

MATEUS DE ALMEIDA SANTOS

**PRODUÇÃO E EMISSÃO DE  $\beta$ -CARIOFILENO EM LARANJEIRAS E  
*Arabidopsis thaliana* PELA SUPEREXPRESSÃO DE TERPENO SINTASES  
E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS VIAS BIOSSINTÉTICAS  
PARA PRODUÇÃO DE TERPENOS**

Tese apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff  
Coorientador: Dr. Leandro Peña

Araraquara  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S237p Santos, Mateus de Almeida  
Produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno em laranjeiras e *Arabidopsis thaliana* pela superexpressão de terpeno sintases e avaliação da expressão gênica nas vias biossintéticas para produção de terpenos / Mateus de Almeida Santos. – Araraquara : [s.n.], 2019  
133 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Nelson Arno Wulff  
Coorientador: Leandro Antonio Peña Garcia

1. Laranja - Doenças e pragas. 2. Inseto como transmissor de doenças das plantas. 3. Doenças e pragas - Controle. 4. Organismos transgênicos. 5. Terpenos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno em laranjeiras e *Arabidopsis thaliana* pela superexpressão de terpenos sintases e avaliação da expressão gênica nas vias biossintéticas para produção de terpenos"

**AUTOR: MATEUS DE ALMEIDA SANTOS**

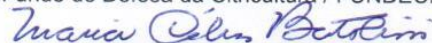
**ORIENTADOR: NELSON ARNO WULFF**

**COORIENTADOR: LEANDRO ANTONIO PEÑA GARCIA**

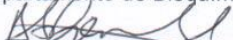
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF  
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA CELIA BERTOLINI  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES  
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ANDREA SOARES DA COSTA FUENTES  
Departamento de Genética e Evolução / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCAR - São Carlos



Dr. RODRIGO FACCHINI MAGNANI  
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara

Araraquara, 24 de setembro de 2019

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Mateus de Almeida Santos

**Nome em citações bibliográficas:** Santos, M.A.; Santos, Mateus Almeida

### Endereço Profissional

- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Quitandinha – Araraquara/SP, CEP 14800-060
- Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS. Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201 – Araraquara/SP, CEP 14807-040

### Formação Acadêmica / Titulação

#### DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Química de Araraquara – Araraquara/SP

Agosto/2015 a setembro/2019

Título da tese: Produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno em laranjeiras e *Arabidopsis thaliana* pela superexpressão de terpeno sintases e avaliação da expressão gênica nas vias biossintéticas para produção de terpenos.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Dr. Leandro Antonio Peña Garcia

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

#### MESTRADO EM CIÊNCIAS

Universidade de São Paulo (USP) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Piracicaba/SP.

Março/2009 a março/2011

Título da dissertação: Tentativa de isolamento do vírus associado à morte súbita dos citros para análise do seu envolvimento na morte das plantas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende

Bolsa: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), nº: 4729-5

GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA (Bacharelado / Licenciatura)

Universidade de Araraquara – Araraquara/SP

Março/2000 a dezembro/2003

### **Estágio Docência**

Instituição: Fac. de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP

Curso: Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Período: 26/02/2018 a 30/06/2018

Disciplina: Biologia Molecular – carga horária: 75h

Supervisor do estágio: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Instituição: Fac. de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP

Curso: Graduação em Farmácia Bioquímica

Período: 30/07/2018 a 08/12/2018

Disciplina: Biotecnologia – carga horária: 45h

Supervisor do estágio: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

### **Publicações**

ALQUÉZAR B., VOLPE H.X.L., MAGNANI R.F., MIRANDA M.P., SANTOS M.A., WULFF N.A., BENTO J.M.S., PARRA J.R.P., BOUWMEESTER H., PEÑA L. (2017).  $\beta$ -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacter*. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1–9.

YAMAMOTO P.T., BASSANEZI R.B., WULFF N.A., SANTOS M. A., SANCHES A.L., TOLOY R.S., GIMENES-FERNANDES N., AYRES A.J. ; JESUS JUNIOR W.C., NAGATA T., TANAKA F.A.O., KITAJIMA E.W., BOVÉ J. M. Citrus Sudden Death Is Transmitted by Graft-Inoculation and Natural Transmission Is Prevented by Individual Insect-Proof Cages. *Plant Disease*, v. 95, p. 104-112, 2011.

TEIXEIRA D.C., ROCHA S.R.P., SANTOS M.A., MARIANO A.G., LI W.B., MONTEIRO P.B. A Suitable *Xylella fastidiosa* CVC Strain for Post-Genome Studies. *Current Microbiology*, v. 49, p. 396-399, 2004.

## **Trabalhos apresentados em congressos internacionais**

### **The 2nd Int. Research Conference on Huanglongbing, Orlando, Fl, 2011**

SOUSA M.C., LEMOS M.V.F., FRARE G.F., SANTOS M.A., LOPES S.A. Distribution of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Ca. L. asiaticus* in foliage of naturally infected citrus trees. In: 2<sup>nd</sup> International Research Conference on Huanglongbing, 2011, Orlando, Florida. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Research Conference on Huanglongbing, 2011, 2011.

### **XVIII Int. Organization of Citrus Virologists (IOCV), Campinas/SP, 2010**

SANTOS, M.A., WULFF N.A., TOLOY R.S., AYRES, A.J., REZENDE J.A.M. Experimental transmission of citrus sudden death associated virus - CSDaV to herbaceous plants. Citrus Research & Technology (Impresso), Cordeirópolis SP, p. 104 - 104, 12 nov. 2010.

### **XVIII Int. Organization of Citrus Virologists (IOCV), Campinas/SP, 2010**

SANTOS M.A., COSTA P.I., JESUS JUNIOR W.C., TANAKA, F.A.O., REZENDE J.A.M., WULFF N.A. Immunoprecipitation of *citrus tristeza virus* (CTV) enhances visualization of putative citrus death associated virus (CSDaV) particles. Citrus Research & Technology (Impresso), Cordeirópolis SP, p. 105 - 105, 12 nov. 2010.

### **XVIII Int. Organization of Citrus Virologists (IOCV), Campinas/SP, 2010**

YAMAMOTO P.T., BASSANEZI R.B., WULFF N.A., SANTOS M.A., SANCHES, A.L., TOLOY R.S., GIMENES-FERNANDES N., AYRES A.J., JESUS JUNIOR W.C., NAGATA, T., TANAKA F.A.O., KITAJIMA E.W., BOVÉ J.M. Studies on citrus sudden death transmission. Citrus Research & Technology (Impresso), Cordeirópolis SP, p. 27 - 27, 12 nov. 2010.

### **HLB/Greening International Workshop, Rib. Preto/SP, 2006**

YAMAMOTO P.T., TEIXEIRA D.C., MARTINS E.C., SANTOS M.A., FELIPPE M.R., GARBIM L.F., CARMO A.U., ABRAHAO D.P., SOUZA M.C., BOVE J.M. Detection of *Candidatus Liberibacter americanus* and *asiaticus* in *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). In: Workshop Internacional Huanglongbing-

Greening, 2006, Ribeirão Preto. Proceedings of the Huanglongbing - Greening International Workshop, 2006. p. 87-87.

### **Trabalhos apresentados em congressos nacionais**

#### **XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília/DF, 2005**

BARROS C.C.P., NAGATA T., SANTOS M. A., TEIXEIRA D.C., JUNIOR W.C. Sequenciamento do genoma completo do *Marafivirus* isolado de laranjeiras com sintomas de morte súbita dos citros. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília. Fitopatologia Brasileira, 2005. v. 30. p. 191.

#### **XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília/DF, 2005**

JUNIOR W.C., TEIXEIRA D.C., SANTOS M.A., POLVERARI F.S., MARTINS E.C., BARROS C.C.P., NAGATA T., REZENDE J.A.M. Detecção de um vírus da família *Tymoviridae* em plantas com morte súbita dos citros. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília. Fitopatologia Brasileira, 2005. v. 30. p. 183.

#### **XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Gramado/RS, 2004**

JUNIOR W.C., TEIXEIRA D.C., SANTOS M.A., ROCHA S.R.P., YAMAMOTO P.T., FELIPPE M.R., ROCHA K.C.G., REZENDE J.A.M. Movimento e distribuição do vírus da tristeza em *seedlings* de laranja azeda. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, Gramado. Revista Fitopatologia Brasileira, 2004. v. 29

#### **XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Gramado/RS, 2004**

JUNIOR W.C., SANTOS M.A., ROCHA S.R.P., FELIPPE M.R., REZENDE J.A.M. Infecção de pés francos de laranja azeda pelo vírus da tristeza. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, Gramado. Revista Fitopatologia Brasileira, 2004. v. 29.

#### **XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Uberlândia/MG, 2003**

TEIXEIRA D. C., ROCHA S. R. P., SANTOS M. A., MARIANO A. G., LI W., MONTEIRO. A Suitable *Xylella fastidiosa* CVC Strain for Post Genome Studies. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2003, Uberlândia. Fitopatologia Brasileira, 2003. v. 28. p. 245-245.

### **XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, 2002**

TEIXEIRA D.C., SANTOS M.A., LOPES, S.A., PEREIRA E.O., ROCHA S.R.P., CAMPERONI G., SOUZA V., TORRES S. C. Z. Otimização de testes de patogenicidade de *Xylella fastidiosa* em plantas de tabaco. In: XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2002, Recife. Fitopatologia Brasileira, 2002. v. 27.

### **XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, 2002**

TEIXEIRA D.C., SANTOS M.A., LI W.B., PRIA JR W.D., ROCHA S.R.P., PEREIRA E.O., PALMA R.R. Manutenção da patogenicidade de *Xylella fastidiosa* em citros após passagem por plantas de *Catharantus roseus*. In: XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2002, Recife. Fitopatologia Brasileira, 2002. v. 27. p. S71-S71.

### **Participação em eventos e congressos**

#### **2018 International Congress of Genetics**

Poster: Analysis of the expression of terpene biosynthetic pathways genes in genetically modified citrus for the production of beta-caryophyllene.  
Foz do Iguaçu, PR, Brasil (2018).

#### **I Simpósio Internacional – Compostos Bioativos de Citrus e Benefícios à Saúde**

Food Research Center – FORC, Universidade de São Paulo, Brasil.  
São Paulo, SP, Brasil (2018).

#### **11th International Congress of Plant Molecular Biology (IPMB-2015)**

Foz do Iguaçu, PR, Brasil (2015).

#### **XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**

Foz do Iguaçu, PR, Brasil (2014).

#### **IV Brazilian Symposium on Plant Molecular Genetics.**

Bento Gonçalves, RS, Brasil (2013).

#### **44º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**

Bento Gonçalves, RS, Brasil (2011).

#### **XVIII Conference of the International Organization of Citrus Virologists**

Poster: Immunoprecipitation of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) enhances visualization of putative Citrus Sudden Death associate Virus (CSDaV) particles  
Campinas, SP, Brasil (2010).

#### **Formação complementar**

Introdução às técnicas de RNAi, CRISPR e análise de microRNAs.

Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia, CBAB, Brasil.

Carga horária: 48h. USP - Ribeirão Preto / SP (2017).

Treinamento: qPCR, Expressão gênica e Southern Blot.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, Espanha.

Carga horária: 80h. IVIA – Valência, Espanha (2012).

VIII Curso de manejo de nutrientes em cultivo protegido

Instituto Agronômico de Campinas, IAC.

Carga horária: 40h. Campinas / SP (2010).

Curso de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Universidade de São Paulo, USP

Carga horária: 20h. Piracicaba, SP (2004)

*Dedico este trabalho à minha esposa  
Roberta, aos meus filhos Pablo e  
Bernardo, meu pai e minha mãe e toda a  
minha família. Vocês são meu suporte,  
minha alegria e o 'tempero' da minha  
vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado o dom da vida e por estar presente em cada momento.

À minha esposa Roberta, que me apoiou desde o início, foi paciente, compreensiva, companheira e esteve ao meu lado em toda situação, me ajudando de todas as formas. Você é essencial.

Aos meus tesouros: Pablo e Bernardo. Que foram sempre dóceis, mesmo quando queriam muito brincar e eu tinha que trabalhar, ler, escrever. Hoje eles não entendem, mas com certeza é por eles todo este esforço.

Ao meu pai, que torceu muito por mim, me apoiou e não mediu esforços em tudo que precisei. Sempre foi e será meu grande parceiro. À minha mãe, que lá do Céu, com certeza torceu por mim. Como sempre fez. Saudades!

