

## **Perspectivas da produção e utilização de transgênicos para o controle do *huanglongbing***

Francisco de Assis Alves Mourão Filho<sup>1\*</sup>, Liliane Cristina Liborio Stipp<sup>1</sup>  
& Beatriz Madalena Januzzi Mendes<sup>2</sup>

### **RESUMO**

Considerando que a doença *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*), causada por *Candidatus Liberibacter* spp. afeta todos os cultivares de citros e, até o momento, não foram identificadas fontes de resistência em outras espécies do gênero *Citrus*, a busca de resistência genética deve envolver ferramentas biotecnológicas para maiores chances de sucesso no controle. Este trabalho teve por objetivo revisar as principais estratégias para busca de resistência a patógenos por transgenia. Aborda também as principais limitações e perspectivas para a produção e utilização de transgênicos de citros para resistência ao HLB.

**Termos de indexação:** biotecnologia, resistência, transformação genética.

### **SUMMARY**

#### **Prospects for production and utilization of transgenics to control huanglongbing**

Considering that huanglongbing (HLB) or greening, caused by *Candidatus Liberibacter* spp., affects all citrus cultivars and no sources of resistance have been identified within the genus *Citrus*, the search for resistance in genetic improvement should include integrate biotechnological tools in order to have better chances of success in controlling the disease. This work is a review on the main strategies for pathogen resistance through genetic transformation. Moreover, the main limitations and prospects to produce and utilize transgenic citrus to control HLB are discussed.

**Index terms:** biotechnology, genetic transformation, resistance.

---

<sup>1</sup> Esalq/USP, Av. Pádua Dias, 11, 13418-900 Piracicaba/SP

\* Autor para correspondência - E-mail: famourao@esalq.usp.br

<sup>2</sup> Cena/USP

## INTRODUÇÃO

Crescente interesse pela busca de resistência genética em citros ao agente causal do *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*) tem sido registrado após a constatação da presença desta doença no Brasil e nos Estados Unidos. Entre as principais razões para a maior demanda na busca por cultivares resistentes ao HLB, estão a alta capacidade de infecção desta doença, o difícil manejo do seu vetor e a ausência de resistência genética no gênero *Citrus*. Desta forma, a produção de transgênicos resistentes ao HLB surge como uma das alternativas viáveis para controle desta doença, pois, pode levar ao cultivo de variedades comerciais contendo um ou poucos genes que induzem esta resistência.

Este trabalho visa abordar o estado da arte neste assunto, indicando as principais estratégias utilizadas para busca de resistência a patógenos por transgenia, reunindo e discutindo as contribuições científicas até o momento, relacionadas à busca de citros transgênicos resistentes a patógenos. Também são relatadas as principais limitações e perspectivas para a produção, avaliação e utilização de plantas transgênicas resistentes ao HLB.

### ESTRATÉGIAS PARA BUSCA DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS DE CITROS POR TRANSGENIA

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas na busca de resistência a patógenos por transgenia (Tabela 1). Dentre elas, destacam-se a utilização de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (*PR*); genes que estimulam o sistema de defesa das plantas; genes maiores de resistência (*R*); genes que codificam moléculas elicitoras de respostas de defesa nas plantas ou de avirulência (*avr*) derivados do próprio patógeno; genes que codificam peptídeos antimicrobianos e genes do próprio genoma do patógeno, baseando-se na resistência derivada do patógeno.

#### Genes relacionados à patogenicidade e à ativação de mecanismos de defesa das plantas

Plantas transgênicas para resistência a doenças podem ser obtidas pela ativação dos sistemas de

defesas das plantas por genes que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade (*PR-pathogenesis-related proteins*). A expressão de genes heterólogos de defesa da planta é direcionada para produção de compostos antimicrobianos como fitoalexinas e acúmulo de ácido salicílico. A ativação do sistema de defesa das plantas pode ocasionar a resistência em locais não infectados, desencadeando sistemas de defesa sistêmicos (SAR - *Systemic Acquired Resistance*) (Wang et al., 1996). As proteínas *PR* mais utilizadas na obtenção de plantas transgênicas para resistência a doenças são quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases.

