

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

**Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da
tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja ‘Valência’
(*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

Fabiana Rezende Muniz

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fabiana Rezende Muniz
Engenheira Agrônoma

**Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da
tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Valência'
(*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

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

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2008

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

Muniz, Fabiana Rezende

Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) / Fabiana Rezende Muniz. - - Piracicaba, 2008.

70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Elisa 2. Frutas cítricas 3. Genética molecular vegetal 4. Plantas transgênicas 5. Resistência genética vegetal 6. Tristeza cítrica I. Título

CDD 634.3
M966c

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

DEDICO e OFEREÇO

Aos meus pais, **JOEL E ORMINDA**, e ao meu irmão, **FREDERICO**, que são meu alicerce e minha inspiração.

Ao meu namorado, **JULIANO**, por todo amor, companheirismo e compreensão.

“O SENHOR é minha luz e minha salvação, a quem temerei?” (Salmo 26)

Meus sinceros agradecimentos:

A Deus por ser o autor de tudo.

Aos meus pais por serem meus exemplos de vida, me amarem tanto e acreditarem sempre em mim.

Ao Frederico e à Tatiane por estarem sempre presentes.

Ao Juliano por completar minha vida e por estar sempre ao meu lado tornando meus dias mais felizes.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela confiança, oportunidade, orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela co-orientação e constantes colaborações.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava pela constante disponibilidade e por diversos auxílios nas análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende pelos conselhos em diversas etapas desse trabalho.

À Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado pela oportunidade de realização das análises imunológicas.

Aos técnicos Renata Beatriz Cruz e José Raimundo pela amizade e constante disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) David, Éder e Sr. José pela amizade, ótimo convívio e ajuda.

À Mônica Lanzoni Rossi e à Profa. Dra. Neusa de Lima Nogueira por possibilitar a realização das análises de microscopia eletrônica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À ESALQ pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e sua equipe, em especial à secretária Luciane Aparecida Lopes.

Aos queridos amigos dos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP e de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da ESALQ/USP: Janaynna, Rafaella, Suane,

Rosely, Liliane, Alessandra, Felipe, Luiz Gustavo, Eveline, Ana Paula, Alice, Andréa, Vânia, Luciana, Sylvia, Carolina, Renan, Bruno, Leonardo, Luzia, Lívia, Marina, Flávia, Waner e Meire, pela grande amizade, companheirismo, carinho, ensinamentos, auxílios e, principalmente, por serem partes essenciais da minha formação de Mestre. Em especial ao Amâncio, que, além de tudo, foi meu grande conselheiro em diversas etapas desse trabalho.

Às amigas Camilla, Suzana, Tathiana e Karina pelo companheirismo e excelentes momentos de descontração.

Ao amigo Marcelo pela imensa amizade firmada durante esse curso, pelas dificuldades que juntos superamos, pelos conselhos e ensinamentos e por ser sempre tão atencioso e amável.

Às amigas distantes: Elisa, Vanisse, Simone, Michelle, Luciana e Gabriela, que continuam sempre presentes e construindo uma amizade cada vez mais forte e essencial, mesmo com a distância.

À Maria, Júlio e Sílvia pela atenção e amor.

À Pedrina, Irineu, Felipe, Mariana e Fábio por terem se tornado pessoas essenciais em minha vida.

Aos meus tios, primos e avós e à Ângela pelas orações, torcida e imenso amor.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento e realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Cultura do citros no Brasil	18
2.2 Tristeza e morte súbita dos citros	19
2.3 Transformação genética de plantas para resistência a doenças causadas por vírus	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Material Vegetal.....	30
3.2 Caracterização molecular das plantas matrizes	31
3.2.1 Extração de DNA e análise de Southern blot	31
3.2.2 Extração de RNA e análise de RT-PCR	32
3.3 Propagação das plantas matrizes	32
3.4 Inoculação das plantas transgênicas com CTV	33
3.4.1 Inoculação por enxertia	33
3.4.2 Inoculação pelo vetor <i>Toxoptera citricida</i>	34
3.5 Avaliação das plantas inoculadas	35
3.6 Análise de microscopia eletrônica	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Caracterização molecular das plantas	37
4.2 Propagação das plantas	40
4.3 Avaliação da resistência à infecção do vírus da tristeza dos citros nas plantas inoculadas	41
5 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

RESUMO

Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

No Brasil a citricultura está entre as culturas de maior importância. A produtividade dessa cultura no país ainda é considerada baixa e esse fato se deve, em parte, a diversas pragas e doenças. Dentre as doenças, tem-se a tristeza, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV). Esse patógeno também pode estar relacionado com outra importante doença da cultura, a morte súbita dos citros (MSC). Com isso, o CTV ganhou ainda maior expressão. Uma alternativa para controlar viroses de plantas é a obtenção de plantas transgênicas resistentes a esses patógenos. Este trabalho objetivou caracterizar com análise molecular e avaliar a resistência ao CTV de plantas transgênicas de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), contendo fragmentos do genoma do CTV, em três construções gênicas diferentes. A transgenia das plantas foi confirmada por análises de Southern blot. A transcrição do transgene foi avaliada por RT-PCR. O material foi inoculado com duas borbulhas infectadas pelo isolado Pêra-IAC, enxertadas no porta-enxerto abaixo do ponto de enxertia da copa transgênica, e pelo vetor *Toxoptera citricida* infectado. Após quatro semanas da inoculação, para avaliar a resistência ao vírus, brotações da copa transgênica foram submetidas ao teste de ELISA sanduíche indireto com anticorpo monoclonal contra a proteína da capa protéica do CTV. Os resultados indicaram variação na resistência à translocação do vírus nas diferentes construções transgênicas utilizadas e entre clones de uma mesma planta. Todas as linhagens transgênicas inoculadas indicaram a presença do vírus em pelo menos uma das três repetições avaliadas, quando inoculadas por enxertia. Quando inoculadas pelo vetor algumas plantas apresentaram todos os seus clones com baixos valores de absorvância, indicando uma possível resistência ao patógeno.

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

ABSTRACT

Molecular characterization and resistance evaluation to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic plants of 'Valência' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

In Brazil, citrus is one of the most important cultures. The productivity of this culture in the country is still considered low and this fact is due to several pests and diseases that affect the crop. Among the diseases there is the tristeza, caused by *Citrus tristeza virus* (CTV). This pathogen can also be related with another important disease, the citrus sudden death. Therefore, CTV acquired much more significance. This work aimed to characterize with molecular analysis and to evaluate the resistance to CTV of transgenic 'Valência' plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck), containing genomic fragments of CTV, in three different transgenic constructs. The plants were confirmed as transgenic by Southern blot. The transcription of the transgene was evaluated by RT-PCR. The transgenic plants were challenged with a weak strain of CTV, CTV-IAC, by bud inoculation with two infected bubbles, and by the infected vector *Toxoptera citricida*. After four weeks of inoculation, the evaluation of viral replication in the transgenic seious was done by ELISA indirect sandwich with monoclonal antibody against the CTV coat protein. The results indicated variation of the resistance to the translocation of the virus between the different transgenic constructs used and between clones of the same plant. All the inoculated plants indicated the presence of the virus in, at least, one of the three evaluated clones, when inoculated by grafting. When inoculated by the vector some plants had all their clones with low values of virus, indicating a possible resistance to the pathogen.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Análises de Southern blot das linhagens transgênicas. + = controle positivo (sonda não marcada); - = controle negativo constituído de planta de laranja ‘Valência’ não-transgênica; CP1 - CP10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-CP; SC1 - SC10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-SC; DS1 - DS10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-dsCP..... 38
- Figura 2 – Análises de RT-PCR das linhagens transgênicas. M = marcador; B = branco; + = controle positivo constituído de amostra de DNA de planta transgênica contendo o gene da capa protéica do CTV; - = controle negativo constituído de cDNA de planta de laranja ‘Valência’ não-transgênica; CP1 - CP10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-CP; SC1 - SC10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-SC; DS1 - DS10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-dsCP.; RNA = amostra de RNA tratada com DNase 39
- Figura 3 – Propagação das linhagens transgênicas. a) Borbulha recém-enxertada em porta-enxerto limão ‘Cravo’ e protegida por fitilho de plástico. b) Plantas do porta-enxerto limão ‘Cravo’ recém-enxertadas. c) Desenvolvimento de borbulha transgênica, 2 meses após a enxertia ... 40
- Figura 4 – Inoculação do CTV. a) Borbulhas de laranja ‘Pêra’ infectadas com o isolado CTV-IAC e enxertadas no porta-enxerto limão ‘Cravo’ abaixo do ponto de enxertia. b) Clones de plantas transgênicas enxertadas em porta-enxerto limão ‘Cravo’ com o ramo transgênico tutorado com

tutor de ferro, no ponto em que foram inoculadas por enxertia. c) Inoculação de plantas pelo vetor *Toxoptera citricida*. d) Colônias do vetor *Toxoptera citricida* mantidas em plantas contaminadas com CTV 41

- Figura 5 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP, após 4 semanas da inoculação com CTV por enxertia de material propagativo contaminado. CP1 - CP10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 43
- Figura 6 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-SC, após 4 semanas da inoculação com CTV por enxertia de material propagativo contaminado. SC1 - SC10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 43
- Figura 7 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-DS após 4 semanas da inoculação com CTV por enxertia de material propagativo contaminado. DS1 - DS10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 44
- Figura 8 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das 6 plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas enxertadas sobre limão 'Cravo', utilizadas como controle nas inoculações com

- CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*, após 4 semanas da última inoculação. VC1 - VC6 = plantas de 'Valência' enxertadas sobre limão 'Cravo'. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada por enxertia (controle positivo) 45
- Figura 9 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP e enxertadas sobre limão 'Cravo', após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. CP1 - CP10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 46
- Figura 10 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-SC e enxertadas sobre limão 'Cravo', após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. SC1 - SC10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 46
- Figura 11 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-DS e enxertadas sobre limão 'Cravo', após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. DS1 -DS10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 47
- Figura 12 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA

das 6 plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas enxertadas sobre laranja azeda, utilizadas como controle nas inoculações com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*, após 4 semanas da última inoculação. VA1 - VA6 = plantas de 'Valência' enxertadas sobre laranja azeda. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada por enxertia (controle positivo) 48

Figura 13 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP e enxertadas sobre laranja azeda, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. CP1 - CP10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 49

Figura 14 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-SC e enxertadas sobre laranja azeda, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. SC1 - SC10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 49

Figura 15 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-DS e enxertadas sobre laranja azeda, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. DS1 - DS10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo) 50

- Figura 16 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando células do floema de folhas de plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência' transgênicas (pCTV-CP) e infectadas com CTV. EDA = acúmulos eletro-densos; VA = arranjos virais; DV = partículas virais desorganizadas; VS = vesículas 53
- Figura 17 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando células do floema de folhas de plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência' transgênicas (CTV-SC) e infectadas com CTV. EDA = acúmulos eletro-densos; VA = arranjos virais; DV = partículas virais desorganizadas; VS = vesículas; I = inclusões fibrosas 54
- Figura 18 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando células do floema de folhas de plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência' transgênicas (pCTV-DS) e infectadas com CTV. EDA = acúmulos eletro-densos; VA = arranjos virais; DV = partículas virais desorganizadas; VS = vesículas 55

LISTA DE ABREVIATURAS

BGMV – *Bean golden mosaic virus*

CaMV – *Cauliflower mosaic virus*

cDNA – complementary DNA ou DNA complementar

CMV – *Cucumber mosaic virus*

CP – gene da capa protéica de vírus

CPsV – *Citrus psorosis virus*

CTAB – Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

CTV – *Citrus tristeza virus* ou vírus da tristeza dos citros

CSDaV – Citrus Sudden Death associated Virus

DNA – ácido desoxirribonucléico

dsRNA – RNA fita dupla

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

kb - kilobases

mRNA – RNA mensageiro

miRNAs – micro RNAs

MSC - Morte súbita dos citros

ORFs – Open reading frames

PBS – phosphate buffer solution

PBST - phosphate buffer solution; TWEEN®

PCR – Polymerase chain reaction ou reação em cadeia da polimerase

pCTV-dsCP – construção contendo hairpin de seqüências gênicas da capa protéica do CTV

pCTV-CP – construção contendo gene da capa protéica do CTV

pCTV-SC – construção contendo seqüência genômica conservada do CTV

PDR – Resistência derivada do patógeno

PPV – *Plum pox virus*

PRSV-W – *Papaya ringspot virus - type W*

PRSV – *Papaya ringspot virus*

PTGS – silenciamento gênico pós-transcricional

PVX – *Potato virus X*

PVY – *Potato virus Y*

PWV – *Passion fruit woodiness virus*

RISC – RNA-induced silencing complex

RNA – ácido ribonucléico

RT – transcrição reversa

RT-PCR – Reverse transcription polymerase chain reaction

SGT – silenciamento gênico transcricional

ssRNA – RNA de fita simples

TEV – *Tobacco etch virus*

TMV – *Tabacco mosaic virus*

TRV – *Tobacco rattle virus*

WMV-2 – *Watermelon mosaic virus - 2*

ZYMV – *Zucchini yellow mosaic virus*

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das principais culturas frutíferas do mundo, com expressiva importância econômica. Ela está amplamente distribuída e é economicamente importante nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde as condições edafoclimáticas são adequadas para o seu desenvolvimento. As plantas cítricas são cultivadas em regiões compreendidas entre os paralelos 40° N e 40° S. As principais regiões produtoras estão concentradas em latitudes superiores a 22° N e 22° S (DAVIES; ALBRIGO, 1994). A produção mundial de citros em 2006 foi de 93.452.961 t. Estima-se que a área plantada no mundo atualmente seja de 7.605.363 ha, com uma produção de 105.431.984 t (FAO, 2008).

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo e o maior produtor e exportador mundial de suco concentrado de laranja (FAO, 2008; IBGE, 2008). O cultivo de frutas cítricas no Brasil é feito em todas as regiões, com destaque para alguns estados como São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais (IBGE, 2008). Apesar da alta produção nacional e do constante incremento na área cultivada de citros no Brasil, a cultura ainda apresenta baixa produtividade, quando comparada com outros países produtores (MACHADO et al., 2005). Esse fato se deve às diversas dificuldades que a cultura apresenta no país, destacando-se o constante surgimento de doenças devastadoras.

Entre essas doenças, tem-se a tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), um vírus de RNA do gênero *Closterovirus*, com tamanho aproximado de 12 x 2000 nm, o que o torna o maior vírus de planta já detectado até os dias atuais (GARNSEY; LEE, 1989). O CTV pode ser transmitido por material propagativo infectado e por afídeos. Entre os afídeos, o *Toxoptera citricida* se destaca como o vetor mais eficiente para a transmissão nas condições brasileiras (WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1993; MÜLLER; COSTA, 1993; MURPHY et al., 1995; MICHAUD, 1998). Entre os principais danos ocasionados por isolados desse vírus, destacam-se as caneluras (*stem pitting*), o enfezamento e os frutos miúdos (MÜLLER; COSTA, 1991).

