

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

**Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. ‘Micro-Tom’) e de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *Csd1* (superóxido dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata***

**Tatiana de Souza Moraes**

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

**Piracicaba  
2015**

**Tatiana de Souza Moraes**  
**Engenheira Agrônoma**

**Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom')  
e de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *Csd1* (superóxido  
dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba**  
**2015**

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

Moraes, Tatiana de Souza

Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom') e de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *Csd1* (superóxido dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata* / Tatiana de Souza Moraes. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

77 p. : il.

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

1. Huanglongbing 2. Transformação genética 3. Citros 4. Planta modelo 5. Micro-Tom  
6. Superóxido dismutase I. Título

CDD 635.642  
M752t

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

**DEDICO**

*À Deus,  
Por ser essencial em minha vida.*

*Aos meus pais,  
Por todo amor e carinho.*

*À minha avó Noêmia,  
Por ser a base de tudo que sou hoje,  
Fortaleza da minha família!*

**OFEREÇO**

*Aos meus irmãos,  
Por todo apoio e companheirismo.*

*Aos amigos,  
Que se fazem especial  
E se tornam essencial em minha vida!*



## AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me proporcionar boas oportunidades e aos meus pais por me ensinarem a ser capaz de aproveitá-las com honestidade, respeito e persistência.

À Profa. Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes, pela orientação, confiança e grande contribuição para a conclusão deste projeto. Tenho muito orgulho em tê-la como orientadora e admiração pela pessoa que você é. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela colaboração, por todos os ensinamentos e reflexões, e acima de tudo, por todo o comprometimento e por sempre estar disponível em ajudar.

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', pela oportunidade de cursar o mestrado e aos professores do programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelo ótimo aprendizado e pela formação acadêmica.

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

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

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC pela importante parceria e, em especial, a Polyana Kelly Martins e Juliana de Freitas Astúia que elaboraram a construção gênica utilizada no trabalho.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres pela colaboração e ensinamentos, e à todos os integrantes do Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal - ESALQ/USP pela amizade e ajuda, em especial à Lilian Pino, Maísa Siqueira e Cassia Regina.

À Danielle Gregório Gomes Caldas e Celso Eduardo Benedetti pela participação como banca, na defesa do meu Mestrado, e pelos comentários e sugestões de grande relevância para este trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas – ESALQ/USP e ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal – CENA/USP, pela infraestrutura na realização deste trabalho, e aos técnicos Liliane Sttip, Marcelo Favareto Correa e Renata Beatriz Cruz, pela amizade e todo auxílio na realização dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP): Eveline Tavano, Lígia Erpen, Bianca Aluisi, Carolina Rossi, Isabela Barbeiro, Fabiana Muniz, Leonardo Soriano, Marcelo Favareto e Renata Cruz. Obrigada pela ajuda, força e companheirismo. Por todos os momentos compartilhados juntos. Vocês são Genghis!

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP): Adriana Martinelli, Sylvia Silveira, Sandra Santa Rosa, Monica Rossi e Emily Rufino, pela amizade, por todo apoio e ajuda.

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

Aos amigos do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP), em especial Marcela Morato, Eloisa Vendemiatti, Maísa Siqueira, Cristiane Calaboni, Magda Tessmer, João Paulo Corrêa, Lucas Riboldi, André Luiz, Guilherme Pereira, Stevan Bordignon, Naiara Célica, Gabriel Rocha, Ana Paula Preczenhak, Tânia Batista, Sabrina, Diney Moreira, Rafaela Vieira. Obrigada pela amizade, incentivo e pelos momentos de confraternização, que apesar de poucos, sempre renderam muitas risadas e momentos divertidos.

Aos amigos sementeiros do Programa de Fitotecnia (Esalq/USP), em especial a Natalia Arruda, Denis Santiago, Danielle Castan e Haynna Abud, pela amizade, incentivo e por todos os momentos que passamos juntos. Vocês são nota 10!

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

À Profa. Tsai e a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Celular - CENA/USP, por disponibilizar o uso de equipamentos, quando solicitado, com muita gentileza e confiança.

À todos os amigos do CENA/USP, que nessa reta final eu tive o prazer de conviver. Vocês se tornaram pessoas queridas, vou guardar com muito carinho a amizade de cada um de vocês.

Ao irmão de coração, Bathuel Silva, por "quebrar os galhos" da minha vida, com muita gentileza e carinho. Muito obrigada por tudo!

Às amigas Fabrícia Reis, Carla Pelizari, Graziela Resende, Lilian Heloisa, Vanessa Cristina Caron e Aline Cruz por toda amizade e pelos ótimos momentos que compartilhei com cada uma de vocês.

À bibliotecária Silvia Maria Zinsly, pelo auxílio durante a revisão deste material.

Às amigas que trago comigo além das quatro pilastras (Viçosa/MG), que apesar da distância se fazem sempre presentes ao meu lado, em especial Rafael Uchôa, Bruna Santana, Martha Freire, Naiara Fernandez, Verônica Faustino e Rodrigo Soares. Muito obrigada pelo apoio, incentivo e ajuda. Amo muito todos vocês!

Por fim, gostaria de agradecer à todos aqueles que através de pequenos gestos fizeram a diferença, me ajudaram a seguir em frente e tiveram sua contribuição na realização deste trabalho.

**Muito Obrigada!**





*“Por mais inteligente que alguém possa ser, se não for humilde, o seu  
melhor se perde na arrogância.  
A humildade ainda é a parte mais bela da sabedoria.”  
(Autor desconhecido)*



*“A luta é indispensável para realizar as metas da alma.  
Lutar é saudável quando se constrói a felicidade”  
(Roberto Shinyashiki)*



## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
LISTA DE FIGURAS .....	17
LISTA DE TABELAS .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 Aspectos gerais da citricultura no Brasil e no mundo .....	23
2.2 Huanglongbing (HLB, ex-greening) .....	25
2.3 Transformação genética de citros .....	28
2.4 Planta modelo Micro-Tom .....	30
2.5 Superóxido Dismutases .....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1 Material vegetal .....	35
3.1.1 Citros .....	35
3.1.2 Micro-Tom .....	36
3.2 Obtenção da construção gênica .....	37
3.3 Cultura e manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	38
3.4 Transformação genética, seleção, regeneração e aclimatização das plantas .....	38
3.4.1 Citros .....	38
3.4.2 Micro-Tom .....	40
3.5 Análises moleculares .....	42
3.5.1 Análise da PCR (reação em cadeia da polimerase) .....	42
3.5.2 Análise de <i>Southern blot</i> .....	43
3.5.3 Análise de expressão do transgene – RT-qPCR (Real-time PCR) .....	44
4 RESULTADOS .....	47
4.1 Transformação genética .....	47
4.1.1 Micro-Tom .....	47
4.1.2 Citros .....	50
5 DISCUSSÃO .....	56
6 CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS .....	65



## RESUMO

### **Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom') e de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *Csd1* (superóxido dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata***

Embora a citricultura seja uma importante atividade econômica no Brasil, nos últimos anos houve uma redução significativa da produção nacional. A baixa rentabilidade que o setor citrícola vem enfrentando, devido ao alto custo de produção, é decorrente principalmente dos problemas fitossanitários, com destaque para as doenças, que afetam diretamente a produtividade dos pomares. Atualmente, o Huanglongbing (HLB) é a doença mais grave que afeta a citricultura mundial, sendo que os danos são severos em todas as variedades de citros. Diante desse fato, a transformação genética de plantas é uma alternativa para a obtenção de plantas transgênicas, com genes que estimulem o sistema de defesa das plantas, tornando-as resistentes a doenças. Apesar da eficácia dos protocolos existentes para a transformação genética de citros, uma desvantagem característica de plantas perenes é o ciclo reprodutivo lento, tornando difícil e demorado a validação de novos genes de interesse. Por isso, uma importante estratégia é o uso de plantas modelos, como o tomateiro, que possui ciclo curto e boa eficiência de transformação genética. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' e *Citrus sinensis*, contendo a construção gênica com o gene *Csd1* (superóxido dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata*. A proteína codificada pelo gene *Csd1*, também conhecido como Sod1 (superoxide dismutase 1), é o mais potente antioxidante na natureza e é um importante constituinte de defesa celular contra o estresse oxidativo causado pela infecção bacteriana. O tomateiro Micro-tom foi utilizado como modelo de patogenicidade para validação do gene. Porém, devido a sua baixa eficiência de transformação genética, os experimentos de inoculação com o patógeno não foram realizados. Posteriormente, a caracterização da função do gene *Csd1* em relação ao HLB será realizada com as plantas transgênicas de citros. A identificação de plantas transgênicas, de tomate e de laranja doce, foi realizada por meio da análise de PCR, utilizando *primers* para a detecção do gene *Csd1*. As plantas PCR+ foram aclimatizadas e transferidas para casa-de-vegetação. A eficiência de transformação genética do tomateiro 'Micro-Tom' e das cultivares de laranja doce, 'Hamlin' e 'Pineapple', foram respectivamente: 0,34%, 4,74% e 3,65%. A caracterização molecular pelas análises de *Southern blot* e RT-qPCR foi realizada apenas em plantas de citros. Foi possível confirmar a integração do transgene em 32 eventos obtidos. O número de eventos de inserção variou de 1 – 5, sendo a presença do gene endógeno *Csd1*, localizada em 3 locais distintos no genoma das plantas. O nível de mRNA do transgene foi verificada em 21 plantas que tiveram apenas uma única inserção do transgene no genoma. Os resultados obtidos mostram que houve transcrição do gene *Csd1* nas plantas transgênicas, assim como, na testemunha não transgênica. A relação do nível de transcrição do transgene com a resistência das plantas ao patógeno será definida após a inoculação com *Candidatus Liberibacter*.

Palavras-chave: Huanglongbing; Transformação genética; Citros; Planta modelo; Micro-Tom; Superóxido dismutase



## ABSTRACT

### **Genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom') and of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) with *Csd1* gene (copper/zinc superoxide dismutase), isolated of *Poncirus trifoliata***

Although the citrus industry is an important economic activity in Brazil, in recent years there has been a significant reduction in the national citrus production. The low profitability of the citrus sector has faced due to the high production cost is mainly attributed to phytosanitary problems, particularly diseases that directly affect productivity of orchards. Currently, huanglongbing (HLB) is the most serious disease that affects the global citrus industry and the damage is severe in all citrus varieties. Genetic transformation of plants is an alternative to obtain transgenic plants with genes that stimulate the plant defense system, making it resistant to diseases. Despite the effectiveness of protocols for genetic transformation of citrus, a characteristic disadvantage of perennial plants is the slow reproductive cycle, hindering validation of new genes of interest. Therefore, an important strategy is the use of model plants, such as the tomato, which has a short cycle and good genetic transformation efficiency. The objective of this study was to obtain transgenic plants of *Solanum lycopersicum* cv. "Micro-Tom" and *Citrus sinensis*, containing the gene construct with *Csd1* gene (copper/zinc superoxide dismutase), isolated of *Poncirus trifoliata*. The protein encoded by the gene *Csd1*, also known as SOD1 (superoxide dismutase 1), is the most powerful antioxidant in nature and is important constituent of cellular defense against oxidative stress caused by bacterial infection. 'Micro-tom' tomato was used as a model for pathogenic gene validation. However, due to its low efficiency of genetic transformation, the inoculation experiments with the pathogen were not realized. Posteriorly, the characterization of gene function *Csd1* in relation to the HLB disease will be realized with citrus transgenic plants. The objective of this study was to obtain transgenic plants of *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' and of *Citrus sinensis*, containing the gene construction with *Csd1* gene (copper/zinc superoxide dismutase), isolated of *Poncirus trifoliata*, for validation and for future study of this gene for resistance to HLB. Proteins encoded by the *Csd1* gene, also known as SOD1 (superoxide dismutase 1), are the most powerful antioxidants in nature and are important constituents of cellular defense against oxidative stress caused by bacterial infection. The identification of transgenic plants of tomato and sweet orange was performed by the PCR analysis using *primers* for the detection of *Csd1* gene. The PCR+ plants were acclimatized and transferred to a greenhouse. The genetic transformation efficiency of tomato 'Micro-Tom' and sweet orange cultivars, 'Hamlin' and 'Pineapple', were 0.34%, 4.74% and 3.65%, respectively. The molecular characterization with the *Southern blot* and RT-qPCR analyses was performed only in citrus plants. The transgene integration was confirmed in 32 plants. The number of insertion events ranged from 1-5 and the presence of *Csd1* endogenous gene is found in three distinct locations in the plants genome. The mRNA level of the transgene was verified in 21 plants that had only a single transgene insertion into the plant genome. The results show that there was transcription of *Csd1* gene in transgenic plants as well as in non-transgenic plants. The relation between the transgene transcript level with the resistance of plants to pathogens is set after inoculation with *Candidatus Liberibacter*.



Keywords: Huanglongbing; Genetic transformation; Citrus; Model plant; Micro-Tom; Superoxide dismutase

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Obtenção de plântulas *in vitro* de *Citrus sinensis* para a coleta de explantes para transformação genética.....36
- Figura 2 - Obtenção de plântulas *in vitro* de tomateiro *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' para a coleta de explantes para transformação genética .....37
- Figura 3 - Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2301-*PtCsd1*.....38
- Figura 4 - Etapas do processo de transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis*), via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*Ptcsd1*.....39
- Figura 5 - Etapas do processo de transformação genética de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom', via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*Ptcsd1*.....41
- Figura 6 - Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom') via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*PtCsd1* .....48
- Figura 7 - Identificação de plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' pelo teste histoquímico GUS, e análise da PCR para detecção do fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e a parte do terminador (OCS).....48
- Figura 8 - Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis*), via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*PtCsd1*.....51
- Figura 9 - Identificação de plantas transgênicas de *Citrus sinensis* pelo teste histoquímico GUS, e análise da PCR para detecção do fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e a parte do terminador (OCS) .....52
- Figura 10 - Análise de *Southern blot*, utilizando sonda para detecção do gene *nptII*, para plantas de laranja doce obtidas nos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*.....53
- Figura 11 - Análise de *Southern blot*, utilizando sonda para detecção do gene *Csd1*, para plantas de laranja doce obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1* .....54

- Figura 12 – Quantificação relativa do gene *Csd1* em relação aos genes de referência *UBC21* e *DIM1* em plantas de laranja doce cv 'Hamlin', contendo a construção gênica pCAMBIA2301-PtCsd1..... 55
- Figura 13 – Quantificação relativa do gene *Csd1* em relação aos genes de referência *UBC21* e *DIM1* em plantas de laranja doce cv 'Pineapple', contendo a construção gênica pCAMBIA2301-PtCsd1..... 56

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos genes de referência *UBC21* e *DIM1*, e do gene *Csd1*, utilizados na análise de RT-qPCR.....45
- Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom', com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1* .....49
- Tabela 3 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' e 'Pineapple', com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*.....51



## 1 INTRODUÇÃO

Originária do Sudeste Asiático, a laranja é uma das frutas mais cultivadas no mundo. Na antiguidade, o comércio entre as nações e as guerras ajudaram a expandir o cultivo dos citros e, em 1500, através da expedição de Cristóvão Colombo as plantas cítricas foram trazidas para o continente americano (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Introduzidas no Brasil logo no início da colonização, a laranja encontrou no país melhores condições para vegetar e produzir do que na própria região de origem, expandindo-se por todo o território nacional (NEVES et al., 2010).

As frutas cítricas são as mais produzidas em todo o mundo, 135 milhões de toneladas por ano, sendo a China o maior produtor mundial de citros, com aproximadamente 32 milhões de toneladas, seguida pelo Brasil e Estados Unidos com cerca de 19 e 10 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2015). Em relação a produção mundial de laranja, o Brasil é líder há quase três décadas. Em 2013, o Brasil possuía, aproximadamente, 24% da produção mundial, enquanto que Estados Unidos e China possuíam em torno de 10% da produção mundial (FAO, 2015).