O gene *RCC2* da quitinase do arroz conferiu resistência ao *Botrytis cinerea* em plantas transgênicas de pepino (Tabei et al., 1998) e ao *Unicinula necator* e a *Ensinoe ampelina* em plantas geneticamente modificadas de videira (Yamamoto et al., 2000).

Em plantas cítricas, o gene *p23*, clonado de tomate, que codifica a proteína relacionada à patogênese *PR-5*, foi introduzido em laranja Pineapple [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], levando à maior resistência à infecção por *Phytophthora citrophthora*, com redução no desenvolvimento de lesões (Fagoaga et al., 2001). O gene *p12* que codifica uma proteína *PR* foi introduzido em plantas de citrange Carrizo [*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] para resistência ao declínio dos citros. Entretanto, as plantas obtidas não foram avaliadas quanto à sua reação face à essa doença de causa desconhecida (Kayim et al., 2004).

Outra estratégia visando controle de patógenos é a utilização de genes que ativam o sistema de defesa de plantas relacionados à reação de hipersensibilidade (HR) ou pela resistência sistêmica adquirida (SAR). A reação de hipersensibilidade se refere à morte celular rápida e localizada no sítio de infecção enquanto que a resistência sistêmica adquirida é mais duradoura e não específica (Wei et al., 1992; Durrant & Dong, 2004). A introdução desses genes possibilita o aumento da resistência aos patógenos, uma vez que plantas transgênicas apresentaram lesões semelhantes às causadas pela reação de hipersensibilidade, denominadas *lesion mimics*.

O gene *bO* (*bacterio-opsin*) foi isolado de *Halobacterium halobium* e codifica uma proteína bacterio-opsina envolvida em mecanismos de defesa de plantas pela ativação da morte celular programada. Essa

**Tabela 1.** Estratégias para produção de plantas cítricas resistentes a patógenos por transgenia

Genótipos de citros	Estratégias	Genes	Pesquisadores e colaboradores	País
citrango Carrizo				
<i>Citrus aurantium</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Gutierrez et al., 1997	Estados Unidos
<i>Citrus aurantifolia</i>				
<i>Citrus aurantifolia</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Domínguez et al., 2000	Espanha
<i>Citrus aurantium</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Ghorbel et al., 2000	Espanha
<i>Citrus paradisi</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Yang et al., 2003	Estados Unidos
<i>Citrus sinensis</i>	peptídeo antimicrobiano	sarcotoxina	Bespalhok Filho et al., 2001	Brasil
<i>Citrus sinensis</i>	genes maiores	PR-5 para resistência a <i>Phytophthora citrophthora</i>	Fagoaga et al., 2001	Espanha
<i>Citrus aurantifolia</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do unCTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Domínguez et al., 2002	Espanha
<i>Citrus paradisi</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Febres et al., 2003	Estados Unidos
Citrango Carrizo	genes relacionados à patogenicidade	<i>p12</i>	Kayim et al., 2004	Estados Unidos
<i>Poncirus trifoliata</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CiMV ( <i>Citrus mosaic virus</i> )	Iwanami et al., 2004	Japão
<i>Citrus aurantium</i>				
<i>Citrus aurantifolia</i>	resistência derivada do patógeno	<i>p23</i> do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Fagoaga et al., 2005	Espanha
<i>Poncirus trifoliata</i>				
<i>Citrus aurantifolia</i>	resistência derivada do patógeno	<i>p23</i> do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Fagoaga et al., 2006	Espanha
<i>Citrus sinensis</i>	peptídeo antimicrobiano	atacina A ( <i>attA</i> )	Boscarol et al., 2006	Brasil
<i>Citrus paradisi</i>	resistência derivada do patógeno	CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Rai, 2006	Estados Unidos
<i>Citrus macrophylla</i>	resistência derivada do patógeno	<i>p23</i> e 3'UTR do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Batuman et al., 2006	Israel
<i>Citrus limonia</i>	ativação de mecanismos de defesa das plantas	<i>bo</i>	Azevedo et al., 2006	Brasil
<i>Citrus paradisi</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Ananthkrishnan et al., 2007	Estados Unidos
<i>Citrus sinensis</i>	peptídeo antimicrobiano	cecropin MB39	Paoli et al., 2007	Brasil
<i>Citrus paradisi</i>	resistência derivada do patógeno	<i>p23</i> e CTV 3'UTR do CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	Febres et al., 2008	Estados Unidos
<i>Citrus sinensis</i>	resistência derivada do patógeno	capa proteica do CPsV (vírus da sorose do citros)	Zanek et al., 2008	Argentina
<i>Citrus sinensis</i>	ativação de mecanismos de defesa das plantas	<i>hprN</i> ( <i>hypersensitive reaction and pathogenicity</i> )	Barbosa-Mendes et al., 2009	Brasil
<i>Citrus sinensis</i>	peptídeo antimicrobiano	<i>atacina A</i> ( <i>attA</i> )	Cardoso et al., 2010	Brasil
<i>Citrus sinensis</i>	genes maiores	<i>Xa21</i>	Mendes et al., 2010	Brasil