A maioria das laranjas doces, apesar de permitir a ampla multiplicação do vírus da tristeza, têm os tecidos do floema tolerantes a sua presença e, por isso, devem ser cultivadas sobre porta-enxertos que também tenham tecidos tolerantes, como o limão 'Cravo'.

Recentemente foi detectada nos pomares brasileiros outra doença possivelmente relacionada ao CTV. Por ser causadora de um definhamento generalizado nas plantas afetadas, a doença foi nomeada morte súbita dos citros (MSC). A MSC afeta laranjas doces enxertadas sobre porta-enxerto de limão 'Cravo', ao contrário do que ocorre com a tristeza (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

Tanto a tristeza como a MSC são doenças de interação entre as variedades copa e porta-enxerto. Por isso, têm seu potencial destrutivo aumentado em certas combinações de copa e porta-enxerto. Nesse contexto, torna-se de extrema importância a obtenção não apenas de novas variedades de porta-enxertos, mas também de copas de citros que sejam tolerantes à multiplicação do vírus da tristeza do citros.

Atualmente, programas de melhoramento para tentar obter novas variedades de citros são desenvolvidos em diversos países (SOOST; CAMERON, 1975), porém os resultados são pouco promissores. Esse fato se deve principalmente a complexas características reprodutivas da cultura, como longo período juvenil, poliembrionia nucelar e, principalmente, a heterozigose (GROSSER; GMITTER, 1990).

Na tentativa de se obter alternativas para o melhoramento de citros, estratégias de biotecnologia, como biologia molecular em conjunto com cultura de tecidos são utilizadas. Desde 1997, quando ocorreu o primeiro relato de que um transgene de grande importância na agricultura estava sendo expresso em plantas transformadas de *Citrus* (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997), diversas pesquisas na área de citricultura têm seguido essa linha para obter novas variedades resistentes a diferentes vírus.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar com análise molecular e avaliar a resistência ao CTV, plantas transgênicas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência', contendo três construções gênicas relacionadas ao gene da capa protéica do CTV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura de citros no Brasil

As plantas cítricas se originaram na Ásia e chegaram ao Brasil durante a primeira metade do século XVI. Sendo as condições de cultivo de citros do país melhores que as encontradas no centro de origem, a cultura se espalhou por todo o país (SWINGLE; REECE, 1967; SOOST; CAMERON, 1975; SCORA et al., 1982; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo e o maior produtor e exportador mundial de suco concentrado de laranja. Para este ano, as previsões indicam uma produção em torno de 17.832.165 t em uma área de 918.939 ha (FAO, 2008; IBGE, 2008). A produção de frutas cítricas no Brasil é feita em todas as regiões, com destaque para os estados de São Paulo (14.177.754 t), Bahia (850.598 t), Sergipe (759.828 t) e Minas Gerais (586.410 t) que somam juntos 91,8% da produção total do país (IBGE, 2008).

No entanto, diversas doenças vêm surgindo juntamente com a expansão da cultura. No início do século XX, os produtores brasileiros substituíram suas plantações em pés-francos, propagadas por sementes, para enxertia sobre laranja 'Caipira' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), eliminando-se assim problemas relacionados à juvenilidade das plantas, como altura elevada, espinhos, produção tardia, entre outros. Entretanto, houve um incremento nos problemas relacionados à deficiência hídrica e à gomose, doença causada por espécies do gênero *Phytophthora*. A solução encontrada foi a substituição do porta-enxerto, empregando-se em todas as áreas produtoras de citros do Brasil, a partir de 1910, a laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), porta-enxerto vigoroso e resistente à seca e à gomose (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; FUNDECITRUS, 2008).

Em 1937, foi detectada a tristeza dos citros no Brasil. Essa doença atingiu 90% dos pomares e dizimou a maioria deles, causando, inclusive, uma escassez de cítricos no Brasil. A doença foi manejada com a substituição da laranja azeda pelo porta-enxerto limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck), tolerante ao vírus causador da tristeza. Com isso, o crescimento da produção foi reiniciado, após 10 anos de recuperação do

desastre causado pelo vírus. No entanto, essa prosperidade não durou muito tempo, pois, a tendência de surgimento contínuo de novas doenças nas plantações de citros tem se verificado ao longo de todo o estabelecimento da cultura no Brasil, até os dias de hoje (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

Já em 1957, foi detectada uma nova doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, nomeada cancro cítrico, que dizimou e continua dizimando milhares de árvores de citros (LARANJEIRA et al., 2005). Em 1977, detectou-se o declínio do citros, doença de interação copa e porta-enxerto, sem etiologia conhecida e que afeta diversas plantas do parque citrícola todos os anos (LARANJEIRA et al., 2005). A clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, foi detectada em 1987 e ocasiona perdas estimadas em 100 milhões de dólares por ano (LOPES et al., 2004; LARANJEIRA et al., 2005). Em 2001, foi detectada a morte súbita, doença também de etiologia desconhecida que por, hipóteses, deve ser causada pelo vírus da tristeza, já que os sintomas da doença e sua disseminação são semelhantes aos observados na tristeza (BASSANEZI et al., 2003; MACHERRONI et al., 2005; MÜLLER et al., 2005). Mais recentemente, em 2004, houve a detecção do huanglongbing (greening), doença causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* ssp.. Essa doença não apresenta variedade de copa ou porta-enxerto resistente e pode ser considerada um dos maiores desafios para a cultura nos dias atuais (FUNDECITRUS, 2008).

2.2 Tristeza e morte súbita dos citros

A baixa produtividade da cultura do citros está relacionada, entre outros fatores, à ocorrência de pragas e doenças. A ocorrência de doenças, que infectam variedades porta-enxerto e copa, tem sido relatada desde o início do plantio comercial de citros no país, sendo necessária uma troca periódica de variedades. Dentre essas doenças encontra-se a tristeza dos citros, que é conhecida, historicamente, como uma doença de grande importância econômica da cultura.

A tristeza dos citros tem origem provável na China (BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989; BORDIGNON et al., 2003) e daí se disseminou por meio de material

infectado. Hoje a doença encontra-se disseminada por todas as regiões produtoras de citros do mundo, principalmente América do Sul, América Central, Estados Unidos, Espanha e Israel (FUNDECITROS, 2008).

A doença foi registrada pela primeira vez no início do século XX, quando pesquisadores da África do Sul observaram que variedades de laranja doce enxertadas em laranja azeda apresentavam uma redução na taxa de crescimento (CAMBRA et al., 1988). A primeira grande devastação causada pelo CTV ocorreu em 1930 na Argentina, onde 10 milhões de árvores foram dizimadas (CARREIRA, 1933). No Brasil, o primeiro relato foi em 1937 em pomares do Vale do Paraíba, SP, onde a doença foi denominada “tristeza” (MOREIRA, 1942). Em 12 anos, 82% dos pomares brasileiros de laranjas doces foram dizimados, o que correspondia a 9 milhões de árvores (MOREIRA; COSTA; GRANT, 1949).

A natureza infecciosa da tristeza foi confirmada por pesquisadores que conseguiram transmiti-la para plantas saudias pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida*) e por enxertia de borbulhas doentes indicando que a doença era causada por um agente patogênico (MENEHINE, 1946; BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989). Em 1963, por meio de técnicas de microscopia eletrônica, pôde-se observar as partículas virais do *Citrus tristeza virus* (CTV), que estavam presentes apenas em plantas doentes (KITAJIMA, 1963).

O CTV, agente causal da tristeza, é um vírus do gênero *Closterovirus* nomeado e é constituído de partículas flexuosas em forma de bastão, que medem em torno de 10 a 12 nm de diâmetro e 700 a 2000 nm de comprimento. Possui como material genético um RNA de fita simples (ssRNA), não segmentado, com peso molecular em torno de 20 kb, o que corresponde a $6,5 \times 10^3$ KDa, sendo considerado o maior genoma de vírus de planta já detectado (GARNSEY; LEE, 1989). As partículas do vírus estão restritas ao floema das plantas infectadas onde são encontrados três tipos de inclusões induzidas pelo vírus: arranjos viróticos, inclusões fibrosas e vesículas citoplasmáticas (ZHOU, et al.; 2002). Os vírions do CTV são heterodímeros constituídos de dois fragmentos: um menor com aproximadamente 75 a 85 nm, encapsulado pela proteína p27 e um maior com aproximadamente 2000 nm, encapsulado pela proteína p25, conferindo ao capsídeo uma estrutura polar (FEBRES et al., 1996). O genoma do CTV possui 19.296

nucleotídeos, com 12 ORFs (*open reading frames*) que codificam em torno de 19 produtos protéicos (PAPPU et al., 1994; HILF et al., 1995; KARASEV et al., 1995; LÓPEZ et al., 2000; MÜLLER et al., 2005).

O vírus da tristeza pode ser transmitido por material propagativo infectado e de forma semi-persistente e não-circulativa por diferentes espécies de afídeos, com destaque para o *Toxoptera citricida*, o qual tem a maior eficiência de transmissão nas condições brasileiras. Resultados de trabalhos anteriores mostram que apenas um pulgão é suficiente para inocular uma planta de citros (HERRON et al., 2006). O modo de transmissão sugere que o vírus deve se acumular no canal alimentar do afídeo e resistir a uma rápida dissociação do mesmo. Os afídeos têm um período de aquisição do vírus de 30 minutos a 24 horas e podem permanecer inoculados por um período de 24 a 36 horas (RACCAH; LOEBENSTEIN; BAR-JOSEPH, 1976; WHITESIDE; GARNSEY; TIMMER, 1993; MÜLLER; COSTA, 1993; MURPHY et al., 1995; MICHAUD, 1998).

A maioria das laranjas doces, apesar de multiplicarem amplamente o vírus da tristeza, tem os tecidos do floema tolerantes à sua presença. São consideradas suscetíveis e tolerantes, pois são abrigo do vírus, permitindo sua multiplicação em altas concentrações, mas não apresentam sintomas quando em pé franco, apesar de poderem apresentar sintomas quando enxertadas em porta-enxerto intolerante como a laranja azeda. Por isso, devem ser cultivadas sobre porta-enxertos que também tenham tecidos tolerantes, como o limão 'Cravo' (BORDIGNON et al., 2003; FUNDECITRUS, 2008).

Danos variáveis são causados pelo CTV, variando desde leve clareamento das nervuras até severas caneluras (*stem pitting*) do lenho e rápido declínio no crescimento. Outros sintomas ocasionados por isolados do vírus são enfezamento, *seedling yellows* e frutos miúdos (MÜLLER; COSTA, 1991; FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

Os produtores brasileiros têm convivido com essa doença utilizando certas combinações de porta-enxerto e copa, assim como clones pré-imunizados, o que tornam as plantas mais tolerantes ao CTV (MÜLLER; COSTA, 1987; 1991; MÜLLER, 1976). Atualmente, todas as plantas de citros são consideradas infectadas pela virose,

em maior ou menor grau, tornando essa doença amplamente reconhecida no país como sendo um dos fatores que contribuem para a redução da produtividade dos pomares.

A presença do CTV pode ser diagnosticada pela observação de sintomas e pela indexação biológica utilizando o limão 'Galego' (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) como planta indicadora (FEICHTENBERGER et al., 2005; MÜLLER et al., 2005). Além disso, diversas técnicas imunológicas utilizando anticorpos são capazes de detectar a presença das partículas virais em plantas infectadas e constituem métodos rápidos e seguros para diagnosticar a doença. Dentre esses métodos destaca-se o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), o qual utiliza um anticorpo conjugado a uma enzima, que na presença de um substrato específico produz uma reação colorimétrica capaz de ser quantificada (ROISTACHER, 1991; STACH-MACHADO et al., 1998).

No final da década de 90 do século XX ocorreu o aparecimento de outra importante doença, possivelmente de origem viral, nomeada Morte Súbita dos Citros. Essa doença foi descrita pela primeira vez em 2001, em Comendador Gomes, MG (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001). Segundo os autores, as plantas afetadas apresentam sintomas de definhamento generalizado, iniciado com a perda de brilho das folhas, redução das brotações e desfolha parcial. O sistema radicular apresenta grande quantidade de raízes mortas, com poucas radículas. O sintoma característico da doença é uma coloração amarelada a alaranjada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto, abaixo da região da enxertia, contrastando com a coloração creme dos tecidos da casca da copa.

Ainda não existem estudos conclusivos, mas algumas evidências indicam que a MSC está ligada a um agente viral disseminado por um vetor de maneira semelhante à tristeza dos citros (BASSANEZI et al., 2003; MACHERRONI et al., 2005). Além disso, há semelhanças entre as duas doenças quanto à sintomatologia, velocidade de progresso, por serem de combinação copa/porta-enxerto e, principalmente, pela distribuição espacial das plantas afetadas e do vetor nos talhões (BASSANEZI et al., 2003; MÜLLER et al., 2005). Já foram observadas e detectadas nas plantas com sintomas de MSC e em afídeos provenientes de plantas com sintomas, partículas de vírus semelhantes ao CTV denominadas Citrus Sudden Death associated Virus

(CSDaV) (FEICHTENBERGER et al., 2005; MACCHERONI et al., 2005). Apesar disso, a MSC afeta laranjas doces enxertadas sobre porta-enxerto de limão 'Cravo', ao contrário do que ocorre com a tristeza (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001). Para a MSC, o limão 'Cravo' desempenha o mesmo papel que a laranja azeda para a tristeza dos citros.

A elevada disseminação e destruição da doença e sua capacidade de afetar plantas de laranja doce enxertadas em limão 'Cravo', que é hoje o principal porta-enxerto no Brasil, torna a MSC uma importante ameaça à citricultura nacional, assim como a tristeza dos citros. Nesse contexto, torna-se extremamente importante a tentativa de se obter não apenas porta-enxertos, mas também copas de citros tolerantes à multiplicação do vírus da tristeza do citros.

2.3 Transformação genética de plantas para resistência a doenças causadas por vírus

A transformação genética se destaca como uma importante ferramenta para o melhoramento de plantas, permitindo a introdução ao genoma de genes responsáveis por características específicas, mantendo as qualidades já existentes na variedade. Além disso, seus produtos podem apresentar vantagens ecológicas, agrônômicas e econômicas para a produção agrícola, como aumento de produtividade, controle de plantas invasoras, resistência a pragas e doenças e, conseqüentemente, redução dos custos de produção. Desse modo, a transformação genética de plantas é considerada uma boa alternativa para a obtenção de novas variedades resistentes a doenças.