Às minhas irmãs Cíntia e Lenise, meus cunhados Jerri e André e minhas sobrinhas: Ana Clara, Raquel, Thaís, Ana Luísa, Ana Beatriz e Ana Carolina. Aos futuros sobrinhos: André e Fred. De perto ou de longe, vocês foram sempre muito importantes.

Aos meus sogros, Etere e Maria Ângela. Obrigado por todo apoio que me deram. Aos meus cunhados: Angélica e Maurício, Rose e Rafael e meus sobrinhos Isabelle, Davi e Daniel.

Ao meu orientador Dr. Nelson Arno Wulff. Sou muito grato pelo seu modo profissional e ao mesmo tempo amigo de orientar, ensinar, incentivar. Obrigado pela confiança, pelos conselhos. Um profissional e uma pessoa ímpar. Com certeza é um exemplo que seguirei. Meu muito obrigado!

Ao meu coorientador Dr. Leandro Peña, pela oportunidade, pelos conselhos e por todo aprendizado que me proporcionou. Sempre disposto a ensinar e ouvir. Obrigado!

Ao FUNDECITRUS, pela oportunidade e apoio, que me fizeram crescer profissional e pessoalmente.

Ao gerente geral do Fundecitrus Juliano Ayres, pela oportunidade, incentivo e por seus conselhos. Obrigado pela confiança.

Aos companheiros do laboratório de Biotecnologia: Márcia, Ana Claudia, Daniela, Eder, Tamires e Karen. Pelo companheirismo, amizade e por toda ajuda

que me deram sempre que eu precisei. Vocês valem ouro! Ao André Sanches, Miguel e todos os companheiros das estufas pela amizade e pelo cuidado primoroso com as plantas! À Tatiana Mulinari, que nestes 4 anos me ajudou em praticamente todas as atividades do laboratório, com sua animação e disposição de sempre! Além da 'assessoria' na parte química. Só tenho a agradecer pelo seu profissionalismo e amizade! À Elaine que com muita destreza me ajudou (e muito!) na engenharia genética. Meu muito obrigado pela ajuda e pela amizade!

Ao Rodrigo Facchini, por todo suporte na área química, pelas verdadeiras aulas que me deu, sempre muito paciente e prestativo. Além das boas conversas sobre vinhos, na hora do café! Ao Haroldo Volpi, sempre prestativo e solícito, e sua equipe, por todo suporte na ecologia química. Obrigado pela ajuda e amizade. Ao Fabrício, Priscila, Rosângela e Lourdes, pela ajuda e conhecimento compartilhado. À Daniela, Deividson, Jean, Camila, Jéssica, Tatiane, Majô, Rosana, Michele e Josiani pela convivência e amizade que, com certeza, fazem o dia-a-dia mais leve. À secretária Priscilla sempre prestativa e atenciosa. A todos os companheiros do Fundecitrus, de todos os departamentos, que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

Um agradecimento especial à pesquisadora Diva. Por toda ajuda, apoio e amizade. Seus ensinamentos e orientações foram essenciais. Você faz muita falta para todos nós.

Aos colegas da Espanha: Berta, que esteve sempre presente e por tudo que me ensinou. Ana Rodrigues, Elsa e Josep. ¡Muchas gracias!

À Bete e Aloísio, à Gi e Gaúcho, à Gabi e Du e à Camila e Zé Mario, por todo apoio, amizade e orações. Vocês acompanharam tudo desde o início. Meu muito obrigado! À Viviani e Victória, pela amizade e apoio. À Roberta Borges, minha amiga de longe, mas que está sempre presente me apoiando e incentivando.

Aos professores e colegas do Instituto de Química e da Farmácia, pelos ensinamentos e companheirismo. Aos integrantes da Seção Técnica de Pós-graduação e da Biblioteca do Instituto de Química pela forma profissional e competente que realizam seu trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite e por toda contribuição, elogio, críticas e sugestões que enriqueceram esta tese.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento concedido para a realização deste projeto.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente deram sua contribuição e possibilitaram a realização deste trabalho. Meu muito obrigado!

*É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão  
que sentar-se, fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias feios em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz embora louco,  
que em conformidade viver.*

*Martin Luther King*

# PRODUÇÃO E EMISSÃO DE $\beta$ -CARIOFILENO EM LARANJEIRAS E *Arabidopsis thaliana* PELA SUPEREXPRESSION DE TERPENO SINTASES E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS VIAS BIOSINTÉTICAS PARA PRODUÇÃO DE TERPENOS

## RESUMO

As citriculturas brasileira e mundial têm sido assolada pelo huanglongbing (HLB), doença associada às bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., transmitidas pelo psilídeo *Diaphorina citri*. Não há cura para a doença e o manejo do HLB é feito com plantio de mudas sadias, erradicação de plantas sintomáticas e controle do inseto vetor. Pomares de citros intercalados com goiabeiras no Vietnã, tiveram menor ocorrência de psilídeos e de plantas com HLB. O composto volátil  $\beta$ -cariofileno, emitido por goiabeiras foi caracterizado como repelente ao psilídeo. Laranjeiras das variedades Pera e Valência foram geneticamente modificadas (GM) com genes da terpeno sintase (*TPS*) e da *farnesil difosfato sintase (FPPS)* de *Arabidopsis thaliana*, com a expectativa de aumentar a produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno, tornando estas plantas repelentes. Em testes biológicos e químicos foram selecionadas plantas transgênicas que apresentaram incremento no acúmulo e emissão de  $\beta$ -cariofileno, fazendo com que o efeito repelente deste sesquiterpeno, superasse a atração que laranjeiras exercem sobre *D. citri*. De maneira similar, foram geradas *Arabidopsis thaliana* GM para superexpressar *TPS* de laranjeira doce. As plantas GM foram caracterizadas quanto à expressão do transgene e dos genes da via biossintética dos terpenos com *1-deoxixilulose 5-fosfato sintase (DXS)*, *geranil difosfato sintase (GDPS)* e *farnesil difosfato sintase (FPPS)* e quanto ao acúmulo e emissão de  $\beta$ -cariofileno. Foi demonstrada a viabilidade da transformação genética de laranja doce com *TPS* de *A. thaliana*, aumentando a produção de  $\beta$ -cariofileno a níveis superiores do que a produção endógena deste composto. Em *A. thaliana*, a superexpressão da *TPS* também aumentou a produção do composto repelente. Houve alteração na expressão em genes chave da via biossintética dos terpenos, mas por outro lado, não houve alteração fenotípica observável, exceto o incremento na produção do  $\beta$ -cariofileno. Nos dois casos, onde foram utilizadas terpeno sintases de *Arabidopsis* e de laranjeira, a manutenção dos íntrons se mostrou preponderante para o aumento na produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno. Os resultados apresentados demonstram a viabilidade desta estratégia biotecnológica para produzir compostos terpênicos repelentes e gerar plantas que possam combater a epidemia de HLB.

Palavras-chave: huanglongbing, *Diaphorina citri*, repelência, transformação genética.

# PRODUCTION AND EMISSION OF $\beta$ -CARYOPHYLLENE IN SWEET ORANGE PLANTS AND *Arabidopsis thaliana* BY OVEREXPRESSION OF TERPENES SYNTHASES AND EVALUATION OF GENE EXPRESSION IN THE BIOSYNTHETIC PATHWAYS FOR TERPENE PRODUCTION

## ABSTRACT

Citrus in Brazil and around the world has been devastated by Huanglongbing (HLB), a disease which is associated to *Candidatus Liberibacter* spp. bacteria and transmitted by the psyllid *Diaphorina citri*. There is no cure to such disease and the HLB management is done by planting healthy seedlings, eradicating symptomatic plants and controlling the insect vector. Citrus orchards interspersed with guava trees in Vietnam had less occurrence of psyllids and fewer plants with HLB. The volatile compound  $\beta$ -caryophyllene, emitted by guava trees, has been considered a repellent to the psyllid. Pera and Valencia sweet oranges varieties were genetically modified (GM) with *Arabidopsis thaliana*'s terpene synthase and with *farnesyl diphosphate synthase (FPPS)* genes, expecting to raise the production and emission of  $\beta$ -caryophyllene, turning such plants into repellents. In biological and chemical trials, transgenic plants with incremental  $\beta$ -caryophyllene accumulation and emission were selected, leading to a sesquiterpene repellent effect stronger than the attraction that citrus trees exert over *D. citri*. Similarly, genetically modified *Arabidopsis thaliana* were generated to overexpress sweet orange TPS. Such genetically modified plants were characterized regarding the transgene expression and to the genes of terpene biosynthesis pathway with *1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS)*, *geranyl diphosphate synthase (GDPS)* and *farnesyl diphosphate synthase (FPPS)* and to the accumulation and emission of the  $\beta$ -caryophyllene. The GM sweet orange plants expressing *A. thaliana* TPS had increased  $\beta$ -caryophyllene production to levels which are higher than endogenous production of such compound. In *A. thaliana*, the TPS overexpression also increased the repellent compound production. There were alterations in the expression of key genes of the terpene biosynthetic pathway, however, there was no observable phenotypic alteration, except the  $\beta$ -caryophyllene production increment. *Arabidopsis* and sweet orange terpene synthases harboring introns, showed a preponderant increase in  $\beta$ -caryophyllene production and emission. The results showed the viability of such biotechnological strategy in order to produce repellent terpene-compounds and generate plants that could fight the HLB epidemic.

Key words: huanglongbing, *Diaphorina citri*, repellency, genetic transformation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção global de suco de laranja e seu consumo, na última década..... 30
- Figura 2.** Sequência dos relatos da ocorrência e surtos de pragas e doenças importantes na citricultura paulista e a evolução da produção de citros em São Paulo..... 33
- Figura 3.** Microscopia eletrônica mostrando vasos de floema de vinca (*Catharanthus roseus*) colonizados por *Ca. Liberibacter americanus*..... 34
- Figura 4.** Sintomas de greening: A) planta com ramos amarelos; B) folha apresentando mosqueado; C) fruto assimétrico; D) sementes abortadas (foto: Fundecitrus)..... 36
- Figura 5.** As três fases do desenvolvimento de *D. citri*: ovo, ninfa (1<sup>o</sup> a 5<sup>o</sup> instares) e adulto..... 37
- Figura 6.** (A) Psílídeo asiático *D. citri* adulto e (B) adulto e ninfas se alimentando em brotações de citros. As ninfas excretam substância açucarada, denominada “honeydew” ..... 38
- Figura 7.** Pomar de citros afetado pelo HLB, com plantas sintomáticas (A). Plantio intercalado de citros e goiabeiras, onde a presença do psílídeo dos citros e de plantas sintomáticas é menor (B)..... 40
- Figura 8.** Via dos terpenos, formada a partir das vias MEP e MVA..... 42
- Figura 9:** T-DNA dos vetores de transformação, com esquema das construções gênicas da sintetase do sesquiterpeno (*AtTPS21*) e da sintetase de farnesil difosfato (*AtFPPS*) de *Arabidopsis thaliana* com elementos regulatórios para expressão gênica em plantas (T = terminador da nopalina sintase, P = promotor 35S do Cauliflower mosaic virus para os genes de *A. thaliana* e promotor nopalina sintase para o gene de seleção *nptII*. Peptídeos de trânsito para direcionar os produtos proteicos aos plastídeos (p) ou para a mitocôndria (m), ou para citosol (sem peptídeos de trânsito). Flechas no início e no fim das construções indicam as bordas invertidas do T-DNA..... 58

<b>Figura 10.</b> (A) Gema recém-emergida enxertada em Troyer. No detalhe, ilustração do corte e da posição da gema. (B) Gema desenvolvida em broto, com as primeiras folhas expandidas.....	60
<b>Figura 11.</b> Ilustração das etapas da extração com solvente de conteúdo foliar.....	65
<b>Figura 12.</b> Ilustração do processo de captura de voláteis emitidos por brotações de citros, com caminho percorrido pelo fluxo de ar, desde o compressor de ar, até a bomba de vácuo.....	67
<b>Figura 13.</b> Esquema das tomadas de medidas para avaliação fenotípica dos eventos GM e controles vetor vazio, com avaliação do tamanho dos entrenós.....	68
<b>Figura 14.</b> Plantio dos eventos de laranja doce com a construção HB21 nas variedades Valência e Pera em campo experimental na região central do estado de São Paulo.....	70
<b>Figura 15.</b> Gemas geradas em explantes de tecido maduro de laranja doce transformados com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . (A) a seta com número 1 indica uma gema advinda de célula geneticamente modificada, posteriormente confirmada através de PCR. A seta com número 2 indica gema escape, que não foi transformada, mostrando uma coloração mais pálida (negativa para a presença do transgene na PCR). (B) duas gemas geneticamente modificadas.....	71
<b>Figura 16.</b> Revelação de gel de agarose após eletroforese de ácidos nucleicos amplificados em reação em cadeia da polimerase. As bandas na altura de 320pb são resultado da amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>AtTPS21</i> . Os números das amostras correspondem à identificação dos eventos HB21 (Valência).....	72
<b>Figura 17.</b> Expressão gênica relativa dos genes <i>AtTPS21</i> e <i>AtFPPS</i> em eventos de laranja doce geneticamente modificados das variedades Pera (P) e Valência (V) com cassetes para direcionamento dos produtos ao citosol (A; eventos HB21, FA e A); plastídeos (B; eventos FTA e TA) e à mitocôndria (C; eventos MFA e MA).....	74