proteína funciona como uma bomba de H<sup>+</sup> ativada pela luz (Krebs & Khorana et al., 1993). Plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *bO* apresentaram *lesion mimics*, levando também à resistência sistêmica adquirida a diversos patógenos (Mittler et al., 1995; Rizhsky & Mittler, 2001). Em citros, o gene *bO* foi introduzido em limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e as plantas transformadas apresentaram redução dos sintomas causados por *Phytophthora nicotianae* (Azevedo et al., 2006).

O gene *hrpN* (*Hypersensitive reaction and pathogenicity*) foi isolado de *Erwinia amylovora*, o qual codifica uma proteína harpina que atua como elicitor de respostas de defesa de plantas (Wei et al., 1992). A expressão do gene *hrpN* em plantas transgênicas de tabaco conferiu um aumento da resistência ao *Botrytis cinerea* (Jang et al., 2006). Plantas transgênicas de laranja Hamlin (*Citrus sinensis*) contendo o gene *hrpN* apresentaram redução na severidade do cancro cítrico quando inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Barbosa-Mendes et al. 2009).

### Genes maiores de resistência ou genes R

Na busca de variedades resistentes a doenças, programas de melhoramento genético convencional baseiam-se principalmente na transferência de genes maiores pela hibridação sexual de espécies cultivadas com selvagens. Estes genes quando identificados e clonados, também podem ser utilizados em programas de melhoramento via transgenia. Os genes maiores de resistência ou genes *R* são responsáveis pelo reconhecimento de genes complementares do patógeno (*avr*), ativando os mecanismos de defesa da planta. Neste modelo, a expressão do gene *avr* induz a produção de moléculas elicitoras que são reconhecidas por receptores R das plantas, que ativam a resistência gene a gene, em um sistema dependente do reconhecimento específico do patógeno pela planta.

A resistência a doenças em plantas transgênicas com genes *R* foi relatada com sucesso em diversos trabalhos, entre eles, destacam-se o gene *Pto* clonado de plantas de tomate que conferiu resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em plantas transgênicas de tabaco (Martin et al., 1993); o gene *Bs2* clonado de plantas de pimentão que conferiu resistência

à *Xanthomonas campestris* em plantas transgênicas de tomate (Tai et al., 1999); o gene *RB* clonado de uma espécie selvagem de batata que conferiu resistência a *Phytophthora infestans* em plantas transgênicas de uma cultivar de batata (Song et al., 2003); o gene *Xa21* clonado de uma espécie selvagem de arroz (Yoshimura et al., 1998) que reduziu a severidade da doença causada pela bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em plantas transgênicas de cultivares de arroz (Wang et al., 1996; Yoshimura et al., 1998, Tu et al., 2000). A partir desses resultados, surgiu a hipótese de que esse gene pudesse conferir resistência a *Xanthomonas* em plantas de citros.