Embora a citricultura seja uma importante atividade econômica no Brasil, nos anos recentes houve uma redução significativa da produção nacional. Os motivos para esta queda de produção são a baixa rentabilidade que o setor citrícola vem enfrentando devido ao alto custo de produção, decorrente principalmente dos problemas fitossanitários, e do preço pouco atrativo do produto no mercado (Agrianual, 2015).

A citricultura está apoiada em um pequeno número de variedades, o que contribui para sua vulnerabilidade, especialmente no que se refere aos fatores fitossanitários (MACHADO et al., 2011). Dentre estes fatores, as doenças, sejam elas causadas por fungos, bactérias ou vírus ganham grande destaque, pois afetam diretamente a produtividade dos pomares e conseqüentemente o retorno econômico dos produtores. Pode-se citar como principais doenças de citros: a clorose variegada dos citros, a pinta-preta, a leprose, o cancro cítrico e o huanglongbing.

O huanglongbing (HLB, *ex-greening*), constatado no Brasil em 2004, é a mais devastadora doença dos citros, sendo transmitida pelos psílídeos *Diaphorina citri* e *Trioza erythrae* e associada as bactérias de floema *Candidatus Liberibacter* spp..

Essa doença causa amarelecimento das folhas, má formação e queda de frutos, causando grandes danos às plantações, comprometendo a produtividade dos pomares e está presente, principalmente, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Os danos são severos em todas as variedades de citros e não se conhece resistência genética até o momento (GIRARDI et al., 2011). Além disso, as medidas de controle para esta doença são caras e pouco eficientes, sendo muitas vezes necessária a eliminação do pomar.

Por essa razão, é de extrema importância, no atual cenário da citricultura, trabalhos que somem esforços para desenvolver variedades resistentes ao HLB, a fim de evitar maiores prejuízos. Diante desse fato, a transformação genética de plantas surge como uma alternativa para a obtenção de plantas transgênicas, com genes que estimulem o sistema de defesa das plantas, tornando-as resistentes a doenças. Assim, devido à grande importância do HLB e a inexistência de cultivares resistentes ao seu agente causal, os trabalhos de buscas de genes para transformação genética se intensificaram nos últimos anos (MACHADO, 2012).

Apesar da eficácia dos protocolos existentes para a transformação genética de citros, uma desvantagem característica de plantas perenes é o ciclo reprodutivo lento, tornando difícil e demorado a validação de novos genes de interesse. Por isso, uma alternativa é fazer o uso de plantas modelos, como por exemplo o tomateiro, que possui ciclo curto e considerável eficiência de transformação genética.

Assim, o objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' e *Citrus sinensis* (L.) cvs. 'Hamlin' e 'Pineapple', contendo a construção gênica com o gene *Csd1* (superóxido dismutase do cobre e do zinco), isolado de *Poncirus trifoliata*. A proteína codificada pelo gene *Csd1*, também conhecido como Sod1 (superoxide dismutases 1), é o mais potente antioxidante na natureza e é um importante constituinte de defesa celular contra o estresse oxidativo causado pela infecção bacteriana (BAFFANA et al., 2011).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais da citricultura no Brasil e no mundo

As plantas cítricas de maior interesse comercial pertencem aos gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, sendo o gênero *Citrus* o de importância mais expressiva. Esses três principais gêneros pertencem ao grupo subtribal C “árvores de citros verdadeiros”, subtribo Citrenae, tribo Citreae, subfamília Aurantioideae e família Rutaceae (SWINGLE; REECE, 1967; ARAÚJO; ROQUE, 2005). Ao gênero *Citrus*, relacionam-se as laranjas doces (*Citrus sinensis*), diversas espécies de tangerina, a laranja azeda (*Citrus aurantium*), o pomelo (*Citrus paradisi*), a toranja (*Citrus grandis*), a lima ácida (*Citrus aurantifolia*), a lima doce (*Citrus limettioides*), o limão (*Citrus limon*), a cidra (*Citrus medica*) e outros tipos, incluindo híbridos naturais (CHAPOT, 1975).

Devido a sua adaptação a condições tropicais e subtropicais, a cultura de espécies cítricas espalhou-se pelo mundo, tornando-se uma atividade agrícola de relevância e destaque entre as espécies frutíferas (PASSOS; SOARES FILHO; SOBRINHO, 2013). Da laranja, além do suco, são extraídos óleos essenciais e líquidos aromáticos. O bagaço de citros, com alto teor energético, é um subproduto industrial de expressivo valor econômico para alimentação animal sobretudo para ruminantes.

Em relação a produção de laranja, Brasil e Estados Unidos utilizam mais de 70% das laranjas que produzem para a fabricação de sucos, sendo o Brasil responsável por mais da metade do suco de laranja produzido mundialmente; a cada cinco copos de suco de laranja bebidos no mundo, três são brasileiros. Já a China vende maior parte da produção para o consumo *in natura*. Os Estados Unidos são os maiores importadores de suco de laranja do Brasil. Até julho de 2014, 88.749 toneladas de suco foram exportadas com destino àquele país, aproximadamente 31% do total das exportações brasileiras (Agrianual, 2015).

Todavia, a história mostra que o potencial citrícola brasileiro ficou adormecido por cerca de 400 anos e somente no século XX o plantio de citros em larga escala foi iniciado, estimulado pela crise do café, no final da década de 1920. Com a decadência do café na década de 1930, o setor citrícola acabou desenvolvendo-se no Estado de São Paulo. O ano de 1939 foi um marco importante para a citricultura



brasileira, especialmente para a paulista, quando a exportação de laranja *in natura* bateu um recorde ainda não ultrapassado de 197 mil toneladas. O crescimento do mercado externo foi interrompido com a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), causando a primeira crise de preços do setor (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Na década de 1960, aconteceu o ressurgimento da citricultura paulista. Esse período é o divisor de águas no perfil da citricultura brasileira, mudando o foco comercial de fruta fresca para a produção de matéria-prima voltada à indústria, consolidando o Estado de São Paulo como o maior pólo citrícola nacional e mundial (BOTEON; NEVES, 2005).

Atualmente, a citricultura brasileira está altamente concentrada na produção de laranja doce, cerca de 90% do total da produção nacional de citros (IBGE, 2014). A região Sudeste destaca-se como a de maior importância no País, com 78,6% da produção nacional. O Estado de São Paulo, por sua vez, detém quase 73% da produção nacional de laranjas, com um volume de produção de 11,8 milhões de toneladas e 504.715 ha de área colhida, destacando-se como a maior região produtora do mundo, seguida pelo Estado da Flórida (EUA), segundo maior produtor (Agriannual, 2015).

Dentre os grupos de citros, os mais produzidos no Brasil são as laranjas doces; tangerinas, mexericas e híbridos; limas e limões; e pomelos. Dentre as laranjas doces, as variedades mais produzidas são Hamlin, Valência, Pêra e Natal. As principais regiões produtoras de laranja no Brasil são: o Estado de São Paulo, com 73% da produção nacional, seguido do estado da Bahia, Minas Gerais, Paraná e Sergipe com respectivamente 6,1; 5,8; 5,8 e 3,8% da produção nacional (Agriannual, 2015).

Sob o enfoque comercial, os pontos fortes da citricultura brasileira, sobretudo a paulista, são o seu custo de produção competitivo e um parque industrial que atua em escala global. Por outro lado, o ponto fraco encontra-se no campo, com a exposição dos pomares a fatores bióticos e abióticos que nos últimos anos comprometeu o custo e a oferta do produto. No ano de 2014, a seca afetou o desenvolvimento das frutas levando a quebra de até 40% na colheita (Fundecitrus, 2015).

Apesar da história mostrar que o setor acaba sempre encontrando soluções para os problemas, graças à habilidade e à agilidade de uma pesquisa de ponta, aliada a elevada capacidade técnica de agrônomos para difundir tecnologias e dos

produtores para absorvê-las, o aparecimento de novas doenças, como o Huanglongbing (HLB, ex-greening), traz um risco econômico muito grande para o setor. Nos últimos anos, o HLB comprometeu a competitividade do setor no mercado, sendo um dos principais problemas em várias regiões produtoras de citros do país. Dados da Secretaria de Agricultura Paulista indicaram que a presença da doença no Estado, em 2013, era de 9,8% de plantas infectadas com HLB nos pomares e, em 2014, a doença avançou para 14%.

Mesmo com esses problemas, a citricultura ainda é uma atividade importante do agronegócio brasileiro. Porém, em 2013 e 2014, devido a presença do HLB, houve erradicação de pomares e a baixa rentabilidade fez com que muitos produtores mudassem de atividade, reflexo do período difícil pelo qual passa a citricultura, principalmente, a laranja destinada à indústria de suco (GCEA/SP, 2014).

Em 2014, estima-se que o país produziu 16.333.255 toneladas de laranja, safra 0,2% superior à produção obtida em 2013 (IBGE, 2015). Em relação ao preço da caixa de laranja, o início de 2014 apresentou uma pequena melhora, quando comparado ao ano de 2013, que acumulou perdas significativas na citricultura paulista, verificadas principalmente desde 2012. O decréscimo do fluxo das exportações de suco a partir de 2012, devido à crise no mercado Europeu, assim como, as sanções impostas pelos Estados Unidos, grandes compradores do suco brasileiro, dificultou a comercialização das frutas, que, em alguns casos, apodreceram nos pomares. Para as indústrias de suco de laranja o ano de 2014 foi ruim, de acordo com dados da Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (Citrus BR, 2015), o ano foi marcado por redução nas exportações, com queda de 15% no volume embarcado e 18% em receita.

## **2.2 Huanglongbing (HLB, ex-greening)**

Huanglongbing, também conhecido como *ex-greening*, é provavelmente a doença mais destrutiva do citros, presente na maioria dos países produtores de citros, gerando perdas econômicas de grande importância (ALBRECHT; BOWMAN, 2012).

De acordo com levantamento amostral realizado em 2012, sob a coordenação do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), que compreendeu 3.371 talhões, com a inspeção de 10% das árvores de cada talhão, constatou-se que 64,1% dos

talhões tinham, ao menos, uma planta com HLB, o que significa uma expansão de 20% da doença nos pomares em relação ao ano de 2011. Atualmente, o HLB apresenta-se em crescimento epidêmico, de acordo com os relatórios entregues semestralmente pelos citricultores à CDA (Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo), em 2013, foram erradicadas 7,2 milhões de plantas cítricas no Estado de São Paulo, decorrentes da incidência do HLB.

O HLB é associado à bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. que vive nos vasos condutores de seiva elaborada impedindo o transporte de nutrientes pelo floema. Estão descritas três espécies de bactérias Gram-negativas associadas a esta doença: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam). A transmissão do agente patogênico é feita por duas espécies de inseto vetor - pislídeo: *Diaphorina citri* e *Trioza erytreae*.

Na Ásia, mais precisamente na China, onde o HLB foi descrito pela primeira vez, em 1919, a doença é atribuída ao Las e ao inseto vetor *Diaphorina citri Kuwayama*, (HALBERT; MANJUNATH, 2004; BOVE, 2006; GOTTWALD, 2010). Lentamente, essa doença se espalhou da Ásia para outras regiões produtoras de citros ao redor do mundo, incluindo as Américas do Sul, Central e do Norte, além do Caribe. As outras espécies de *C. Liberibacter*, Lam e Laf, ocorrem em alguns países sendo transmitidas pelo inseto vetor *Trioza erytreae* Del Guercio. Porém, os casos mais graves de HLB em todo o mundo estão normalmente relacionados com *C. Liberibacter asiaticus* e ao inseto vetor *Diaphorina citri Kuwayama* (BOVÉ, 2006).

Relatada com o nome huanglongbing, que significa “doença do ramo amarelo” (REINKING, 1919), alguns sintomas típicos de plantas com o HLB são manchas assimétricas das folhas mais velhas e uma variedade de padrões cloróticos, assemelhando-se muitas vezes aos sintomas de deficiência de zinco. Algumas folhas tornam-se curvadas, de tamanho reduzido, com nervuras engrossadas e escurecidas. Ocorre o brotamento fora de época, a redução da produção de frutos e em estágios mais avançados da doença morte da planta (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

Após a descoberta do HLB no Brasil e nos Estados Unidos, em 2004 e 2005, respectivamente, a maioria dos cientistas recomendam o controle dessa doença pelo monitoramento intenso do inseto vetor, identificação e remoção de árvores infectadas e uso de mudas sadias (GOTTWALD, 2007; FUNDECITRUS, 2008).

O controle biológico do psílídeo por parasitóides e predadores é considerado insuficiente para a mitigação da doença. Muitos produtores, portanto, adotaram o uso de inseticidas. Porém, a utilização dessas medidas de manejo do HLB é cara, e o uso repetitivo de inseticidas para o controle do psílídeo interfere com o controle biológico de pragas de citros, incluindo a *Diaphorina citri*. Além disso, muitos produtores estão relutantes em remover árvores infectadas que ainda estão marginalmente produtivas. Com isso, árvores infectadas que atuam como fontes de inóculo são mantidas e exacerbam a epidemia. A presença de citros em áreas residenciais urbanas também atua como fonte de inóculo e reservatórios para o psílídeo. Além dos citros, a murta é hospedeira tanto do inseto transmissor quanto da bactéria causadora do HLB, recomendando-se a eliminação dessa planta ornamental (LARANJEIRA et al., 2005).

A doença afeta a maioria das plantas cítricas, embora diferentes respostas foram observadas por diferentes genótipos e espécies do gênero *Citrus* (BOVÉ, 2006; TEIXEIRA et al., 2008; FOLIMONOVA et al., 2009; ALBRECHT, 2012), como mostra alguns estudos que observaram tolerância no gênero *Poncirus* e alguns dos seus híbridos. (MCCLEAN; SCHWARZ, 1970; MIYAKAWA; ZHAO, 1990; SHOKROLLAH, 2009), sendo relatada a ausência de sintomas bem definidos da doença.

O bloqueio da translocação do fluxo da seiva elaborada, devido ao entupimento dos elementos crivados, juntamente com a necrose do floema é o fator principal para os danos causados pela doença. Entre as principais razões para a maior demanda na busca por cultivares resistentes ao HLB, está a alta capacidade de infecção deste patógeno, o difícil manejo do seu vetor e a ausência de resistência genética no gênero *Citrus*. Desta forma, a produção de plantas transgênicas resistentes ao HLB surge como uma alternativa viável para controle da doença, pois pode levar ao cultivo de variedades comerciais contendo um ou poucos genes que induzem esta resistência (MOURÃO FILHO; STIPP; MENDES, 2010).

Pesquisas de expressão gênica, através de microarranjos e PCR quantitativo, mostraram uma variedade de genes que têm a sua expressão alterada em plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter*. Genes envolvidos na organização celular, fotossíntese, sinalização hormonal, transporte de assimilados, mecanismos de defesa celular, sinalização de hormônios, entre outros tiveram sua expressão modificada devido a infecção por Las (ALBRECHT; BOWAN, 2008; MAFRA et al.,

2013). Tais genes podem servir como potenciais alvos na abordagem biotecnológica, proporcionando uma estratégia para, eventualmente, controlar esta doença devastadora de citros.

Estudos em plantas cítricas em resposta à infecção por Las (ALBRECHT; BOWMAN, 2012), tiveram como principal objetivo identificar genes associados com a tolerância ao HLB. O gene *superóxido dismutase do cobre e do zinco (Csd1)* foi um dos, entre outros genes, que tiveram sua expressão alterada, sugerindo o seu possível envolvimento na proteção das plantas contra o Las.

### 2.3 Transformação genética de citros

A transformação genética de plantas constitui na introdução controlada de um gene no genoma de uma planta. Um gene responsável por uma determinada característica, uma vez identificado, pode ser isolado, clonado e utilizado em programas de melhoramento genético, através da transformação genética, permitindo que características agrônômicas importantes como resistência a doenças, pragas, herbicidas e tolerância a estresse possam ser introduzidas em plantas cultivadas (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Nesse sentido, a transformação genética de plantas exige a elaboração de construções gênicas contendo três elementos básicos: o promotor responsável por regular a expressão gênica, o gene que codifica a proteína de interesse, e o terminador que determina o final do processo de transcrição (VISARADA et al., 2009). Além do gene de interesse, deve ser inserido um gene de seleção, para selecionar as células que foram transformadas (ANAMI, 2013).