Existem atualmente diversas estratégias para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças. Entre essas estratégias temos o uso de genes R de resistência, genes não vegetais que codificam proteínas antibacterianas, genes que estimulam o sistema de defesa da planta, genes relacionados à patogênese e o uso da resistência derivada do patógeno (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). Segundo os autores, o que tem se observado até o momento é uma grande dificuldade em se obter plantas transgênicas resistentes a fungos e bactérias. Por outro

lado, diversos resultados de pesquisas mostram que as estratégias para resistência de plantas transgênicas a vírus funcionam efetivamente.

Para a resistência a vírus, a aplicação do conceito de resistência derivada do patógeno (PDR), proposto por Sanford e Johnston (1985) pode ser considerada a estratégia padrão. De acordo com esses autores, a resistência do hospedeiro ao patógeno pode ser obtida pela introdução de genes específicos do próprio patógeno ao genoma do hospedeiro. A resistência pode ser alcançada de duas formas: pela expressão de proteínas, como nos casos de expressão dos genes das proteínas da capa protéica, de replicação ou de movimento do vírus, ou pelo RNA, sem que haja necessidade de expressão da proteína, como no caso do silenciamento gênico.

As primeiras plantas transformadas aplicando-se a PDR foram obtidas em 1986 por Powell-Abel et al., que obtiveram plantas transgênicas de tabaco expressando o gene da capa protéica do *Tobacco mosaic virus* (TMV). Desde então, essa estratégia de engenharia genética para resistência a vírus se mostrou aplicável para mais de 20 espécies de vírus em diferentes espécies de hospedeiros (BEACHY, 1997). Muitas plantas expressando a CP de vírus de RNA têm mostrado uma alta resistência a esses vírus, a qual só é quebrada com uma elevada inoculação de RNA viral desencapsulado (BAULCOMBE, 1996; GOLDBACH; BUCHER; PRINS, 2003). Alguns autores sugerem que essa resistência está relacionada com a ligação entre a capa protéica e os mecanismos de replicação e translocação dos vírus (BEACHY; LOESCHFRIES; TUMER, 1990; BAULCOMBE, 1996; GOLDBACH; BUCHER; PRINS, 2003). Outros indicam como fonte da resistência as interações moleculares entre subunidades da capa protéica, ocasionando uma desestabilização da partícula viral (BENDAHMANE et al., 1997).

O restabelecimento da cultura do mamoeiro no Havaí, pelo cultivo comercial de plantas transgênicas, é um dos exemplos de sucesso dessa técnica. A obtenção das plantas de mamão transgênicas resistentes ao *Papaya ringspot virus* (PRSV) foi possível graças à introdução do gene da capa protéica do mesmo vírus ao genoma das plantas (FITCH et al., 1992). Em 1995, Tricoli et al. desenvolveram uma linhagem de plantas transgênicas de abobrinha-de-moita, resistentes ao *Cucumber mosaic virus* (CMV), ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e ao *Watermelon mosaic virus - 2*

(WMV-2) (TRICOLI et al., 1995), que foi aprovada para a comercialização nos Estados Unidos. No entanto, ela não permanece mais no mercado, pois se mostrou suscetível a outro vírus, o *Papaya ringspot virus - type W* (PRSV-W). Recentemente foi liberada, também nos Estados Unidos, uma variedade de ameixa modificada para expressar o gene responsável pela proteína do capsídeo do vírus *Plum pox virus* (PPV), mostrando alta resistência a esse vírus (CIB, 2008).

Resultados promissores também vêm sendo obtidos em nível de pesquisa. São exemplos a transformação de plantas de tomateiro com a combinação de dois genes de capa protéica, representando os dois subgrupos do *Cucumber mosaic virus* (CMV), para resistência a esse vírus (KANIEWSKI et al., 1999) e a transformação de plantas de maracujazeiro com a capa protéica do *Passion fruit woodiness virus* (PWV) para resistência ao mesmo vírus (TREVISAN et al., 2006).

No caso da resistência mediada por proteínas de replicação ou de movimento do vírus, sabe-se que tais moléculas entram em competição com a proteína funcional produzida pelo vírus, diminuindo o movimento do vírus entre as células e resultando em resistência, pois impede que o vírus se estabeleça ou atrase o aparecimento dos sintomas causados pela virose nas plantas infectadas (BAULCOMBE, 1996). Mutantes da proteína de movimento do TMV têm conferido proteção contra viroses como as causadas por cucumovírus e tobamovírus, além da própria tobamovirose (COOPER et al., 1995; BAULCOMBE, 1996).

Em 1992, foi demonstrado que nem sempre era necessária a expressão da proteína para o funcionamento do mecanismo de defesa das plantas, sendo que construções não traduzidas corretamente também eram capazes de conferir resistência a vírus. Os autores descreveram plantas transgênicas de tabaco contendo um gene modificado da capa protéica do *Tobacco etch virus* (TEV) pela introdução de três códons de parada imediatamente após o códon de iniciação AUG. Tais plantas expressaram um mRNA instável correspondente a capa protéica do TEV e aproximadamente 40% dessas linhagens foram altamente resistentes ao TEV (LINDBO; DOUGHERTY, 1992). Esse tipo de resistência é conhecido como resistência mediada por RNA. É um tipo de inibição da ação do vírus por competitividade entre as partículas virais e o transgene ou o seu transcrito. A competição dificulta a replicação e o

desenvolvimento do vírus na planta infectada. Isso ocorre quando o transgene especifica um RNA defectivo interferente ou RNA antisense, ou a partir do uso de RNA-satélite (BAULCOMBE, 1996; VAN DEN BOOGAART; LOMONOSSOFF; DAVIES, 1998).

Muitas vezes, a infecção por vírus ocasiona o silenciamento do transgene homólogo e esse silenciamento pode ocasionar a resistência contra vírus homólogos. O silenciamento gênico é definido como sendo uma série de mecanismos moleculares envolvidos no sistema de defesa de organismos contra vírus e material genético (ácidos nucleicos) invasor, pela supressão de genes específicos (WASSENEGGER, 2002; SOUZA; MENDES; MOURÃO FILHO, 2007). Por meio desses mecanismos, a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente (ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005).

O silenciamento é a estratégia predominante em trabalhos envolvendo resistência transgênica a vírus de plantas (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). A evidência de que o silenciamento é um mecanismo de defesa de plantas contra vírus é o fato de que os vírus podem induzir e também são alvos do silenciamento (ZERBINI; ALFENAS; ANDRADE, 2005). Através dessa estratégia, as plantas respondem à invasão de patógenos regulando a expressão dos genes do patógeno em nível transcricional (SGT), em que ocorre uma metilação na região promotora bloqueando a transcrição, e pós-transcricional (PTGS), em que ocorre degradação do RNA após a transcrição, sem que ocorra a tradução (AL-KAFF et al., 1998; FAGARD; VAUCHERET, 2000). Algumas pesquisas demonstraram que o mecanismo pós-transcricional funciona em nível de RNA e, por isso, tem o potencial de suprimir o acúmulo de RNA viral que tem identidade seqüencial com o transgene silenciado (INGELBRECHT et al., 1994; NIEBEL et al., 1995). Em 1998, FIRE et al. demonstraram que a formação de um RNA de fita dupla (dsRNA), uma forma artificial de RNA que não ocorre naturalmente em células, está relacionada com essa estratégia (FIRE et al., 1998). O silenciamento pode se deslocar no interior da planta, pelo floema, a longas distâncias, ou de célula a célula (GURA, 2000).

Os estudos com silenciamento gênico em plantas foram iniciados na década de 90 do século passado, quando tentou-se aumentar a expressão de uma enzima chave

na síntese de antocianinas, flavonóides responsáveis pela coloração de flores. Foi introduzido o gene quimérico da enzima em petúnias na tentativa de se obter uma coloração mais intensa das pétalas. Inesperadamente, o gene introduzido produziu flores totalmente brancas ou variegadas. Houve uma inibição da expressão (silenciamento) do transgene e de um gene endógeno com homologia ao transgene (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). O fenômeno ficou conhecido como co-supressão, termo aplicado ao silenciamento pela ação do RNA de um transgene, onde há supressão conjunta do transgene e do gene endógeno (BAULCOMBE, 2002).

Desde o início das pesquisas com silenciamento gênico, muitos pesquisadores têm demonstrado que a infecção de plantas transgênicas por vírus pode ativar o mecanismo do silenciamento gênico. Plantas de tabaco foram transformadas com uma construção contendo proteínas virais do *Potato virus X* (PVX) e obtiveram diversos fenótipos atribuídos ao silenciamento gênico. As plantas que tiveram seus transgenes silenciados foram as mais resistentes ao vírus (ANGELL; BAULCOMBE, 1997). Plantas de batata contendo um transgene derivado do TEV foram inoculadas com o *Potato virus Y* (PVY). Apesar do transgene não ser traduzido, as plantas se mostraram imunes ao vírus, resultado atribuído ao silenciamento (WATERHOUSE; GRAHAM; WANG, 1998). Diversos outros trabalhos têm demonstrado, em espécies de plantas transformadas com fragmentos de vírus, a resistência ao vírus pela “recuperação” ou imunidade das plantas. Outros exemplos são plantas de tabaco transformadas com cDNA genômico de TMV resistentes a infecção do mesmo vírus (YAMAYA et al., 1988), plantas de *Brassica napus* transformadas para resistência ao *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (AL-KAFF et al., 1998), indução de defesa mediada por RNA com a infecção de plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* pelo PVX e pelo *Tobacco rattle virus* (TRV) (RATCLIFF; MACFARIANE; BAULCOMBE, 1999), resistência ao CTV mediada por PTGS em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* (ROY et al., 2006) e plantas de feijoeiro contendo uma construção genética com o hairpin do gene *AC1* do *Bean golden mosaic virus* (BGMV) para resistência a esse mesmo vírus (BONFIM, et al., 2007). A maioria das plantas transgênicas resistentes a vírus apresenta o PTGS, ou seja, o transgene não afeta a transcrição do loco do gene, mas apenas causa a degradação de seqüências específicas de mRNAs alvos (YU; KUMAR, 2003).

Apesar de o silenciamento funcionar por meio de diversas rotas, quase todos os organismos eucariotos têm um mecanismo de silenciamento que é ativado por dsRNA e usa enzimas do tipo RNase III, chamadas Dicers, para processar o dsRNA em pequenas moléculas com aproximadamente 21 a 24 nucleotídeos, conhecidas como microRNAs (miRNAs). Esses microRNAs guiam a destruição ou a inibição da tradução do mRNA alvo por um complexo de endonucleases chamado RISC (BERNSTEIN et al., 2001; WATERHOUSE, 2001; 2006; VOINNET, 2005).

A transformação genética integrada com a biologia molecular se destaca como uma importante alternativa para a obtenção de novos cultivares de plantas cítricas resistentes a patógenos. Vale ressaltar que, apesar de ser usado em diversos países há mais de cem anos para se obter plantas com melhores características agrônômicas e culturais, como resistência a doenças (SOOST; CAMERON, 1975), o melhoramento convencional de plantas cítricas não vêm obtendo resultados promissores. Isso se deve a complexas características reprodutivas intrínsecas à cultura, como longo período juvenil, poliembrionia nucelar e, principalmente, a heterozigose (GROSSER; GMITTER, 1990).

No final da década de 80 do século passado, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas de citros. Os autores procederam a transformação de protoplastos de laranja doce por meio de PEG para a inserção direta de DNA (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989).

Diversos são os relatos de trabalhos bem sucedidos com plantas de citros transgênicas para resistência a vírus, sendo que a técnica mais utilizada para a transformação é a via *Agrobacterium*. O primeiro relato de um transgene importante na agricultura sendo expresso em *Citrus* deu-se em 1997, quando pesquisadores obtiveram *C. aurantium* e *C. aurantifolia* com o gene da capa protéica do CTV integrado e sendo expresso nessas plantas (GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997). No século atual já foram obtidas, por exemplo, plantas transgênicas de *C. aurantifolia* contendo o gene *p25* da capa protéica do CTV (DOMÍNGUEZ et al., 2000; DOMÍNGUEZ et al., 2002a; DOMÍNGUEZ et al., 2002b; FAGOAGA et al., 2005; FAGOAGA et al., 2006), de *Citrus paradisi* contendo uma construção com o gene *Ctv* de resistência ao CTV (RAI, 2006), de limão 'Cravo', laranja azeda e cultivares de laranja doce com o gene ou

fragmentos do gene da capa protéica do CTV (SCHINOR, 2006), de laranja doce contendo o gene da capa protéica do *Citrus psorosis virus* (CPsV) (ZANEK et al., 2008) e de *Citrus paradisi* com diferentes construções contendo o gene da capa protéica de diversas estirpes do CTV (FEBRES; LEE; MOORE, 2008). Dessas plantas, as que já foram avaliadas quanto a resistência aos diversos vírus, apresentaram resultados promissores.

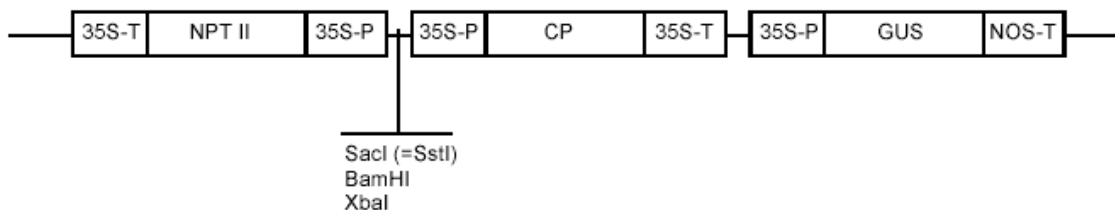
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

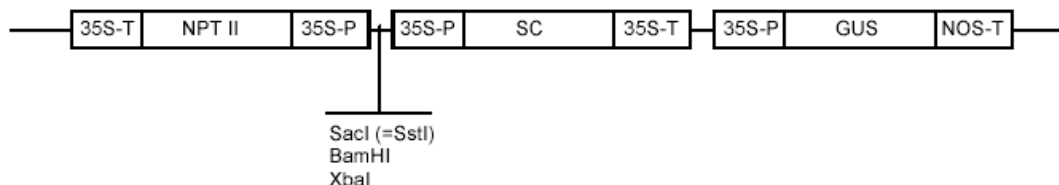
O material vegetal constituiu-se de trinta linhagens transgênicas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência', contendo seqüências gênicas que podem influenciar a resistência ao CTV. Como controle positivo e negativo foram utilizadas plantas de laranja 'Valência' e de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) não transgênicas, fornecidas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira.