O gene *Xa21* codifica uma proteína quinase (*receptor kinase like-protein*), com domínios da serina-treonina quinase e regiões ricas em leucina, sugerindo que as respostas de defesa são ativadas pela ação do gene no reconhecimento da superfície celular do patógeno (Song et al., 1995). Após detectar sinais da bactéria e provocar a expansão da membrana da célula vegetal, a proteína codificada pelo gene *Xa21* gera uma mensagem dentro da célula vegetal, iniciando os mecanismos de defesa da planta (Ronald, 1997).

No Brasil, Mendes et al. (2010) relataram a produção de plantas transgênicas de laranja doce, baseando-se nessa estratégia, com a introdução do gene maior *Xa21*, visando a resistência a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, bactéria causadora do cancro cítrico. Neste trabalho, identificaram-se linhagens de plantas transgênicas de laranja Hamlin, Natal e Pêra (*Citrus sinensis*) com a alta resistência ao cancro cítrico. Estes resultados demonstram a possibilidade da utilização de genes *R* no controle de doenças em citros a partir da transferência interespecífica e intergenérica desses genes por transgenia, sendo possível a prospecção de genes maiores em espécies de plantas que são resistentes ao *Candidatus Liberibacter* spp.

### Genes relacionados a peptídeos antimicrobianos

A obtenção de plantas transgênicas expressando genes que codificam peptídeos antimicrobianos representa uma importante estratégia no controle de patógenos. Peptídeos antimicrobianos estão presentes em insetos, humanos e plantas, podendo ser produzidos constitutivamente na planta ou apenas quando esta sofre

uma injúria ou infecção e seu mecanismo de ação é pela inibição da síntese de proteínas do patógeno (Zasloff, 2002; Carlsson et al., 1998).

Dentre os peptídeos utilizados para a transformação genética de plantas, destacam-se a atacina (Sun et al., 1991; Kang et al., 1996), cecropina (Huang et al., 1997) e sarcotoxina (Ohshima et al., 1999).

O gene que codifica a proteína atacina foi isolado de insetos como *Hyalophora cecropia*, *Drosophila melanogaster* e *Tricloplusia ni*. As atacinas atuam na parede celular, ocasionando alterações na permeabilidade da membrana, principalmente de bactérias Gram negativas, devido a sua ligação com lipopolissacarídeos da membrana externa, provocando a desorganização e a inibição da síntese de diversas proteínas dessa membrana (Carlsson et al., 1998). Altas concentrações de atacinas podem ocasionar a lise de células bacterianas (Engstrom et al., 1984).

A expressão do gene da *atacina E* (*attE*) em plantas transgênicas de macieira (Norelli et al., 1994; Ko et al., 2000) e pereira (Reynoird et al., 1999) conferiu resistência à *Erwinia amylovora*. Plantas de macieira também foram transformadas com o gene *atacina A*, o qual foi eficiente no aumento de resistência a *E. amylovora* (Norelli & Aldwinckle, 1993). Plantas transgênicas de laranja Hamlin, Natal, Pêra e Valência contendo o gene *attA* mostraram um aumento na resistência a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Boscariol et al., 2006, Cardoso et al., 2010).

A cecropina foi isolada da hemolinfa do inseto *Hyalophora cecropia* e exibe atividade lítica e antibacteriana (Boman & Hultmark, 1987). Em batata, plantas transgênicas com o gene da cecropina SB-37 apresentaram redução na severidade da doença causada por *Erwinia carotovora* (Arce et al., 1999). Plantas transgênicas de tabaco expressando o gene da cecropina B foram obtidas visando à resistência à *Pseudomonas solanacearum* e *P. syringae* pv. *tabaci* (Florack et al., 1995). O gene *cecropin* MB39, análogo da cecropina B e resistente à ação de proteases foi introduzido em plantas de tabaco, apresentando aumento na resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Huang et al., 1997). O gene *cecropin* MB39 também foi introduzido em plantas de laranja Valência na tentativa de se obter plantas resistentes a *Xylella fastidiosa* (Paoli et al., 2007).