Dentre os genes de seleção, o gene *nptII* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, que confere resistência ao antibiótico canamicina, é muito utilizado em transformação genética (DONMEZ et al., 2013). Porém, mesmo com a presença dos genes de seleção, é muito comum ocorrer escapes que, normalmente, estão relacionados à proteção das células não transformadas ao agente seletivo pelas células transformadas adjacentes, e pela persistência da *A. tumefaciens* no tecido inoculado (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

Além dos genes de seleção, a utilização de genes repórteres que facilitam a identificação da transgenia codificando proteínas de atividade enzimática, cujo produto é facilmente detectável, também podem ser utilizados na transformação

genética. O gene *uidA*, que codifica a enzima  $\beta$ -Glucuronidase (GUS), é um exemplo de gene repórter muito utilizado em transformação genética de plantas (JEFFERSON et al., 1987; PAOLI et al., 2007).

O primeiro trabalho com transformação genética de citros, foi obtido no final da década de 1980, utilizando polietilenoglicol (PEG) para introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). Desde então, diversos métodos de transformação genética têm sido relatados para citros, como: eletroporação de protoplastos (NIEDZ; MCKENDREE; SHATTERS Jr., 2003), introdução direta de DNA exógeno com PEG em protoplastos (FLEMING et al., 2000; GUO et al., 2005; VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990), bombardeamento de partículas em células embriogênicas (YAO et al., 1996) e co-cultivo de segmentos internodais ou de segmentos de epicótilo com *Agrobacterium tumefaciens* (MOORE et al., 1992; GUTIÉRREZ; LUTH; MOOR, 1997; GHORBEL et al., 2000; YANG et al., 2000; MENDES et al., 2002; PEÑA et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2008) ou *Agrobacterium rhizogenes* (YANG; SUN; TONG, 2006).

O co-cultivo de explantes com *Agrobacterium tumefaciens* é o método de transformação genética mais utilizado em citros (PENÃ et al., 2005; ZOU et al., 2008; DUTT; LEE; GROSSER, 2010). O baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção são as principais razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium* (BRASILEIRO; LACORTE, 2000). A qualquer parte separada da planta destinada ao uso *in vitro* dá-se o nome de explante. Inúmeros são os exemplos que podem ser citados: fragmentos de hipocótilo, epicótilo, cotilédone, raiz, flor, folha, entre outros. Sua escolha pode ser influenciada por vários fatores, tais como: disponibilidade do material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido e estação do ano (CID; TEIXEIRA, 2010). Na transformação genética de citros, os explantes mais comumente utilizados são segmentos de epicótilo coletados de plantas obtidas de sementes germinadas *in vitro* (MENDES et al., 2002; PEÑA et al., 2008; DUTT; VASCONCELLOS; GROSSER, 2011, DUTT et al., 2012).

O princípio da transformação genética de plantas via *Agrobacterium* é a inoculação dos explantes com *A. tumefaciens*, contendo um plasmídeo com o gene de interesse, seguido da seleção de uma ou mais células transformadas e da regeneração de uma planta transgênica. Portanto, o protocolo ideal de transformação genética deve adequar, ao mesmo tempo, a descontaminação do

tecido infectado pela bactéria, a seleção das células que foram transformadas e que expressam o gene de seleção, e a regeneração destas células em plantas (BRASILEIRO; LACORTE, 2000).

A transformação genética via *A. tumefaciens* já mostrou bons resultados para diversos híbridos e espécies de citros tais como *C. sinensis* (MUNIZ et al., 2012), *C. aurantium* (GHORBEL et al., 2000), *C. aurantifolia* (DOMINGUEZ et al., 2000), *C. paradisi* (FEBRES; LEE; MOORE, 2008), *Poncirus trifoliata* (ZOU et al., 2008), *C. paradisi* x *P. trifoliata* (VIEIRA et al., 2005), e *C. sinensis* x *P. trifoliata* (MIYATA et al., 2011). Da mesma forma, plantas transgênicas de citros contendo genes com diferentes finalidades foram obtidas, tais como: genes envolvidos com a qualidade do suco (GUO et al., 2005), com a redução do período juvenil (CERVERA; NAVARRO; PEÑA, 2009; DUAN; FAN; GUO, 2010), resistência a afídeos (YANG et al., 2000), resistência à salinidade (CERVERA et al., 2000; FU et al., 2011), resistência a doenças causadas por vírus (SCHINOR, 2006; FEBRES et al., 2008; ZANEK et al., 2008; MUNIZ et al., 2012, 2014), resistência a doenças causadas por fungos (PEÑA; NAVARRO, 1999; GENTILE et al., 2007; KATOH et al., 2007) e resistência a doenças causadas por bactérias (BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007; MENDES et al., 2010; YANG et al., 2011).

No Brasil, diversas plantas transgênicas de cultivares copa e porta-enxerto de citros com diferentes genes relacionados a diferentes finalidades foram produzidas, especialmente no que se refere ao controle de doenças, como por exemplo, plantas transgênicas de limão 'Cravo' e laranja doce apresentando redução dos sintomas causados por gomose (AZEVEDO et al., 2006) e cancro cítrico (BARBOSA-MENDES et al., 2009), respectivamente. Genes que codificam peptídeos antibacterianos conferiram menor suscetibilidade ao cancro cítrico em cultivares de laranja doce (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010) e genes derivados do próprio patógeno foram utilizados para obter plantas transgênicas resistentes ao CTV (MUNIZ et al., 2012).

## 2.4 Planta modelo Micro-Tom

O tomateiro *Solanum lycopersicum* L. é uma das hortaliças mais importantes em todo o mundo, e tem sido considerado um sistema modelo da família Solanaceae para estudos de genética clássica e molecular (KNAPP, 2002; KRYLOD, 2012). A

conclusão bem sucedida do projeto genoma do tomateiro (SATO et al. 2012) permitiu o desenvolvimento de variedades de alto rendimento e nutricionalmente melhoradas, tanto pelo melhoramento convencional e molecular, quanto pelo método de transformação genética.

Sistemas eficientes de transformação genética de plantas são essenciais para a indústria agro-biotecnológica, assim como, a análise funcional de genes envolvidos em diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das vias metabólicas (PEREIRA, 2000; TYAGI e MOHANTY 2000; OSTERGAARD e YANOFSKY 2004; LEE et al. 2004; DAN et al. 2006; SUN et al. 2006).

Entre as cultivares de *Solanum lycopersicum*, a miniatura 'Micro-Tom' (MT) é considerada um modelo emergente para utilização em programas de melhoramento genético. MT difere do padrão das outras cultivares de tomate por conter em seu genoma dois genes recessivos, que conferem o fenótipo anão (MEISSNER et al., 1997). Como sistema modelo, o MT compartilha várias características únicas com *Arabidopsis*, tais como: pequeno tamanho, o que lhe permite crescer a uma alta densidade (1.357 plantas/m<sup>2</sup>), ciclo de vida curto (70 - 90 dias para colher frutos maduros) e genoma pequeno (350 Mbp) (MEISSNER et al., 2000; MATSUKURA et al., 2008; PINO et. al., 2010).

Desde a década de 1980, a transformação genética de tomateiro mediada por *Agrobacterium*, tem sido explorada utilizando discos da folha como explante para diferentes cultivares. A eficiência de transformação genética varia de 10 - 33% em função da cultivar, enquanto que especificamente para o MT, taxas de 20 - 56% foram relatadas. Muitos parâmetros afetando a eficiência da transformação genética foram testados, incluindo a capacidade de regeneração *in vitro*, que é basicamente determinada pelo genótipo (PINO et. al., 2010).

Assim, a utilização da cultivar 'Micro-Tom' como planta modelo torna-se uma importante ferramenta para a validação de novos genes. Em relação ao melhoramento genético de citros, apesar da existência de protocolos de transformação genética eficazes, devido ao ciclo reprodutivo lento, uma característica de plantas perenes, torna-se difícil e demorada a validação de novos genes. Portanto, na busca de alternativas, se faz necessário o uso de plantas modelos, que possuem ciclo curto e alta eficiência de transformação genética.



## 2.5 Superóxido Dismutases

Quando em condições de estresse, os organismos aeróbicos, durante o metabolismo do oxigênio, produzem espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), os radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 1993). As espécies reativas de oxigênio causam reações oxidativas em cascata, resultando na perda de pigmentação da clorofila e destruição de membranas (SHAALTIEL; GRESSEL, 1986). Porém, as plantas, assim como os demais organismos aeróbicos, desenvolveram sistemas complexos de proteção para competir com esse estresse oxidativo, constituído de diversas enzimas, entre elas, a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (ELSTNER,1991).

Dentro de uma célula, as superóxido dismutases constituem a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio, através da dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ . O oxigênio reativo é produzido em qualquer local em que uma cadeia de transporte de elétrons esteja presente, e, portanto, a ativação de  $O_2$  pode ocorrer em diferentes compartimentos da célula (ELSTNER,1991), incluindo mitocôndrias, cloroplastos, microssomas, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol. Assim sendo, não é surpreendente encontrar as SODs presentes em várias regiões subcelulares. Porém, apesar de todos os possíveis compartimentos dos locais celulares para a formação  $O_2^{\bullet-}$ , cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos são os mais importantes geradores de espécies reativas de oxigênio - ROS (FRIDOVICH, 1986).

A enzima superóxido dismutase foi isolada pela primeira vez de sangue bovino como uma proteína de cobre verde (MANN; KEILIN, 1938), cuja função biológica acreditava-se ser simplesmente o armazenamento de cobre. Em 1969, McCord e Fridovich descobriram a função catalítica da enzima e sua atividade enzimática foi determinada em diferentes tecidos.

As membranas fosfolipídicas são impermeáveis a moléculas carregadas de  $O_2^{\bullet-}$ , sendo portanto crucial que SODs estejam presentes para a remoção de  $O_2^{\bullet-}$  nos compartimentos em que os radicais  $O_2^{\bullet-}$  são formados. Com base no cofator de metal utilizado pela enzima, SODs são classificados em três grupos: SOD de ferro (Fe SOD), SOD de manganês (Mn SOD), e SOD de cobre-zinco (Cu-Zn SOD), e estas SODs são localizadas em diferentes compartimentos da célula. Fe SODs são

localizadas nos cloroplastos, Mn SOD são localizadas nas mitocôndrias e peroxissomos e Cu - Zn SODs nos cloroplastos, no citosol e, possivelmente, no espaço extracelular (TAKAHASHI; ASADA, 1983).

A metaloenzima superóxido dismutase 1 (Sod1), também conhecida como superóxido dismutase de cobre e do zinco, é composta por duas subunidades idênticas de 16 kDa formando um homodímero através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Ademais, cada subunidade de Sod1 contém um íon de cobre, um íon de zinco e uma ligação dissulfeto intramolecular. O íon de zinco e a ligação dissulfeto desempenham um importante papel estrutural na manutenção da conformação de alças de proteínas que compreendem o canal iônico do sítio ativo e também na interface entre as subunidades. O íon de cobre constitui o elemento catalítico responsável pelas reações de oxirredução e fracionamento do radical superóxido (VALENTINE et al., 2005).

O estresse oxidativo é conhecido por estar envolvido na patofisiologia de várias doenças e a suplementação de SODs tem mostrado ser benéfica no tratamento ou prevenção de tais doenças. Em plantas, espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham papel importante na sinalização de vias que respondem a estresses bióticos e abióticos. ROS também são ativadas como moléculas de defesa quando as plantas são infectadas por patógenos, ou mesmo simbiontes como as micorrizas arbusculares (ABBA et al., 2009). O aumento do nível de SOD pode também proteger as plantas contra o estresse causado pelo frio em alta altitude e injúrias causadas por O<sub>3</sub> (SAHOO; KUMAR; AHUJA, 2011). Espécies transgênicas com introdução de SOD mostraram resistência aumentada a estresses físicos, como frio, seca, salinidade e alta intensidade de luz, e a estresses químicos como O<sub>3</sub>, íons metálicos, O<sub>2</sub><sup>-•</sup> e herbicidas, além de promover a melhoria da produção de biomassa nos sistemas aéreo e radicular (THOMAS et al., 1996). Outros estudos tem proposto que a tolerância ao sal mediada por SOD é alcançada através de lignificação de estruturas vasculares, que é induzida devido ao aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela SOD (GILL et al., 2010).

Assim, a obtenção de plantas transgênicas contendo o gene *Csd1* pode ser uma alternativa viável para o combate a *Candidatus Liberibacter*, uma vez que proteínas codificadas por este gene atuam como potentes antioxidantes e são importantes constituintes de defesa celular contra o estresse oxidativo causado pelo ataque de bactérias.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas, do Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, unidades da Universidade de São Paulo - USP, em Piracicaba, SP.

#### 3.1 Material vegetal

##### 3.1.1 Citros

Os experimentos de transformação genética de citros foram realizados com as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) ‘Hamlin’ e ‘Pineapple’. Para a realização da enxertia *in vitro* foi utilizado citrange ‘Carrizo’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] como porta-enxerto. As sementes da cultivar ‘Hamlin’ foram obtidas de frutos oriundos da Empresa Citrograf, localizada em Rio Claro/SP. As sementes de laranja ‘Pineapple’ foram obtidas de frutos oriundos do Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' - IAC, em Cordeirópolis/SP. As sementes de citrange ‘Carrizo’ foram extraídas de frutos oriundos do Campo Experimental da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

As sementes foram lavadas com cal e água, para a retirada da mucilagem, e colocadas para secar à temperatura ambiente (24 h). Para a germinação *in vitro*, foi retirado o tegumento das sementes, e estas passaram por desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água na proporção de 1:3, durante 15 min, sob agitação constante. Após o tratamento, as sementes foram lavadas com água destilada estéril (3x), dentro da câmara de fluxo laminar, e em seguida introduzidas em tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e phytigel™ (2,0 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8 (Figura 1A).

O material foi incubado em ausência de luz, à temperatura de 27 °C, para o alongamento do epicótilo. Após a germinação e estiolamento (Figuras 1B-C), o material foi transferido para fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 27 °C, por

um período de 10 - 15 dias. As plântulas obtidas (Figura 1D) foram utilizadas para retirada dos explantes: segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm), conforme estabelecido por Mendes et al. (2002).

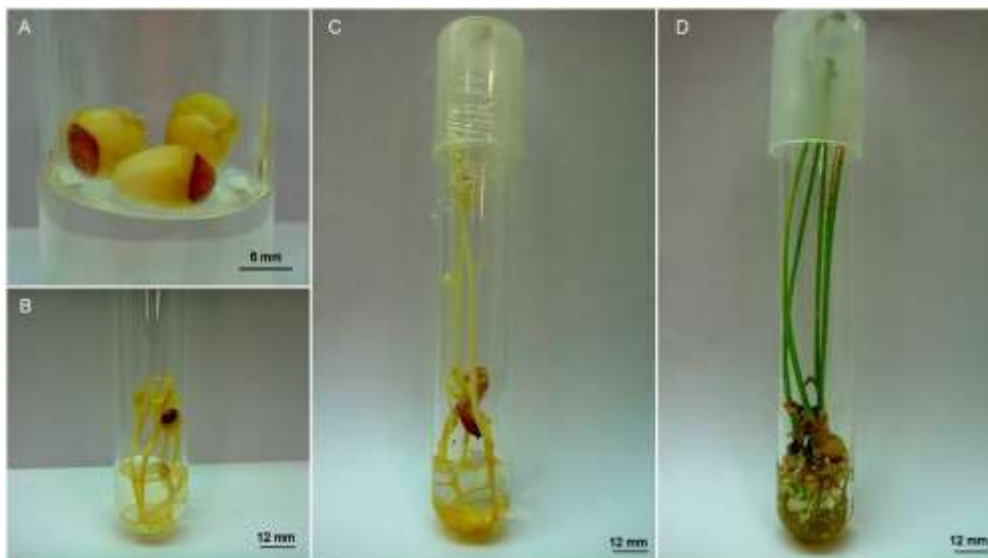


Figura 1 - Obtenção de plântulas *in vitro* de *Citrus sinensis* para a coleta de explantes para transformação genética. A-B) Sementes introduzidas no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), incubadas em ausência de luz. C) Plântula estiolada, pronta para ser transferida para fotoperíodo de 16 h de luz. D) Plântula em estágio para a retirada dos explantes

### 3.1.2 Micro-Tom

As sementes, provenientes do Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal – ESALQ/USP, disponibilizadas pelo professor Lázaro Eustáquio Peres, foram extraídas dos frutos do tomateiro Micro-Tom (Figuras 2A-B), imersas (16 h) e lavadas com fermento biológico e água, para a retirada da mucilagem, e colocadas para secar à temperatura ambiente (24 h). Em seguida, passaram por desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água na proporção de 1:3, durante 15 min, sob agitação constante. Após o tratamento, as sementes foram lavadas com água destilada estéril (3x), dentro da câmara de fluxo laminar. Após a assepsia, as sementes foram introduzidas (Figura 2C) em frascos contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais e vitaminas, sacarose ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>TM</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ), pH ajustado para 5,8 (Figura 2C).