<b>Figura 18.</b> Medidas da espessura do caule, distância entre entrenós e área foliar de plantas GM, construção HB21, e plantas controle vetor vazio. As barras seguidas de mesma letra indicam não diferirem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$ ). .....	76
<b>Figura 19.</b> Conteúdo de $\beta$ -cariofileno em ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) acumulado nas folhas de laranjeira (A) e emissão de $\beta$ -cariofileno a partir de ramos de laranjeira (em $\text{ng.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$ (ppb/h) (B). .....	78
<b>Figura 20.</b> Southern blotting para avaliação do número de cópias e integridade do T-DNA. (A) Eventos FTA 20 (P), FA 14, 15 e 17 (V), FA 9 e 16 (P). (B) e (C) Eventos HB21 2, 5, 6, 14, 15, 16 e 17 (V). As letras 'a' e 'b' representam número de cópias e integração do T-DNA, respectivamente. ....	79
<b>Figura 21.</b> Análise de expressão gênica dos eventos HB21 (Valência) para os genes de laranjeira DXS, GDPS e FPPS. A linha tracejada em vermelho é apenas uma referência do controle para as demais amostras. As barras seguidas de letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$ ). ....	80
<b>Figura 22.</b> Análise de expressão gênica de eventos que também apresentaram diferenças nos níveis de expressão para os genes de laranjeira <i>DXS</i> , <i>GDPS</i> e <i>FPPS</i> . A linha tracejada em vermelho é apenas uma referência do controle para as demais amostras. As barras seguidas de letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \leq 0,05$ ).....	81
<b>Figura 23.</b> Folhas de plantas GM HB21 inoculadas com <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> apresentando sintomas de mosqueado.....	83
<b>Figura 24.</b> Expressão gênica de <i>AtTPS21</i> após sete meses de plantio em área experimental. ....	84
<b>Figura 25.</b> Fluxo de trabalho para obtenção dos cassetes de transformação, transformação genética e avaliação das plantas GM.....	107
<b>Figura 26.</b> Conjunto de blocos disponíveis conforme a estratégia de construção escolhida. Para as construções <i>CsTPS</i> foi escolhida a opção <i>basic</i> .....	110

<b>Figura 27.</b> Mapa do T-DNA com o cassete do gene da sesquiterpeno sintase (TPS) de <i>Citrus sinensis</i> obtido a partir do cDNA (A) e do DNA genômico (B). A TPS está sob o controle do promotor 35S do CaMV e do terminador NOS. O cassete de seleção <i>nptII</i> (resistência à neomicina ou canamicina) está sob controle do promotor e terminador NOS. ....	112
<b>Figura 28.</b> Plantas de <i>Arabidopsis</i> 30 dias após a semeadura prontas para transformação (A). Silíquas e sementes coletadas originadas dos primeiros botões florais transformados (B).....	115
<b>Figura 29.</b> Segregação de plantas de <i>A. thaliana</i> após transformação genética.....	116
<b>Figura 30.</b> Revelação de gel de agarose após eletroforese de ácidos nucleicos amplificados em reação em cadeia da polimerase. As bandas nas alturas de 1760 pb e 3599 pb são resultado da amplificação dos fragmentos correspondentes ao gene <i>CsTPS</i> a partir do cDNA e gDNA, respectivamente.....	121
<b>Figura 31.</b> Revelação de gel de agarose com bandas correspondentes à amplificação dos ácidos nucleicos em cadeia da polimerase dos fragmentos <i>CsTPS</i> 21 originados de cDNA e gDNA (1760 pb e 3599 pb). (A) PCR a partir de extração de plasmídeo de <i>E. coli</i> contendo a construção em vetor pDGB3Q2. (B) PCR a partir de plasmídeo extraído de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> contendo a mesma construção em vetor pDGB3Q2.....	122
<b>Figura 32.</b> Seleção de <i>Arabidopsis</i> transformadas geneticamente. (A) germinação de sementes em meio contendo canamicina. As sementes não transformadas morrem logo após a germinação. No detalhe, plântula transformada identificada com número 1 (verde) e plântula não transformada com número 2 (branca). (B) A planta resistente à canamicina transplantada em substrato. (C) <i>Arabidopsis</i> transplantada apresentando botões florais e silíquas contendo sementes. No detalhe, silíquas colhidas com sementes maduras.....	123
<b>Figura 33.</b> Expressão gênica de <i>CsTPS</i> em <i>A. thaliana</i> transformadas geneticamente.....	124

<b>Figura 34.</b> Expressão gênica de <i>CsTPS</i> em <i>A. thaliana</i> transformadas geneticamente.....	125
<b>Figura 35.</b> Expressão gênica de <i>GDPS</i> e <i>FPPS</i> em <i>A. thaliana</i> transformadas geneticamente.....	126
<b>Figura 36.</b> Plantas de <i>Arabidopsis</i> em copo nos tamanhos que foram utilizadas para os ensaios de emissão de $\beta$ -cariofileno.....	127
<b>Figura 37.</b> Emissão de $\beta$ -cariofileno a partir de <i>Arabidopsis</i> GM e controle selvagem (em $\text{ng.g}^{-1} \text{FW.h}^{-1}$ (ppb/h).....	127

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais doenças dos citros causadas por patógenos.....	32
<b>Tabela 2.</b> Eventos GM em laranja doce das variedades Pêra e Valência gerados em função da construção genética e estratégia empregada.....	72
<b>Tabela 3.</b> Valores de Ct obtidos na qPCR nas avaliações de 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação via borbulha. Amostras com valores de Ct menores ou iguais a 35,0 são consideradas 'positivas' para a presença de <i>Ca. L. asiaticus</i> .....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*AtTPS*: *Arabidopsis thaliana* terpeno sintase

CaMV: *Cauliflower mosaic virus*

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid

*CsTPS*: *Citrus sinensis* terpeno sintase

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

CVC: Clorose variegada dos citros

DMAPP: dimetilalil pirofosfato ou dimetilalil difosfato

DPEC: dicarbonato de dietila

DNA: Deoxyribonucleic acid

*DXS*: Deoxilulose sintase

FAM: 6-carboxyfluorescein

*FPPS*: Farnesil difosfato sintase

FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry

gDNA: genomic deoxyribonucleic acid

*GDPS*: Geranil difosfato sintase

GM: Geneticamente modificado

ha: hectares

HLB: huanglongbing

IPP: isopentenil pirofosfato

HLB: Huanglongbing

LB: Left border

MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato

MVA: Mevalonic acid

NOS: Nopalina sintase

Primer: iniciador ou oligonucleotídeo

RB: Right border

RNA: Ribonucleic acid

T-DNA: Transfer DNA

Ti: Tumor inducing

TPS: terpeno sintase

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>29</b>
<b>A CITRICULTURA E SEUS DESAFIOS</b> .....	<b>29</b>
1 Citricultura mundial e o consumo do suco de laranja .....	29
1.2 Citricultura brasileira: realidade e desafios.....	30
1.3 Huanglongbing, a pior doença da citricultura mundial .....	33
1.3.1 Agente causal, sintomas e danos econômicos.....	34
1.3.2 Vetor <i>Diaphorina citri</i> .....	36
1.4 Efeito repelente da goiabeira .....	38
1.5 Terpenos.....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>53</b>
<b>LARANJEIRAS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA A PRODUÇÃO DE <math>\beta</math>- CARIOFILENO E REPELÊNCIA A <i>Diaphorina citri</i></b> .....	<b>53</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>56</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 Identificação e isolamento dos genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	57
3.2 Montagem dos cassetes de transformação.....	57
3.3 Fonte de tecido para transformação.....	59
3.4 Transformação genética de tecido adulto de laranja doce .....	59
3.5 Identificação de plantas contendo o cassete de transformação através da reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	60
3.6 Análises de expressão gênica.....	61
3.6.1 Extração do RNA total.....	61
3.6.2 Análise da expressão gênica via RT-qPCR.....	62
3.7 Análises químicas nas folhas de laranjeiras geneticamente modificadas .....	64
3.7.1 Análise de conteúdo de terpenos das folhas de citros.....	64
3.7.2 Análise de emissão de voláteis .....	66

3.8 Análise de fenótipo .....	68
3.9 Determinação do número de cópias via Southern Blotting .....	69
3.10 Avaliação do título de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantas de laranja doce com superexpressão de $\beta$ -cariofileno .....	69
3.10.1 Detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> via qPCR .....	69
3.11 Plantio em campo .....	70
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
4.1 Transformação genética em explantes de tecido adulto de laranjeira doce .....	71
4.2 Análises de expressão gênica.....	73
4.3 Análise de fenótipo .....	75
4.4 Análise química de conteúdo e emissão de terpenos .....	77
4.5 Determinação do número de cópias via Southern Blotting .....	78
4.6 Análises de expressão gênica dos precursores endógenos de citros.....	79
4.7 Avaliação do título de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantas com superexpressão do $\beta$ -cariofileno .....	82
4.8 Análise de expressão gênica pós-plantio .....	83
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
5.1 Expressão gênica de <i>AtTPS21</i> e <i>AtFPPS</i> .....	86
5.2 Análises químicas para conteúdo e emissão de terpenos.....	88
5.3 Avaliação do número de cópias por Southern blotting .....	90
5.4 Avaliação do título de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantas de laranja doce com superprodução de $\beta$ -cariofileno.....	91
5.5 Plantio de eventos HB21 (Valência) em campo experimental .....	92
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>104</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>106</b>
2.1 Objetivo geral.....	106
2.2 Objetivos específicos .....	106

<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>107</b>
3.1 Preparo de bactérias para transformação .....	108
3.1.1 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> para eletrotransformação .....	108
3.1.2 Preparo de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	108
3.2 Isolamento do gene <i>CsTPS</i> .....	108
3.3 Construção dos cassetes de transformação .....	109
3.3.1 Domesticação do gene <i>CsTPS</i> .....	111
3.3.2 Clonagem de <i>CsTPS</i> e <i>gCsTPS</i> em <i>pDGB3α2</i> .....	111
3.3.3 Clonagem em <i>pDGB3Ω1</i> e adição do cassete de resistência à canamicina ....	112
3.4 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por choque térmico e preparo do inóculo para transformação genética .....	113
3.5 Cultivo, transformação e seleção de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	113
3.5.1 Obtenção de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	113
3.5.2 Transformação genética de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	114
3.5.3 Seleção de plantas geneticamente modificadas.....	115
3.6 Confirmação da transformação genética por PCR e análises de expressão gênica .....	116
3.6.1 Extração de DNA e PCR para confirmação da transformação genética .....	116
3.6.2 Extração do RNA total.....	117
3.6.3 Análise de expressão gênica via RT-qPCR.....	117
3.7 Análise de emissão de voláteis .....	118
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>121</b>
4.1 Isolamento do gene <i>CsTPS</i> , construção dos cassetes de transformação e transformação de <i>A. tumefaciens</i> .....	121
4.2 Seleção de plantas transformadas.....	122
4.3 Caracterização das plantas geneticamente modificadas.....	124
4.3.1 Confirmação da transformação genética via PCR.....	124
4.3.2 Análise de expressão gênica via qPCR .....	124
4.4 Análise de emissão de voláteis .....	126
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>128</b>

<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>132</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>135</b>



