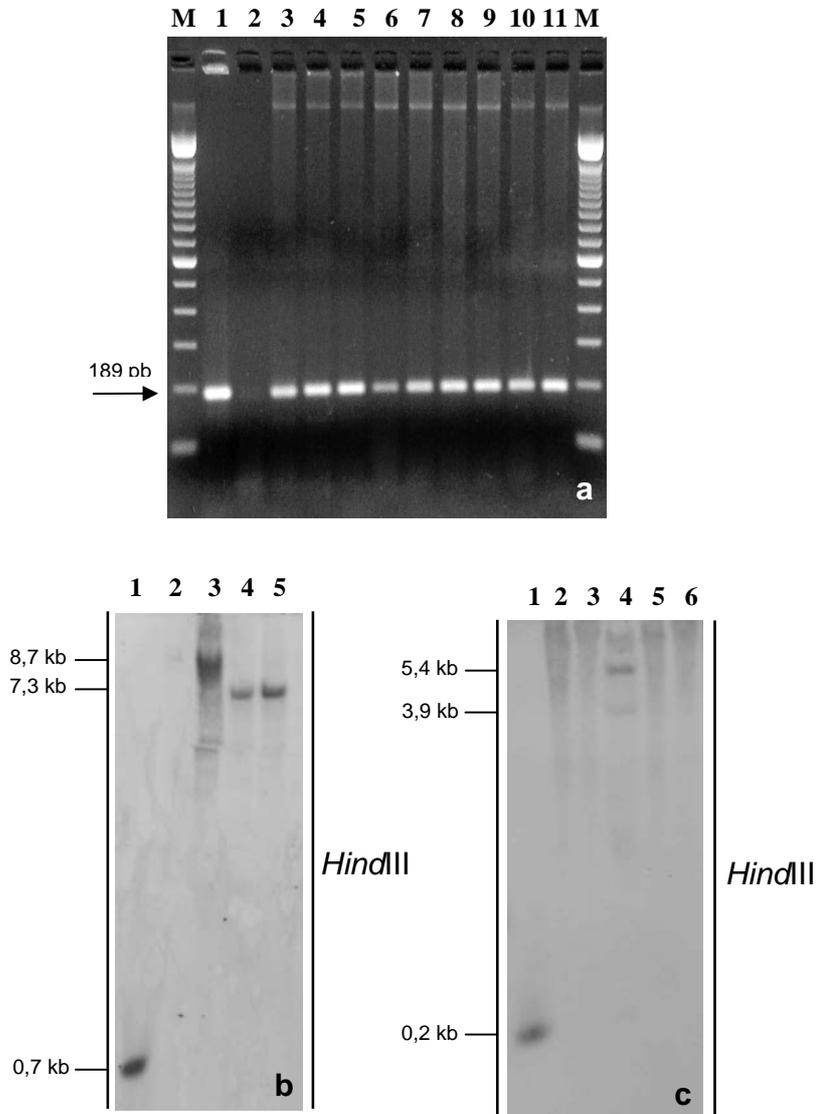


Figura 7 - Análise molecular das plantas de laranja 'Valência' regeneradas dos experimentos de transformação genética com o gene *cecropin* MB39 **a.** Análise de PCR com 'primers' específicos para detecção do gene *cecropin* MB39; M= marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); 1= Controle positivo (vetor CsPPCEC/2201); 2= Controle negativo (planta não transgênica); 3 a 6= Plantas transformadas com o promotor CsPP; 7 a 11= Plantas transformadas com o promotor CaMV 35S **b.** Análise de 'Southern blot' utilizando sonda do gene *nptII*; 1= controle positivo (fragmento do gene *nptII* amplificado por PCR); 2 a 5= DNA digerido com a enzima *HindIII* das plantas transformadas com o promotor CsPP **c.** Análise de 'Southern blot' utilizando sonda do gene *cecropin* MB39; 1= controle positivo (fragmento do gene *cecropin* MB39 amplificado por PCR); 2 a 6= DNA digerido com a enzima *HindIII* das plantas transformadas com o promotor CaMV 35S