Após 8 dias de incubação, 4 dias no escuro e 4 dias sob fotoperíodo 16 h de luz, as plântulas estavam em estágio de desenvolvimento adequado (Figura 2D) para a obtenção dos explantes: segmentos de cotilédones.

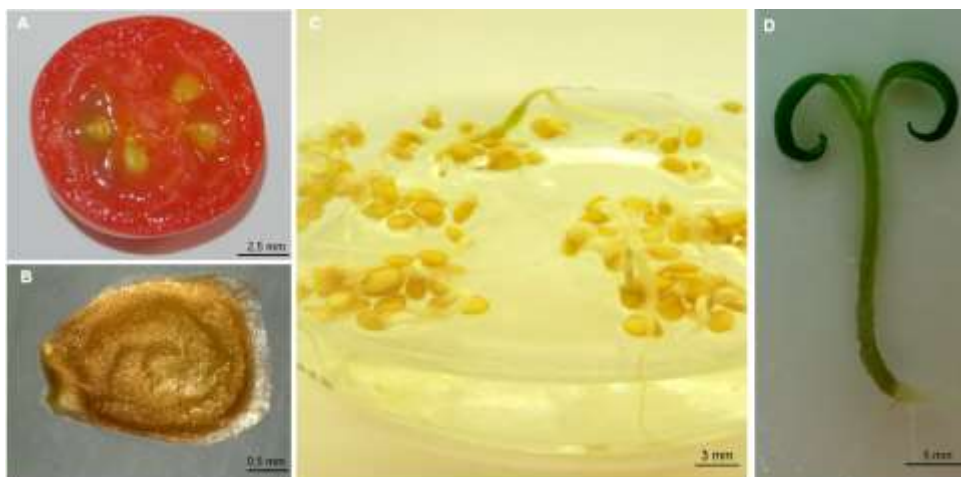


Figura 2 - Obtenção de plântulas *in vitro* de tomateiro *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' para a coleta de explantes para transformação genética. A) Fruto. B) Semente. C) Sementes introduzidas no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). D) Plântula em estágio para a retirada dos explantes

### 3.2 Obtenção da construção gênica

A construção gênica utilizada contém o gene *PtCsd1* (*Cytosolic Copper/Zinc Superoxide Dismutase*) e foi elaborada pela Dra. Polyana Kelly Martins, sob supervisão da Dra. Juliana de Freitas Astúa, do grupo de pesquisa do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, em Cordeirópolis/SP. O gene *Csd1* (459 pb) foi isolado e clonado de *Poncirus trifoliata* e inserido em um cassete, contendo o promotor da Ubiquitina 10 e terminador OCS (gene da octopina-sintase), o qual foi inserido no plasmídeo pCambia2301. Para a seleção das células transformadas foi utilizado o gene *npII* (neomicina fosfotransferase II), que confere resistência ao antibiótico canamicina. O gene *uidA* (GUS) foi utilizado como gene repórter (Figura 3).

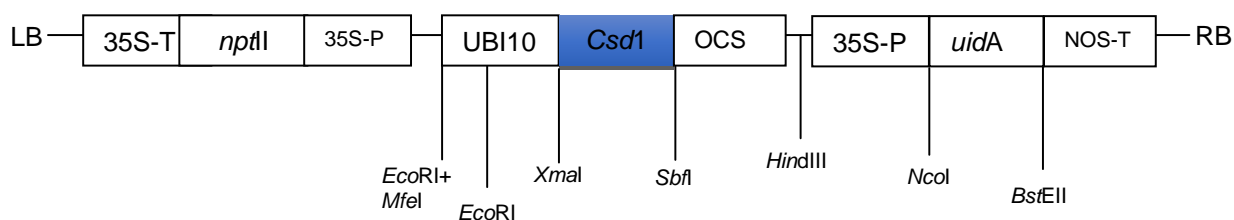


Figura 3 - Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2301-PtCsd1. 35S-P: Promotor constitutivo CaMV35S; 35S-T: terminador CaMV35S; UBI10: promotor constitutivo do gene ubiquitina 10; OCS: terminador do gene octopina-sintase; NOS-T: terminador do gene nopalina-sintetase; LB: borda esquerda; RB: borda direita

### 3.3 Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

As culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 105, foram mantidas à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em solução de glicerol (50%) e meio de cultura YEP líquido (peptona  $10\text{ g L}^{-1}$ , extrato de levedura  $10\text{ g L}^{-1}$  e cloreto de sódio  $5\text{ g L}^{-1}$ ), suplementado com canamicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ) e rifampicina ( $50\text{ mg L}^{-1}$ ).

Para os experimentos de transformação genética, a bactéria foi transferida para meio de cultura YEP sólido contendo os antibióticos canamicina e rifampicina, e incubados a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após 72 h de cultivo, uma colônia isolada foi transferida para frascos tipo erlenmeyer contendo meio de cultura YEP líquido, suplementado com os antibiótico citados anteriormente.

A cultura de bactéria foi incubada por 16 h, sob agitação ( $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 180 rpm) e, em seguida, foi feita a leitura da densidade ótica da suspensão bacteriana. Ao atingir a leitura de 0,5 a 1,0, no espectrofotômetro (600 nm), a suspensão foi centrifugada (4800 rpm; 15 min;  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e o precipitado formado foi ressuspendido em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), obtendo concentração final de  $5 \times 10^8\text{ UFC mL}^{-1}$ .

### 3.4 Transformação genética, seleção, regeneração e aclimatização das plantas

#### 3.4.1 Citros

As plântulas germinadas *in vitro* foram selecionadas e depois segmentadas para a obtenção dos explantes (Figura 4A), que foram sendo reservados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura MS líquido (MURASHIGE; SKOOG,

1962), suplementado com sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), pH ajustado para 5,8. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril retirou-se o meio de cultura MS líquido da placa de Petri e adicionou-se a suspensão bacteriana. Os explantes ficaram imersos na suspensão bacteriana durante 15 min. Posteriormente, foram secos em papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactéria, e transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura de co-cultivo MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), benzilaminopurina (BAP;  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ágar ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ), pH ajustado para 5,8, incubados à temperatura de  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , em ausência de luz, por um período de 2 dias (Figura 4B).

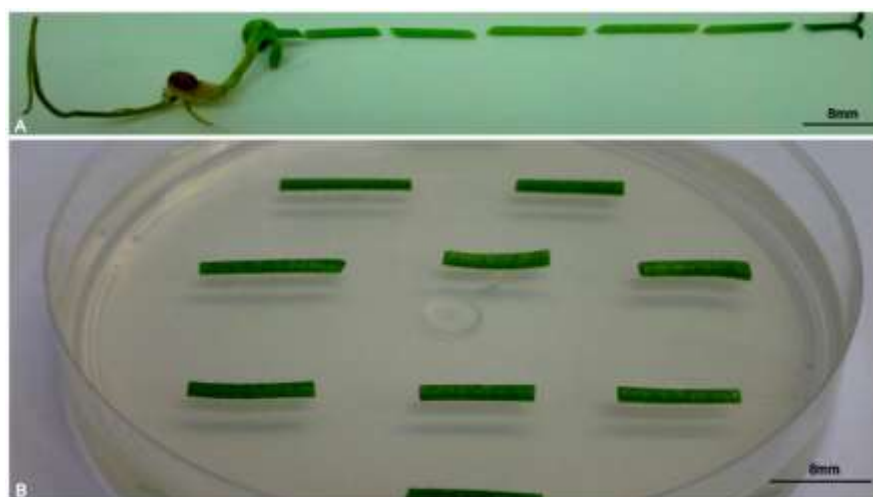


Figura 4 - Etapas do processo de transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis*), via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*Ptcsd1*. A) Obtenção dos explantes, segmentos de epicótilo (0,8 - 1,0 cm). B) Explantes cultivados em meio de cultura de co-cultivo MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969)

Após 2 dias de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura, de seleção e regeneração de plantas, constituído de sais e vitaminas MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), suplementado com sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), canamicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), cefatoxima ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ágar ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ), pH ajustado para 5,8, incubados à temperatura de  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , em ausência de luz. A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para meio de cultura fresco. Esses subcultivos foram realizados por um período de 60 dias, após esse período o material foi transferido para fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As gemas adventícias desenvolvidas foram subcultivadas até atingirem 1 cm de comprimento quando foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange 'Carrizo', germinadas *in vitro*. As gemas menores e pouco vigorosas, foram transferidas para



tubos de ensaio com meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ácido naftaleno acético (ANA; 0,5 mg L<sup>-1</sup>), ácido indol-butírico (IBA; 0,5 mg L<sup>-1</sup>), cefatoxima (250 mg L<sup>-1</sup>) e ágar (7,0 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8, até que atingissem o tamanho e vigor necessário para que pudessem ser enxertadas. Antes de serem enxertadas, foi retirada uma amostra do material vegetal para que fosse realizado o ensaio histoquímico GUS, para identificação de gemas adventícias transgênicas.

Para realizar o teste histoquímico GUS, retirou-se uma amostra (5 mm) da gema adventícia desenvolvida, as amostras foram imersas em solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida (X-GLUC), e incubadas à temperatura de 37 °C, em ausência de luz, por 16 h. Após esse período, a solução de X-GLUC foi retirada e o material vegetal lavado com álcool etílico (70%) para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul no tecido vegetal.

O material que apresentou reação GUS positiva (coloração azul) foi enxertado *in vitro* no citrange 'Carrizo' e, subcultivado a cada 10 dias, em tubos de ensaio (25 x 125 mm) contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8, por um período de aproximadamente 40 dias. Após a cicatrização dos ferimentos da enxertia *in vitro*, bom vigor do enxerto e bom desenvolvimento das raízes do porta enxerto, as plântulas foram aclimatizadas em vasos de polipropileno (500 mL) contendo substrato esterilizado. Cada vaso foi coberto com saco plástico, para formar uma câmara úmida, e as plantas foram aclimatizadas gradualmente até que atingissem condições adequadas para serem transferidas para casa-de-vegetação.

### 3.4.2 Micro-Tom

Os explantes (segmentos de cotilédone) foram obtidos das plântulas germinadas *in vitro*, com 8 dias de idade, e transferidos para placa de Petri (90 x 15 mm) com a face abaxial em contato com o meio de cultura de cocultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ANA (0,07 mg L<sup>-1</sup>), acetoseringona (20 mg L<sup>-1</sup>) e phytigel (4 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8 (Figura 5A-B).

Antes de iniciar o processo de transformação genética, foi acrescentado 1 mL de acetoseringona na suspensão bacteriana, sendo esta reservada por 10 min.

Após este período, uma gota da suspensão bacteriana foi colocada sobre cada explante, por 10 min. Em seguida, retirou-se a suspensão bacteriana com auxílio de pipeta de Pasteur estéril e sobre os explantes colocou-se folhas de papel filtro estéril, para retirar o excesso da suspensão. Os explantes foram incubados à temperatura de 24 °C, em ausência de luz, por um período de 2 dias.

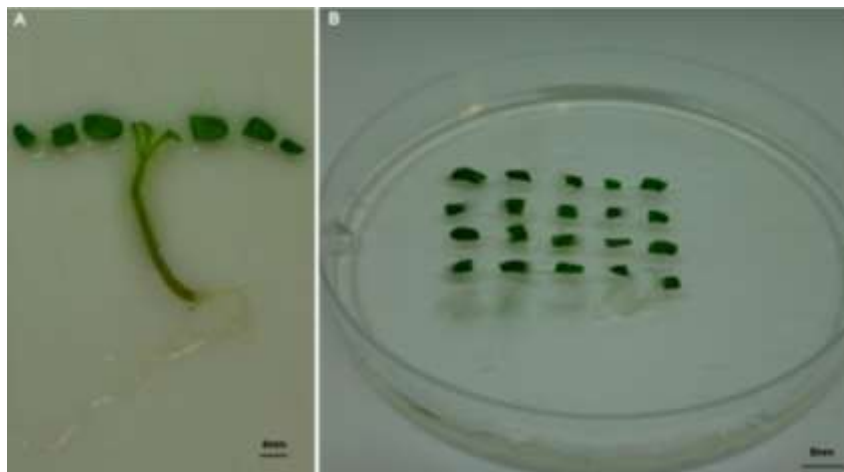


Figura 5 - Etapas do processo de transformação genética de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom', via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*Ptcsd1*. A) Obtenção dos explantes: segmentos de cotiledone. B) Explantes cultivados em meio de cultura de co-cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração, constituído de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e vitamina B5 (GAMBORG et al., 1968), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), BAP (1 mg L<sup>-1</sup>), canamicina (100 mg L<sup>-1</sup>), timentim (300 mg L<sup>-1</sup>) e phytigel (4 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8. O material foi incubado sob fotoperíodo de 16 h de luz, à temperatura de 27 °C, por 3 semanas.

Os brotos desenvolvidos (2 - 4 mm) foram isolados e transferidos para frascos contendo 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), canamicina (100 mg L<sup>-1</sup>), timentim (300 mg L<sup>-1</sup>) e phytigel (4 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8, por um período de duas semanas, para o desenvolvimento adequado das raízes.

Uma amostra (5 mm) dos brotos bem desenvolvidos foi retirada para realização do ensaio histoquímico GUS. As amostras foram imersas em solução de X-GLUC, e incubadas à temperatura de 37 °C, em ausência de luz, por 16 h. Após esse período, a solução de X-GLUC foi retirada e o material vegetal lavado com

álcool etílico (70%) para retirada da clorofila, facilitando a visualização da reação pela presença da coloração azul no tecido vegetal.

As plantas GUS positivas e devidamente enraizadas foram transferidas para vasos (500 mL) contendo substrato esterilizado. Cada vaso foi coberto com saco plástico, para formar uma câmara úmida, e as plantas foram aclimatizadas gradualmente até que atingissem condições adequadas para serem transferidas para casa-de-vegetação. Na casa-de-vegetação, a autofecundação das plantas ocorreu naturalmente com o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, os quais foram colhidos quando atingiram coloração vermelho-alaranjado. As sementes (T1) foram extraídas e armazenadas à 4 °C para posterior obtenção das linhagens homozigotas, pela autofecundação e produção de sementes T2 e T3, e respectiva seleção das progênes por aspersão de solução de canamicina. As plantas homozigotas serão desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. tomato.