Foram avaliadas dez plantas matrizes (To) de cada uma das três construções gênicas descritas a seguir:

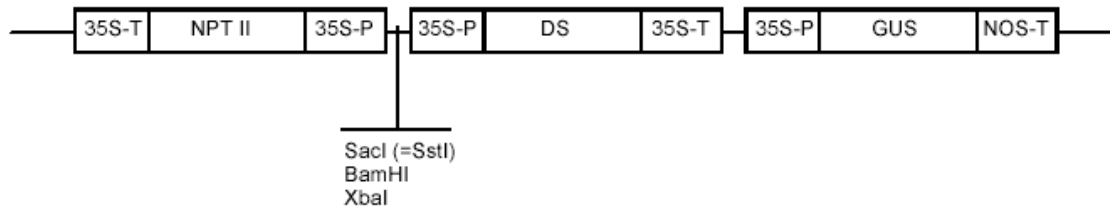
- pCTV-CP: contendo o gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros, com 684 pb, dirigido pelo promotor 35S, com o gene de seleção *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e o gene repórter GUS.



- pCTV-SC: contendo uma seqüência conservada clonada de diferentes isolados do vírus da tristeza dos citros, próximo à extremidade 3' do genoma, compreendendo uma parte do gene da proteína p23 e uma parte da região 3' não traduzida, com 559 pb, dirigida pelo promotor 35S, com o gene de seleção *nptII* e o gene repórter GUS.



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



3.2 Caracterização molecular das plantas matrizes

As plantas transgênicas foram analisadas por Southern blot e RT-PCR, para confirmação da integração e transcrição do transgene.

3.2.1 Extração de DNA e análise de Southern blot

O DNA total das plantas matrizes foi extraído pelo método de Doyle & Doyle (1991), usando CTAB e incluindo-se lavagens com fenol e clorofórmio-álcool isoamílico e precipitação com acetato de amônio. Constatada a integridade e qualidade do DNA extraído, este foi quantificado por fluorometria (“QubitTM Fluorometer”; kit “Quant-iTTM DNA assay kit”, Invitrogen).

Para realizar a análise de Southern blot, uma amostra de 60 µg desse DNA foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, por um período mínimo de 16 h. Os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose (1%), por eletroforese. O produto da reação de digestão foi transferido para membrana de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare) e fixado a 80 °C, por 90 a 120 min.

As sondas para hibridização foram preparadas por PCR. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%) e purificados com o auxílio do kit “QIAEX® II Gel Extraction” (Qiagen). A marcação da sonda e a detecção da hibridização foram realizadas com o auxílio do kit “Gene ImagesTM

Random Primer Labelling Module” e “AlkPhos Direct Labelling Reagents” (GE Healthcare), seguindo-se as orientações do fabricante.

Após a marcação, as sondas foram hibridizadas (60 °C) contra o DNA impregnado na membrana, seguindo de lavagens de estringência (60 °C). A detecção das sondas hibridizadas na membrana foi realizada com auxílio do kit “CDP-Star™ Detection Reagent” (GE Healthcare).

3.2.2 Extração de RNA e análise de RT-PCR

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o produto comercial TRIzol (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Constatada a integridade e qualidade do RNA extraído, este foi quantificado por fluorometria (“Qubit™ Fluorometer”; kit “Quant-iT™ RNA assay kit”, Invitrogen).

Após a quantificação, foi feita a transcrição reversa (RT) das amostras de RNA total com “primers” específicos para detecção dos genes em estudo seguida de amplificação por PCR (RT-PCR). Para tanto, 5 µg de RNA foi tratado com a enzima “RQ1 RNase-free DNase” (Promega). Para a reação de transcrição reversa foram utilizadas as enzimas transcriptases reversa “SuperScript™ II Reverse Transcriptase” (Invitrogen) ou “ImProm-II™ Reverse Transcription System” (Promega) e para a amplificação, a enzima “Taq DNA Polymerase” (Invitrogen). Foram utilizados para a reação 1,8 µg de RNA total, tratado com DNase juntamente com “primers” específicos para os transgenes em estudo. O cDNA gerado a partir desta reação, em um volume de 1 µL da reação de transcrição reversa contendo 0,08 µg de RNA total, foi então submetido a reação de PCR e seu produto separado por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo, visualizado e fotografado em transiluminadores UV.

3.3 Propagação das plantas matrizes

A propagação das 30 matrizes transgênicas foi realizada por enxertia em T invertido em porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* (L.) Osb.), obtidos em viveiros

comerciais, e em porta-enxertos de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), produzidos a partir de sementes da variedade 'São Paulo', obtidas na Empresa Citrograf. Foram propagadas 10 borbulhas de cada planta matriz transgênica no porta-enxerto limão 'Cravo'. Das plantas desenvolvidas, cinco foram utilizadas para inoculação do CTV por enxertia, e as outras cinco foram utilizadas para inoculação do CTV com o vetor *Toxoptera citricida*. Para o porta-enxerto laranja azeda foram enxertadas cinco borbulhas de cada planta matriz, as quais foram utilizadas apenas para a inoculação do CTV com o vetor. Foram propagadas também 20 borbulhas no porta-enxerto limão 'Cravo' e 10 borbulhas no porta-enxerto laranja azeda das variedades 'Valência' e lima ácida 'Galego', as quais foram utilizadas como controle positivo e negativo nos experimentos.

Após a propagação, as plantas foram monitoradas constantemente para averiguar o "pegamento" dos enxertos. Aproximadamente um mês após a enxertia, foram retirados os fitilhos protetores das borbulhas e realizada a poda da parte aérea do porta-enxerto, estimulando o desenvolvimento da borbulha.

As matrizes e as plantas propagadas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação, recebendo adubações periódicas com nitrato de cálcio e com Osmocote (22-04-08). Além disso, foram feitas avaliações periódicas para detectar a presença de pragas e doenças e para realizar podas, retirando brotações indesejáveis.

3.4 Inoculação das plantas transgênicas com CTV

Após quatro meses de desenvolvimento normal dos clones, foram iniciadas as inoculações com o patógeno. A inoculação do vírus nas plantas transgênicas propagadas foi feita por enxertia com borbulhas provenientes de plantas infectadas com o CTV e com o vetor *Toxoptera citricida* infectado com o CTV.

3.4.1 Inoculação por enxertia

Foram inoculadas por enxertia três clones de cada planta matriz transgênica, enxertados em porta-enxerto limão 'Cravo'. Quando a copa transgênica apresentou

entre 30 e 40 cm de comprimento (em torno de quatro meses após a propagação do material transgênico), inoculou-se o CTV pela enxertia de tecido infectado. Como inóculo foram utilizadas borbulhas de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) infectadas com o isolado CTV-IAC, fornecidas pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis-SP. Foram enxertadas duas borbulhas infectadas, em T invertido, no porta-enxerto, abaixo do ponto de enxertia do enxerto transgênico ou controle. Os fitilhos foram retirados 30 dias após a enxertia das borbulhas infectadas.

3.4.2 Inoculação pelo vetor *Toxoptera citricida*

Foram inoculados com o inseto vetor seis clones de cada planta matriz transgênica, sendo três enxertados em porta-enxerto de limão 'Cravo' e três em laranja azeda. Como controle positivo utilizou-se 12 plantas de 'Valência' não-transgênicas, sendo seis enxertadas sobre limão 'Cravo' e seis sobre laranja azeda. Os vetores utilizados foram os afídeos da espécie *Toxoptera citricida*. Indivíduos desta espécie foram coletados na natureza para iniciar a colônia. Estes foram desenvolvidos e multiplicados em plantas fontes de CTV, obtendo-se assim uma colônia infectada. Os pulgões utilizados foram analisados e identificados como *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), com a supervisão do pesquisador Dr. Valdir Yuki, do Instituto Agronômico de Campinas. O isolado de CTV utilizado também foi o CTV-IAC. Os insetos foram mantidos em constante desenvolvimento e multiplicação em plantas contaminadas com CTV, dentro de casa de vegetação.

Foram feitas três inoculações com intervalos de sete dias entre elas, sendo que em cada inoculação aproximadamente 20 pulgões foram transferidos das plantas CTV positivas (colônias) para cada clone ou planta controle. Após cada inoculação fez-se o ELISA das plantas usadas como controle, sendo que, apenas após a terceira inoculação foi possível obter todas as plantas controle com altos valores de presença do vírus, considerando-se a inoculação altamente eficiente. Os pulgões eram mantidos nas plantas por um período de 48 horas e retirados com um forte jato de água.

3.5 Avaliação das plantas inoculadas

A detecção da replicação do CTV nas plantas transgênicas foi realizada no Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob a supervisão da Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado. Para tanto, foi realizado o teste serológico de ELISA sanduíche indireto. Foram utilizados para a detecção do vírus um antissoro policlonal contra CTV e um anticorpo monoclonal contra a proteína da capa protéica do isolado CTV-IAC.

Para a extração da proteína, foram maceradas 0,4 g de nervuras de folhas em 2 mL de tampão PBST (Phosphate buffer solution; TWEEN®), contendo 2% de polivinilpirolidona. Em seguida, o macerado foi centrifugado (4800 g, 20 min).

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

Foi determinada a presença do vírus pelo teste de ELISA, 4 semanas após a inoculação do CTV. Analisou-se 3 clones de cada uma das plantas transgênicas enxertadas sobre limão 'Cravo' e inoculadas por enxertia; 3 clones de cada uma das plantas transgênicas enxertadas sobre limão 'Cravo' e inoculadas com o vetor; 3 clones de cada uma das plantas transgênicas enxertadas sobre laranja azeda e inoculadas

com o vetor; e 3 clones de cada um dos controles positivos e negativos (laranja doce 'Valência' e lima ácida 'Galego' não transgênicas inoculados – controle positivo – e não inoculados – controle negativo).

3.6 Análise de microscopia eletrônica

Foram feitas análises de microscopia eletrônica de transmissão no Laboratório de Histopatologia Vegetal do CENA/USP e no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da ESALQ/USP, sob a supervisão da Prof. Dra. Neusa de Lima Nogueira. Tais análises foram realizadas em amostras de folhas de três clones das plantas matrizes transgênicas de 'Valência' inoculadas por enxertia com o CTV, para se avaliar a presença do patógeno causador da tristeza dos citros nas plantas inoculadas. Pequenas porções de tecidos (1 x 2 mm) de folhas foram fixadas em solução de Karnovsky modificado: glutaraldeído 2% , paraformaldeído 2%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio (0,05 M PH 7,2), por 1 h. Em seguida foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e fixadas por 1 h com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após passar por rápidas lavagens com solução salina 0,9%, foram coradas “em bloco” com acetato de uranila 2,5% em água, por 16 h, e desidratadas com séries crescentes de acetona em água (25, 50 e 75%), por 5 min cada série, seguidas por 2 tratamentos com acetona 90% (10 min) e 3 tratamentos com acetona pura (20 min). Posteriormente os espécimes foram incluídos em resina Epon ou Spurr. Os cortes ultrafinos (60 - 90 nm) foram depositados em telas de cobre recobertas com formvar (TAAB Laboratories), contrastados com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). Tais cortes foram examinados ao microscópio eletrônico (Zeiss EM-900) e fotografados. As fotos obtidas foram analisadas, identificando-se a presença ou não de partículas e inclusões do patógeno.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular das plantas

As plantas matrizes utilizadas nos experimentos foram identificadas como transgênicas por PCR. Para confirmação da integração do transgene foram realizadas análises de Southern blot com digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *Bam*HI e hibridização com as sondas dos genes da capa protéica do CTV e da região conservada do CTV (Figura 1). A integração das seqüências transgênicas foi confirmada para todas as linhagens contendo o gene da capa protéica e da seqüência conservada do CTV e para seis linhagens contendo a seqüência hairpin (Figura 1). Pela análise dos resultados do Southern blot é possível verificar que as plantas transgênicas são provenientes de diferentes eventos de transformação genética e possuem de 1 a 3 eventos de inserção do transgene (Figura 1). Não foi constatada hibridização nas amostras de DNA das plantas não transgênicas, utilizadas como controle, em todas as análises realizadas. Plantas geneticamente transformadas apresentando mais de um evento de inserção é fato constantemente observado em trabalhos com plantas cítricas como plantas de *Citrus aurantifolia* transformadas com o gene da capa protéica do CTV (DOMÍNGUEZ et al., 2000), plantas de *Poncirus trifoliata* com integração do gene *Ctv* (RAI, 2006) e plantas de citrange Carrizo transformadas para expressar em alto grau uma enzima chave na biossíntese de giberelinas (FAGOAGA et al., 2007).

Depois de obter a confirmação da integração do transgenes nas plantas matrizes, foram feitas análises de RT-PCR para detectar a presença de RNA mensageiro relativo ao transgene. Das 10 matrizes transgênicas avaliadas contendo a construção gênica pCTV-CP, em apenas uma (CP6) não foi possível detectar a presença de RNA mensageiro, mostrando que o transgene está sendo transcrito nas outras 9 plantas. Todas as matrizes contendo a construção pCTV-SC mostraram a transcrição do transgene. Para as matrizes contendo a construção pCTV-dsCP, com exceção de apenas uma que obteve um sinal fraco (DS4), não foi possível detectar a transcrição do transgene (Figura 2). As plantas contendo a construção pCTV-dsCP não apresentaram ou apresentaram apenas sinais baixos da expressão do transgene

provavelmente porque a construção *hairpin* pode formar RNAs fita dupla que são processados em pequenas moléculas com aproximadamente 21 a 24 nucleotídeos, conhecidas como microRNAs pela enzima DICER, desencadeando o processo de silenciamento gênico. A adição à reação de PCR de uma amostra de RNA tratado com DNase, a qual não apresentou amplificação do transgene, comprovou a ausência de contaminação com DNA no material (Figura 2). Outros pesquisadores também obtiveram plantas transgênicas para resistência a vírus contendo construções *hairpin* como ameixeiras resistentes ao PPV (ZHANG et al., 2006) e feijoeiro resistente ao BGMV (BONFIM et al., 2007).