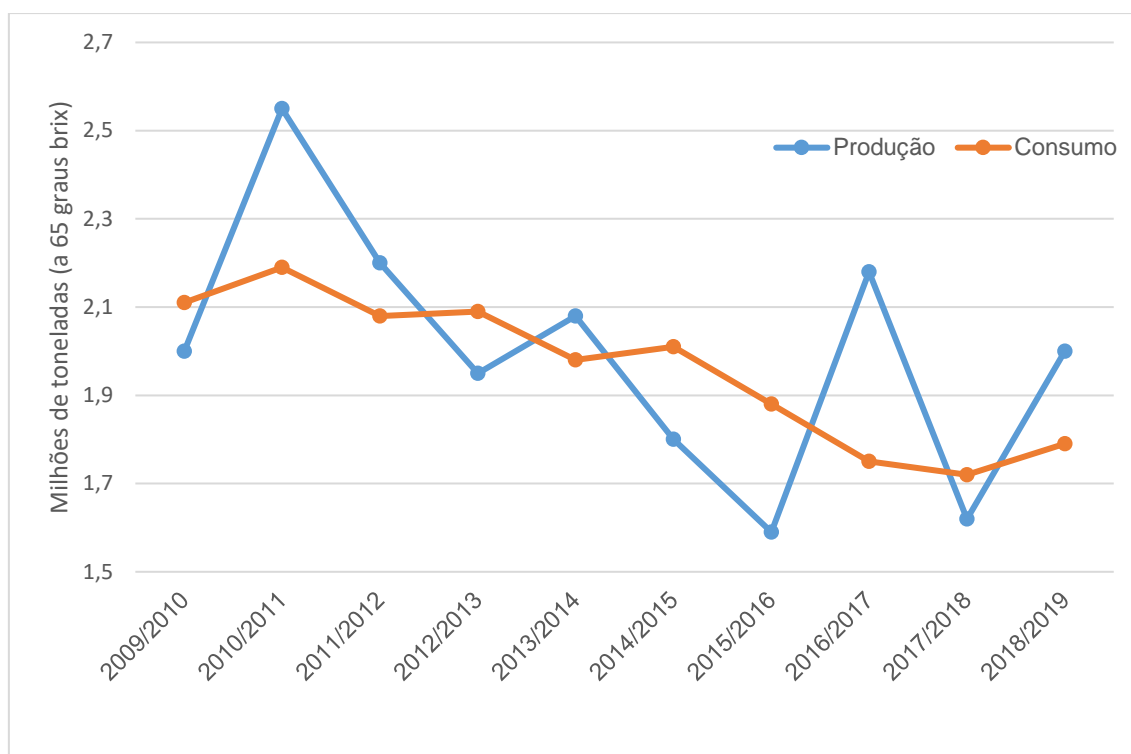
## CAPÍTULO 1

### A CITRICULTURA E SEUS DESAFIOS

#### 1 Citricultura mundial e o consumo do suco de laranja

A produção global de laranja na safra 2018/19 está prevista para 51,8 milhões de toneladas. Deste número, 5,1 milhões serão destinadas à exportação de frutas frescas. Projeta-se nesta mesma safra uma produção de 2 milhões de toneladas (65 graus brix) de suco de laranja (USDA, 2019). Dois países concentram 80% de toda produção de citros no mundo: Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida). Outros países estão em plena expansão na produção de frutas cítricas, principalmente voltadas ao consumo de mesa. Dentre eles, China se destaca na produção de mandarinas e tangerinas (USDA, 2018). A Espanha é outro país que se destaca na produção de frutos para mesa, principalmente nas variedades Clemenules e Navelina, tendo um aumento de 28,1% em sua produção 2018/2019 em relação à safra anterior (CitrusBR, 2019a). Embora as frutas cítricas estejam entre os principais itens da alimentação familiar em mais de 100 países no mundo (MATOS Jr. et al., 2005), o consumo, principalmente do suco concentrado, tem diminuído, entre outros fatores, pelo teor de açúcar – embora natural da fruta – além da forte concorrência com outras bebidas disponíveis no mercado, como chás, águas aromatizadas ou néctares de frutas (NEVES et al., 2019; USDA 2019; Figura 1). Ainda assim, o consumo do suco de laranja ou mesmo de fruta fresca ainda é grande, principalmente em países da Europa e na China e nos Estados Unidos. Conforme o Serviço Europeu de Estatística (Eurostat), a importação de frutas cítricas pelos países da União Europeia entre os anos 2013 a 2018, aumentou 40%, tendo como destaque o Marrocos como maior exportador de frutas para estes países.

**Figura 1.** Produção global de suco de laranja e seu consumo, na última década.



(Fonte: USDA, 2019)

## 1.2 Citricultura brasileira: realidade e desafios

Com um parque citrícola de aproximadamente 194,4 milhões de árvores, ocupando principalmente os estados de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro, chamado de cinturão citrícola, o Brasil é o maior produtor da fruta e maior exportador de suco de laranja do mundo. O país está bem à frente dos Estados Unidos, seu principal competidor no mercado, produzindo 75% do total de suco exportado, contra 19% dos americanos (USDA, 2019). De todo suco consumido no mundo 61% são produzidos no Brasil. A citricultura brasileira gera cerca de 200 mil empregos, diretos e indiretos, arrecadando U\$180 milhões em impostos e gerando um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares (NEVES & TROMBIN, 2017). De toda laranja produzida no país, 70% é destinada ao processamento industrial. Deste montante, 97% do suco produzido é exportado para diversos países, principalmente para a Europa (NEVES, 2010).

Embora a produção de frutas cítricas seja alta no país, a área plantada tem diminuído. No cinturão citrícola a área plantada diminuiu 52.199 hectares de 2015 a 2018, contando com 378.048 hectares (PES, 2018). Esta diminuição

também é reflexo do adensamento implantado nos pomares, significando uma diminuição do espaçamento entre plantas. Este espaçamento, segundo dados da Embrapa e da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), pode promover um aumento na produção das safras iniciais em até 89% em relação aos espaçamentos tradicionalmente utilizados (EMBRAPA, 2015). Na prática, a redução da área plantada não representa diminuição de produção, mas otimização da área utilizada.

As principais variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] produzidas no país são Hamlin, Westin, Rubi, Valência, Natal e Pera Rio, sendo a última a principal variedade plantada, sendo colhidas 79,12 milhões de caixas na safra 2018/2019, das mais de 285 milhões de caixas colhidas no período (PES, 2019).

Manter a produtividade e a competitividade do parque citrícola nacional torna-se um grande desafio, principalmente pelos desafios sanitários que a cultura apresenta. O cinturão citrícola possui as características de continuidade espacial e temporal. As plantas, que são clones de suas matrizes, carregam baixa variabilidade genética e permanecem produtivas no campo por décadas (BASSANEZI et al., 2011a). Todos estes fatores expõem as plantas a doenças e pragas que causam grandes perdas econômicas (Tabela 1) e que já chegaram a quase dizimar a citricultura do país. Entre as décadas de 1930 e 1940, cerca de 9 milhões de plantas enxertadas em laranjeira Azeda (*C. aurantium* L.) morreram com Tristeza dos citros, devido à intolerância do porta-enxerto ao *Citrus tristeza virus* (CTV). Estando quase todo o parque citrícola sobre este porta-enxerto, grande parte das plantas foi perdida. A solução foi a substituição do porta-enxerto laranjeira Azeda pelo limoeiro Cravo (*C. limonia* Osb.), iniciando a citricultura praticamente do zero. A morte súbita dos citros (MSC) – outra doença com relação copa/porta-enxerto – trouxe muitos problemas aos citricultores da região norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro, forçando a substituição de grande parte do limoeiro Cravo, que na época respondia por mais de 70% dos porta-enxertos utilizados, por outras variedades como o citrumeleiro Swingle (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*; GIMENES-FERNANDES & BASSANEZZI, 2001). Segundo dados da Coordenação de Defesa Agropecuária de Estado de São Paulo (CDA, 2019), 50% dos pomares paulistas estão

enxertados sobre Citrumelo Swingle, seguido por limoeiro Cravo, tangerineiras Sunki e Cleópatra e trifoliata Flying Dragon.

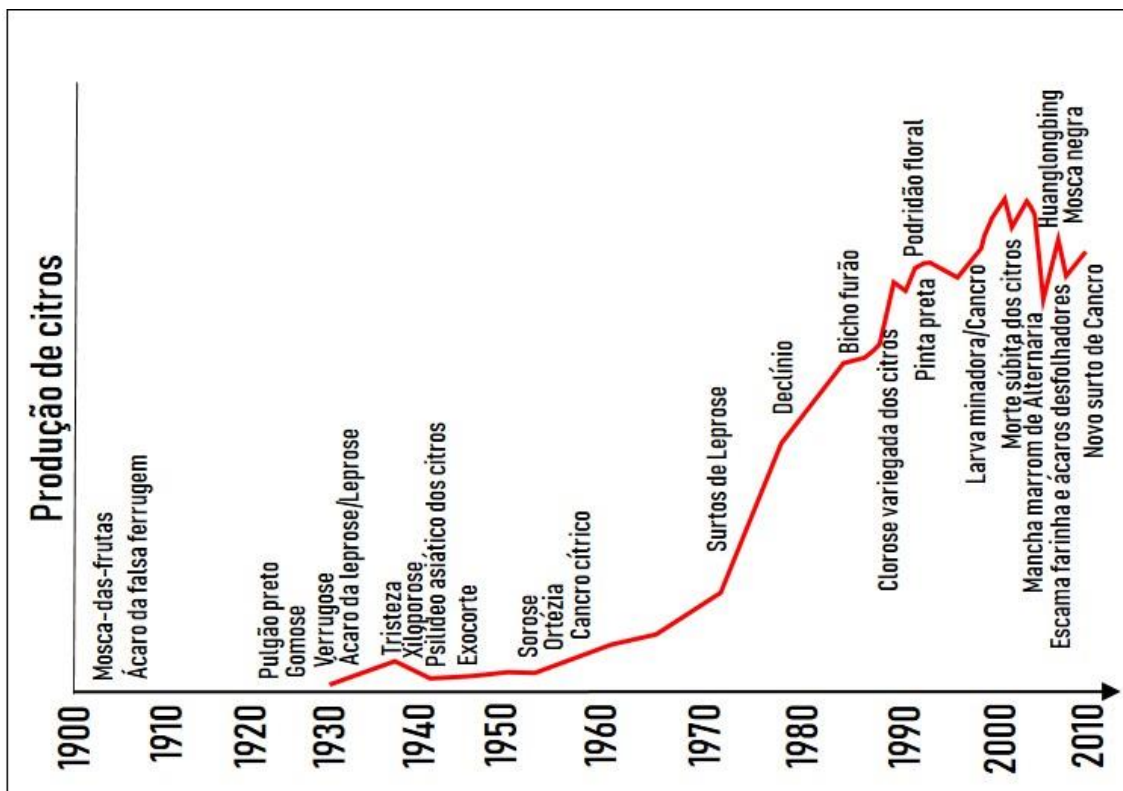
**Tabela 1.** Principais doenças dos citros causadas por patógenos.

<b>Principais doenças dos citros</b>	
Tipo de patógeno	Doença
Vírus	Tristeza, Morte Súbita dos Citros, Leprose, Sorose
Viróides	Exocorte, Xiloporose
Bactérias	Cancro Cítrico, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Greening (Huanglongbing)
Fungos e similares	Verrugose, Melanose, Podridão Floral, Pinta Preta, Mancha Marrom de Alternária, Gomose

(Fonte: o autor)

Durante a primeira década dos anos 2000, 39 milhões de árvores foram erradicadas pelas quatro principais doenças presentes nos pomares: CVC, Cancro Cítrico, Morte Súbita dos Citros e Huanglongbing (NEVES, 2010), esta última, a mais devastadora delas. Outras doenças também atingem os pomares, algumas delas podendo ser fator limitante à exportação de frutos. Na Figura 2, pode-se verificar a incidência de doenças e pragas juntamente com a evolução da produção de citros no Estado de São Paulo.

**Figura 2.** Sequência dos relatos da ocorrência de surtos de pragas e doenças importantes na citricultura paulista e a evolução da produção de citros em São Paulo.