Devido à dificuldade encontrada neste trabalho para as análises de ‘Southern blot’, não foi possível obter resultados positivos para as outras plantas avaliadas. Os resultados obtidos do isolamento primário aos quatro e dez meses mostram que o sistema de inoculação em citros com a bactéria *Xylella fastidiosa* foi eficiente, pois ocorreu o crescimento da bactéria na maioria das placas com meio de cultura. A detecção da bactéria pela PCR aos quatro meses apresentou uma porcentagem maior do que a do isolamento, de mesmo período, mostrando que a detecção por PCR foi mais eficiente (Tabela 7). Isso ocorre porque a PCR permite um diagnóstico relativamente rápido com uma alta sensibilidade ( $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>), enquanto que o isolamento em meio de cultura possui uma sensibilidade limite de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> (POOLER; HARTUG, 1995; ALMEIDA et al., 2001). Nas plantas controle negativo (não transgênicas e não inoculadas) não foram detectadas colônias bacterianas de *X. fastidiosa* nos isolamentos, indicando que não ocorreram contaminações da bactéria durante os isolamentos em meio de cultura. Análises de PCR deram negativas para essas plantas e não apareceram sintomas de CVC, comprovando que não houve disseminação do patógeno entre as plantas mantidas em casa de vegetação.

Tabela 7 - Avaliação da infecção das plantas transgênicas de laranja ‘Valência’, contendo o gene *cecropin* MB39, 4 e 10 meses após a inoculação com *Xylella fastidiosa*

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Plantas infectadas		
	Isolamento da bactéria (4 meses - %)	PCR (4 meses - %)	Isolamento da bactéria (10 meses - %)
CsPP2	85,7	92,8	100
CsPP3	66,6	100	100
CsPP4	100	100	100
CsPP5	100	100	100
35S1	86,6	93,3	93,3
35S3	100	100	86,6
35S7	93,3	93,3	93,3
35S12	93,3	93,3	100
35S13	100	93,3	100
TEST	93,3	93,3	100
<b>Média</b>	<b>91,8</b>	<b>95,9</b>	<b>97,3</b>

<sup>(1)</sup> CsPP = plantas transformadas com o promotor PAL de citros; 35S = plantas transformadas com o promotor CaMV 35S; TEST = plantas não transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa* (controle)

As médias da população bacteriana das plantas transformadas geneticamente não diferiram da planta controle (não transgênica), quando quantificadas aos quatro meses (Figura 8). Entre os tratamentos, as médias variaram de 3,4 a 6,2 Log UFC/g de tecido, indicando que uma grande concentração do patógeno foi inoculada inicialmente. Essa alta concentração pode ter

impedido uma resposta de defesa da planta, seja ela natural ou oriunda da expressão gênica exógena inserida geneticamente.

Aos dez meses após a inoculação bacteriana, foi realizado o isolamento primário a partir de duas folhas das plantas transgênicas retiradas a 50 cm acima do ponto de inoculação, permitindo assim verificar a movimentação sistêmica da bactéria. Em todos os tratamentos verificou-se a presença de *X. fastidiosa*, indicando que a bactéria migrou para a região do ápice das plantas confirmando a movimentação sistêmica da bactéria pela planta. As médias populacionais de *X. fastidiosa* de três plantas transformadas com o gene *cecropin* MB39 dirigido pelo promotor CaMV 35S (35S1, 35S3 e 35S7) foram inferiores às médias populacionais constatadas na planta controle (Figura 8).