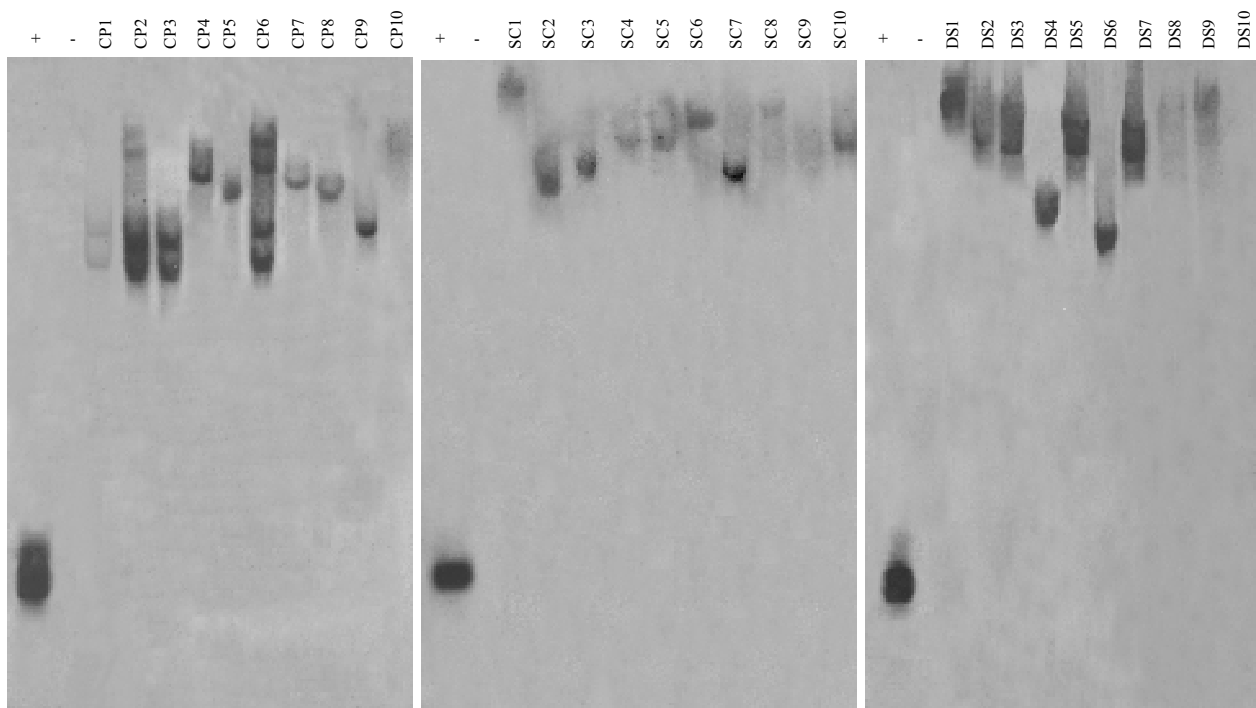


Figura 1 – Análises de Southern blot das linhagens transgênicas. + = controle positivo (sonda não marcada); - = controle negativo constituído de planta de laranja 'Valência' não-transgênica; CP1 - CP10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-CP; SC1 - SC10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-SC; DS1 - DS10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-dsCP

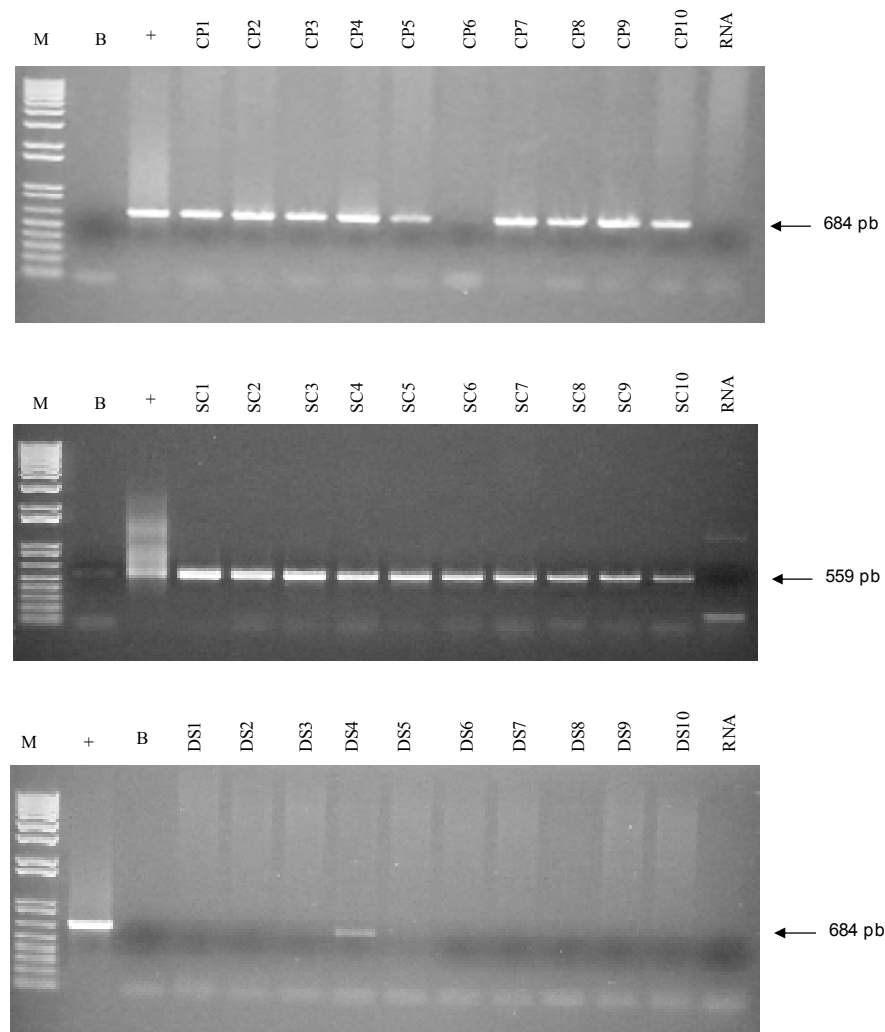


Figura 2 – Análises de RT-PCR das linhagens transgênicas. M = marcador; B = branco; + = controle positivo constituído de amostra de DNA de planta transgênica contendo o gene da capa protéica do CTV; - = controle negativo constituído de cDNA de planta de laranja ‘Valência’ não-transgênica; CP1 - CP10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-CP; SC1 - SC10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-SC; DS1 - DS10 = plantas obtidas em experimentos de transformação genética com a construção gênica pCTV-dsCP.; RNA = amostra de RNA tratada com DNase

4.2 Propagação das plantas

Cada uma das 30 plantas matrizes foi propagada por enxertia, em dez repetições no porta-enxerto limão 'Cravo', e em cinco repetições no porta-enxerto laranja azeda (Figura 3). Desses clones, 60% foram utilizados para os testes de avaliação da resistência ao CTV. A poda da parte aérea dos porta-enxertos, para estimular a brotação das borbulhas, e a retirada dos fitilhos protetores foram feitas de 25 a 30 dias após a enxertia avaliando-se o "pegamento" das borbulhas, observando-se uma eficiência na propagação das plantas de 97% para as plantas enxertadas em limão 'Cravo' (9 clones não desenvolveram) e de 88% para as enxertadas em laranja azeda (18 clones não desenvolveram).

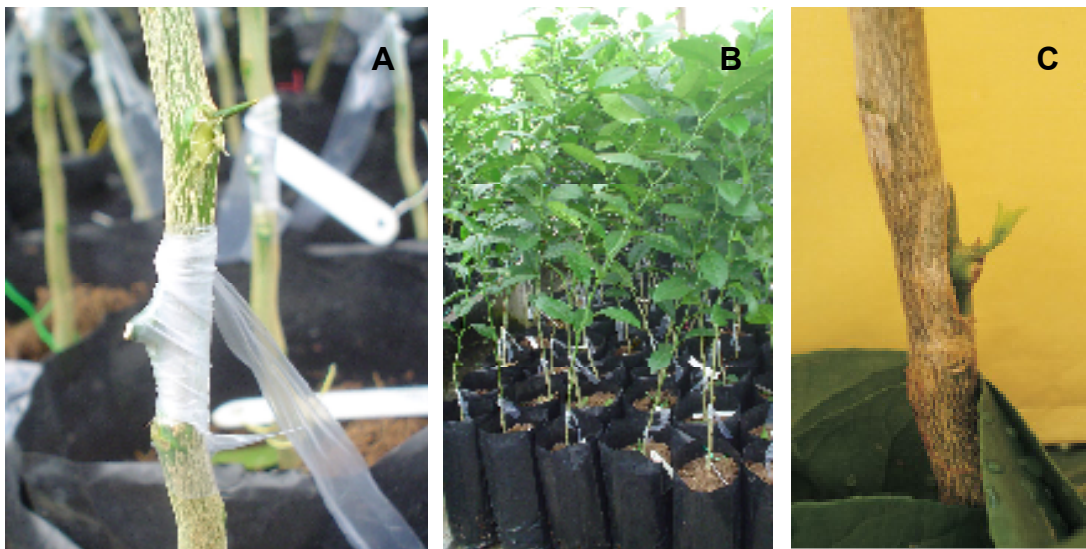


Figura 3 – Propagação das linhagens transgênicas. a) Borbulha recém-enxertada em porta-enxerto limão 'Cravo' e protegida por fitilho de plástico. b) Plantas do porta-enxerto limão 'Cravo' recém-enxertadas. c) Desenvolvimento de borbulha transgênica, 2 meses após a enxertia

4.3 Avaliação da resistência à infecção do vírus da tristeza dos citros nas plantas inoculadas

Após quatro meses de desenvolvimento normal dos clones, foram iniciadas as inoculações com o patógeno. As inoculações foram feitas por enxertia de borbulhas provenientes de plantas infectadas com o CTV ou por pulgões da espécie *Toxoptera citricida* contaminados com o CTV (Figura 4). Esses insetos foram mantidos em constante desenvolvimento e multiplicação em plantas contaminadas com CTV, dentro de casa de vegetação, como mostra a Figura 4.



Figura 4 – Inoculação do CTV. a) Borbulhas de laranja ‘Pêra’ infectadas com o isolado CTV-IAC e enxertadas no porta-enxerto limão ‘Cravo’ abaixo do ponto de enxertia. b) Clones de plantas transgênicas enxertadas em porta-enxerto limão ‘Cravo’ com o ramo transgênico tutorado com tutor de ferro, no ponto em que foram inoculadas por enxertia. c) Inoculação de plantas pelo vetor *Toxoptera citricida*. d) Colônias do vetor *Toxoptera citricida* mantidas em plantas contaminadas com CTV

Aproximadamente quatro semanas após as inoculações das plantas transgênicas foi feita a avaliação da presença e replicação do CTV nessas plantas. Para tanto, utilizou-se o teste serológico de ELISA sanduíche indireto, utilizando-se para a detecção do vírus um antissoro policlonal contra CTV e um anticorpo monoclonal contra a proteína da capa protéica do isolado CTV-IAC. Esta técnica é bastante

sensível, pois ao se usar antissoro policlonal para sensibilizar a placa há uma alta concentração da proteína a ser detectada pelo anticorpo monoclonal.

Em uma primeira fase, fez-se o teste de ELISA para três clones de cada uma das matrizes transgênicas, inoculados por enxertia. Nessas análises, todas as linhagens indicaram a presença do vírus em pelo menos dois dos três clones avaliados. Alguns clones acusaram baixos valores de absorvância a 450 nm, indicando baixa concentração do vírus. Para as matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP foi detectado 1 clone das matrizes CP2, CP3 e CP9 com baixos valores de absorvância (Figura 5). O mesmo foi observado para as matrizes contendo a construção pCTV-SC, em que as plantas SC7, SC8 e SC10 apresentaram 1 clone com baixos valores de absorvância cada (Figura 6). Já para as plantas contendo a construção pCTV-dsCP, as linhagens DS2, DS6 e DS9 apresentaram 1 clone e a DS7 apresentou 2 clones com baixos valores de absorvância (Figura 7).

O inóculo utilizado nessas plantas pode ter sido muito forte e com isso o vírus pode ter sobreposto a resistência das plantas transgênicas, que, na sua maioria, não foram resistentes. Alguns autores também defendem a teoria de que, sendo o porta-enxerto limão 'Cravo' tolerante e suscetível ao CTV, o vírus pode se mover e replicar facilmente no porta-enxerto e chegar em altas concentrações na copa transgênica, sobrepondo a resistência oferecida pela construção gênica inserida no genoma dessas plantas (ZANEK et al., 2008).

Numa segunda etapa, tentando-se refletir melhor as condições naturais em que as plantas são infectadas com o vírus, a análise da resistência das plantas transgênicas foi realizada pela inoculação do vírus pelo inseto vetor.

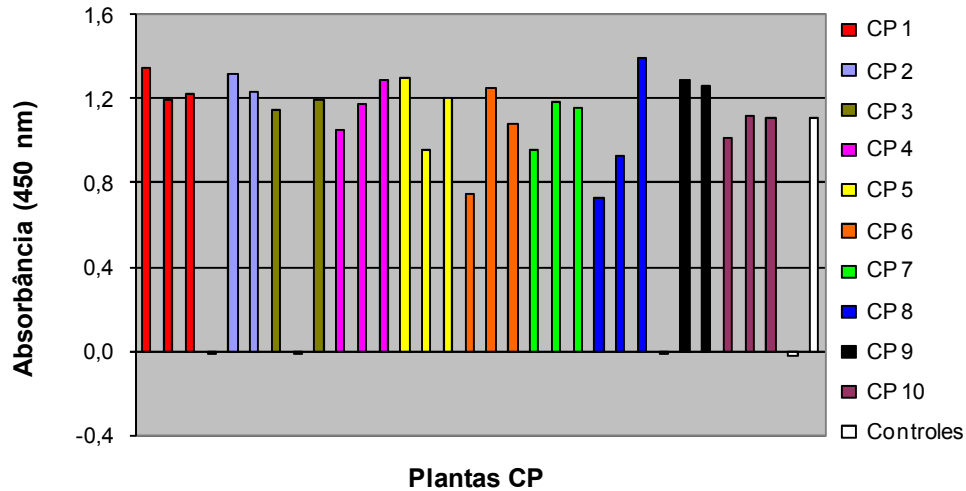


Figura 5 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP, após 4 semanas da inoculação com CTV por enxertia de material propagativo contaminado. CP1 - CP10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

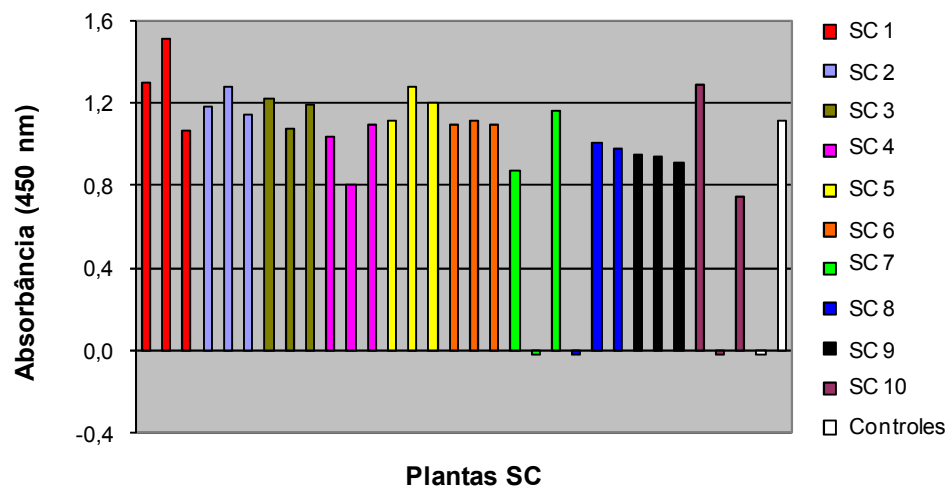


Figura 6 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-SC, após 4 semanas da inoculação com CTV por enxertia de material propagativo contaminado. SC1 - SC10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