(Fonte: BASSANEZI et al., 2011b)

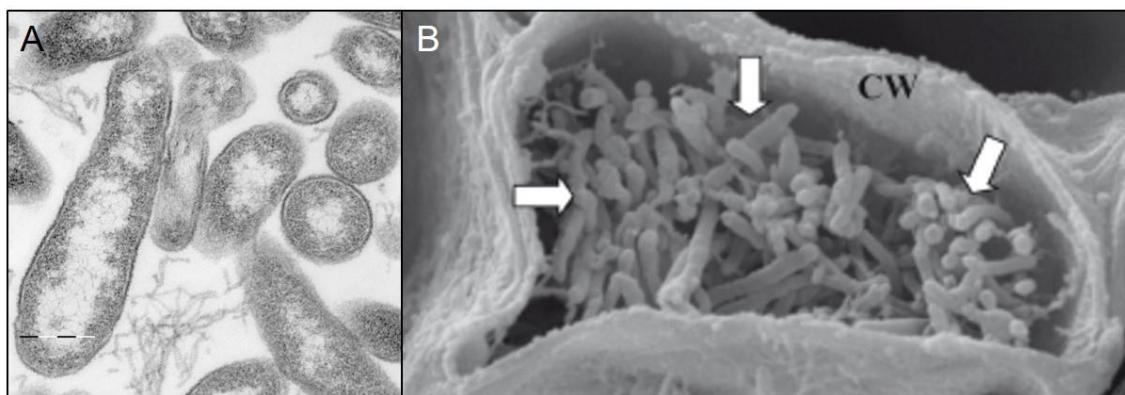
### 1.3 Huanglongbing, a pior doença da citricultura mundial

De todas as doenças citadas que acometem a citricultura, sem dúvida a mais grave é o huanglongbing (HLB). Apesar de seus primeiros relatos nas Américas serem de pouco mais de uma década, esta é provavelmente uma das mais antigas doenças conhecidas dos citros (BOVÉ, 2006). Seu primeiro relato foi feito por Reiking (1919) na China, sendo referida em diversos países por diferentes nomes. Somente em 1995 a doença foi oficialmente chamada de Huanglongbing, em referência ao nome originado na China, significando 'doença do ramo amarelo', devido à aparência das plantas sintomáticas (BOVÉ, 2006). No Brasil é popularmente conhecida como 'greening', assim como na África do Sul e Estados Unidos.

### 1.3.1 Agente causal, sintomas e danos econômicos

O HLB é associado à presença de bactérias não cultiváveis em meio de cultura, fastidiosas, gram-negativas, pertencentes à  $\alpha$ -subdivisão das *Proteobacterias*: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* (Figura 3), relatadas primeiramente na África, Ásia e América, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2005b), estando ausente somente na bacia do Mediterrâneo e na Austrália. *Ca. L. asiaticus* é atualmente de distribuição cosmopolita, sendo encontrada também na África continental e nas Américas. Dado não existir até o momento a cura ou controle que impeça absolutamente a ocorrência da doença, no Brasil foram adotadas práticas de manejo com base em um tripé composto pela aquisição de mudas sadias certificadas, erradicação das plantas doentes no pomar e o controle rigoroso do inseto vetor (FUNDECITRUS, 2017).

**Figura 3.** Microscopia eletrônica mostrando vasos de floema de vinca (*Catharanthus roseus*) colonizados por *Ca. Liberibacter americanus*.



(Fonte: (A) Wulff et al., 2014. (B) Tanaka et al., 2007)

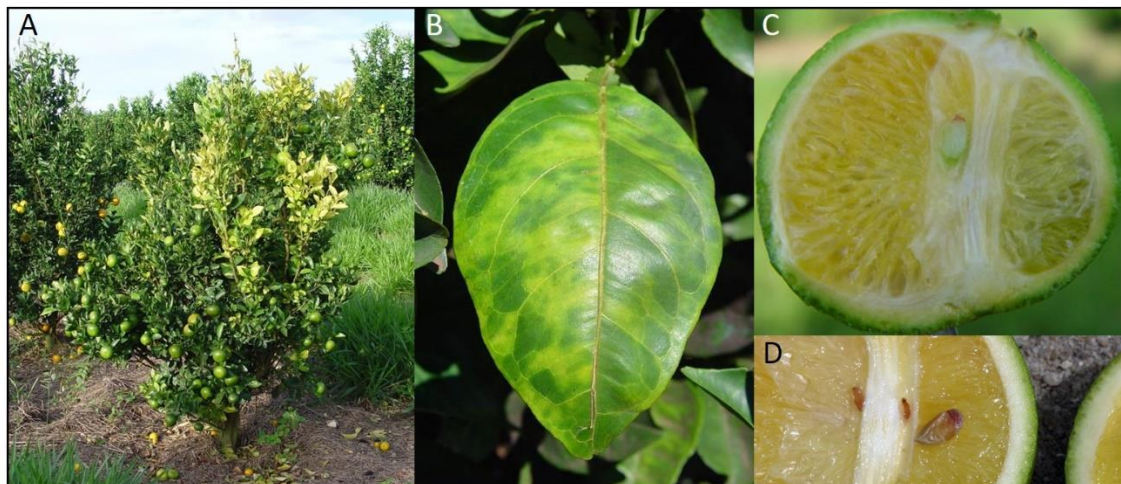
O HLB teve seu primeiro relato no país em março de 2004, na região de Araraquara/SP, onde foi relatada a presença da espécie *Ca. Liberibacter americanus* (TEIXEIRA et al., 2005a), até então desconhecida e tendo recebido esta denominação por seu primeiro relato ser nas Américas. Além desta espécie, também foi diagnosticada a ocorrência de *Ca. Liberibacter asiaticus* (COLLETA FILHO et al., 2004). No ano de 2005, o HLB também foi encontrado no estado da Flórida, nos Estados Unidos, associado à *Ca. Liberibacter asiaticus* (HALBERT & MANJUNATH, 2004), fazendo-se presente desde então nos dois

principais países produtores de laranja, Brasil e Estados Unidos. Os sintomas da doença se caracterizam por folhas mosqueadas – coloração parcialmente verde e amarela, sem uma delimitação clara entre as cores – que muitas vezes podem ser confundidos com deficiências minerais; queda de folhas, sementes abortadas e queda e deformação dos frutos (Figura 4), sendo este último o principal fator para a queda de produção (BASSANEZI, et al., 2011a). Os sintomas, assim como o número de plantas infectadas no pomar, avançam rapidamente e não existem variedades comerciais resistentes à *Liberibacter* (FOLIMONOVA et al., 2009) ou ao inseto vetor (WESTBROOK et al., 2011), tampouco a cura para a doença. Dados do Fundecitrus mostram que os frutos de ramos doentes são até 19% menores e até 42% mais leves, o que representa menos suco, além de suco mais ácido (5 a 45% mais acidez), mais azedo e mais amargo (BASSANEZI et al., 2011a).

Diversas tentativas para cura ou diminuição dos sintomas ou danos foram realizadas, desde o uso de antibióticos como ampicilina, penicilina ou tetraciclina; tratamentos com termoterapia, além de tratamentos nutricionais (SPANN et al., 2009; ZHANG et al., 2014; MORGAN et al., 2016), todos sem sucesso efetivo sobre a doença. Diversos grupos de pesquisa têm buscado identificar genótipos tolerantes para a obtenção de genes de resistência. Níveis de tolerância ou resistência em diferentes gêneros, ou mesmo em *Citrus* foram relatados, sem entretanto, resultar em variedades comerciais até o momento (SHOKROLLAH et al., 2009; STOVER et al., 2014; RAMADUGU et al., 2016).

No Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro, a incidência de HLB que era de 16,73% em 2017, subiu para 19,02% em 2019, com 37,1 milhões de árvores sintomáticas (PES, 2019). Sementes de limão Cravo e citrumelo Swingle, que compõem os porta-enxertos mais utilizados nos pomares brasileiros (POMPEU JUNIOR, 2005), também sofrem impacto do HLB, tendo suas qualidades físicas e fisiológicas afetadas, refletindo em menor viabilidade e emergência (MORELLI, 2016). Não ocorre a transmissão de *Ca. Liberibacter* spp. via sementes em citros.

**Figura 4.** Sintomas de HLB: (A) planta com ramos amarelos; (B) folha apresentando mosqueado; (C) fruto assimétrico; (D) sementes abortadas (foto: Fundecitrus).



(Fonte: Fundecitrus)

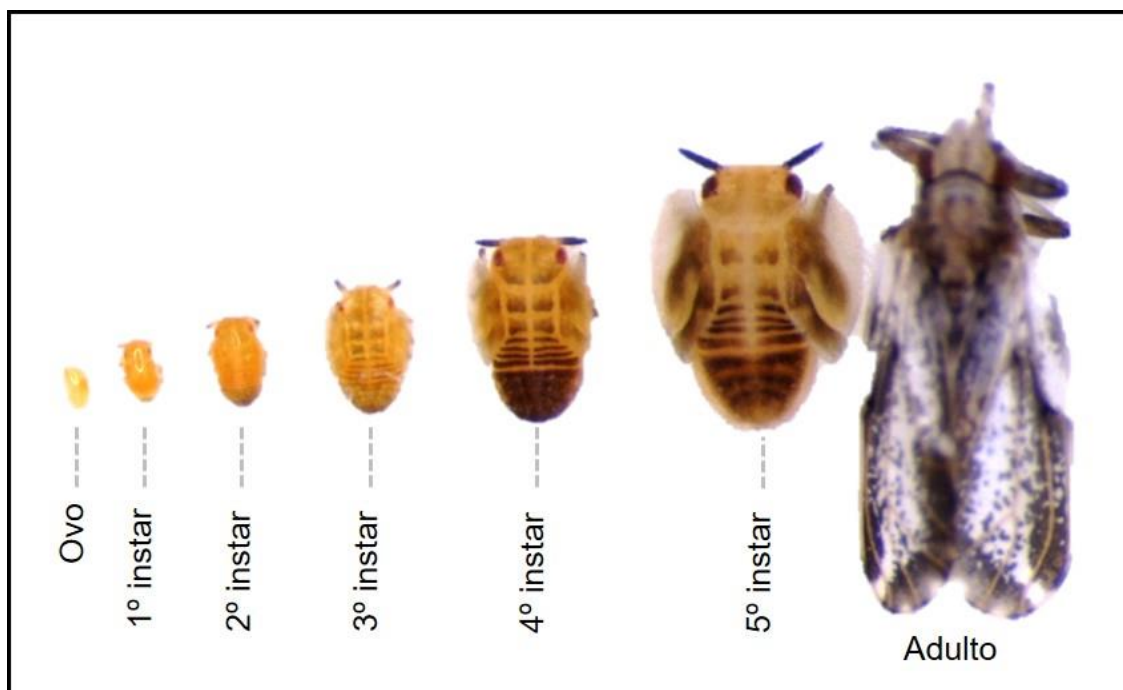
### 1.3.2 Vetor *Diaphorina citri*

O psílideo *Diaphorina citri*, primeiramente relatado em 1907, em Taiwan (MICHAUD, 2004), tem sido encontrado no Brasil desde a década de 40 (COSTA-LIMA, 1942), porém, somente com o aparecimento do HLB no país em 2004 o inseto ganhou importância como vetor (COLETA-FILHO et al., 2004). No período anterior à detecção da doença, o inseto era considerado uma praga secundária nos pomares (GALLO et al., 2002), causando distorção ou abscisão de brotações em casos de elevada infestação (MICHAUD, 2004). Dos vetores, *Diaphorina citri* – transmissor das espécies *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* – e *Trizoa erythrae* – transmissor de *Ca. L. africanus* – somente o primeiro está presente no Brasil (CEN et al., 2012). *D. citri* ou psílideo dos citros, se alimenta preferencialmente em ramos novos de plantas da família das rutáceas onde vinte e uma espécies são referidas como hospedeiras (Figura 7; PARRA et al., 2010). Em citros, as fêmeas ovipositam em todas as fases de brotação (V2 – V5). Quando os ovos são depositados em tecidos mais lignificados (V6 – V7) a mortalidade pós-emergência tende a ser alta (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Uma das principais hospedeiras é a *Murraya paniculata* (L.) Jack, também conhecida por murta, murta-de-cheiro, murta-da-índia, murta-dos-jardins ou jasmim-laranja, sendo muito utilizada ornamentalmente ou como cerca-viva, presente em grande parte das cidades do Brasil (LOPES et al., 2005). Até o

momento, todas as espécies cítricas cultivadas comercialmente, além de seus híbridos, são hospedeiras de *Ca. Liberibacter* spp., com variações nos sintomas (DE LANGE et al., 1985; KOIZUMI et al., 1994).

O desenvolvimento do psíldeo dos citros possui três estádios: ovo, ninfa com cinco estádios e adulto (Figura 5; AUBERT, 1987). A temperatura é crucial no ciclo de desenvolvimento, sendo 25 a 28°C a faixa ideal (CATLING, 1970). Sua alimentação ocorre por sucção de seiva do floema, através de um aparato bucal do tipo sugador labial tetraqueta, contendo dois estiletes maxilares e dois mandibulares (BONANI, 2009). Adultos e ninfas podem adquirir a bactéria através da alimentação em plantas contaminadas, sendo que as ninfas podem adquirir a partir do segundo ínstar e transmitir o patógeno após a emergência dos adultos (HUNG et al., 2004). O período de 15 minutos de alimentação já é suficiente para a transmissão da bactéria a uma planta sadia (PELZ-STELINSKI et al., 2010).