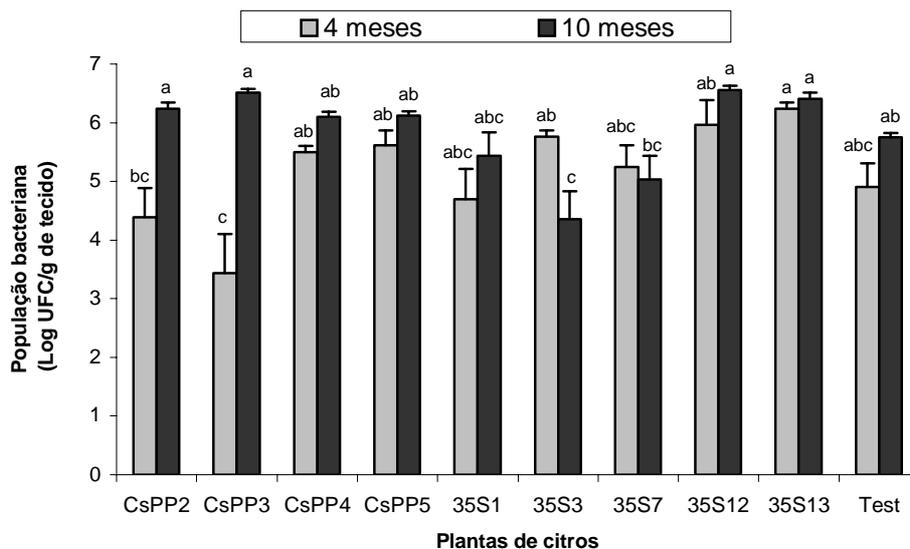


Figura 8 - População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC/g de tecido) em plantas de laranja 'Valência' transformadas com o gene *cecropin* MB39 aos 4 e 10 meses após a inoculação. CsPP = plantas transformadas com o promotor PAL de citros; 35S = plantas transformadas com o promotor CaMV 35S; Test = planta não transgênica (controle). Barras de erro representam o erro padrão da média. Letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ )

Os tratamentos 35S3 e 35S7 apresentaram uma queda das médias populacionais obtidas ao dez meses após a inoculação da bactéria quando comparadas ao quatro meses após a inoculação, podendo atribuí-la à expressão do gene *cecropin* MB39 impedindo o crescimento da bactéria *X. fastidiosa*. A redução da média populacional bacteriana foi maior para o tratamento

35S3, sendo esta a única a diferir da planta controle. Os tratamentos CsPP são aqueles em que o gene *cecropin* MB39 está sendo controlado pelo promotor PAL clonado de citros (CsPP), enquanto que os tratamentos 35S controlado pelo promotor constitutivo CaMV 35S. Azevedo et al. (2006) analisaram a expressão do gene GUS dirigido pelo promotor CsPP em plantas de laranja ‘Valência’ e verificaram que a expressão foi obtida em células da epiderme do pecíolo cortado e não nos vasos do xilema. As plantas transformadas dos tratamentos CsPP, podem não estar expressando o gene *cecropin* MB39 dentro dos vasos do xilema, local onde a bactéria habita, o que explicaria as altas populações bacterianas encontradas. O promotor CaMV 35S é caracterizado por ser um promotor forte e com alta expressão gênica por todos os tecidos da planta (não específico), sendo relatado em diversos trabalhos com transformação genética de citros e outras espécies. O fato de duas plantas do tratamento 35S (35S3 e 35S7) apresentarem quedas nas médias populacionais bacterianas aos 10 meses, sugere que esse promotor está sendo mais eficiente, em relação ao CsPP, na expressão do gene *cecropin* MB39, dificultando o crescimento e a movimentação sistêmica da bactéria *X. fastidiosa*. As médias da porcentagem de folhas sintomáticas das plantas transgênicas avaliadas aos oito meses, foram maiores do que a média obtida pela planta controle, sendo que apenas no tratamento 35S13 esse aumento diferiu do controle (Figura 9). Os sintomas nas folhas começaram a aparecer com quatro meses após a inoculação, caracterizado por pequenas manchas cloróticas na face adaxial de folhas mais maduras e manchas de cor palha na face abaxial (Figura 10).