Plantas transgênicas de tabaco expressando o gene da sarcotoxina, isolado de larvas de *Sarcophaga peregrina*, mostraram um aumento na resistência à infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ohshima et al., 1999). Plantas de laranja Pêra transformadas com gene da sarcotoxina, também apresentaram redução na severidade de cancro cítrico (Bespalhok Filho et al., 2001).

### Genes relacionados à resistência derivada do patógeno

A obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus é baseada na resistência derivada do patógeno. O princípio deste mecanismo de resistência propõe que a resistência a determinado vírus pode ser obtida a partir de genes do seu próprio genoma. Esses genes são identificados e clonados a partir do vírus e, posteriormente, introduzidos e expressos no genoma da planta, via transformação genética, podendo conferir resistência ao patógeno (Sanford & Johnson, 1985). Diversos pesquisadores têm utilizado a resistência derivada do patógeno na busca de plantas transgênicas de citros resistentes à tristeza. Diferentes sequências do genoma do CTV de várias estirpes já foram introduzidos em citros, tais como a sequência do gene da capa proteica em citrange Carrizo, laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e lima ácida Galego [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle] (Gutiérrez et al., 1997), *C. aurantium* (Ghorbel et al., 2000), *C. aurantifolia* (Domínguez et al., 2000, Domínguez et al., 2002) e pomelo (*C. paradisi* Macfad.) (Ananthkrishnan et al., 2007), a sequência do gene da proteína p23 em *C. aurantium*, *C. aurantifolia* e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Fagoaga et al., 2005), *C. aurantifolia* (Fagoaga et al., 2006), a sequência do gene que codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e um fragmento do gene da proteína p23 unido a uma sequência de regiões não transcritas (3'UTR) em *C. paradisi* (Febres et al., 2003; Febres et al., 2008).

Iwanami et al. (2004) relataram a produção de plantas de *P. trifoliata* transformadas com gene da capa proteica do CiMV (*Citrus mosaic virus*), sendo que apenas uma linhagem foi resistente quando inoculada mecanicamente com esse vírus. Plantas transgênicas de laranja Pineapple com gene da capa proteica do

vírus da sorose dos citros foram inoculadas com um isolado do vírus (CPV4). Entretanto, estas plantas não apresentaram tolerância ou resistência após 12 meses da inoculação (Zanek et al., 2008).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora se registre o crescente interesse na busca por plantas transgênicas resistentes ao HLB, diversas limitações a esta meta devem ser consideradas. Entre estas dificuldades, citam-se a resistência parcial por parte do mercado consumidor, com restrição ao consumo de transgênicos, as limitações no número de genes disponíveis para introdução e avaliação em citros e as dificuldades legais (regulatórias) para avaliação de plantas transgênicas no campo.

Boa parte destas dificuldades vem sendo superada por meio de maior informação e divulgação sobre características de segurança dos produtos transgênicos, prospecção e clonagem de genes candidatos e desenvolvimento de políticas governamentais de apoio à pesquisa de campo com transgênicos no Brasil, em especial pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Entre as estratégias a serem utilizadas na busca de genes candidatos à resistência, aquelas relacionadas à identificação e clonagem de genes relacionados a peptídeos antibacterianos e de genes relacionados à ativação de mecanismos de defesa das plantas parecem ser as mais adequadas na busca de resistência ao HLB por transgenia pois, até o momento, não foram identificadas fontes de resistência genética ao patógeno.