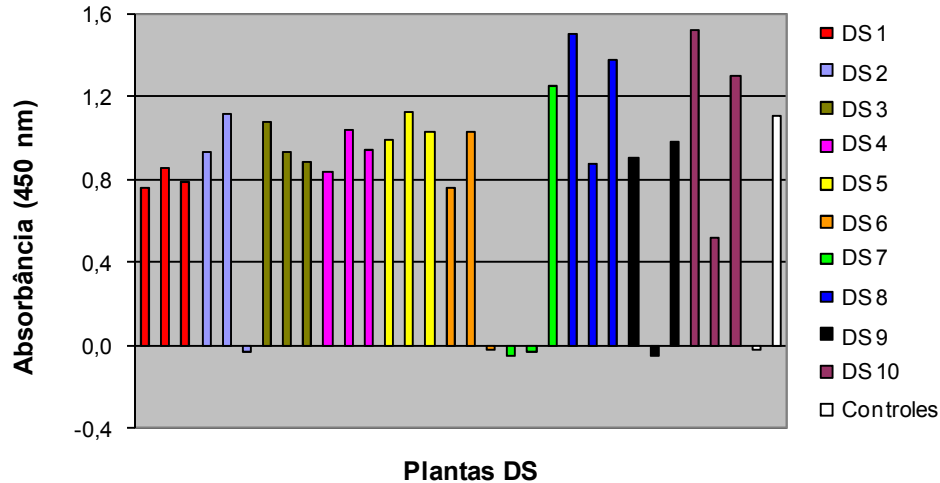


Figura 7 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-DS após 4 semanas da inoculação com CTV por enxertia de material propagativo contaminado. DS1 - DS10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

Foram inoculados três clones de cada uma das 30 matrizes transgênicas e seis plantas de laranja ‘Valência’ não-transgênicas, enxertados sobre limão ‘Cravo’. Para se obter 100% de eficiência de inoculação das seis plantas utilizadas como controle, foram necessárias três inoculações com intervalos de sete dias entre elas, sendo que em cada inoculação foram utilizados aproximadamente 20 pulgões por planta transgênica e esses foram mantidos nas plantas por um período de 48 horas (Figura 8). As inoculações dos clones foram feitas simultaneamente com as inoculações das plantas utilizadas como controle, até a obtenção de 100% da presença do vírus nestas.

Aproximadamente quatro semanas após a terceira inoculação com pulgões infectados com CTV foi realizado o teste de ELISA em todas as plantas (transgênicas e não transgênicas), o que mostrou maior número de plantas apresentando baixos valores de absorbância, comparando-se com os resultados da inoculação por enxertia de material propagativo contaminado. Foram observadas quatro matrizes que apresentaram seus três clones com baixos teores de absorbância, uma de cada uma das construções pCTV-CP (CP6) e pCTV-SC (SC4) e duas da construção pCTV-dsCP

(DS2 e DS9), sendo essas as mais propícias a apresentar resistência ao CTV. Todas as outras matrizes mostraram presença do vírus em pelo menos um de seus clones.

Para as matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP foram observados 16 clones das diferentes matrizes com baixos valores de absorvância, sendo que todas as matrizes apresentaram pelo menos um clone com baixa absorvância (Figura 9). Resultados semelhantes foram observados para as matrizes contendo a construção pCTV-SC, em que foram observados 17 clones com baixos valores de absorvância e todas as matrizes apresentaram pelo menos um desses clones (Figura 10). Já para as plantas contendo a construção pCTV-dsCP, observaram-se 19 clones com baixas absorvâncias entre todas as matrizes, com exceção da planta DS1 que foi a única matriz enxertada sobre limão 'Cravo' e inoculada pelo pulgão que apresentou todos os seus clones com altos valores de absorvância (Figura 11).

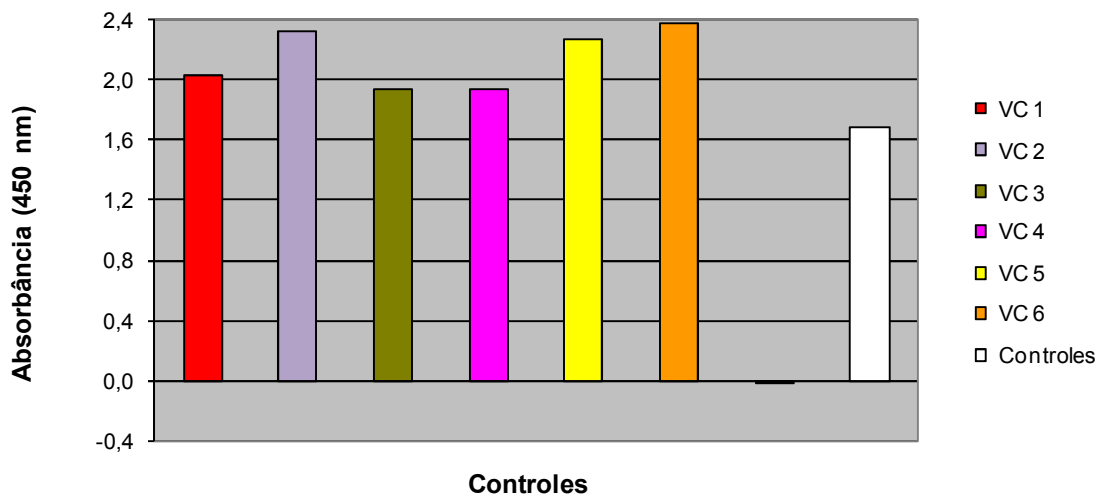


Figura 8 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das 6 plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas enxertadas sobre limão 'Cravo', utilizadas como controle nas inoculações com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*, após 4 semanas da última inoculação. VC1 - VC6 = plantas de 'Valência' enxertadas sobre limão 'Cravo'. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada por enxertia (controle positivo)

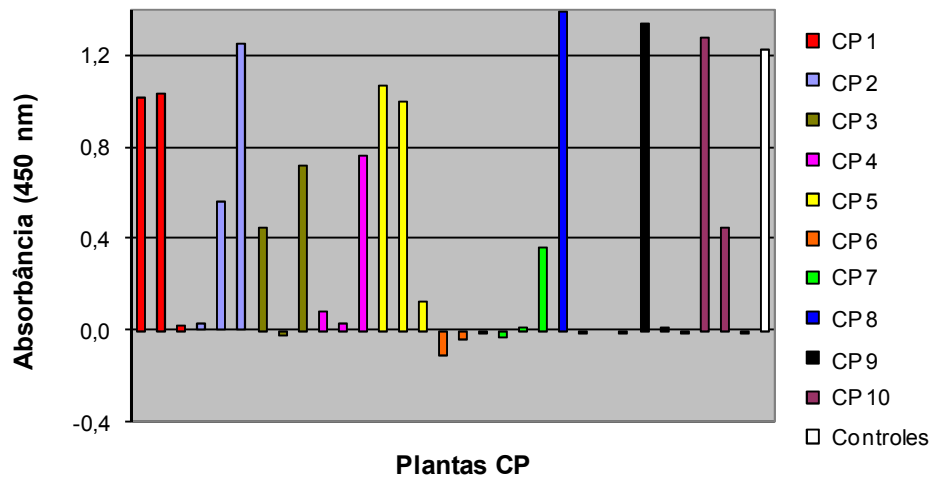


Figura 9 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP e enxertadas sobre limão ‘Cravo’, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. CP1 - CP10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

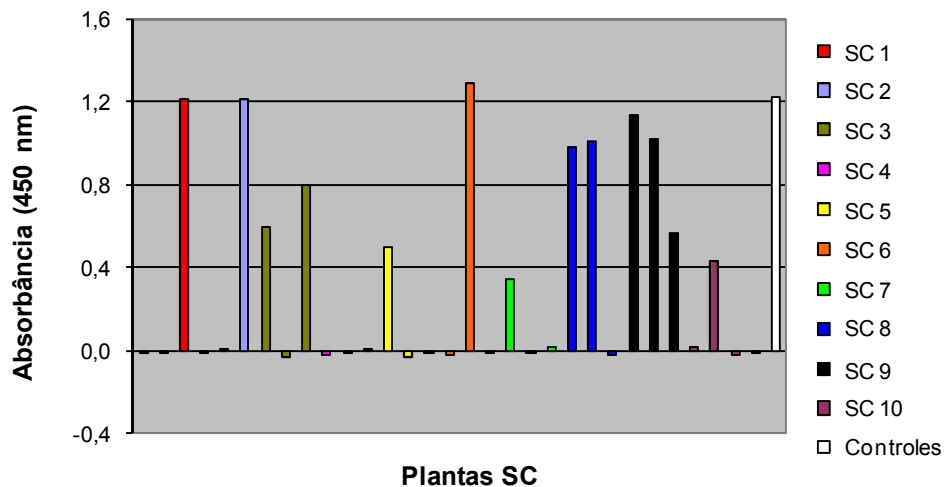


Figura 10 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-SC e enxertadas sobre limão ‘Cravo’, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. SC1 - SC10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

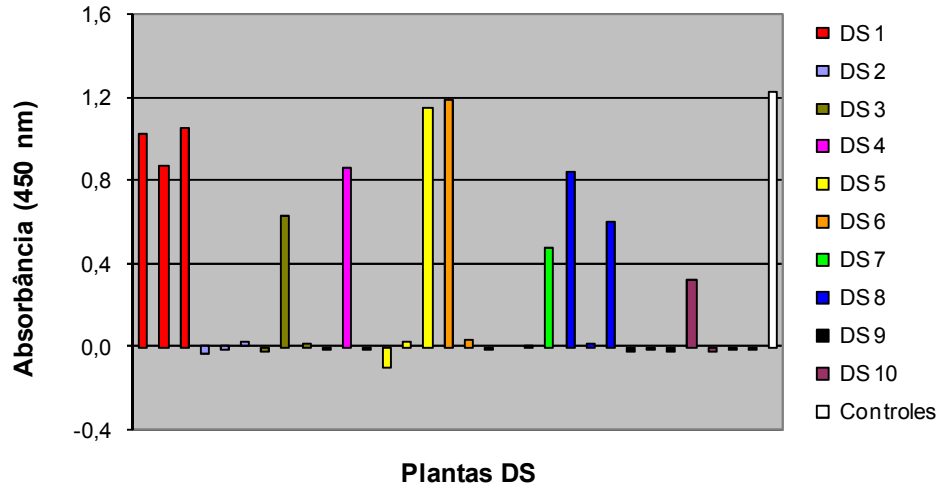


Figura 11 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-DS e enxertadas sobre limão ‘Cravo’, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. DS1 -DS10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

Almejando avaliar o desempenho das plantas transgênicas enxertadas em outro porta-enxerto, partiu-se para nova etapa de análises de resistência das plantas transgênicas à infecção com o CTV, utilizando-se o porta-enxerto laranja azeda. Nessa nova etapa, foram inoculados com o vetor *Toxoptera citricida* contaminado com o CTV 3 clones de cada uma das 30 matrizes transgênicas e 6 plantas de ‘Valência’ não-transgênicas, enxertados sobre laranja azeda. Assim como para as plantas enxertadas sobre limão ‘Cravo’, foram feitas 3 inoculações com intervalos de 7 dias entre elas, sendo que em cada inoculação foram utilizados aproximadamente 20 pulgões por planta e esses foram mantidos nas plantas por um período de 48 horas, o que foi suficiente para se obter 100% de eficiência de inoculação das 6 plantas utilizadas como controle (Figura 12).

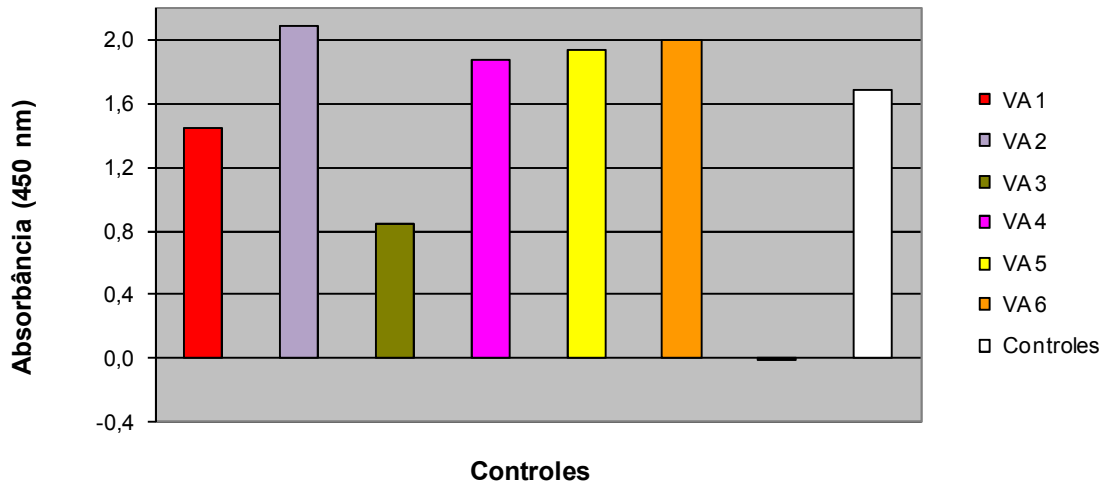


Figura 12 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das 6 plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas enxertadas sobre laranja azeda, utilizadas como controle nas inoculações com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*, após 4 semanas da última inoculação. VA1 - VA6 = plantas de ‘Valência’ enxertadas sobre laranja azeda. Controles = plantas de laranja doce ‘Valência’ não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada por enxertia (controle positivo)

Aproximadamente um mês após a última inoculação com o vetor, realizou-se o teste de ELISA. Foram observadas sete matrizes apresentando seus três clones com ausência ou baixos valores de partículas virais, sendo que dois contêm a construção pCTV-CP (CP2 e CP4), um contém a construção pCTV-SC (SC7) e quatro contêm a construção pCTV-dsCP (DS3, DS4, DS8 e DS9). As outras 23 matrizes apresentaram partículas do vírus em pelo menos um de seus três clones avaliados. Para as matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP foram observados 17 clones pertencentes às 10 diferentes matrizes com baixos valores de absorbância (Figura 13). O mesmo foi observado para as matrizes contendo as construções pCTV-SC e pCTV-dsCP, nas quais foram observados, respectivamente, 19 e 18 clones com baixos valores de absorbância, sendo que todas as matrizes apresentaram pelo menos um desses clones (Figuras 14 e 15, respectivamente).