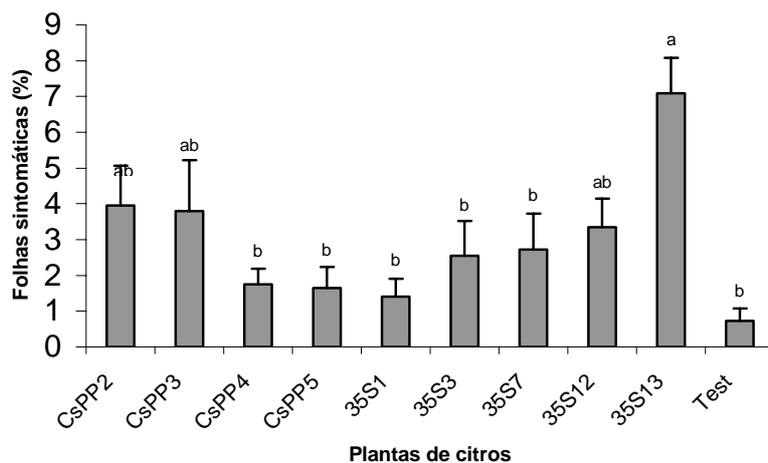


Figura 9 - Porcentagem de folhas sintomáticas em plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ aos 8 meses após a inoculação com *X. fastidiosa*. CsPP = plantas transformadas com o promotor PAL de citros; 35S = plantas transformadas com o promotor CaMV 35S. Barras de erro representam o erro padrão da média. Letras iguais não diferem significativamente no teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ )



Figura 10 - Plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ inoculadas com *X. fastidiosa* **a.** Aspecto geral das plantas mantidas em casa de vegetação **b.** Folhas apresentando sintomas de CVC na face adaxial das folhas **c.** Folhas apresentando sintomas de CVC na face abaxial das folhas

Comparando os resultados da porcentagem de folhas sintomáticas com a população bacteriana, constata-se que não houve uma correlação, já que a menor média da população bacteriana foi encontrada para o tratamento 35S3, porém a menor porcentagem de sintomas foliares foi da planta controle. Os tratamentos CsPP2, CsPP3, 35S12 e 35S13 apresentaram as maiores médias populacionais bacterianas aos dez meses e as maiores porcentagens de folhas sintomáticas.

Ao analisarmos os resultados obtidos da planta controle (não transgênica) nos experimentos com inoculação da *X. fastidiosa*, verificou-se que se tratou da menor porcentagem de folhas sintomáticas, apesar de ter uma eficiência de inoculação de 93% e uma população bacteriana dentro da média obtida na maioria dos tratamentos. Isso pode ser explicado pelo fato de plantas cítricas de laranja ‘Valência’ apresentarem suscetibilidades diferentes à bactéria *Xylella fastidiosa* nos estágios de maturação dos tecidos vegetais, já que as plantas controle foram obtidas de borbulheiras adultas (tecido maduro), enquanto que as plantas dos tratamentos avaliados foram originadas de borbulhas das plantas matrizes transgênicas regeneradas por cultura de tecido com, aproximadamente, dois anos e meio (tecido juvenil). Devido a esses problemas, experimentos adicionais realizados pela equipe de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), avaliaram a diferença de plantas de laranja ‘Valência’ não transgênicas juvenis e adultas quanto à suscetibilidade a *Xylella fastidiosa*, inoculadas e quantificadas da

mesma forma deste trabalho, e revelaram que plantas juvenis apresentaram mais sintomas e populações bacterianas do que as plantas adultas (dados não publicados).

Tendo em vista esses resultados, a planta transgênica 35S3 inibiu o crescimento e movimentação da *X. fastidiosa* significativamente, mesmo quando comparada com uma planta adulta não transformada. Talvez se esse experimento fosse conduzido utilizando uma controle juvenil, essa diferença seria mais evidente, podendo também aparecer outras plantas transgênicas diferindo da testemunha, como no caso da 35S7, que apresentou uma baixa média populacional porém não significativa. A planta 35S3 foi analisada por Azevedo (2006) quanto à resistência à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, utilizando-se folhas destacadas perfuradas com agulha de 0,56 mm e imersas em solução contendo o patógeno, e relatou uma significativa tolerância quando comparada à testemunha. Isso demonstra que o peptídeo cecropina proporciona uma ação tóxica para as bactérias *X. fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