Até o momento, trabalhos específicos nesta área realizados são escassos. O gene D4E1 que codifica um peptídeo antimicrobiano foi introduzido em plantas de *Citrus grandis* Osbeck x *Poncirus trifoliata* com a finalidade de controlar o HLB (Stover et al., 2008). Resultados preliminares demonstram que as plantas transgênicas obtidas com esse gene quando inoculadas com *Candidatus Liberibacter* spp. apresentaram sintomas mais tardios quando comparados com plantas não transgênicas (Bowman et al., 2010). O grupo de pesquisa da Esalq/USP, Cena/USP e Instituto Biológico de São Paulo está intensificando estudos com este peptídeo antimicrobiano através da produção de plantas transgênicas de laranja Hamlin,

Pêra e Valência, principais cultivares de laranja doce do setor citrícola brasileiro. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira também está concentrado na obtenção de plantas transgênicas de citros para resistência ao HLB, sendo que o gene *npr1*, clonado de *Arabidopsis thaliana*, que ativa mecanismos de defesa da planta, foi introduzido em plantas de laranja doce (Simões, 2008). Neste trabalho, o autor verificou que as plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter* spp. ocorreu a multiplicação do patógeno. No entanto, quatro linhagens não manifestaram sintomas da doença.

Trabalhos bem sucedidos para obtenção de plantas resistentes a bactérias, para a redução da severidade do cancro cítrico com o uso do gene *attA* (Boscariol et al., 2006, Cardoso et al., 2010) e do gene *hrpN* (Barbosa-Mendes et al., 2009), e para redução da severidade da clorose variegada dos citros com o uso do gene *cecropin* MB39 (Paoli et al., 2007) estimularam a avaliação dessas plantas para resistência ao HLB, uma vez que os mecanismos de resistência desencadeados por esses genes não são específicos, sendo promissores na busca de variedades resistentes ao *Candidatus Liberibacter* spp. Plantas transgênicas de laranja doce com os genes *attA* e *hrpN* foram inoculadas com psilídeos infectíveis ou borbulhas contaminadas com *Candidatus Liberibacter* spp. e estão em fase de avaliação para controle desse patógeno.

Em complemento à estas estratégias, é fundamental considerar também a prospecção e clonagem de promotores de atuação específica no floema (tecido colonizado preferencialmente pela bactéria causadora do HLB). Promotores de floema, clonados de *Arabidopsis thaliana* e *Citrus sinensis*, já foram utilizados com sucesso para expressão do gene repórter *uidA* (GUS) em plantas transgênicas de citros, onde a expressão da proteína codificada pelo *uidA* pode ser observada especificamente no floema (Miyata, 2010). Os resultados deste trabalho poderão otimizar as perspectivas de produção de transgênicos com maior resistência ao HLB, pois, poderão dirigir suas proteínas codificadas de forma mais intensa no tecido colonizado pela bactéria. Além disso, a produção de transgênicos com expressão diferencial em tecidos de citros poderá também apresentar maior aceitação pelo mercado consumidor, consciente que o produto expresso pelo transgênico não será acumulado nos tecidos a serem consumidos (frutos ou suco).

As perspectivas para a produção de plantas cítricas transgênicas resistentes ao HLB são favoráveis, considerando-se as limitações já mencionadas. Os grupos de pesquisa no Brasil têm registrado atuação pioneira e destacada nesta área, com aproximadamente 30% das pesquisas já produzidas relacionadas à transformação genética de citros para resistência a doenças (Tabela 1). Maiores esforços deverão ser dispensados nos próximos anos, com o fortalecimento destes grupos, em especial, pela sua integração e colaboração mútua proveniente do recém criado Instituto Nacional de Genômica para Melhoramento de Citros (INCT Citros).