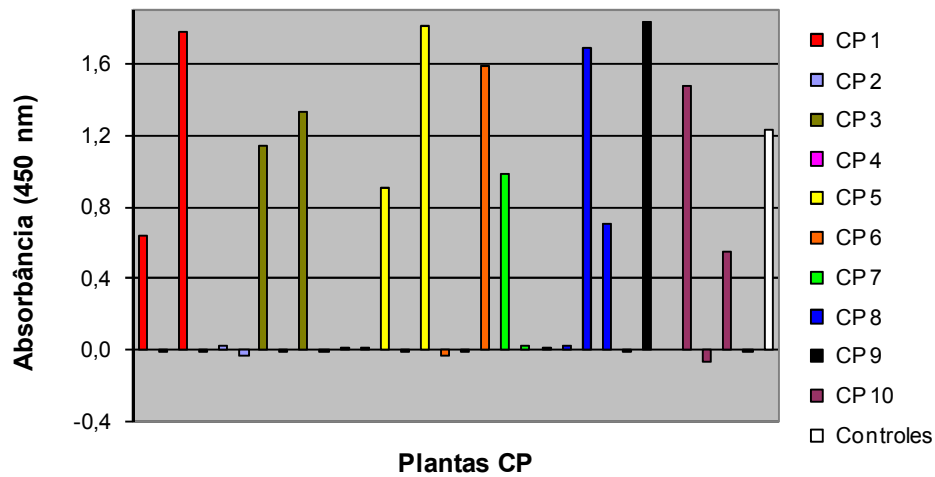


Figura 13 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-CP e enxertadas sobre laranja azeda, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. CP1 - CP10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

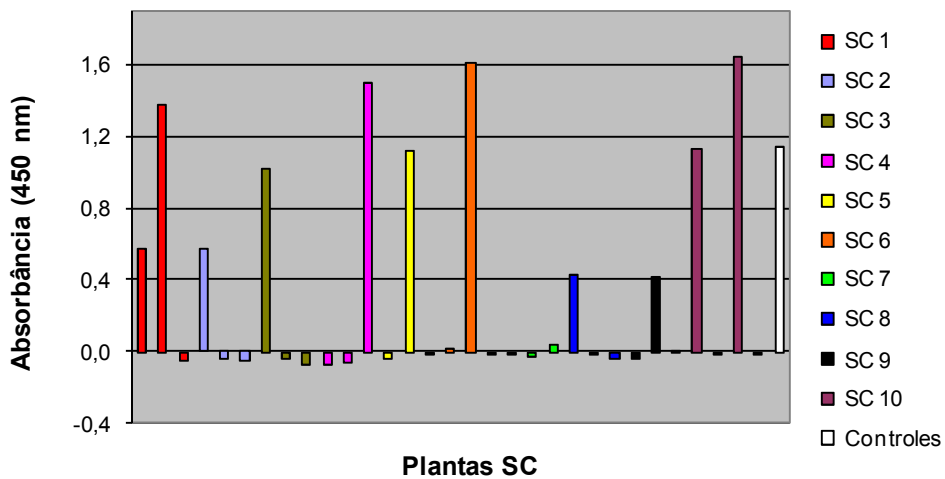


Figura 14 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-SC e enxertadas sobre laranja azeda, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. SC1 - SC10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

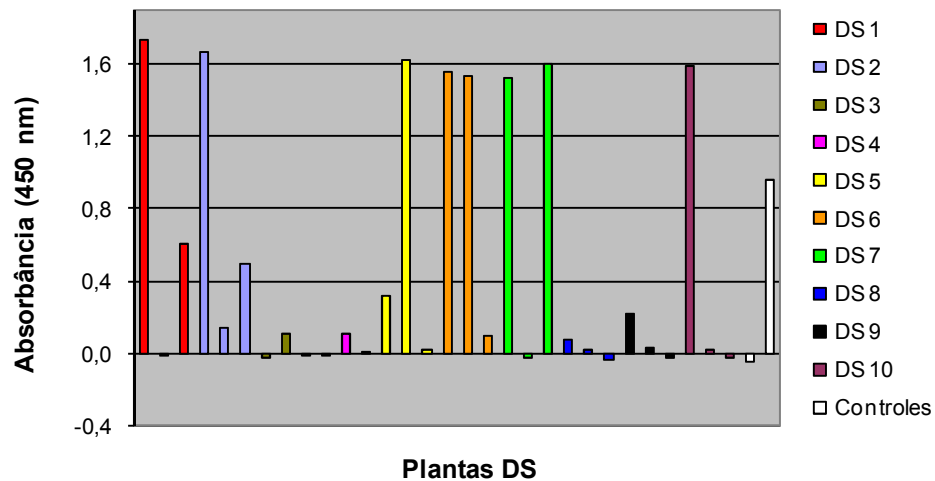


Figura 15 – Avaliação da concentração de vírus por meio de análises de ELISA das matrizes transformadas com a construção gênica pCTV-DS e enxertadas sobre laranja azeda, após 4 semanas da última inoculação com CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*. DS1 - DS10 = plantas transgênicas. Controles = plantas de laranja doce 'Valência' não-transgênicas, sendo uma não-inoculada com CTV (controle negativo) e outra inoculada juntamente com os clones (controle positivo)

Resultados semelhantes de resistência ao CTV de plantas cítricas transgênicas vêm sendo constatados por outros trabalhos. Pesquisadores investigaram a resistência ao CTV de plantas de *Citrus aurantifolia* expressando o gene que codifica a proteína p23 do CTV. Os clones das plantas transgênicas foram inoculados por afídeos ou por enxertia de borbulhas contaminadas e tiveram sua resistência avaliada pelo teste de ELISA. Os autores observaram alguns clones apresentando resistência ao CTV por silenciamento gênico pós-transcricional (FAGOAGA et al., 2006). Domínguez et al. (2002b) inocularam CTV por enxertia de borbulhas contaminadas em 42 linhagens transgênicas de *Citrus aurantifolia* expressando o gene que codifica a proteína p25 da capa protéica do vírus. Foram avaliados nessas plantas o desenvolvimento de sintomas e o acúmulo de vírus por ELISA. Os pesquisadores constataram clones resistentes ao CTV ou com retardo no acúmulo de vírus e no aparecimento de sintomas. Recentemente, utilizando inoculações por enxertia de borbulhas infectadas pelo vírus da tristeza dos citros e avaliações por ELISA e RT-PCR, foi relatada resistência ao CTV

em plantas transgênicas de pomelo contendo variadas construções derivadas do CTV (FEBRES; LEE; MOORE, 2008).

É importante destacar que para as três análises feitas (plantas enxertadas sobre limão 'Cravo' e inoculadas por enxertia; plantas enxertadas sobre limão 'Cravo' e inoculadas por pulgão; plantas enxertadas sobre laranja azeda e inoculadas por pulgão), as plantas contendo a construção pCTV-dsCP foram as que apresentaram os resultados mais promissores para resistência ao CTV (Figuras 7, 11 e 15).

Todos os clones que apresentaram baixos valores de absorvância para o CTV deverão ser inoculados novamente com o vetor contaminado com o vírus para nova avaliação de resistência.

Fato comum observado nos resultados foi uma variação na concentração do vírus entre clones de uma mesma planta transgênica, que receberam a mesma inoculação. Essa constatação também é reportada em outros experimentos de resistência de plantas transgênicas a vírus. Fagoaga et al. (2006) observaram que plantas transgênicas de *Citrus aurantifolia* apresentavam seus clones com respostas diferentes à inoculação com o vírus, sendo que alguns indicaram susceptibilidade e outros, imunidade. Plantas transgênicas de maracujazeiro contendo o gene da proteína capsidial do PWV receberam três inoculações mecânicas sucessivas com três isolados do vírus. Clones de todas as plantas apresentaram alguma resistência à infecção, mas apenas uma planta, nomeada T2, apresentou todos os seus clones com alta resistência ou imunidade ao vírus (TREVISAN et al., 2006). Domínguez et al. (2002b) obtiveram linhagens transgênicas de *Citrus aurantifolia* com 10 a 33% de seus clones com baixa concentração de vírus quando inoculadas com o CTV. Os autores sugerem que isso se deve à variação da dose de vírus recebida por cada planta, à distribuição aleatória do vírus nas plantas infectadas e ao nível variável de expressão do transgene.

Com base nos resultados das análises realizadas foi possível indicar que não há uma relação entre o número de cópias do transgene inseridos no genoma das plantas e a resistência dessas plantas ao vírus, visto que as plantas que apresentaram 2 ou 3 eventos de inserção (CP1, CP2, CP3, CP6 e CP9) apresentaram valores de absorvância nas avaliações de resistência semelhantes aos observados para as plantas que apresentaram apenas um evento de inserção.

Para observar partículas do CTV nas plantas transgênicas, foram feitas fotos digitalizadas no microscópio eletrônico de transmissão em secções de folhas de clones de plantas transformadas de 'Valência' contendo as três construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC e pCTV-DS (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente). As análises ultraestruturais mostraram que os três clones inoculados apresentaram células infectadas e que nessas células o vírus estava presente na forma de partículas longas, flexuosas e desorganizadas e também como linhas mais organizadas, largas, paralelas e encurvadas. As análises revelaram os 3 tipos de inclusões induzidas pelo vírus: arranjos virais, inclusões fibrosas e acúmulo de vesículas citoplasmáticas, corroborando com os resultados de Zhou et al. (2002).

Apesar de não ter sido possível observar uma relação entre os resultados de avaliação da resistência ao CTV com inoculação com o pulgão vetor entre as matrizes transgênicas enxertadas sobre porta-enxerto limão 'Cravo' ou sobre porta-enxerto laranja azeda, algumas plantas foram consideradas promissoras para apresentarem resistência ao CTV, pois apresentaram baixos valores de presença do vírus quando enxertadas sobre os dois porta-enxertos. Entre as plantas contendo a construção pCTV-CP, a planta CP4 (2 clones com baixo valor de absorbância quando enxertada sobre limão 'Cravo' e 3 quando enxertada sobre laranja azeda) e as plantas CP6 e CP7 (3 clones enxertados sobre limão 'Cravo' e 2 dos enxertados sobre laranja azeda com baixos valores de absorbância) podem ser consideradas promissoras. Para as plantas contendo a construção pCTV-SC, considerou-se promissoras as plantas SC4 (3 clones enxertados sobre limão 'Cravo' e 2 dos enxertados sobre laranja azeda com baixos valores de absorbância) e SC7 (todos os seus clones com baixos valores de presença de vírus). Já para as plantas contendo a construção pCTV-DS, foram consideradas promissoras as plantas DS9 (todos os seus clones com baixos valores de absorbância), DS10 (3 clones enxertados sobre limão 'Cravo' e 2 dos enxertados sobre laranja azeda com baixos valores de vírus) e DS3 e DS4 (2 clones enxertados sobre limão 'Cravo' com baixos valores de presença de CTV e todos os 3 enxertados sobre laranja azeda).

Todos os clones que apresentaram baixos valores de absorbância serão inoculados novamente pelo pulgão e os que continuarem apresentando baixa presença do vírus terão seu desempenho frente ao CTV avaliado em campo.

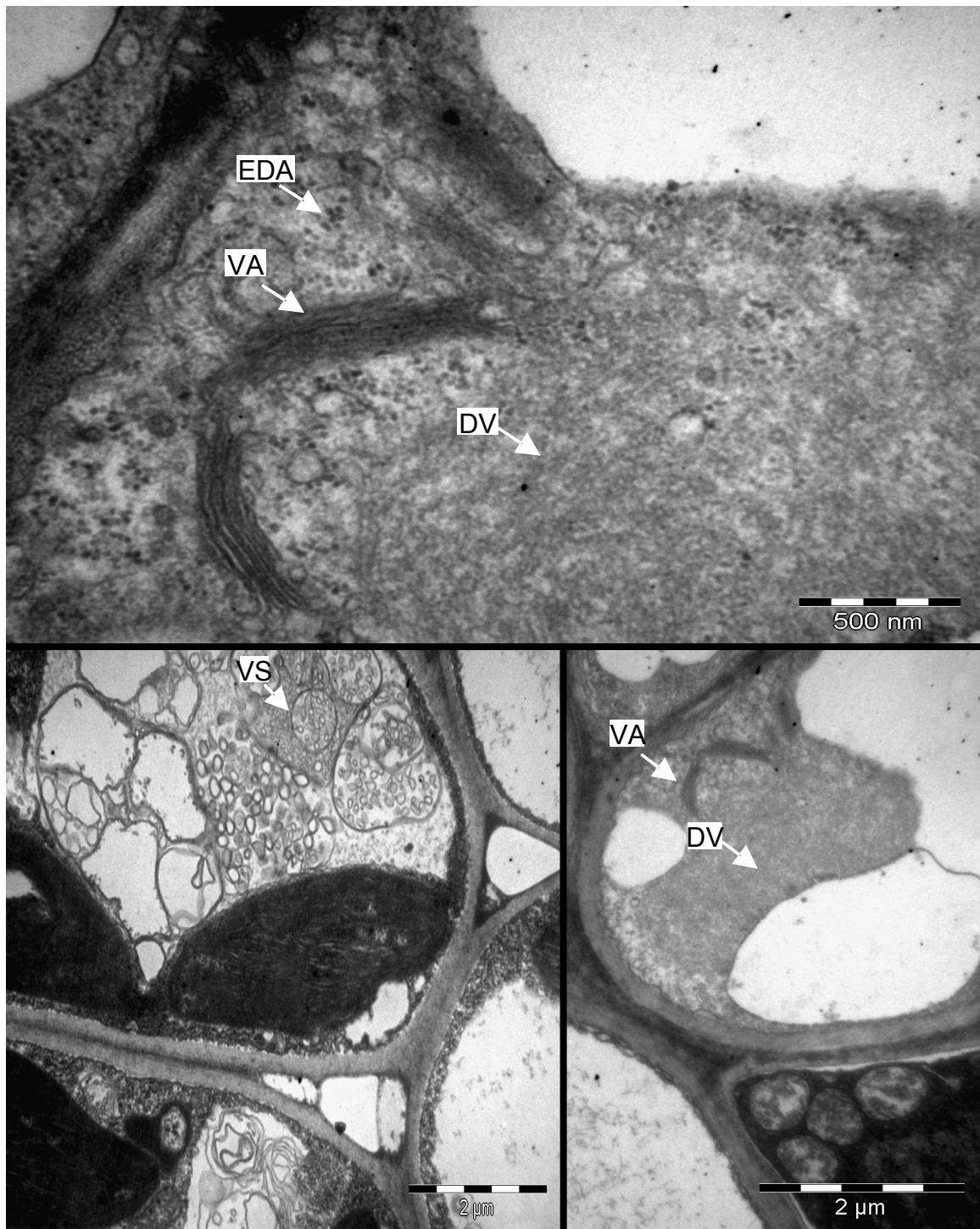


Figura 16 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando células do floema de folhas de plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência' transgênicas (pCTV-CP) e infectadas com CTV. EDA = acúmulos eletro-densos; VA = arranjos virais; DV = partículas virais desorganizadas; VS = vesículas