**Figura 5.** As três fases do desenvolvimento de *D. citri*: ovo, ninfa (1º a 5º instares) e adulto.



(Fonte: Fundecitrus)

Compostos voláteis emitidos por novos fluxos vegetativos exercem importante papel na atratividade dos insetos vetores (KARBAN; BALSWIN,

1997). Algumas espécies de psíldeos parecem fazer uso de compostos voláteis emitidos por plantas para localização de parceiros sexuais (HÓRTON; GUÉDOT; LANDOLT, 2007), além dos próprios voláteis emitidos pelas fêmeas. Zanardi et al. (2018) identificaram o ácido acético como um composto atraente liberado por fêmeas de *D. citri*.

Voláteis emitidos por plantas infectadas por fitopatógenos, podem exercer maior atração a insetos vetores do que os emitidos por plantas saudias, o que favorece a disseminação do patógeno (MAUCK et al., 2010). Plantas com sintomas de HLB, sofrem acúmulo de metabólitos secundários, provocado por alterações bioquímicas devido à presença de *C. Liberibacter* sp., o que parece ser responsável pela maior atração ao inseto vetor (CEVALLOS-CEVALLO & REYES-DE-CORCUERA, 2008; MANTHEY, 2008; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013).

**Figura 6.** (A) Psíldeo asiático *D. citri* adulto e (B) adulto e ninfas se alimentando em brotações de citros. As ninfas excretam substância açucarada, denominada “honeydew”.



(Fonte: (A) IRAC-BR. (B) Fundecitrus)

#### 1.4 Efeito repelente da goiabeira

Relatos de produtores da região do Delta do Mekong, no Vietnã, apontavam para a baixa incidência de HLB e do inseto vetor *D. citri* onde citros era plantado em consórcio com goiabeiras [*Psidium guajava* L. (Myrtaceae)], quando

comparado a pomares sem a presença destas plantas (BEATTIE et al., 2006). Essas observações mobilizaram a comunidade científica que iniciou uma série de estudos a fim de compreender o fenômeno. Cientistas japoneses, vietnamitas e australianos conduziram os primeiros estudos que apontaram o papel das goiabeiras como possíveis repelentes aos insetos (BEATTIE et al., 2006). Laranjeiras jovens intercaladas com goiabeiras permaneceram livres do HLB por um ano, enquanto plantios sem goiabeiras apresentavam 30% das plantas doentes quatro meses após o plantio (HALL et al., 2007). Zaka e colaboradores (2010) mostraram que voláteis emitidos pelas goiabeiras exerciam papel repelente frente aos psilídeos. Dos 57 componentes voláteis identificados, 27 são terpenos, destacando-se os sesquiterpenos, além de álcoois e aldeídos (OGUNWANDE et al., 2003; BEGUM et al., 2002, 2004; SOARES et al., 2005, ZAKA et al., 2010). NORONHA JR. (2010) mostrou efeito repelente dos voláteis de goiabeiras a insetos adultos de *D. citri*. Em condições de campo, Ichinose et al (2012) mostraram o efeito protetivo das goiabeiras intercaladas com citros, efeito que gradualmente perde a efetividade a partir do segundo ano devido às laranjeiras ultrapassarem em tamanho as goiabeiras, diluindo o efeito repelente. Alquézar e colaboradores (2017), estudando os compostos orgânicos voláteis (VOCs) de goiabeiras, identificaram uma predominância na emissão de  $\beta$ -cariofileno, constituindo entre 20 a 58% do total de VOCs emitidos. Linhagens geneticamente modificadas de *A. thaliana* que superexpressavam  $\beta$ -cariofileno constitutivamente foram repelentes ao psilídeo dos citros, demonstrando o papel repelente do composto  $\beta$ -cariofileno (ALQUÉZAR et al., 2017).

**Figura 7.** Pomar de citros afetado pelo HLB, com plantas sintomáticas (A). Plantio intercalado de citros e goiabeiras, onde a presença do psilídeo dos citros e de plantas sintomáticas é menor (B).



(Fonte: Fundecitrus)

## 1.5 Terpenos

Terpenos ou terpenóides (compostos semelhantes a terpenos) são hidrocarbonetos que constituem uma imensa classe de metabólitos secundários naturais, representando o grupo de metabólitos mais diversificado que existe, com aproximadamente 50 mil moléculas identificadas (VRANOVÁ, et al., 2013). Essa diversidade de moléculas atrai grande interesse industrial e agrícola. Os óleos essenciais, derivados de terpenos, são amplamente utilizados em cosméticos e na indústria alimentícia, melhorando a qualidade sensorial dos alimentos (RAVINDRA & KULKARNI, 2015). Os terpenos podem ser armazenados em estruturas especializadas ou não, o que influencia no padrão de emissão (STAUDT et al., 1993; LORETO et al., 1996).

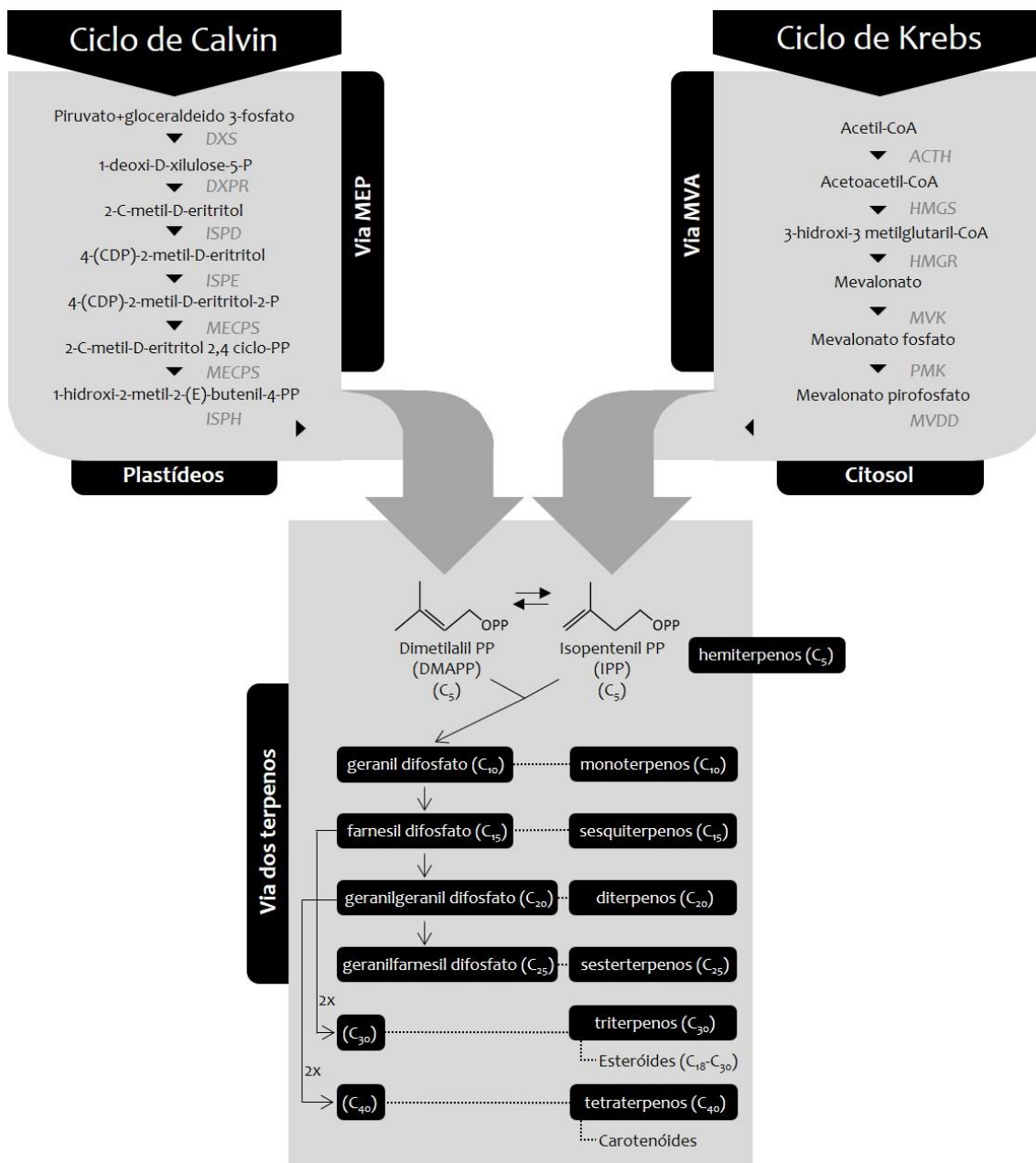
Tanto a produção, como a emissão de terpenos dependem de fatores bióticos e abióticos (LANGENHEIM, 1994; PEÑUELAS & LLUSIÀ, 1998). Temperatura, luminosidade e disponibilidade de água são importantes fatores abióticos (PEÑUELAS & LLUSIÀ, 1999; STAUDT & SEUFERT, 1995; SEUFERT 1997; LLUSIÀ & PEÑUELAS, 1998), enquanto que a ação de predadores, polinizadores ou patógenos estão entre os principais fatores bióticos (DUDAREVA et al., 2006).

Os terpenos são formados por unidades de isoprenos ou isoprenóides com cinco átomos de carbono, normalmente em um arranjo cabeça-cauda que são

considerados os blocos de construção dos terpenos. São encontrados na forma de isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (ROHMER et al., 1993; NEWMAN & CHAPPELL, 1999). Ambos são derivados de precursores prenil difosfato (prenil-PP), que podem ser sintetizados por duas vias: a via do mevalonato (MVA) localizada no citosol e presente em todos os eucariotos e algumas bactérias, ou a via 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), encontrada nos plastídios; A via do MEP está presente apenas nas plantas, algumas bactérias e protozoários (LANGE & CORTEAU, 1999; LICHTENTHALER, 1999), sendo que as plantas possuem ambas as vias, o que pode ter atribuído vantagens na adaptação aos mais variados ambientes (VRANOVÁ et al., 2013).

O esqueleto estrutural dos terpenos é representado por  $(C_5)_n$ , sendo o tipo mais simples de terpeno chamado de hemiterpeno, que contém uma unidade de isopreno  $C_5$  ( $C_5H_8$ ), seguido por monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (Figura 6). A biossíntese desta diversidade de compostos se dá pela condensação de unidades de DMAPP com IPP. Quando uma unidade de cada é condensada e catalisada pela enzima *geranyl difosfato sintase*, ocorre a formação de pirofosfato de geranilo (GPP) o que leva à formação dos monoterpenos. A condensação do GPP com IPP, catalisados pela enzima *farnesil difosfato sintase*, originam farnesil pirofosfato (FPP) que formará os sesquiterpenos. Esta dinâmica se seguirá para a formação dos demais terpenos (LANGE et al., 2000; DEWICK, 2001).

**Figura 8.** Via dos terpenos, formada a partir das vias MEP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato) e MVA (ácido mevalônico).



(Fonte: o autor)

Inicialmente, acreditava-se que as vias MVA e MEP trabalhavam separadamente, onde MVA apenas provia substrato para síntese de compostos, como sesquiterpenos, enquanto MEP disponibilizava substrato para a formação de mono e diterpenos, entre outros. Porém, tem-se descoberto uma dinâmica troca entre as vias. Enzimas e unidades de IPP podem ser deslocadas entre plastídios e citosol e até mesmo substratos podem ser trocados entre

compartimentos celulares (MCGARVEY & CROTEAU, 1995; ROHMER, 1999; KAPPERS et al., 2008).

Os terpenos produzidos através destas duas vias, desempenham importantes papéis na biologia das plantas. Além de componentes comuns dos odores florais, os terpenos atuam no sistema de defesa, tolerância ao estresse e sinalização entre plantas, induzindo respostas de defesa nas plantas vizinhas (KAISER, 1991). Alguns mono- e sesquiterpenos parecem atuar na resistência a danos causados por herbívoros e na atração de seus inimigos naturais, sinalizando quais plantas estão infestadas e quais não estão. Esta emissão de resposta, pode envolver diferentes misturas de voláteis, que são induzidas por elicitores de diferentes estruturas de acordo com a espécie de herbívoros (PARÉ & TUMLINSON, 1999; SCHUMAN et al., 2015). Esta sinalização também ocorre pelas folhas não atacadas da planta, indicando que o processo de emissão destes terpenos pode ocorrer de maneira sistêmica (PARÉ & TUMLINSON, 1998). Alguns autores apontam que compostos voláteis, incluindo terpenos, poderiam atuar como termoprotetores, numa espécie de proteção à planta frente ao aquecimento climático (PEÑUELAS & LLUSIÀ, 2003). Muitos voláteis de terpenos, atuam repelindo insetos através da emissão desses compostos pelos tecidos vegetais. Esta capacidade de repelência é usada pela indústria que se aproveita de óleos vegetais para repelência a insetos em residências.