### 3.5 Análises moleculares

#### 3.5.1 Análise de PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para a análise de PCR, o DNA foi extraído a partir de folhas coletadas de plântulas, de citros e tomateiro, regeneradas *in vitro* nos experimentos de transformação genética, usando o método de extração CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Os “primers” utilizados foram UBI10 - F (5' – GCGATCGAATTTGTCGATTA – 3') e OCS - R (5' –CAACGTGCACAACAGAATTG- 3'), que amplificam um fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e parte do terminador (OCS). A amplificação foi feita em termociclador, no programa 1 ciclo de 94 °C por 3 min para a primeira desnaturação, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1,5 min, 72 °C por 1,5 min, mais um ciclo final de extensão de 1 min a 72 °C, estabilizando a 4 °C. Os produtos da reação de amplificação foram separados por eletroforese, aplicando-se as amostras em gel de agarose (1%), tampão TAE (1 x), a uma voltagem de 65 V. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) e posteriormente, visualizado e fotografado em luz UV (EDAS 120, Kodak, Rochester, NY, USA).

### 3.5.2 Análise de *Southern blot*

Para análise de Southern blot, o DNA total foi extraído de folhas jovens (1,4 g) de plantas de citros PCR positivas, utilizando-se o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop® - Thermo Scientific, San Jose, EUA), e a pureza das amostras determinada pela razão OD260/OD280 (1,80 - 2,00). O DNA (20 - 60 µg) foi submetido à reação de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (16 h; 37 °C). O DNA digerido foi precipitado com acetato de amônio (7,8 M) e álcool absoluto, ressuspenso em água pura (MilliQ) e os fragmentos obtidos separados por eletroforese em gel de agarose (1%), tampão TAE (1X) e brometo de etídio (0,1%), a 35 V, por 16 h.

Após a eletroforese, o gel foi lavado em tampões apropriados, transferidos para membrana de nylon 'Amersham Hybond™ - N+' (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) por 16 h e posteriormente, fixado por 2 h, a 80 °C. Em seguida, a membrana foi pré-hibridizada por 30 min (60 °C). A sonda (150 ng), constituída de um fragmento do gene *nptII*, foi marcada com fosfatase alcalina, com o kit (*AlkPhos Direct*) e a hibridização foi realizada por 16 h, a 60 °C. Para essa análise, também foi utilizada sonda constituída de um fragmento do gene *Csd1*, marcada com fosfatase alcalina, com o kit (*AlkPhos Direct*) e hibridização realizada por 16 h, a 60 °C.

Posteriormente, a membrana foi lavada em soluções recomendadas pelo kit de marcação. A reação de detecção foi realizada com o kit 'CDP Star™ Detection Reagent' (Amersham Biosciences, UK), conforme as orientações do fabricante. Após a secagem do agente de detecção, a membrana foi colocada no cassete (Amersham Life Science, USA) com uma chapa fotográfica por 2 h. A revelação do filme foi realizada em solução reveladora Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA), por 5 min. Após lavagem em água (1 min), o filme foi mantido por 15 min em solução fixadora Kodak GBX (Carestream Health, Rochester, USA) e novamente lavada em água (1 min).

### 3.5.3 Análise do nível de mRNA do transgene – RT-qPCR (Real-time PCR)

O nível de mRNA do transgene foi quantificada pela análise RT-qPCR. O RNA foi extraído do limbo foliar de plantas de citros, com o uso do produto comercial TRIzol (1 mL; Invitrogen) e o auxílio de um disruptor de tecidos (TissueLyser II – Qiagen; 30hz; 3 min). Os tubos com as amostras foram mantidos à temperatura ambiente (5 min), em seguida adicionou-se clorofórmio (200 µL). Os tubos foram invertidos (15x) e mantidos à temperatura ambiente (3 min) e então centrifugados (12.000 x g; 15 min; 4 °C). A fase aquosa foi transferida para tubo novo e adicionou-se etanol 70% (500 µL).

A purificação do RNA foi feita utilizando-se o kit easy RNA Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e tratamento com DNase (RNase-Free DNase Set- Qiagen) de acordo com instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada, utilizando-se espectrofotômetro (NanoDrop®) e a pureza foi determinada pela razão de OD260/OD280 (1,80 - 2,00).

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA, 1 µl de primer oligo dT (10 µM), 1 µl de mix de dNTP (10 mM) e água destilada livre de RNase, para um volume final de 12 µL. A reação foi incubada a 65 °C (5 min) e depois acondicionada em gelo (3 min). Posteriormente, 4 µl de tampão First Strand (5x), 2 µl de DDT (0,1 M) e 1 µl de RNaseOUT (Invitrogen) foram adicionados à reação e esta foi incubada a 37 °C (2 min). Foi adicionado 1 µl da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) permanecendo a 37 °C (50 min). Para inativação da atividade enzimática, a reação foi incubada a 70 °C (15 min). Em seguida, as amostras de cDNA foram normalizadas para 2,5 ng mL<sup>-1</sup> e armazenadas a -20 °C.

A análise de RT-qPCR foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) disponível no Laboratório de Biologia Molecular e Celular - CENA/USP. Foram utilizados dois genes de referência para analisar a transcrição do transgene *Csd1*, o gene *UBC21* e *DIM1* (MAFRA et al., 2012), utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos genes de referência *UBC21* e *DIM1*, e do gene *Csd1* na análise de RT-qPCR

Gene	Sequência 5' – 3'F	Sequência 5' – 3'R
<i>UBC21</i>	CCTCCACAAGTGCGGTTTTTAA	CTGGGCTCCATGCGTTCTT
<i>DIM1</i>	CGAAACCTGTATGCAGATGG	ACGGTTGAGGGATCGTAAAG
<i>Csd1</i>	TCTTGGTGGAAGTGGAGGGTG	ATGAGGACCAGGCTTGAGAC

Para a reação, foram utilizados 10 µl do cDNA diluído (2,5 ng µl<sup>-1</sup>), 0,6 µl do conjunto de primers (5 µM), 7,5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 1,9 µl de água isenta de nucleasse, em placa de 96 poços (0,1 ml; MicroAmp - Applied Biosystems). As amostras foram analisadas em triplicatas para cada planta e o gene analisado, incluindo amostras de plantas não transgênicas, nas condições de amplificação padrão (FAST), de acordo com o programa: 1 ciclo de 20 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 3 s a 95 °C e 30 s a 60 °C.

Ao final da reação, através da coleta de dados de inflorescência, foi determinado o ponto de fusão médio dos amplicons, por meio da análise de Melting, que se deu submetendo as amostras a 95 °C (15 s), aquecendo-as gradativamente de 60 - 95 °C, com taxa de aquecimento de 0,3 °C s<sup>-1</sup>, e finalmente mantendo-as a 60 °C (15 s). O valor do ciclo de quantificação (Cq) foi determinado para o gene alvo e para o gene de referência em cada evento de transformação. Os dados gerados durante a análise de RT-qPCR foram avaliados com o auxílio do software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Este software faz uma regressão linear para cada uma das curvas de amplificação, gerando o valor de eficiência para cada reação, bem como o rendimento médio para cada gene.

Após este cálculo, os dados Cq produzidos na análise de RT-qPCR foram analisados no software Rest 2009.lnk (PFAFFL et al., 2002) e o cálculo da Quantificação relativa do gene *Csd1* foi realizado, pelo método comparativo, usando a seguinte fórmula de quantificação relativa:  $RQ = e^{-\Delta\Delta Cq}$ . Os genes *UBC21* e *DIM1* foram utilizados como genes de referência, para a normalização da expressão gênica. Não foi utilizada nenhuma planta como calibrador.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Transformação genética

#### 4.1.1 Micro-Tom

As etapas do processo de obtenção de plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' estão ilustradas na Figura 6. A indução de gemas adventícias nos segmentos de cotilédones, ocorreu após 15 dias de cultivo em meio de cultura MS (Figura 6A), com desenvolvimento rápido, sendo que após 30 – 45 dias já era possível visualizar a formação de folhas novas (Figura 6B). As plântulas foram individualizadas e, quando a raiz apresentou bom vigor e tamanho superior a 1 cm de comprimento (Figura 6C), foram transferidas para vasos contendo substrato para aclimatização (Figura 6D). Durante o processo de aclimatização (10 - 15 dias) ocorreu o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea da planta. Após esse período, as plantas estavam em condições de serem transferidas para de casa-de-vegetação e, após 30 - 45 dias, houve a formação e desenvolvimento de frutos. Os frutos foram colhidos quando apresentavam coloração vermelho-alaranjado e as sementes extraídas e armazenadas a 4 °C (Figura 6E). Posteriormente, as sementes foram plantadas em vasos contendo substrato e cultivados em casa-de-vegetação, produzindo indivíduos T1. As sementes dessa geração estão armazenadas a 4 °C para a obtenção de linhagens homocigotas, pela autofecundação e produção de sementes T2 e T3.

Foram realizados 50 experimentos de transformação genética de tomateiro *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom', porém apenas os experimentos que tiveram pelo menos uma gema adventícia GUS positiva estão relacionados na Tabela 2. Nestes experimentos, de um total de 7053 explantes inoculados com *A. tumefaciens* foram obtidos 314 explantes responsivos (4,45%), ou seja, explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias após a transformação genética. Para a identificação da transgenia o teste histoquímico GUS (Figura 7A) foi realizado nas 314 gemas adventícias, e apenas 24 gemas adventícias apresentaram resultado GUS positivo (7,64%), resultando numa eficiência média de transformação genética de 0,34%.



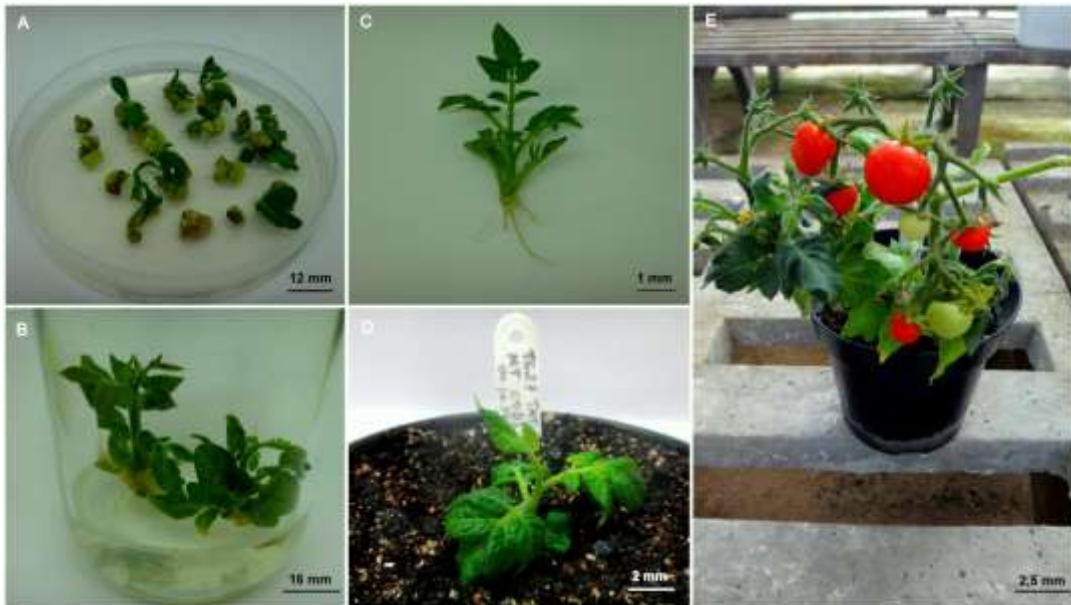


Figura 6 - Transformação genética de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom') via *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-*PtCsd1*. A) Desenvolvimento de gemas adventícias a partir do cultivo de segmentos de cotilédones. B) Gemas adventícias com aproximadamente 60 dias de cultivo *in vitro* C) Detalhe do tamanho mínimo de raiz para transferência da plântula para o substrato. D) Plântula em fase de aclimatização. E) Planta transgênica de tomateiro aclimatizada

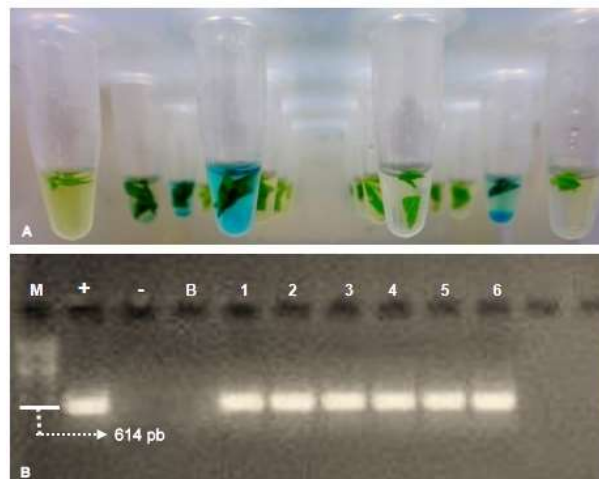


Figura 7 - Identificação de plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom' pelo teste histoquímico GUS (a), e análise de PCR para detecção do fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e a parte do terminador (OCS) (b). (M): marcador molecular 1kb (Fermentas). (+): controle positivo (plasmídeo pCAMBIA2301 contendo o gene *Csd1*). (-): controle negativo (água). Colunas de 1 - 6: amostra de DNA de plantas regeneradas nos experimentos de transformação genética

Após o desenvolvimento das plantas e antes de serem transferidas para a casa-de-vegetação, realizou-se a análise de PCR para a detecção do fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e parte do terminador (OCS). A análise de PCR permitiu a identificação do fragmento em todas as amostras coletadas das plantas GUS+ (Figura 7B). Das 24 plantas PCR+ obtidas apenas 6 completaram o desenvolvimento de frutos (4 – 7 frutos/plantas). As sementes coletadas dos frutos (0 – 5 sementes/frutos), foram armazenadas à temperatura de 4 °C.

Os testes de inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. tomato com plantas não transgênicas foi iniciado para pré-avaliação dos sintomas e ajustes do protocolo. Todavia, a baixa eficiência de transformação genética e, conseqüentemente, reduzida obtenção de plantas transgênicas, aliado ao fator tempo para obtenção das linhagens homozigotas, impossibilitou que as plantas transgênicas fossem desafiadas com o patógeno.

Tabela 2 - Experimentos de transformação genética de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom', com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*

Experimento	Explantos responsivos*/ total de explantes	Plantas GUS+/ plantas avaliadas	Eficiência de transformação genética(%) <sup>a</sup>
1	3/50	1/3	2
2	4/49	1/4	2
4	11/400	1/11	0,25
5	8/320	1/8	0,31
11	15/538	2/15	0,37
13	8/400	1/8	0,25
14	7/200	4/7	2
19	38/696	1/38	0,14
21	24/760	2/24	0,26
23	16/510	1/16	0,20
27	10/980	1/10	0,10
32	27/550	2/27	0,36
36	31/400	2/31	0,50
37	41/400	1/41	0,25
38	31/400	1/31	0,25
41	40/400	2/40	0,5
<b>Total</b>	<b>314/7053</b>	<b>24/314</b>	<b>0,34</b>

<sup>a</sup> Número de plantas GUS+(x100)/ número total de explantes introduzidos

\* Explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias

#### 4.1.2 Citros

As etapas do processo de obtenção de plantas transgênicas de *Citrus sinensis* estão ilustradas na Figura 8. A regeneração das gemas adventícias a partir de segmentos de epicótilo ocorreu após 30 dias de cultivo dos explantes em meio de cultura MT (Figuras 8A-B). As gemas adventícias se desenvolveram gradativamente e, assim que apresentavam tamanho adequado (> 1 cm) e bom vigor, foram enxertadas *in vitro* permitindo o desenvolvimento das plantas (Figuras 8C-D). Após uma semana, os tecidos do enxerto e do porta-enxerto apresentavam sinais da cicatrização do ferimento, resultado de uma enxertia bem sucedida, formando um único indivíduo. O não pegamento da enxertia ocorreu em alguns casos, muitas vezes, devido ao pequeno tamanho das gemas adventícias. A medida que as plantas enxertadas apresentavam bom vigor foram transferidas para vasos contendo substrato para aclimatização (15 - 20 dias após a enxertia) e posteriormente transferidas para casa-de-vegetação (45 - 60 dias após a enxertia) (Figura 8E).