Desta forma, o potencial para produção de transgênicos na busca de resistência ao HLB pode ser uma alternativa viável e complementar a todas as demais estratégias importantes no desenvolvimento para o combate a esta doença de alto impacto destrutivo, viabilizando técnica e economicamente a citricultura brasileira, para a manutenção de sua posição de liderança mundial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ananthkrishnan G, Orbovic V, Pasquali G, Calovic M & Grosser JW (2007) Transfer of citrus tristeza virus (CTV)-derived resistance candidate sequences to four grapefruit cultivars through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* (43)6:593-601.
- Arce P, Moreno M, Gutierrez M, Gebauer M, Dell'Orto P, Torres H, Acuña I, Oliger P, Venegas A, Jordana X, Kalazich J & Huluique L (1999) Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic plants expressing the *attacin* or the *cecropin* SB-37 genes. *American Journal Potato Research* 76:169-177.
- Azevedo FA, Mourão Filho FAA, Mendes BMJ, Almeida WAB, Schinor EH, Pio R, Barbosa JM, Gudetti-Gonzalez S, Carrer H & Lam E (2006) Genetic transformation of 'Rangpur' lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (bacterio-opsin) gene and initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. *Plant Molecular Biology Reporter* 24:185-196.
- Barbosa-Mendes JM, Mourão Filho FAA, Bergamin Filho A, Harakava R, Beer SV & Mendes BMJ (2009) 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* 122:109-115.
- Batuman O, Mawassi M & Bar-Joseph M (2006) Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3'UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* 33:319-327.
- Bespalhok Filho JC, Kobayashi A, Pereira LFP & Vieira LGE (2001) Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 28:229-234.
- Boman HG & Hultmark D (1987) Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology* 41:103-126.
- Boscariol RL, Monteiro M, Takahashi GK, Chabregas SM, Vieira MLC, Vieira LGE, Pereira LFP, Mourão Filho FAA, Cardoso SC, Cristiano RSC, Bergamin Filho A, Barbosa JM, Azevedo FA & Mendes BMJ (2006) *Attacin* A gene from *Tricoplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131(4):530-536.
- Bowman KD, Albrecht U, Hall DG & McCollum TG (2010) Transformation of US-802 citrus rootstock with D4E1 antimicrobial peptide gene for resistance to *huanglongbing* disease. *Plant & Animal Genomes XVIII Conference, San Diego*, p.710
- Cardoso SC, Barbosa-Mendes JM, Boscariol-Camargo RL, Cristiano RSC, Bergamin Filho A, Vieira MLC, Mendes BMJ & Mourão Filho FAA (2010) Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the *attacin* A gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Molecular Biology Reporter* 28:185-192.
- Carlsson A, Nystrom T, Cock H & Bennich H (1998) *Attacin* - an insect immune protein - binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology* 144:2179-2188.

- Domínguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P & Peña L (2000) Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 19(4):427-433.
- Domínguez A, Mendoza AH, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P & Peña L (2002) Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic 'Mexican' lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10(1/2):1-10.
- Durrant WE & Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209.
- Engstrom P, Carlsson A, Engstrom A, Tao ZJ & Bennich H (1984) The antibacterial effect of attacin from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 3:3347-3351.
- Fagoaga C, López C, Mendoza AH, Moreno P, Navarro L, Flores R & Peña L (2006) Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* 60(2):153-165.
- Fagoaga C, López C, Moreno P, Navarro L, Flores R & Peña L (2005) Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus-specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:435-445.
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L & Peña L (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7(2):175-185.
- Febres VJ, Lee RF & Moore GA (2008) Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. *Plant Cell Reports* 27(1):93-104.
- Febres VJ, Niblett CL, Lee RF & Moore GA (2003) Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Reports* 21(5):421-428.
- Florack D, Allefs S, Bollen R, Bosch D, Visser B & Stiekema W (1995) Expression of giant silkworm *cecropin* B genes in Tobacco. *Transgenic Research* 4:132-141.
- Ghorbel R, Domínguez A, Navarro L & Peña L (2000) High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Tree Physiology* 20:1183-1189.
- Gutiérrez MA, Luth DE & Moore GA (1997) 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* 16:745-753.
- Huang Y, Nordeen RO, Di M, Owens LD & McBeath JH (1997) Expression of an engineered Cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Phytopathology* 87(5):494-499.
- Iwanami T, Shimizu T, Ito T & Hirabayashi T (2004) Tolerance to *Citrus mosaic virus* in transgenic trifoliolate orange lines harboring capsid polyprotein gene. *Plant Disease* 88:865-868.
- Jang YS, Sohn SI & Wang MH (2006) The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449-456.
- Kang D, Lundstrom A & Steiner H (1996) *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. *Gene* 174:245-249.
- Kayim M, Ceccardi TL, Beretta MJG, Barthe GA & Derrick KS (2004) Introduction of a citrus blight associated gene into Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) by *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Reports* 23:377-385.
- Ko K, Norelli JL, Reynoird JP, Boresjza-Wysocka E, Brown SK & Aldwinckle HS (2000) Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on *attacin* gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. *Biotechnology Letters* 22:373-381.