## REFERÊNCIAS

- ALQUÉZAR, B.; VOLPE, H.X.L.; MAGNANI, R.M; MIRANDA, M.P.; SANTOS, M. A.; WULFF, N. A.; BENTO, M.S.B.; PARRA, J.R.P.; BOWMEESTER, H.; PEÑA, L. (2017).  $\beta$ -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus liberibacters*. Sci. Rep. 7:5639. 10.1038/s41598-017-06119-w
- AUBERT, B. (1987). *Trioza erytrae* (Del-Guercio) and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera, Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits*, v.42, n.3, p.149–162.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GASPAROTO, M.C.G.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. (2011). Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. v.130, p.577-586.
- BASSANEZI, R.B.; BUSATO, L.A.; SANCHES, A.L.; BARBOSA, J.C. (2005). Danos da Morte Súbita dos Citros sobre a produção de laranja. *Fitopatol. Bras.*, v.30, p.749-503.
- BEATTIE, G.A.C.; HOLFORD, P.; MABBERLEY, D.J.; HAIGH, A.M.; BAYER, R.; BROADBENT, P. (2006). Aspects and insights of Australia–Asia collaborative research on huanglongbing. *Proceedings of an International Workshop for Prevention of Citrus Greening Diseases in Severely Infested Areas, 7–9 December 2006, Ishigaki, Japan (Multilateral Research Network for Food and Agricultural Safety. Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; Tokyo, Japan)*. pp. 47– 64.
- BEGUM, S.; SIDDIQUI, B.; HASSAN, S.I. (2002). Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves. *Natural Product Research*, 16, 173–177.
- BEGUM, S.; HASSAN, S.I.; ALI, S.N.; SIDDIQUI, B.S. (2004). Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Natural Product Research*, v.18, p.135–140.
- BONANI, J. P. (2009). Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. 83p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BOVÉ, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of Citrus. *Journal of Plant Pathology*, v.88(1), p.7-37.

CATLING, H. D. (1970). Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. FAO Plant Protection Bulletin, v. 18, n. 1, p. 8-15.

CEN, Y.; ZHANG, L.X.; GUO, J.; DENG, X.; ZHOU, W.; SEQUEIRA, R.; GAO, J.; WANG, Z.; YUE, J.; GAO Y. (2012). Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). Florida Entomologist, Gainesville, v.95, n.2, p.304-311, 2012.

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; CORCUERA, R.J.I. (2008). Metabolite changes in HLB Orange Leaves by GC-MS and Other Techniques. In: International Research Conference on Huanglongbing, 2008, Orlando. Proceedings. Orlando: USDA, ARS, p. 176-177.

CIFUENTES-ARENAS, J.C.; GOES, A.; MIRANDA, M.P.; BEATTIE, G.A.C.; LOPES, S.A. (2018). Citrus flush shoot ortogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. PloS ONE 13(1): e0190563.

CITRUSBR, 2019a. Colheita de citros na Espanha passa dos 4M toneladas. (disponível em: <http://www.citrusbr.com/nocampo/>). Acesso: 08/08/2019

COLLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU, J.J.; MACHADO, M.A. (2004). First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. Plant Disease 88: 1382.

COSTA-LIMA. (1942). Insetos do Brasil: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, t. 3, cap. 23, p. 94-111. (Série Didática, 4).

DE LANGE, J.H.; VINCENT, P.M.; NEL, M. (1985). Breeding for resistance to greening disease in citrus. Citrus and Subtropical Fruit Journal 614: 6-9.

DEWICK, P. M. (2001). Medicinal natural products: a biosynthetic approach / Paul M. Dewick. – 2nd ed. p. cm.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences, v.25, p.417-440.

EMBRAPA, 2015. Ultra-adensamento de plantio de citros pode quase dobrar produção. (disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3311969/ultra-adensamento-de-plantio-de-citros-pode-quase-dobrar-producao>). Acesso: 02/08/2019.

FLESCH, G; ROHMER, M. (1988). Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopan skeleton. *Eur J Biochem*, v.175, p.405–411

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

FUNDECITRUS, 2017. 'Dez mandamentos' contra o greening: medidas para controlar a praga. (disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/dez-mandamentos-contr-o-greening-medidas-para-controlar-a-praga/593>) . Acesso: 12/08/2019.

FUNDECITRUS, 2005. MSC evolui. *Revista Fundecitrus*, Araraquara, n.131, p.14, nov/dez.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. (2002) *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920 p.

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

HALBERT, S.E. (2005). The discovery of Huanglongbing in Florida. *Proceedings of 2<sup>nd</sup> International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop*, Florida Citrus Mutual, Orlando 2005, H-3.

HALL, D.G.; HENTZ, M.G.; CIOMPERLIK, M.A. (2007). A comparison of traps and stem tap sampling for monitoring adult Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Florida Entomologist*, Gainesville, v.90, p.327-334.

HORTON, D.R.; GUÉDOT, C.; LANDOLT, P.J. (2007). Diapause status of females affects attraction of male pear psylla, *Cacopsylla*, to volatiles from female infested pear shoots. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Amsterdam, v.123, p.185-192.

HUNG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. (2004). Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus Huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology*, Oxford, v.53, p.96-102.

ICHINOSE, K.; HOA, N.V.; BANG, D.V.; TUAN, D.H.; DIEN L.Q. (2012). Limited efficacy of guava interplanting on citrus greening disease: effectiveness of protection against disease invasion breaks down after one year. *Crop Protection*, v.34, p.119-126.

KAISER, R. (1991). Trapping, investigation and reconstitution of flower scents. In: Mueller, P.M., Lamparsky, D. (Eds.), *Perfumes: Art, Science, Technology*. Elsevier Applied Science, London, p. 213–250.

KAPPERS, I.F.; DICKE, M.; BOUWMEESTER, H.J. (2008). Terpenoids in plant signalling, chemical ecology. In: *Biology TP* (ed) Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. Wiley, Hoboken, p.1–8.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T. (1997). *Induces responses to herbivory*. Chicago: University of Chicago Press, 317p.

KOIZUMI, M.; PROMMINTARA, M.; DEEMA, N.; CHOOPANYA, D. (1994). Phytopathological studies on citrus greening disease in Thailand. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. 58 p.

LANGE, B.M.; CROTEAU, R. (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13714-19.

LANGE, M.B.; WILDUNG, M.R.; STAUBER, E.J.; SANCHEZ, C.; POUCHNIK, D.; CROTEAU, R.B. (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, p.2934–2939.

LANGENHEIM, J. H. (1994). Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, v.20, p.1223-1280.

LICHTENTHALER, H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.50, p.47–65.

LLUSIÀ, J.; PEÑUELAS, J. (1998). Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought. *Canadian Journal of Botany*, v.76, p.1366-1372

LOPES, S. A.; MARTINS, E. C.; FRARE, G. F. (2005). Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. *Summa Phytopathologica*, v.31, p. 48-49.

LOPES, J.S.; PARRA, J.R.P.; YAMAMOTO, P.T.; BENTO, J.M.S. (2015) Psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros. Piracicaba: FEALQ, 908 p.

LORETO, F.; CICCIOLO, P.; CECINATO, A.; BRANCALEONI, E.; FRATTONI, M.; TRICOLI, D. (1996). Influence of environmental factors and air composition on the emission of  $\alpha$ -pinene from *Quercus ilex* leaves. *Plant Physiology*, v.110, p.267-275.

MANN, R.S.; ALI, J.G.; HERMANN, S.L.; TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K.S.; ALBORN, H.T.; STELINSKI, L.L. (2012). Induced release of a plant defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens*, v.8, Issue 3, 12p.

MANTHEY J.A. (2008). Differences in secondary metabolites in leaves from orange (*Citrus sinensis* L.) trees affected with greening disease (huanglongbing) (HLB). *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, v.121, p.285-288.

MATOS JR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR, J. (2005). *Citros*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. 929p.

MAUCK, K.E.; DE MORAES, C.M.; MESCHER, M.C. (2010). Deceptive chemical signals by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *National Academy of Sciences of the USA, Washington. Proceedings...* Washington, v.1, n.1, p.1-6.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, v.7, p.1015-1026.

MICHAUD, J. P. (2004). Natural mortality of *Asian citrus* psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological Control*, v. 29, n. 2, p. 260–269.

MORELLI, M. (2016) Transmissão e impacto do HLB na qualidade física e fisiológica de sementes de porta-enxertos de citros. Campinas. 42p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas.

MORGAN, K.T.; ROUSE, R.E.; EBEL, R.C. (2016). Foliar applications of essential nutrients on growth and yield of "Valencia" sweet orange infected with huanglongbing. *HortScience*, v.51(12), p.1482-1493.

MÜLLER, G. W.; DE NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MATTOS JÚNIOR, D; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S.

A.; GIROTTI, L. F. & MACHADO, M. A. (2002). Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. *Laranja*. v.22, n.2, p.371-386.

NEWMAN, J.D.; CHAPPELL J. (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v.34, p.95-106

NEVES, M.F. (coord.); TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSORI, F.; KALARI, R. (2010) *O Retrato da Citricultura Brasileira*. Ribeirão Preto, Markestrat, p.8-9.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. (2017). *Anuário da citricultura 2017*. 1ª edição. São Paulo. CitrusBR.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; NETO, L.C.M.; KALAKI, R.B. (2019). Orange juice chain: past, present and future. Print edition ISBN 978-0-620-82716-4.

NORONHA JUNIOR, N.C. (2010). Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). 72 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; ADELEKE, K.A.; EKUNDAYO, O.; KOENIG, W.A. (2003). Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal*, v.8, p.36–138.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. (1998). Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry*, v.47, p.521–526

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* v.121 p.325-331.

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; GOMEZ-TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. (2010). Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. *Citrus R&T*, v.31, p. 37-51.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. (1998). Influence of intra- and inter-specific interference on terpene emission by *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* seedlings. *Biologia Plantarum*, v.41, p.139-143.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. (1999). Short-term response of terpene emission rates to experimental changes of PFD in *Prunus halepensis* and *Quercus itex* in summer field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, v.42, p.61-68.

PEÑUELAS, J.; LLUSIA, J. (2003). BVOCs: plant defense against climate warming? *Tren Plant Sci*, v.8, p.105-109.

PELZ-STELINSKY, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. (2010). Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by *Asian citrus psyllid* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v.103, n.5, p.1531-1541.

PES, 2019. Inventário de árvores do cinturão citrícola do estado de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Retrato dos pomares em março de 2019. (In: [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/2019\\_05\\_24\\_Invent%C3%A1rio\\_e\\_Estimativa\\_do\\_Cinturao\\_Citricola\\_2019-2020.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2019_05_24_Invent%C3%A1rio_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2019-2020.pdf)) Acesso: 08/08/2019.

PES, 2018. Reestimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro – fechamento em abril/2019. (Disponível em: [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/0419\\_Reestimativa\\_da\\_Safra\\_de\\_Laranja.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0419_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf)) Acesso em: 08/08/2019

POMPEU JUNIOR, J. (2005). Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI J. D.; PIO M. R.; POMPEU JUNIOR, J. *Citros*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p.63-106

RAMADUGU, C.; KEREMANE, M. L.; HALBERT, S. E.; DUAN, Y. P.; ROOSE, M. L.; STOVER, E.; et al. (2016). Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in *Citrus* relatives. *Plant Dis*. v.100, p.1858–1869.

RAVINDRA, N.S.; KULKARNI, R.N. (2015). Essential oil yield and quality in osescented geranium: Variation among clones and plant parts. *Scientia Horticulture*. v.184, p.31–35.

REINKING, O.A. (1919). Diseases of economic plants in Southern China. *Philippine Agricultural*, v.8, p.109-135.

ROHMER, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, v.16, p.565-574.

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*, v.295, p.517–524.

SCHWARZ, M.K. (1994). Terpene Biosynthesis in *Ginkgo biloba*: Eineüerraschende Geschichte. PhD thesis. ETH Zürich, Switzerland.

SCHUMAN, M.C.; ALLMAN, S.; BALDWIN, I.T. (2015). Plant defense phenotypes determine the consequences of volatile emission for individuals and neighbors. *eLife*; 4:e04490.

SEUFERT, G. [ED.]. (1997). BEMA: a European commission project on biogenic emissions in the Mediterranean area. *Atmospheric Environment* v.31, p.1-255.