Foram realizados 5 experimentos de transformação genética de laranja doce, sendo 4 experimentos com a cultivar 'Hamlin' e 1 com a cultivar 'Pineapple' (Tabela 3). Para a cultivar 'Hamlin', verificou-se que, de um total de 3249 explantes inoculados com *A. tumefaciens*, foram obtidos 291 explantes responsivos (8,96%). Para a identificação da transgenia o teste histoquímico GUS (Figura 9A) foi realizado em 277 gemas adventícias, tendo sido identificadas 154 gemas adventícias GUS positivas (55,6%), resultando numa eficiência média de transformação genética de 4,74%. Para a cultivar 'Pineapple', verificou-se que, de um total de 520 explantes inoculados com *A. tumefaciens*, foram obtidos 41 explantes responsivos (7,88%). Para a identificação da transgenia o teste histoquímico GUS (Figura 9A) foi realizado em 39 gemas adventícias, tendo sido identificadas 19 gemas adventícias GUS positivas (48,72%), resultando numa eficiência de transformação genética de 3,65%.

Após a enxertia *in vitro* e desenvolvimento das plantas, realizou-se a análise de PCR para a detecção do fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e parte do terminador (OCS). A análise da PCR permitiu a amplificação do fragmento em todas as amostras coletadas das plantas GUS+ (Figura 9B). As plantas PCR positivas (30) foram transferidas para casa-de-vegetação.

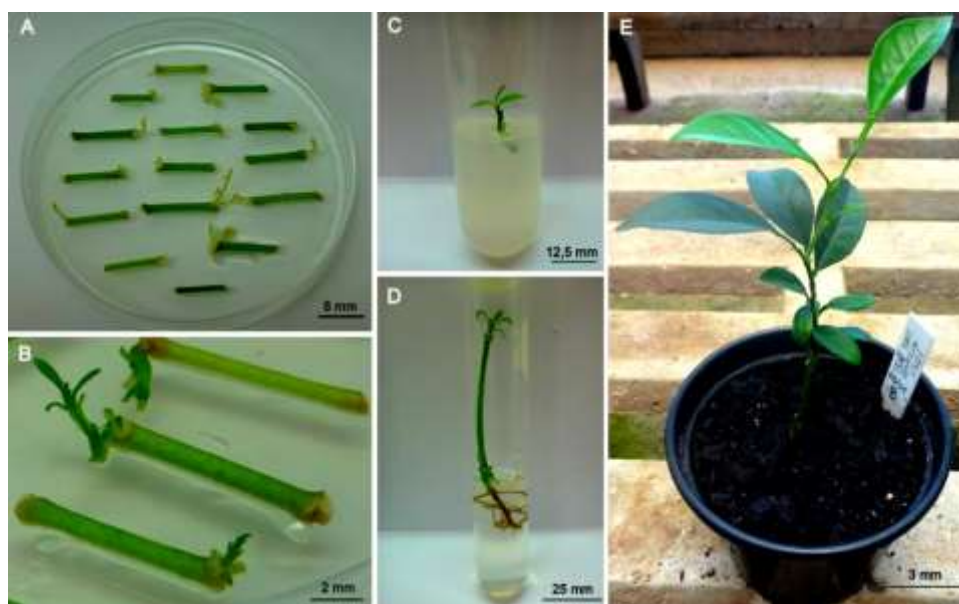


Figura 8 - Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis*), via *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pCAMBIA2301-PtCsd1. A) Desenvolvimento de gemas adventícias a partir do cultivo de segmentos de epicótilo, incubados em ausência de luz. B) Detalhe de gema adventícia após transferência para fotoperíodo de 16 h de luz. C) Gema adventícia cultivada em meio de cultura de enraizamento. D) Enxertia *in vitro* da gema adventícia cv. 'Hamlin', sob o porta-enxerto citrange 'Carrizo'. E) Planta transgênica de laranja doce aclimatizada

Tabela 3 - Experimentos de transformação genética de *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' e cv. 'Pineapple', com a construção gênica pCAMBIA2301-PtCsd1

Experimento	Cultivar	Explantos responsivos*/ total de explantes	Plantas GUS+/ plantas avaliadas	Eficiência de transformação genética (%) <sup>a</sup>	Plantas aclimatizadas
1	'Hamlin'	49/648	22/48	3,39	8
2	'Hamlin'	8/767	3/8	0,39	0
3	'Hamlin'	92/960	43/86	4,48	18
4	'Hamlin'	142/874	86/135	9,83	23
<b>Total</b>		<b>291/3249</b>	<b>154/277</b>	<b>4,74</b>	<b>49</b>
1	'Pineapple'	41/520	19/39	3,65	7
<b>Total</b>		<b>41/520</b>	<b>19/39</b>	<b>3,65</b>	<b>7</b>

<sup>a</sup> Número de plantas GUS+(x100)/ número total de explantes introduzidos

\* Explantes que apresentaram o desenvolvimento de gemas adventícias

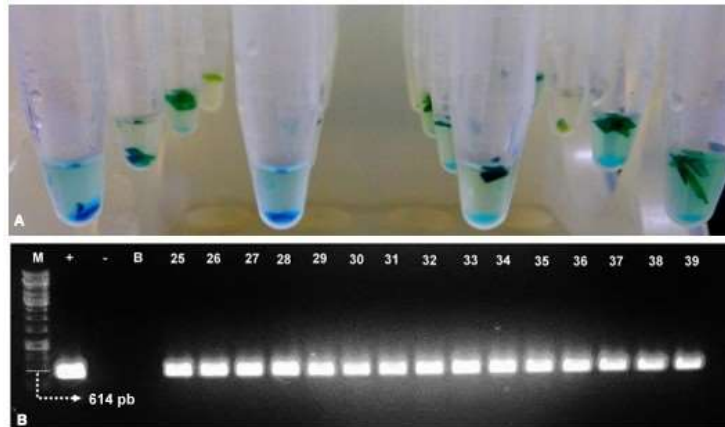


Figura 9 - Identificação de plantas transgênicas de *Citrus sinensis* pelo teste histoquímico GUS (a), e análise de PCR para detecção do fragmento de 614 pb, referente a parte do promotor (UBI10), ao gene *Csd1* e a parte do terminador (OCS) (b). (M): marcador molecular 1kb (Fermentas). (+): controle positivo (plasmídeo pCAMBIA2301 contendo o gene *Csd1*). (-): controle negativo (água). Colunas de 25-39: amostra de DNA de plantas regeneradas nos experimentos de transformação genética

A integração do transgene no genoma das plantas foi confirmada pela análise de *Southern blot*. Foram analisadas 32 plantas transgênicas de laranja doce, com a sonda para detecção do gene *np11l*, sendo 27 plantas da cultivar 'Hamlin' e 5 plantas da cultivar 'Pineapple' (Figura 10A-C). O perfil de hibridização foi diferente entre as plantas analisadas, indicando que as plantas são provenientes de eventos independentes de transformação genética. Houve uma variação de 1 a 5 eventos de inserção, sendo que a maioria das plantas apresentaram uma única inserção da construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*. Não foram observadas hidridizações nas amostras de DNA de plantas não transgênicas em nenhuma das análises realizadas com a sonda do gene *np11l*.

A análise de *Southern blot* também foi realizada com a sonda para detecção do gene *Csd1*, a qual hibridizou com o transgene e o gene endógeno (Figura 11). Foram analisadas 13 plantas transgênicas de laranja doce, sendo 12 plantas da cultivar 'Hamlin' e 1 planta da cultivar 'Pineapple'. A amostra com DNA genômico da planta não transgênica (controle negativo) mostra a presença do gene endógeno em 3 locais distintos, entre as posições 3 - 6 Kb. Nas amostras transgênicas avaliadas é possível observar a presença do gene endógeno e do transgene. Porém, as inserções do transgene localizadas nas posições entre 3 e 6 Kb não são visualizadas devido a presença das bandas do gene endógeno. É possível observar a correlação entre as duas sondas utilizadas quando a inserção do transgene não está localizada nesta região (3 - 6 Kb). Por exemplo, na amostra

TG4-9, observa-se a presença de 5 bandas quando a sonda para detecção do gene *Csd1* foi utilizada, e 2 bandas quando a sonda para detecção do gene *nptII* foi utilizada. Na comparação do perfil das hibridizações, nota-se a coincidência de 3 bandas no intervalo 3 – 6 Kb (Figura 11), referente ao gene endógeno.

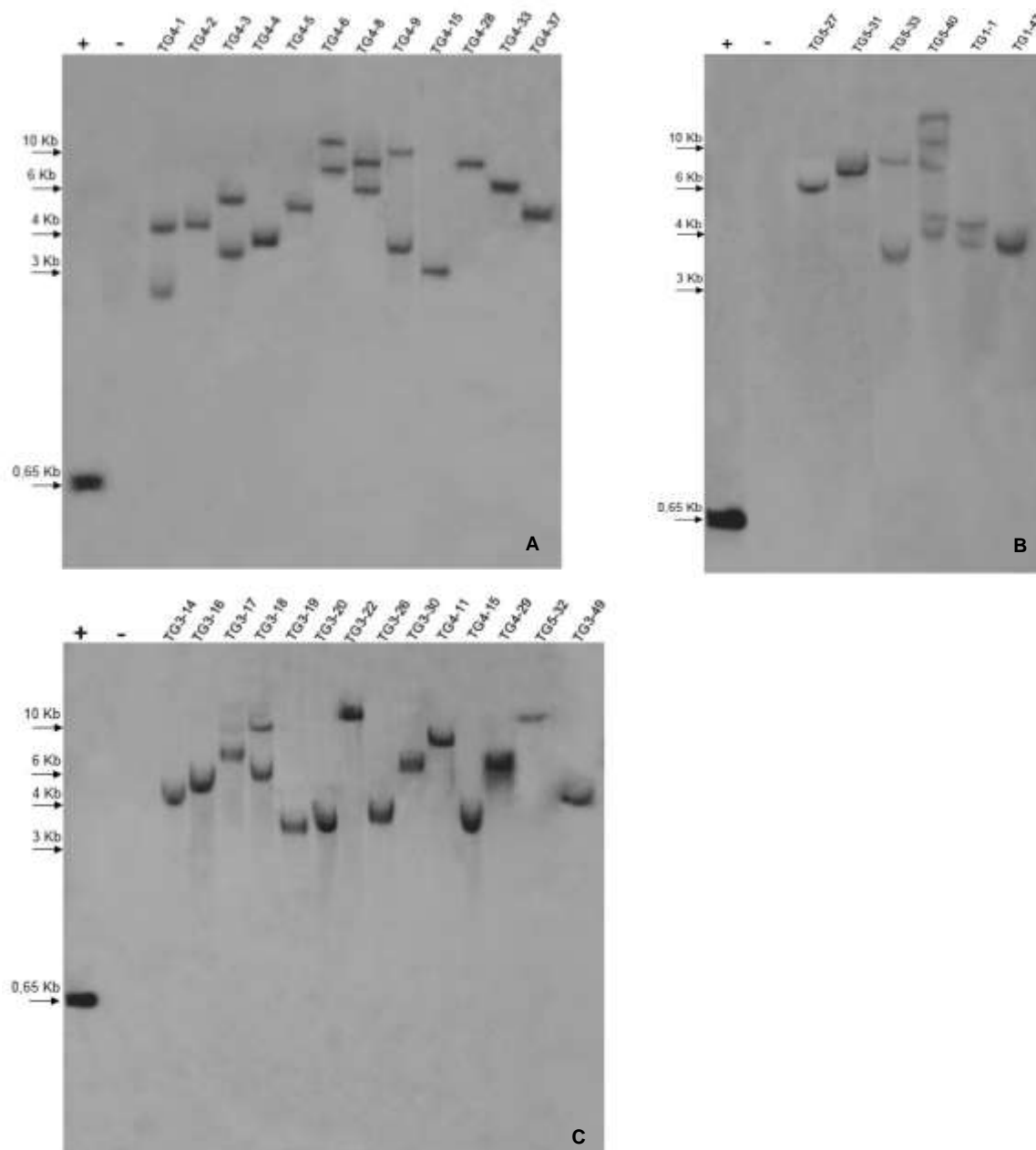


Figura 10 - Análise de *Southern blot*, utilizando sonda para detecção do gene *nptII*, para plantas de laranja doce obtidas nos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*. Colunas: DNA de plantas PCR+, digerido com a enzima *EcoRI*. (+): controle positivo (fragmento amplificado do gene *nptII* – 656 pb); (-): controle negativo (A e C: DNA de planta não transgênica da cultivar 'Hamlin'; B: DNA de planta não transgênica da cultivar 'Pineapple'). TG1, TG3 e TG4: DNA de plantas da cultivar 'Hamlin'. TG5: DNA de plantas da cultivar 'Pineapple'

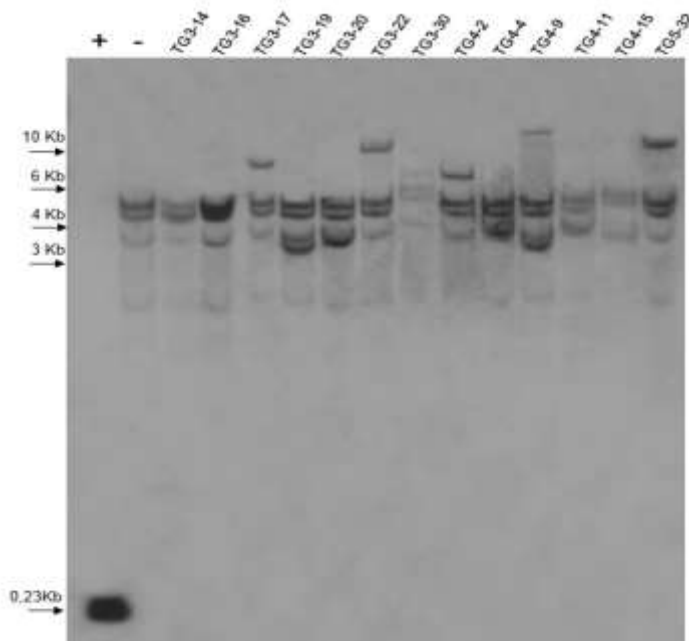


Figura 11 - Análise de *Southern blot*, utilizando sonda para detecção do gene *Csd1*, para plantas de laranja doce obtidas a partir dos experimentos de transformação genética com a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*. Colunas: DNA de plantas PCR+, digerido com a enzima *EcoRI*. (+): controle positivo (fragmento amplificado do gene *Csd1* – 231pb); (-): controle negativo (DNA de planta não transgênica da cultivar ‘Hamlin’). TG3 e TG4: DNA de plantas da cultivar ‘Hamlin’. TG5: DNA de plantas da cultivar ‘Pineapple’

A análise de RT-qPCR foi realizada em 21 plantas de laranja doce previamente analisadas por *Southern blot* e com apenas uma inserção do transgene no genoma da planta (Figuras 12-13). A eficiência da reação foi diferente para cada conjunto de amostras analisadas em uma mesma placa. Os resultados obtidos mostram a quantificação relativa, dos níveis de mRNA do gene *Csd1*, nas plantas transgênicas, assim como, na testemunha não transgênica. Na testemunha o nível de transcrição foi inferior quando comparado com as amostras transgênicas. O nível de mRNA do gene *Csd1* nas amostras transgênicas é referente ao somatório dos transcritos do transgene e do gene endógeno. Mais de uma planta não transgênica foi utilizada nesta análise mostrando que os níveis de mRNA do gene endógeno é variável entre as plantas.