- Krebs MP & Khorana HG (1993) Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. *Journal Bacteriology* 175(6):1555-1560.
- Martin GB, Brommonschenkel, SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED & Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436.
- Mendes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL, Cruz RB, Mourão Filho FAA & Bergamin Filho, A (2010) Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. *Plant Pathology* 59:68-75.
- Mittler, R. Shulaev V & Lam E (1995) Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* 7(1):29-42.
- Miyata LY (2009) Promotores específicos para expressão gênica no floema na transformação genética de citros. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 66p.
- Norelli JL & Aldwinckle HS (1993) Increasing the fire blight resistance of apple by transformation with genes encoding antibacterial proteins. *Acta Horticulturae* 338:385-386.
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Destéfano-Beltrán L & Jaynes JM (1994) Transgenic 'Mailing 26' apple expressing the *attacin* E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77:123-128.
- Ohshima M, Mitsuhashi I, Okamoto M, Sawano S, Nishiyama K, Kaky H, Natori S & Ohashi Y (1999) Enhanced resistance to bacterial diseases of transgenic tobacco plants over expressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of insect. *The Japanese Biochemical Society* 125:431-435.
- Paoli LG, Boscariol-Camargo RL, Harakava R, Mendes BMJ & Mourão Filho FAA (2007) Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(11):1663-1666.
- Rai M (2006) Refinement of the *Citrus tristeza virus* resistance gene (CTV) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology* 61:399-414.
- Reynold JP, Mourgues F, Norelli J, Aldwinckle HS, Brisset MN & Chevreau E (1999) First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacin* E gene from *Hyalophora cecropia*. *Plant Science* 149:23-31.
- Rizhsky L & Mittler R (2001) Inducible expression of bacterio-opsin in transgenic tobacco and tomato plants. *Plant Molecular Biology* 46:313-323.
- Ronald PC (1997) Making rice disease-resistant. *Scientific American* 11:68-73.
- Sanford JC & Johnson SA (1985) The concept of pathogen-derived resistance. *Journal of Theoretical Biology* 113:395-405.
- Simões TS (2008) Respostas de plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) à infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 59p.
- Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Hegeson JP & Jiang J (2003) Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 100(16):9128-9133.
- Song W, Wang G & Chen L (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science* 270:1804-1806.
- Stover E, Bowman K, McCollum G & Niedz R (2008) Developing transgenic solutions for HLB resistant citrus at the US Horticulture. *IRCHLB Proceedings, Orlando*, p.374.
- Sun SC, Lindstrom I, Lee JY & Faye I (1991) Structure and expression of the *attacin* genes in *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* 196:247-254.
- Tabei Y, Kitade S, Nishizawa Y, Kikuchi N, Kayano T, Hibi T & Akutsu K (1998) Transgenic cucumber

- plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports* 17:159-164.
- Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE & Staskawicz BJ (1999) Expression of resistance the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 96(24):14153-14158.
- Tu J, Datta K, Krush GS, Zhang Q & Datta SK (2000) Field performance of *Xa21* transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.), IR72. *Theoretical and Applied Genetics* 101:15-20.
- Wang GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S & Ronald PC (1996) The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9:850-855.
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Colmer A & Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88.
- Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML & Mirkov TE (2003) Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the *Citrus tristeza virus* resistance gene (CTV) locus in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Physiology* 131:482-492.
- Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T & Matsuta N (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 19:639-646.
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang ZX, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N & Sasaki T (1998) Expression of *Xa21*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95:1663-1668.
- Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velásquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L & García ML (2008) Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Reports* 27:57-66.
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.