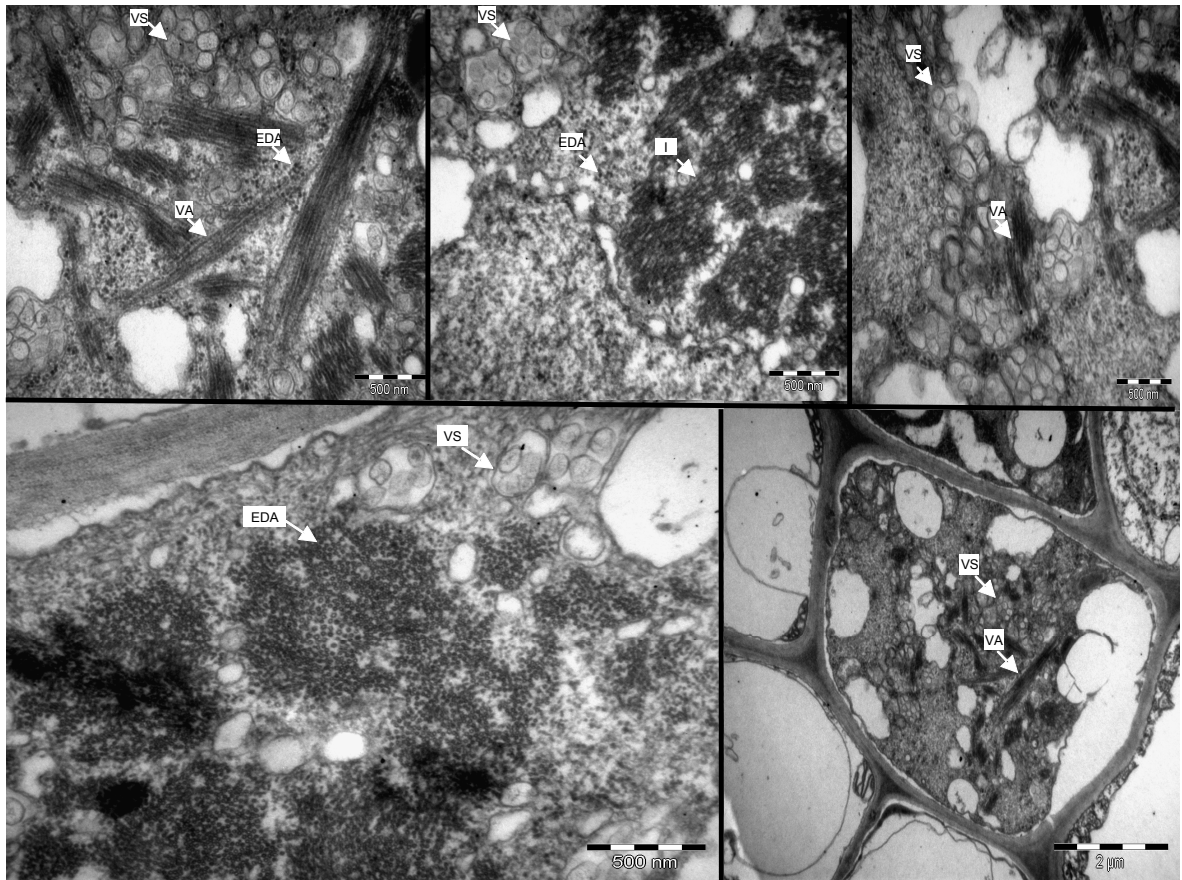


Figura 17 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando células do floema de folhas de plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência' transgênicas (CTV-SC) e infectadas com CTV. EDA = acúmulos eletro-densos; VA = arranjos virais; DV = partículas virais desorganizadas; VS = vesículas; I = inclusões fibrosas

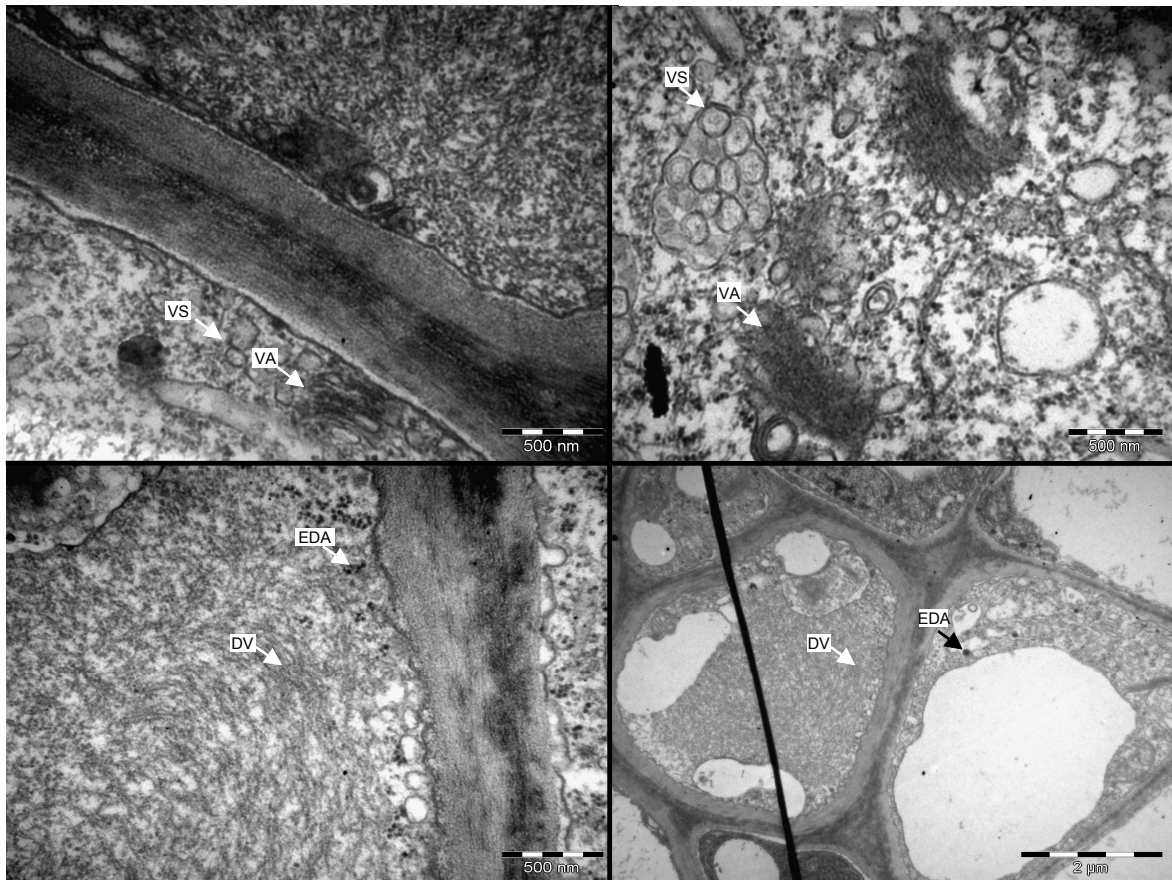


Figura 18 – Micrografias eletrônicas de transmissão mostrando células do floema de folhas de plantas de *Citrus sinensis* cv. 'Valência' transgênicas (pCTV-DS) e infectadas com CTV. EDA = acúmulos eletro-densos; VA = arranjos virais; DV = partículas virais desorganizadas; VS = vesículas

5 CONCLUSÕES

A inoculação do vírus da tristeza dos citros pela enxertia de borbulhas provenientes de plantas de citros contaminadas com esse vírus é muito drástica, o que não permite uma avaliação fiel da resistência das plantas ao CTV.

A inoculação de clones das plantas transgênicas com o vírus da tristeza dos citros por meio do pulgão vetor levou à identificação de clones com baixa concentração do vírus, indicando uma possível resistência ao patógeno.

O maior número de clones com baixa concentração do CTV foi identificado entre as plantas matrizes contendo a construção gênica pCTV-dsCP, contendo repetições no sentido sense e antisense do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros.

REFERÊNCIAS

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

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

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

BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T.R.; BOVÉ, J.M. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 502-512, 2003.

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

BAULCOMBE, D.C. RNA silencing. **Current Biology**, London, v. 12, p. 82-84, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

CARREIRA, C. **Informe preliminar sobre uma enfermidade nueva comprobada em los citrus de Bella Vista (Corrientes)**. Buenos Aires: Ministério de Agricultura, 1933. p. 275-280.

CIB. Disponível em: < <http://www.cib.org.br>>. Acesso em: 22 out. 2008.

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

COOPER, B.; LAPIDOT, M.; HEICK, J.A.; DODDS, J.A.; BEACHY, R.N. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. **Virology**, Amsterdam, v. 206, p. 307-313, 1995.

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

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

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

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

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 1, p. 13-15, 1991.

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

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

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

FAGOAGA, C.; TADEO, F.R.; IGLESIAS, D.J.; HUERTA, L.; LLISO, I.; VIDAL, A.M.; TALON, M.; NAVARRO, L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L.; PEÑA, L. Engineering of gibberellin levels in Citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1407-1420, 2007.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 28 set. 2008.

FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 1331-1335, 1996.

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

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2. p. 261-296.

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

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-811, 1998.

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

FUNDECITRUS. Disponível em: <www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 30 set. 2008.

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

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p.93, 2001.

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

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

GURA, T. A silence that speaks volumes. *Nature*, London, v. 404, p. 804-808, 2000.

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

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

IBGE, Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 28 set. 2008.

INGELBRECHT, I.; VAN HOUTT, H.; VAN MONTAGU, M.; DEPICKER, A. Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 10502-10506, 1994.

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

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

KITAJIMA, E.W. Thread-like particles associated with Tristeza disease of citrus. **Nature**, London, v. 201, p.1011-1012, 1963.

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

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

LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, Amsterdam, v. 189, p.725-733, 1992.

LÓPEZ, C.; CASTILLO-NAVAS, J.; GOWDA, S.; MORENO, P.; FLORES, R. The 23-KDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus Tristeza Virus* is an RNA-binding protein. **Virology**, Amsterdam, v. 269, p. 462-470, 2000.

LOPES, S.A.; LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Clorose variegada: perdas anuais de US\$ 100 milhões. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p. 20-23, 2004.

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

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F.; ZACHARIAS, P.R.A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPÇÃO, L.C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E.C.; FERRARI, F.; FRANCO, S.F.; GIACHETTO, P.F.; GIRASOL, A.; JORDÃO JR., H.; SILVA, V.H.A.; SOUZA, L.C.A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ZANCA, A. S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J. P.; REINACH, F.C.; FERRO, J.A.; SILVA, A.C.R. da. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae Family) associated with Citrus Sudden Death Disease. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, Mar. 2005.

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

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

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

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

MOREIRA, S.; COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Conhecimentos atuais sobre a tristeza dos citros. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 24, p. 335-345, 1949.

MÜLLER, G.W. A tristeza dos citros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 2, p. 245-263, 1976.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, p. 197-198, 1987.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. **Citricultura brasileira**, São Paulo, p. 735-762, 1991.

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

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

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

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

NIEBEL, F.C.; FRENO, P.; VAN MONTAGU, M.; CORNELISSEN, M. Post-transcriptional cosuppression of 9-13-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 347-358, 1995.

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

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

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

RAI, M. Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 61, p. 399-414, 2006.

RATCLIFF, F.; MACFARIANE, S.; BAULCOMBE, D.C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1207-1215, 1999.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, vol. 18, p. 208-213, 1963.

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

ROY, G.; SUDARSHANA, M.R.; ULLMAN, D.E.; DING, S.; DANDEKAR, A.; FALK, B.W. Chimeric cDNA Sequences from *Citrus tristeza virus* confer RNA silencing-mediated resistance in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. **Virology**, Amsterdam, v. 96, p. 819-827, 2006.

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

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

SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; SOOST, R.K.; NAUER, E.M. Contribution to the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). **Systematic Botany**, Laramie, v. 7, p. 170-177, 1982.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in Fruit Breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.

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

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

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

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J.; MACIEL, C.; VIEIRA, M.L.C.; MELETTI, L.M.M.; REZENDE, J.A.M. Resistance to Passion fruit woodiness virus in transgenic passionflower expressing the virus coat protein gene. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 1026-1030, 2006.

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

VAN DEN BOOGAART, T.; LOMONOSSOFF, G.P.; DAVIES, J.W. Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology-dependent gene silencing? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p.717-723, 1998.

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

WASSENEGGER, M. Gene silencing. **International Review of Cytology**, Amsterdam, v. 219, p. 61-113, 2002.

WATERHOUSE, P.M. Defense and counterdefense in the plant world. **Nature Genetics**, London, v. 38, p. 138-139, 2006.

WATERHOUSE, P.M.; GRAHAM, M.W.; WANG, M.B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 13959–13964, 1998.

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defence against viruses. **Nature**, London, v. 411, p. 834-842, 2001.

WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M; TIMMER, L.W. **Compendium of Citrus Diseases**. 2nd ed. Saint Paul. APS Press. 1993. 128 p.

YAMAYA, J.; YOSHIOKA, M.; MESHI, T.; OKADA, Y.; OHNO, T. Cross protection in transgenic tobacco plants expressing a mild strain of tobacco mosaic virus. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 215, p. 173-175, 1988.

YU, H.; KUMAR, P. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.22, p.167-174, 2003.

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

ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 191-244, 2005.

ZHANG, S.C.; TIAN, L.M.; SVIRCEV, A.; BROWN, D.C.W.; SIBBALD, S.; SCHNEIDER, K.E.; BARSZCZ, E.S.; MALUTAN, T.; WEN, R.; SANFACON, H. Engineering resistance to *Plum pox virus* (PPV) through the expression of PPV-specific hairpin RNAs in transgenic plants. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 28, p. 263-270, 2006.

ZHOU, C.L.E.; AMMAR, E.; SHETA, H.; KELLEY, S.; POLEK, M.; ULLMAN, D.E. *Citrus tristeza virus* ultrastructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 80, p. 512-525, 2002.

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](#)