O valor de quantificação relativa das amostras de laranja ‘Hamlin’ avaliadas (Figura 12) variou de 0,14 – 1,67 (Figura 12A), sendo o menor valor de transcrição referente a testemunha; 0,44 – 1,58 (Figura 12B), sendo que entre as plantas não transgênicas a variação foi de 0,44 – 1,04 e, entre as plantas



transgênicas, a variação foi de 1,30 – 1,58; 1,04 – 1,83 (Figura 12C), sendo o menor valor de transcrição referente a testemunha; 0,70 – 1,75 (Figura 12D), sendo que entre as plantas não transgênicas a variação foi de 0,70 – 1,46 e, entre as plantas transgênicas, a variação foi de 1,62 – 1,75. O valor de quantificação relativa das amostras de laranja 'Pineapple' avaliadas (Figura 13) variou de 0,57 – 1,55, sendo que entre as plantas não transgênicas a variação foi de 0,57 – 0,77 e, entre as plantas transgênicas, a variação foi de 1,18 – 1,55.

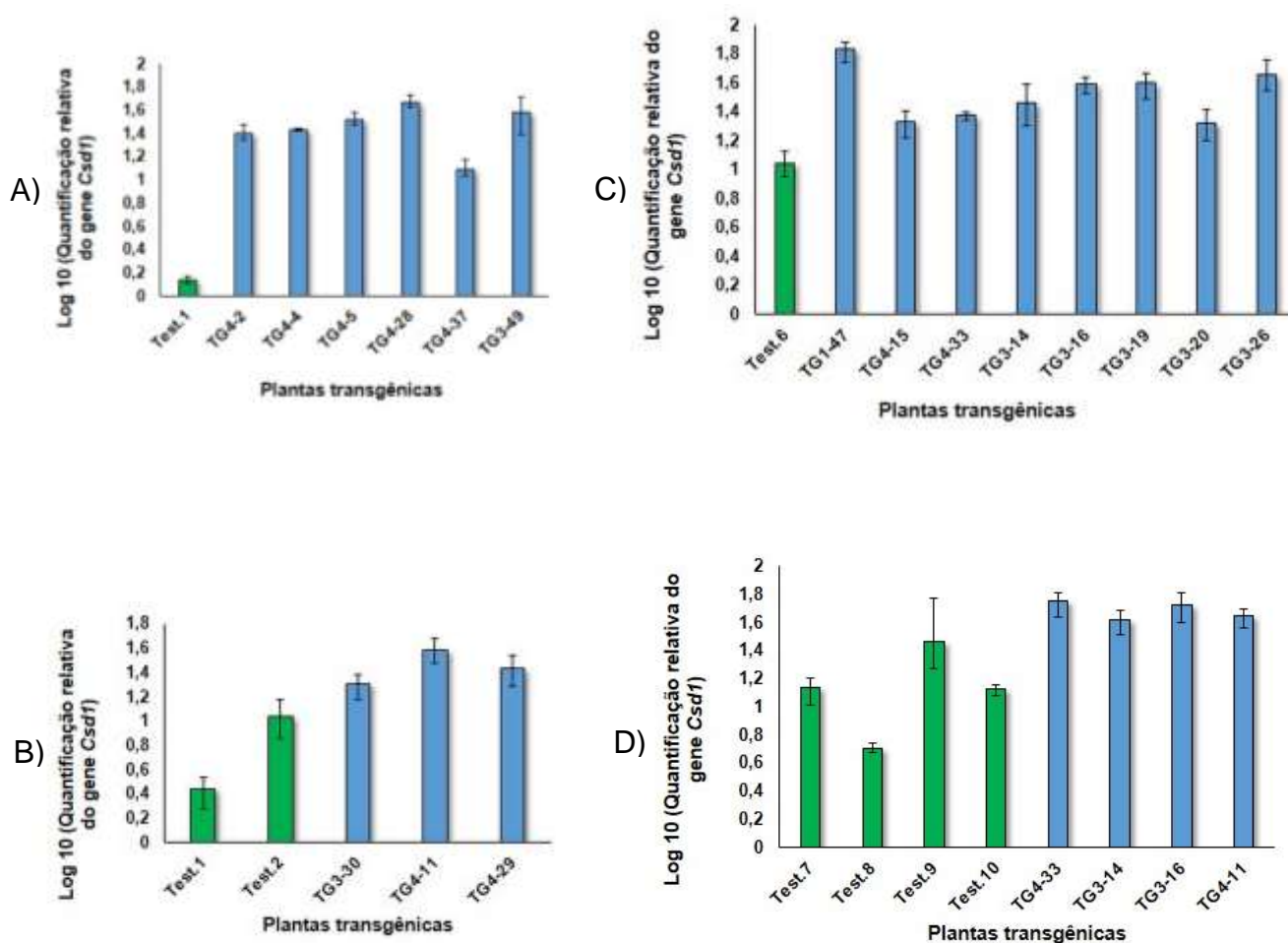


Figura 12 – Quantificação relativa do gene *Csd1* em relação aos genes de referência *UBC21* e *DIM1* em plantas de laranja doce cv 'Hamlin', contendo a construção gênica pCAMBIA2301-Pt*Csd1*. A-D: conjunto de amostras com a mesma eficiência de reação.



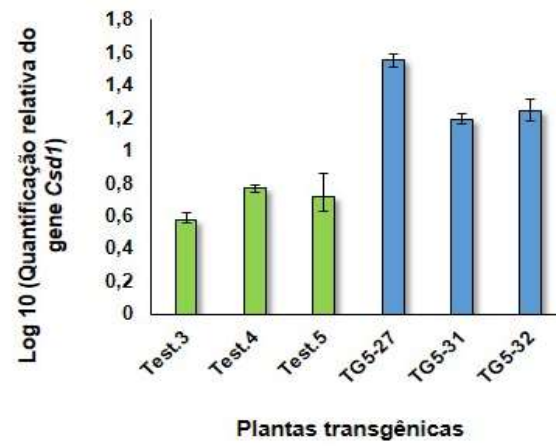


Figura 13 – Quantificação relativa do gene *Csd1* em relação aos genes de referência *UBC21* e *DIM1* em plantas de laranja doce cv 'Pineapple', contendo a construção gênica pCAMBIA2301-Pt*Csd1*.

## 5 DISCUSSÃO

O uso de organismos modelos em pesquisas científicas, principalmente em estudos de investigação em genética e biologia molecular tem contribuído para a compreensão de inúmeros processos biológicos. Entre os vegetais, a espécie *Arabidopsis thaliana* L. é a planta modelo mais utilizada por apresentar ciclo de vida relativamente curto, produção de um grande número de sementes, facilidade de cultivo em espaços restritos, grande número de estudos científicos publicados e existência de um número significativo de linhas geneticamente alteradas que facilita a sua análise e manipulação (VAECK et al., 1987; MEINKE et al., 1998; XIONG et al., 1999; BRITO et al., 2009).

Recentemente, o tomateiro *Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom' vem sendo utilizado como planta modelo por possuir uma série de características que têm facilitado a sua manipulação, como ciclo de vida curto, tamanho e genoma pequeno, além de possuir algumas características que estão ausentes em *Arabidopsis thaliana*, como frutos carnosos e climatéricos, tricomas multicelular e glandular (TANKSLEY, 1993; MEISSNER et al., 1997; PINO et al., 2010).

Neste trabalho, foi proposto a utilização da planta modelo Micro-Tom para validação do gene *Csd1* e posterior estudo relacionado a obtenção de plantas transgênicas de citros resistentes ao huanglongbing. Apesar da eficácia dos protocolos existentes para a transformação genética de citros, uma desvantagem característica de plantas perenes é o ciclo reprodutivo lento, tornando difícil e demorado a validação de novos genes de interesse. Apesar dos estudos em plantas modelos não garantirem a boa performance dos transgenes na espécie alvo, em diversos casos foi observada uma correlação positiva entre a resposta observada em plantas modelos e a espécie alvo estudada (MEINKE et al., 1998; XIONG et al., 1999). Assim, o uso de plantas modelos torna-se uma estratégia eficaz no estudo de genes envolvidos em respostas a estresses abióticos e bióticos, visando o melhoramento genético de culturas de importância comercial.

O tomateiro, segundo a literatura, é compatível com as técnicas de cultura de tecidos (HILLE et al., 1989; PATIL, 1994), além disso, a cultivar 'Micro-Tom' possui boa eficiência de transformação (aproximadamente 40%) e um protocolo fácil de execução, sendo possível a aclimatização das plantas transgênicas,

aproximadamente, 40 dias após a inoculação com *Agrobacterium tumefaciens* (PINO et al., 2010). No entanto, neste trabalho, utilizando o mesmo protocolo desenvolvido por Pino e colaboradores, a eficiência de transformação genética obtida foi muito baixa (0,34%). A alta quantidade de escapes foi um dos principais fatores dessa baixa eficiência. Brotos regenerados não transgênicos (escapes) podem estar relacionados a vários fatores, entre os quais, estão a alta eficiência de regeneração de brotos em oposição à baixa transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*; a ineficiência de seleção pelo antibiótico canamicina, em virtude da proteção que às células transformadas fazem às células não transformadas, impedindo o contato destas com o agente seletivo; e a persistência de *A. tumefaciens* nos explantes por um longo período após o co-cultivo, o que pode favorecer a formação de brotos falsos positivos ou quiméricos (COSTA; OTONI; MOORE, 2002; PENÃ et al., 2005).

Nos últimos anos, muito progresso tem sido obtido no desenvolvimento de protocolos mais eficientes de transformação genética mediado por *A. tumefaciens* para 'Micro-Tom' (SUN et al., 2006; DAN et al., 2006; CRUZ-MENDIVIL et al., 2011). No entanto, eficiências variáveis de transformação genética têm sido relatadas quando se utilizam diferentes estirpes de *A. tumefaciens* (MCCORMICK et al., 1986; LAZO et al., 1991; HOOD et al., 1993; SUN et al., 2006; DAN et al., 2006; CRUZ-MENDIVIL et al., 2011; CHETTY et al., 2013).

Neste trabalho, paralelo aos experimentos de transformação genética de MT, testes de inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. tomato com plantas não transgênicas foram iniciados para pré-avaliação dos sintomas e ajustes de protocolo. O patógeno escolhido para os testes de inoculação deveria apresentar características mais próximas possível ao patógeno causador do HLB. Por essa razão o patógeno *Pseudomonas syringae* pv. tomato (bactéria, gram negativa e biotrófico) foi escolhido. Outro fato somado a esta escolha é que o hospedeiro ('Micro-Tom') é suscetível a este patógeno (TAKAHASHI et al., 2005; ARIE et al., 2007), facilitando a visualização e avaliação dos sintomas após a infecção. Assim, após a obtenção de plantas transgênicas de MT contendo a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*, os eventos homozigotos obtidos neste trabalho seriam desafiados com *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Porém, os resultados mostram que houve uma baixa eficiência de transformação genética e reduzida obtenção de plantas transgênicas, impossibilitando que tais plantas fossem desafiadas com esse

patógeno. Sendo assim, o foco deste trabalho foi voltado para a transformação genética de citros e caracterização molecular dos eventos obtidos.

A transformação genética em citros é empregada há mais de duas décadas, tornando-se uma importante ferramenta no melhoramento genético dessas espécies. Através da super-expressão ou do silenciamento gênico, genes isolados de plantas, fungos, bactérias e insetos foram experimentalmente introduzidos em citros, resultando na produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses bióticos e abióticos (GONG; LIU, 2013).

Sabe-se que a transformação genética de citros é genótipo dependente, assim, neste trabalho optou-se por trabalhar com a cultivar 'Hamlin' pois dentre as laranjas doces cultivadas no Brasil ela é a mais responsiva, com médias de até 18% de eficiência de transformação genética (BOSCARIOL et al., 2006; DUTT; GROSSER, 2009; MENDES et al., 2010). A eficiência média de transformação genética para a cultivar 'Hamlin' obtida neste trabalho, utilizando a construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*, foi de 4,74%, valor este relativamente mais baixo do que o encontrado na literatura. Estudos comprovam que a eficiência de transformação genética de citrus varia em função de alguns fatores, tais como: genótipo e tipo de explante (BACHCHU et al., 2011; DUTT; GROSSER, 2010; DUTT et al., 2012; KHAN; FU; LIU, 2012), cultivar (BOSCARIOL et al., 2003; MUNIZ et al., 2012), estirpe de *Agrobacterium* (DUTT; GROSSER, 2009; BOND; ROOSE, 1998), espécie (CERVERA et al., 2008; GHORBEL et al., 2000; PEÑA et al., 1997) e construção gênica (MIYATA et al., 2012; PORTO et al., 2014).

A transformação genética também foi realizada com cultivar 'Pineapple'. A eficiência de transformação genética, em um único experimento realizado para esta cultivar, foi de 3,65%. Esta cultivar já foi utilizada em trabalhos de transformação genética (PENÃ et al., 1995; CERVERA et al., 1998) alcançando média de eficiência de transformação genética de 8,4% (OLIVEIRA, 2008).

Através da análise de *Southern blot*, foi possível confirmar a integração do transgene nas plantas obtidas. Como mostra os resultados, houve uma variação de 1 a 5 eventos de inserção no genoma das plantas transgênicas, sendo que a maioria das plantas apresentaram uma única inserção da construção gênica pCAMBIA2301-*PtCsd1*. A transformação mediada por *Agrobacterium* é um processo aleatório, e a integração de um número definido de cópias do transgene não é possível (NAGAYA et al., 2005). Há relatos da influência do número de cópias na transcrição do

transgene, podendo interferir nos níveis de mRNA dos genes integrados, no silenciamento dos genes e na sua estabilidade (SCHUBERT et al., 2004). Além disso, o número de cópias do gene também é um parâmetro importante para a biotecnologia vegetal, uma vez que as plantas transgênicas com inserções de uma única cópia do transgene são preferencialmente aprovadas pelas agências reguladoras.

Assim, os níveis de mRNA do transgene verificada pela análise de RT-qPCR foi realizada apenas nas amostras que tiveram uma única inserção do transgene no genoma da planta. Para esta análise, foram utilizados dois genes de referência, *UBC21* e *DIM1*, que segundo resultados obtidos por Mafra et al. (2012), dentre outros genes, foram os que se apresentaram mais estáveis quando testado em diferentes tecidos de citros. Uma característica de genes de referência é apresentarem transcritos com expressão estável em um determinado tecido, ou entre tecidos, em diferentes fases de desenvolvimento da planta e sob diferentes condições ambientais. Genes de referência são, geralmente, genes constitutivos. Alguns dos mais conhecidos e utilizados em plantas incluem os genes da actina, ubiquitina,  $\beta$ -tubulina e desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) (THELLIN et al., 1999; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Neste trabalho foi possível observar a transcrição do transgene em todas as plantas transgênicas avaliadas. Segundo resultados de pesquisa no National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2015) o gene superóxido dismutase do cobre e do zinco, isolado e clonado de *Poncirus trifoliata*, tem sequência similar nas espécies *Citrus sinensis* e *Citrus clementina*. Assim, o gene de interesse é endógeno na espécie em estudo, resultando na detecção dos níveis de mRNA, do gene *Csd1*, também nas plantas não transgênicas avaliadas. A superexpressão de genes de resistência já presentes na espécie constitui uma forma de obter plantas resistentes a doenças, além disso, a utilização de construções gênicas constituídas por elementos genéticos (promotor, gene de interesse e terminador) provenientes da mesma espécie ou de espécies relacionadas (cisgenia) é uma abordagem de transformação genética que tem sido discutida nos últimos anos (HOLME et al., 2013). Neste trabalho, a superexpressão do gene *Csd1* foi confirmada pela análise de RT-qPCR. De acordo com Bustin et al. (2009), o desempenho da análise de RT-qPCR é influenciado por diversos fatores, como a idade e condição fisiológica da amostra coletada, assim com, sua qualidade de armazenamento, o procedimento

utilizado para o isolamento do DNA/RNA, a seleção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a transcrição reversa e realização da PCR em tempo real.