## 5 CONCLUSÕES

- Foi possível a obtenção de gemas GUS+ para os cultivares de laranja ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ via *Agrobacterium tumefaciens* com os vetores CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 e AtPP-GUS/2201.
- Plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ contendo os vetores CsPPCEC/2201, AtPPCEC/2201 ou AtPP-GUS/2201 foram regeneradas e aclimatizadas.
- Uma planta transgênica de laranja ‘Valência’ contendo o gene *cecropin* MB39 dirigido pelo promotor CaMV 35S apresentou tolerância a *Xylella fastidiosa*.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 4, p. 382-386, 2001.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2003.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa* – Adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ANDERSEN, P.C.; ISHIDA, M.L.; MOMOL, E.A.; BRODBECK, B.V.; LEITE, B.; MOMOL, M.T. Influence of *Vitis* xylem fluid plus cecropin on growth of *Xylella fastidiosa*. **Vitis**, Berlin, v. 43, n. 1, p. 19-35, 2004.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 6, p. 127-143.
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (bO), cecropina e gus**. 2005. 76 p. Tese (Doutorado em fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.J.M.; HARAKAVA, R.; GABRIEL, D.W.; LEE, R.F. *GUS* gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valencia' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1623-1628, 2006.
- BARBOSA, J.M. **Estudos de fatores que influenciam o processo de transformação genética em citros via *Agrobacterium tumefaciens***. 2002. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 28, p. 229-234, 2001.
- BOMAN, H.G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 103-126, 1987.

- BOND, J.E.; ROOSE, M.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 229-234, 1998.
- BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21***. 2004. 87 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - 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**, Berlin, v. 22, p. 122-128, 2003.
- BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; CNPH, 1999. v. 2, p. 679-735.
- BRLANSKY, R.H.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W.; PURCIFULL, D.E.; RAJU, B.C. Immunofluorescent detection of xylem-limited bacteria *in situ*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 11, p. 1444-1448, 1982.
- CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, p. 26-30, 2000.
- CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, p. 271-278, 1998.
- CHRISTENSEN, B.; FINK, J.; MERRIFIELD, R.B.; MAUZERALL, D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 85, p. 5072-5076, 1988.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132, 2001.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.

- DAVIS, M.J.; GILLASPIE JUNIOR, A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, H.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria. Including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. nov., subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 34, n. 2, p. 107-117, 1984.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.427-433, 2000.
- DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterisation 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, 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: IAC; Fundag, 2005. cap. 1, p. 3-15.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.
- DURÁN-VILA, N.; GOGORCENA, Y.; ORTEGA, V.; ORTIZ, J.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Effect of temperature and photosynthetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 11-18, 1992.
- FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 7 maio 2007.
- FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; FATTA DEL-BOSCO, S. GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, p. 450-455, 2000.
- FLORACK, D.; ALLEFS, S.; BOLLEN, R.; BOSCH, D.; VISSER, B.; STIEKEMA, W. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 4, n. 2, p. 132-141, 1995.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agriannual 2007**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. 504 p.
- FRENCH, W.J.; STASSI, D.L.; SCHAAD, N.W. The use of immunofluorescence for the identification of phony peach bacterium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, n. 7, p. 1106-1108, 1978.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v. 2, p. 291-300.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 1, p.61-65, 1990.

FUNDECITRUS. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 10 maio 2007.

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, p. 1183-1189, 2000.

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

GHORBEL, R.; CARMELO, L.; 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, p. 27-36, 2001.

GIACOMIN, L.J.; SZALAY, A.A. Expression of a *PAL1* promoter luciferase gene fusion in *Arabidopsis thaliana* in response to infection by phytopathogenic bacteria. **Plant Science**, Limerick, v. 116, p. 59-72, 1996.

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

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

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**, Berlin, v. 16, p. 745-753, 1997.

HARAKAVA, R. **Citrus variegated chlorosis: development of transgenic resistance and molecular studies of pathogenesis**. 2000. 70 p. Thesis (Ph.D.). University of Florida, Gainesville, 2000.