O gene *Csd1* codifica proteínas superóxido dismutases, que têm atraído atenção por causa do papel que desempenham na desintoxicação (dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , em  $H_2O_2$  e  $O_2$ ) de radicais superóxido, os quais podem danificar severamente as células (BOWLER et al., 1992). Relatos de que o aumento do nível de superóxido dismutase pode proteger as plantas de estresses bióticos e abióticos são encontrados na literatura (ABBA et al., 2009; GILL et al., 2010; SAHOO; KUMAR; AHUJA, 2011; THOMAS et al., 1996). Porém, estudos relacionados a proteção de plantas visando a resistência a doenças, utilizando genes que codificam a superóxido dismutase, ainda não foram relatados. Assim, a importância dos níveis de transcrição do transgene será definida depois que as plantas obtidas neste trabalho forem desafiadas com *Candidatus Liberibacter*. Nesse sentido, esses resultados serão importantes para posterior avaliação do gene *Csd1* visando plantas resistentes ao HLB.



## 6 CONCLUSÃO

Foram obtidas plantas transgênicas de *Citrus sinensis* cvs. 'Hamlin' e 'Pineapple', contendo a construção gênica com o gene *Csd1*.

A transcrição do gene *Csd1*, nas plantas cítricas, foi confirmada pela análise de RT-qPCR.

Não foram obtidas plantas transgênicas homozigotas da cultivar 'Micro-Tom', devido a baixa eficiência de transformação genética e ao limitado tempo para obtenção das linhagens homozigotas do tomateiro.





## REFERÊNCIAS

- ABBA, S.; KHOUJA, H.R.; MARTINO, E.; ARCHER, D.B.; PEROTTO, S. SOD1-targeted gene disruption in the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius* reduces conidiation and the capacity for mycorrhization. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, p. 1412–1421, 2009.
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. Citros/Laranja, 2015. p. 241-276.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing huanglongbing in Florida. **Plant Science**, Limerick, v. 175, p. 291-306, 2008.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 185-186, p. 118-130, 2012.
- ANAMI, S.; NJUGUNA, E.; COUSSEMS, G.; AESAERT, S.; VAN LIJSEBETTENS, M. Higher plant transformation: principles and molecular tools. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 57, p. 483-494, 2013.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; FUNDAG, v. 6, p. 125-145, 2005.
- ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M; TERAOKA, T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 24, p. 135-147, 2007.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA–MENDES, J.M.; GUDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the *b0* (Bacterio-Opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v. 24, p. 185-196, 2006.
- BACHCHU, M.A.A.; JIN, S.B.; PARK, J.W.; SUN, H.J.; YUN, S.H.; LEE, H.Y.; LEE, D.S.; HONG, Q.C.; KIM, Y.W.; RIU, K.Z.; KIM, J.H. *Agrobacterium*-mediated transformation using embryogenic calli in satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Miyagawa Wase. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Suwon, v. 52, n 2, p. 170-175, 2011.
- BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; AHUJA, P.S. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Florida, v. 68, n. 2, p. 129-138, 2011.
- BARBOSA–MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the

transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 109-115, 2009.

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

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

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

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

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

BOVE, J.M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 88, p. 7–37, 2006.

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

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biologic**, California, v.43, p.83-116, 1992.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa, v.2, p.679 -736, 1999.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Agrobacterium: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia**, Brasília, v. 15, p. 12-15, 2000.

BRITO, D.Q.; MENEZES-OLIVEIRA, V.; AMORIM, M.J.B.; SOARES, A.M.V.M.; LOUREIRO, S. *Arabidopsis thaliana*: planta teste em estudos multidisciplinares. **Captar**, v. 1, n. 2, p. 205-216, 2009.

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

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

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

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

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

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY, 1975. p. 14-20.

CHETTY, V.J.; CEBALLOS, N.; GARCIA, D.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; LOPEZ, W.; OROZCO-CÁRDENAS, M.L. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. **Plant Cell Reporter**, New York, v. 32, p. 239-247, 2013.

CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L.P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília:Embrapa, 2010. p. 16-42.

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

CITRUSBR - Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. A Indústria Brasileira do Suco de Laranja. [www.citrusbr.com](http://www.citrusbr.com), 2015.

CRUZ-MENDIVIL, A.; RIVERA-LOPEZ, J.; GERMAN-BAEZ, L.J.; LOPEZ-MEYER, M.; HERNANDEZ-VERDUGO, S.; LOPEZ-VALENZUELA, J.A.; REYES-MORENO, C.; VALDEZ-ORTIZ, A. A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of Tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. **HortScience**, v. 46, p. 1660–1665, 2011.

DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C.L. MicroTom – a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, p. 432-441, 2006.

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

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

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

DONMEZ, D.; SIMSEK, O.; IZGU, T.; KACAR, Y.A.; MENDI, Y.Y. Genetic transformation in citrus. **Scientific World Journal**, Denver, v.2013, p.1-8, 2013.

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

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

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

DUTT, M.; LEE, D.H.; GROSSER, J.W. Biofunctional selection-reporter system for genetic transformation of citrus: mannose and kanamycin-based systems. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 46, n. 6, p. 467-476, 2010.

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

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

ELSTNER, E.F. Mechanisms of oxygen activation in diferente compartments of plant cells. In: PELL, E.J.; STEFFEN, K.L. ( Ed.). **Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologist, 1991. p. 13-15.

FAO. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>. Acesso em: 09 abril, 2015.

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.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; FATTA DEL-BOSCO, S. GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In Vitro Cellular Desenvolpmental Biology-Plant**, Columbia, v.36, p. 450-455, 2000.

FOLIMONOVA, S.Y.; ROBERTSON, C.J.; GARNSEY, S.M.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O. Examination of the Responses of Different Genotypes of Citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) Under Different Conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 1346–1354, 2009.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. In: **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 58, p. 61-97, 1986.

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

FUNDECITRUS. Disponivel em: <<http://www.fudecitrus.com.br/doencas/10-Greening>>. Acesso em: 10 outubro, 2014.

FUNDECITRUS. Fundo de defesa da citricultura. Disponível em: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br). Acesso em 02 fevereiro, 2015.

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

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

GILL, T.; SREENIVASULU, Y.; KUMAR, S.; AHUJA, P.S. **Journal Plant Physiology**, Toronto, v. 167, p. 757–760, 2010.

GIRARDI, E.A.; NASCIMENTO A.S.; LARANJEIRA, F.F. **Guia de Identificação do Huanglongbing (HLB, ex-greening) do Citrus**. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011.

GONG, X.; LIU, J. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in *Citrus* and its related genera. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 113, p. 137-147, 2013.

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

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

GILL, T.; SREENIVASULU, Y.; KUMAR, S.; AHUJA, P.S.; **Journal of Plant Physiology**, Toronto, v. 167: p. 757–760, 2010.

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

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

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllid (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Florida, v. 87, p. 330-353, 2004.

HILLE, J.; KOORNNEEF, M.; RAMANNA, M.S.; ZABEL, P. Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. **Euphytica**, Wageningen, v. 42, p. 1-23, 1989.

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

HOOD, E.E.; GELVIN, S.B.; MELEHERS, L.S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, Edinburgh, v. 2, p. 208–218, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: < [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Producao\\_Agricola\\_Municipal\\_\[anual\]/2012/tabelas\\_pdf/tabela04.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2012/tabelas_pdf/tabela04.pdf) >. Acesso em: 26 maio.2015.

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

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

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

KNAPP, S. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, p. 2001-2022, 2002.

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

KRYLOD, A. UNCTAD <http://www.unctad.info/en/Infocomm/AACPproducts/COMMODITY-PROFILE—Tomato/>. Acesso em: 20 setembro, 2014

LARANJEIRA, F.F.; FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B. Manejo integrado de doenças dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D. de; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. cap.21, p.631-652.

LAZO, G.R.; STEIN, P.A.; LUDWIG, R. A DNA transformation - competent arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 9, p. 963–967, 1991.

LEE, M.K.; KIM, H.S.; KIM, J.S.; KIM, S.H.; PARK, J.D. *Agrobacterium* mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. **Journal of Plant Biology**, California, v. 47, p. 300–306, 2004.

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

MAFRA, V.; MARTINS, P.K.; FRANCISCO, C.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTÚAS, J.; MACHADO, M. Candidatus *Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **Bmc Genomics**, Edinburgh, v. 14, e. 31263, 2013.

MANN T, KEILIN D. Homocuprein and hepatocuprein, copperprotein compounds of blood and liver in mammals. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 126, p. 303-315, 1938.



MCCLEAN, A.P.D.; SCHWARZ, R.E. Greening or blotchy-mottle disease of citrus, **Phytophylactica**, Amsterdam, v. 2, p. 177–194, 1970.

MCCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reporter**, New York, v. 5, p. 81–84, 1986.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYYATUY, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MEISSNER, R.; CHAGUE, V.; ZHU, Q.; EMMANUEL, E.; ELKIND, Y.; LEVY, A.A. A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. **Plant Journal**, Berlin, v.22, p.265–274, 2000.

MEINKE, D. W.; CHERRY, J.M; DEAN, C.; ROUNSLEY, S. D.; KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. **Science Magazine**, New York, v. 282, n. 5389, p. 662-682, 1998.

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

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

MIYAKAWA, T.; ZHAO, X.Y. Citrus host range of greening disease, eds Aubert B., Tontyaporn S., Buangsuwon D. Proc. 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. **FAO-UNDP**, p 118–121, 1990.

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

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

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

MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Perspectivas da produção e utilização de transgênicos para o controle do *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.91-100, 2010.

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

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.; HARAKAVA, R.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; STACH-MACHADO, D.; REZENDE, J.A.M.; FEBRES, V.J.; MOORE, G.A.; MENDES, B.M.J. Reaction of transgenic *Citrus sinensis* plants to *Citrus tristeza virus* infection by *Toxoptera citricida*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 139, n. 1, p. 151-159, 2014.

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

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, I., 1969. Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, v. 3, p. 1155-1169, 1969.

MATSUKURA, C.; AOKI, K.; FUKUDA, N.; MIZOGUCHI, T.; ASAMIZU, E.; SAITO, T.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Comprehensive Resources for Tomato Functional Genomics Based on the Miniature Model Tomato Micro-Tom. **Current Genomics**, Paris, v. 9, p. 436-443, 2008.

NAGAYA, S.; KATO, K.; NINOMIYA, Y.; HORIE, R.; SEKINE, M.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, Liverpool, v. 46, n. 1, p. 438-444, 2005.

NEVES, M.F.; KALAK, R.B.; TROMBIN, V.G. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR: 2010. 137p.

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

OLIVEIRA, M.L.P. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética de citros mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Tese – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 80 p., 2008.

OSTERGAARD, L.; YANOFSKY, M.F. Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Berlim, v. 39, n. 5, p. 682 -696, 2004.

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

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

PATIL, R.S. **Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum*) for crop improvement**.1994. 253p. Thesis (Ph.D in Botany) – University of Nottingham, Nottingham, 1994.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, p. 183-191, 1995.

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

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; PÉREZ, R.; ROMERO, J.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus. In: CURTIS, I.S. (Ed.). **Transgenic crops of the world: essential protocols**, Dordrecht, chap. 11, 2004. p. 145–157.

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; ROMERO, J.; BALLESTER, A.; SOLER, N.; PONS, E.; RODRIGUEZ, A.; PERIS, J.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L. Citrus. In: KOLE, C.; HALL, T.C. (Org.) **Compendium of transgenic crop plants: transgenic tropical and subtropical fruits and nuts**, Oxford, v. 5, p. 1-62, 2008.

PEREIRA, A. A transgenic perspective on plant functional genomics. **Transgenic Research**, Edinburgh, v. 9, p. 245–260, 2000.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, e. 36, 2002.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AVEZEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, p. 23, 2010.

PORTO, M.S.; PINHEIRO, M.P.N.; BATISTA, V.G.L.; DOS SANTOS, R.C.; FILHO, P.A.M.; LIMA, L.M. Plant promoters: Na approach os structure and function. **Molecular Biotechnology**, v. 56, p. 38-39, 2014.

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

REINKING, O.A. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agricultural**, Los Baños, v. 8, p. 109-135, 1919.

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

SATO, S.; TABATA, S.; HIRAKAWA, H.; ASAMIZU, E.; SHIRASAWA, K. The tomato genome sequence provides insight into fleshy fruit evolution. **Nature**, London, v. 485, p. 635–641, 2012.

SAHOO, R.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. Induction of a new isozyme of superoxide dismutase at low temperature in *Potentilla astrisanquinea* Lodd. Variety argyrophylla (Wall. Ex. Lehm) Griens. **Journal of Plant Physiology**, Toronto, v. 158, p. 1093–1097, 2011.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Glasgow, v.101, p.7-12, 1993.

SCHINOR, E.H. **Organogênese in vitro e transformação genética de Citrus sinensis L. Osb, com o gene da capa protéica em uma sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SCHUBERT D.; LECHTENBERG, B.; FORSBACH, A.; GILS, M.; BAHADUR, S.; SCHMIDT, R. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. **Plant Cell**, Nanjing, v. 16, n. 10, p. 2561-72, 2004.

SHAALTIEL, Y.; GRESSEL, J. Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Coryza bonariensis*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, Massachusetts, v. 26, p.22-28, 1986.

SHOKROLLAH, H.; ABDULLAH, T.L.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A.; ABDULLAH, N.A.P. Differential reaction of citrus species in Malaysia to huanglongbing (HLB) disease using grafting method. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, Dakota, v. 4, p. 32-38. 2009.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, p. 426-431, 2006.

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

TAKAHASHI, H.; SHIMIZU, A.; ROSMALAWATI, T.A.S.; FUNKUSHIMA, S.; KIKUCHI, M.; HIKICHI, Y.; KANDA, A.; TAKAHASHI, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K.; ICHINOSE, Y.; TAGUCHI, F.; YASUDA, C.; KODAMA, M.; EGUSA, M.; MASUTA, C.; SAWADA, H.; SHIBATA, D.; HORI, K.; WATANABE, Y. Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. **Journal of General Plant Pathology**, Heidelberg, v. 71, p. 8-22, 2005.

TAKAHASHI, M.A.; ASADA, K. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Berlin, v. 226, p. 558-566, 1983.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD-JAGOUÉIX, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BOVE, J.M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, Bochum, v.22, p.139-150, 2008.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS C.B.; HENNEN, G.; GRISAR, B.T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 291–295, 1999.

THOMAS, B.; DAVIES, H.M.; KRIDL, J.; O'NEAL, J.K.; VAN ASSCHE, C.J.; **US patent 5538878**, 1996.

TYAGI, A.K.; MOHANTY, A. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. **Plant Science**, California, v. 158, p. 1–18, 2000.

VAECK, M.A.R.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M. VEN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Insect resistance in transgenic plants expressing modified *Bacillus thuringiensis* toxin genes. **Nature**, London, v. 328, p. 33-37, 1987.

VALENTINE, J.S.; DOUCETTE, P.A.; POTTER, S.Z. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. In: (Ed.). **Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto: Annual Reviews, v.74, p.563-593, 2005.

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

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

VISARADA, K. B. R. S.; MEENA, K.; ARUNA, C.; SRUJANA, S.; SAIKISHORE, N.; SEETHARAMA, N. Transgenic Breeding: Perspectives and Prospects. **Crop Science**, Madison, v.49, p.1555-1563, 2009.

XIONG, L.; LEE, B.; ISHITANI, M.; LEE, H.; ZHU, J.K. HOS5 – a negative regulator of osmotic stress-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 19, p. 569-578, 1999.

WANG, L.; XIE, W.; CHEN, Y.; TANG, W.; YANG, J.; YE, R.; LIU, L.; LIN, Y.; XU C., XIAO, J.; ZHANG, Q. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of Rice. **The Plant Journal**, Wuhan, v. 61, n. 5, p. 752–766, 2009.

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

YANG, X.H.; SUN, Z.H.; TONG, R.J. Optimizing culture system of Ri T-DNA transformed roots for *Citrus grandis* cv. Changshou Shatian You. **Agricultural Sciences in China**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 90-97, 2006.

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

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

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

ZHANG, Y.; ZHU, H.; ZHANG, Q.; LI, M.; YAN, M.; WANG, R.; WANG, L.; WELTI, R.; ZHANG, W.; WANG, X. Phospholipase D $\alpha$ 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Nanjing, v. 21, n. 8, p. 2357–2377, 2009.

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