HIDAKA, T.; OMURA, M. Transformation of citrus protoplasts by electroporation. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Nagoya, v. 62, p. 371-376, 1993.

- HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAK, 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.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 209-212, 1995a.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 11, p. 1368-1372, 1995b.
- HOLFORD, P.; HERNANDEZ, N.; NEWBURY, H.J. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, p. 196-199, 1992.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant disease: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. London: Elsevier Science, 1995. v. 1: Prokaryotes, p. 185-197.
- HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, Washington, v. 179, p. 298-300, 1973.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 nov. 2005.
- ISHIDA, M.L.; ANDERSEN, P.C.; LEITE, B. Effects of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay xylem fluid on cecropin B activity against *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 64, p. 73-81, 2004.
- JAYNES, J.M.; NAGPALA, P.; DESTEFANO-BELTRAN, L.; HONG-HUNG, J.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, S. Expression of a cecropin B lytic peptide analogue in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, Limerick, v. 8, p. 43-53, 1993.
- KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 541-545, 1994.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; STANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70-73, 1987.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, Mishima, v. 64, p. 91-97, 1989.

KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G.; LOPES, J.R.S. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 2000, Campinas. **Proceedings**. Riverside: IOCV, 2000. p. 423.

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**. 1997. 144p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 18, p. 511-558.

LEITE JUNIOR, R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 17, p. 7, 1991.

LUTH, D.; MOORE, G. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 57, p. 219-222, 1999.

MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, p. 53-57, 1994.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 9, p. 223-277.

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

MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; FARIAS, P.C.M.; BENEDITO, V.A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 37, n. 4, p. 256-261, 2001.

MIRCETICH, S.M.; LOWE, S.K.; MOLLER, W.J.; NYLAND, G. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 17-24, 1976.

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. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 379-385, 2004.

MONTANELLI, C.; NASCARI, G. Introduction of an antibacterial gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) using a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Genetic and Breeding**, Florence, v. 45, p. 307-316, 1991.

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

MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 1-21.

MOREIRA, C.S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 116-144.

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

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

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. (Org.). **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2005. 225 p.

NIEDZ, R.P.; MCKENDREE, W.L.; SHATTERS JUNIOR, R.G. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and regeneration of transformed plants. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 39, p. 586-594, 2003.

NORDEEN, R.O.; SINDEN, S.L.; JAYNES, J.M.; OWENS, L.D. Activity of cecropin SB37 against protoplasts from several plant-species and their bacterial pathogens. **Plant Science**, Limerick, v.82, p.101-107, 1992.

NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; DESTEFANO-BELTRAN, L.; JAYNES, J.M. Transgenic Malling 26' apple expressing the *attacin* E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. **Euphytica**, Amsterdam, v. 77, p. 123-128, 1994.

OHL, S.; HEDRICK, S.A.; CHORY, J.; LAMB, C.J. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 837-848, 1990.

PALAZZO, D.A.; CARVALHO, M.L.V. Estimativas de perdas em laranja Natal, por clorose variegada dos citros (CVC), nas colheitas de 1991/92, em Colina, SP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 295, 1993.

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

- PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany**, London, v.94, p.67-74, 2004.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 731-737, 1997.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, p. 616-619, 1995a.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v. 104, p. 183-191, 1995b.
- 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, p. 263-267, 2001.
- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, New York, v. 31, p. 377-381, 1995.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 131-151, 1996.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 55-76, 1999.
- RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J.H.; VAN de PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 133, p. 1051-1071, 2003.
- ROBERTS, S.J.; EDEN-GREEN, S.J.; AMBLER, D.J. *Pseudomonas syzygii*, sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. **Systematic Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1990.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros – revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, p. 1-14, 1990.
- SAKUTA, C.; ODA, A.; YAMAKAWA, S.; SATOH, S. Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap protein of cucumber. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 39, n. 12, p. 1330-1336, 1998.
- SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros.** 2006.

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

SHARMA, A.; SHARMA, R.; IMAMURA, M.; MACHILI, H. Transgenic expression of cecropin B an antibacterial peptide from *Bombix mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight rice. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 484, p. 7-11, 2000.

SHUFFLEBOTTOM, D.; EDWARDS, K.; SCHUCH, W.; BEVAN, M. Transcription of 2 members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction-patterns. **Plant Journal**, York, v.3, p.835-845, 1993.

SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.C.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, v. 406, p. 151-159, 2000.

STEINER, H.; ANDREU, D.; MERRIFIELD, R.B. Binding and action of cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 939, p. 260-266, 1988.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subf. Aurantioideae). In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1943. v. 1, p. 129-474.

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

VANEECHOUTTE, M.; KAMPFER, P.; DE BAERE, T.; FALSÉN, E.; VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al., 1990) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 54, p. 317-327, 2004.

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

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H-Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 37, n. 2, p. 136-143, 1987.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R.; PRIA JUNIOR, W.D.; FELIPPE, M.R.; MIRANDA, V.S.; TEIXEIRA, D do C.; LOPES, J.R.S. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 2, p. 178-181, 2002.

- 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**, Berlin, v. 19, p. 1203-1211, 2000.
- 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**, Limerick, v. 113, 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, p. 147-155, 2002.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, p. 389-395, 2002.

**ANEXO**

## ANEXO A - MEIOS DE CULTURA

Soluções estoque do meio MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969).

<b>MT Macronutrientes estoque (50x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5
KNO <sub>3</sub>	95,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,5
KO <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
<b>MT Micronutrientes estoque (100x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,68
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,86
KI	0,083
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0025
<b>MT Ferro estoque (200x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Na <sub>2</sub> EDTA	7,45
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,57
<b>MT Vitaminas estoque (100x)</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Myo-inositol	10,0
Tiamina-HCL	1,0
Pyridoxina-HCL	1,0
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2

**MT Cálcio estoque (66x)**CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O**g.L<sup>-1</sup>**

22,0

**MT**

MT Macronutrientes estoque (50x)

20,0 mL.L<sup>-1</sup>

MT Micronutrientes estoque (100x)

10,0 mL.L<sup>-1</sup>

MT Vitaminas estoque (100x)

10,0 mL.L<sup>-1</sup>

MT Cálcio estoque (66x)

15,0 mL.L<sup>-1</sup>

MT Ferro estoque (200x)

5,0 mL.L<sup>-1</sup>

Sacarose

25,0 g.L<sup>-1</sup>

Ágar

8,0 g.L<sup>-1</sup>

**Obs:** o meio de cultura MT teve o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o ágar e foi autoclavado por 20 minutos (121°C e 1,0 kg/cm<sup>2</sup>).

**YEP**

Peptona

**g.L<sup>-1</sup>**

10,0

Extrato de Levedura

10,0

NaCl

5,0

**Obs:** o meio de cultura YEP teve o pH ajustado para 7,0 antes de adicionar o ágar, e autoclavados por 20 minutos (121°C e 1,0 kg/cm<sup>2</sup>). Meio YEP sólido: adição de 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

Meio de cultura sólido para crescimento de *Xylella fastidiosa* (WILL; PURCELL, 1998).

**PWG**

Água destilada	900 mL.L <sup>-1</sup>
Phytone Peptone	4,0 g.L <sup>-1</sup>
Tryptcase Peptone	1,0 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g.L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	1,2 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g.L <sup>-1</sup>
Phenol Red estoque (0,2%)	10 mL.L <sup>-1</sup>
Hemin Chloride (solução estoque)	10 mL.L <sup>-1</sup>
Gelrite Gellan Gum	8,0 g.L <sup>-1</sup>
L-glutamina	4,0 g/50mL.L <sup>-1</sup>
BSA	3,0 g/100mL.L <sup>-1</sup>

**Obs:** A L-glutamina e BSA foram preparadas separadamente do resto do meio e filtrados com filtro de membrana de 0,25 µM. O resto do meio foi autoclavado e só então misturados com a L-glutamina e BSA.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)