SHOKROLLAH, H.; ABDULLAH, T.L.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A.; ABDULLAH, N.A.P. (2009). Differential reaction of citrus species in Malaysia to huanglongbing (HLB) disease using grafting method. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, v.4, p.32-38.

SOARES, F.D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M.O.M.; MONTEIRO, A.R. (2005). Volatile and non-volatile chemical composition of the White guava fruit (*Psidium guajara*) at different stages of maturity. *Food Chemistry*, v.100, p.15-21.

SPANN, T.M.; SCHUMANN, A.W. (2009). The role of plant nutrients in disease development with emphasis on citrus and huanglongbing. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* v.122, p.169-171.

STAUDT, M.; KOTZIAS, D.; SPARTA, C.; CICCIOI, P. (1993). Holm oak (*Quercus ilex*)-a strong emitter of monoterpenes. In P Ciccioli [ed.], *Proceedings of the first Italian Symposium on the strategies and techniques for the monitoring of the atmosphere*, Societa Chimica Italiana, Rome, Italy, p.579-586.

STAUDT, M.; SEUFERT, G. (1995). Light-dependent emission of monoterpenes by holm oak (*Quercus ilex* L.). *Naturwissenschaften*, v.82, p.89-92.

STOVER, E.; MCCOLLUM, G.; RAMOS, J.; SHATTERS, R.G. (2014). Growth, health and *Liberibacter asiaticus* titer in diverse citrus scions on mandarin versus trifoliate hybrid rootstocks in a field planting with severe huanglongbing. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, v.127, p.53-59.

TEXEIRA, D.C.; AYRES, A.J.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; DANET, J.L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. (2005a). First Report of a Huanglongbing-like Disease of Citrus in São Paulo State, Brazil, and Association of a New liberibacter Species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the Disease. *Plant Disease*, v.89, p.107.

TEIXEIRA, D.C.; DANE, J.L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; BASSANEZI, R.B.; AYRES, A.J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. (2005b). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular Cellular Probes*, v.19 p.173-179.

USDA (2019). Citrus: world markets and trade. July 2019 (in: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>).

USDA (2018). (In: [fas.usda.gov/data/eu-28-citrus-annual-4](https://www.fas.usda.gov/data/eu-28-citrus-annual-4))

WESTBROOK, C.J.; HALL, D.G.; STOVER, E.; DUAN, Y.P.; LEE, R.F. (2011). Colonization of citrus and citrus-related germoplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). HortScience, v.46, p.997-1005.

VRANOVA, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. Annu. Rev. Plant Biol., v.64, p.665–700. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120116

ZAKA, S.M.; ZENG, X.N.; HOLFORD, P.; BEATTIE, G.A.C. (2010). Repellent effect of guava leaf volatiles on settlement of adults of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama, on citrus. Insect Science, v.17, p.39-45.

ZHANG, M.; YANG, C.; POWELL, C.A. (2015). Application of Antibiotics for Control of Citrus Huanglongbing. Adv. Antibiotics Antibodies, v.1, p.1.

ZHANG, M.; GUO, Y.; POWELL, C.A.; DOUD, M.S.; YANG, C.; DUAN, Y. (2014). Effective Antibiotics against 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in HLB-Affected Citrus Plants Identified via the Graft-Based Evaluation. PLoS One, 9(11): e111032.

ZHAO, J.-P.; WANG, H.-T.; ZENG, X.-N.; XUE, P.-P. (2013). Differences in selection behaviors and chemical cues of adult asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected young shoots of citrus plants. Journal of Agricultural Science, Cambridge, v.5, n.9, p.83-91.

## CAPÍTULO 2

### LARANJEIRAS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -CARIOFILENO E REPELÊNCIA A *Diaphorina citri*

#### 1 INTRODUÇÃO

A Biotecnologia foi definida em 1919 por Karl Ereky, como o conjunto das técnicas aplicadas aos organismos vivos, com o intuito de obter produto, processo ou serviço, com fins industriais ou práticos (BUD, 1993). A transformação genética de plantas, importante ferramenta da biotecnologia, é o nome dado ao processo de transferência de um ou mais genes de um organismo para outro, neste caso um organismo vegetal, sem que haja fecundação (TORRES et al., 2000). A possibilidade de transferência de genes que podem conferir características novas, a partir de plantas sexualmente incompatíveis – o que não era possível com o melhoramento convencional – ou até mesmo de outros organismos, torna a tecnologia dos transgênicos vantajosa e inovadora.

O cultivo comercial de plantas transgênicas no mundo teve início no começo da década de 1990, na Califórnia, com o desenvolvimento do primeiro tomate geneticamente modificado (GM), para se obter uma maior durabilidade na prateleira. A partir de então, outras espécies de plantas GM foram produzidas, notadamente plantas de ciclo curto como a soja, milho e algodão. A área plantada com transgênicos no mundo, que era de 1,7 milhão de hectare em 1997, saltou para 189,2 milhões vinte anos depois. Dos 24 países produtores de plantas GMs, o Brasil aparece em segundo lugar, com 50,2 milhões de hectares, atrás apenas dos Estados Unidos, com 75 milhões. Da área plantada no Brasil a soja ocupa 33,7 milhões de hectares, seguida pelo milho, com 15,6 milhões e do algodão, com 940 mil ha. A produção brasileira de transgênicos representa 26% de todo cultivo GM global (ISAAA, 2018). Existem ainda outras culturas comercialmente aprovadas no país, como feijão, cana-de-açúcar e eucalipto.

Para que seja possível a pesquisa e posterior comercialização de uma planta transgênica é necessária a aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), entidade ligada ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação, que presta apoio técnico consultivo e assessora o

governo Federal na elaboração e implementação das políticas de Biossegurança. Os organismos GMs podem ser divididos em três gerações, de acordo com a característica desejada e a ordem cronológica de aparecimento, sendo a primeira geração a mais plantada no mundo, onde a característica predominante dos cultivos é a resistência a herbicidas, pragas e vírus. A segunda geração é caracterizada pela busca de melhoramentos nutricionais e a terceira é destinada à síntese de produtos como vacinas, hormônios, anticorpos, entre outros (Embrapa, 2019).

Não existem laranjeiras transgênicas liberadas comercialmente, porém grupos de pesquisa de diversos países trabalham na obtenção de plantas, principalmente voltadas à resistência a doenças e pragas. Plantas de laranja doce foram as primeiras culturas arbóreas onde a regeneração de tecidos foi alcançada a partir de protoplastos (KOBAYASHI et al., 1983). Kobayashi e Uchiniya (1989) conduziram o primeiro trabalho de transformação genética em laranja doce, obtendo calos transgênicos contendo marcador *neomicina fosfotransferase II (nptII)*.

Mais de 60 trabalhos com transformação e regeneração de citros transgênicos foram publicados (Peña et al., 2008). Destes, 85% utilizaram *Agrobacterium tumefaciens* como vetor de transformação. Esta bactéria, com notável habilidade de transferir naturalmente um segmento de DNA (T-DNA) a partir de um plasmídeo indutor de tumor (Ti) para o núcleo das células infectadas, causando tumores no hospedeiro, é utilizada para transformação de plantas, substituindo parte do T-DNA por um ou mais genes de interesse. Este método tem diversas vantagens sobre outros métodos como o PEG, eletroporação ou bombardeamento de partículas, pois reduz a frequência da obtenção de eventos com múltiplas cópias do T-DNA, apresenta menor instabilidade, além de ser um sistema de transformação unicelular, evitando a formação de mosaicos (KONCZ et al., 1994, HANSEN et al., 1997, ENRÍQUEZ-OBREGÓN et al., 1997, 1998).

Diante da grave ameaça representada pelo HLB, da indisponibilidade de variedades resistentes e da ineficácia dos tratamentos contra a doença utilizados no campo, a obtenção de plantas transgênicas é uma saída que a biotecnologia busca apresentar à cadeia citrícola. Com base no modelo de repelência de *D. citri* reportado no Vietnã, em pomares consorciados com goiabas, foi iniciado um projeto visando a obtenção de laranjeiras doces com capacidade de emitir  $\beta$ -

cariofileno, tornando as laranjeiras repelentes naturais ao inseto. A estratégia visou o emprego do gene *TPS21* de *Arabidopsis thaliana* (*TPS21*, *At5g23960*), com atividade (-)-E- $\beta$ -cariofileno sintase e  $\alpha$ -humuleno sintase, bem caracterizado na literatura quanto ao produto formado, além do gene precursor de sesquiterpenos, farnesil pirofosfato sintase, a serem introduzidos de forma conjunta ou isolada em laranjeira doce via *Agrobacterium tumefaciens*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar laranjeiras doce das variedades Pera e Valência geneticamente modificadas para superexpressão, acúmulo e emissão do composto sesquiterpênico  $\beta$ -cariofileno.

### 2.1 Objetivos específicos

- i. Avaliar a expressão dos transgenes da sintase dos sesquiterpenos e da sintase de farnesil pirofosfato de *Arabidopsis thaliana* em plantas de laranja doce geneticamente modificadas;
- ii. Analisar a expressão gênica em genes chave na via biossintética dos terpenos em plantas de laranja doce GM;
- iii. Avaliar o fenótipo das plantas de laranja doce GM com alteração na produção de  $\beta$ -cariofileno.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação e isolamento dos genes de *Arabidopsis thaliana*

Diversos estudos já haviam caracterizado grande parte dos genes da via dos terpenos em *Arabidopsis*, em especial dos genes responsáveis pela produção de  $\beta$ -cariofileno (CHEN et al., 2003; THOLL et al., 2005), bem como o precursor farnesil difosfato sintase - FPPS (CUNILLERA et al., 1996). Desta maneira, a partir da sequência de DNA depositada no GeneBank foram delineadas as estratégias para obtenção dos genes. *Primers* foram desenhados a partir da sequência da  $\beta$ -cariofileno sintase *AtTPS21* (*At5g23960*) para amplificação de cDNA/DNA codificante para *TPS21* sintase funcional e *AtFDS1* (acesso nº X75789) para amplificação de cDNA codificante de uma FPP sintase funcional. O RNA/DNA foi extraído de *Arabidopsis thaliana* (ecótipo Columbia) em colaboração com o Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), em Valência (Espanha).

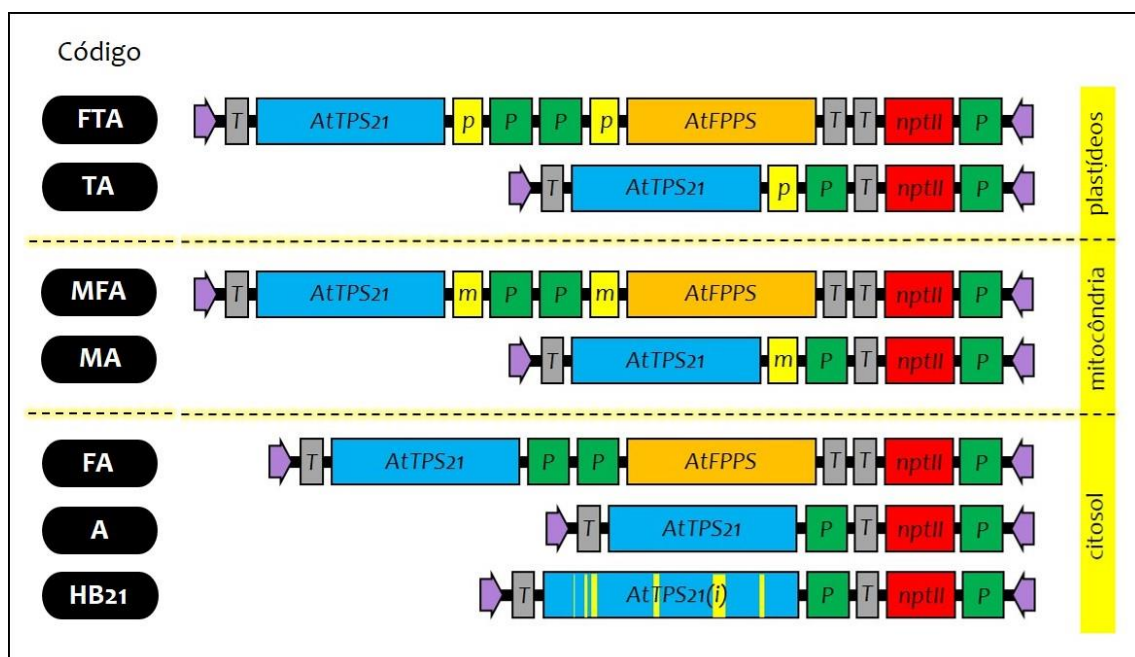
#### 3.2 Montagem dos cassetes de transformação

Para montagem dos cassetes de transformação, foram utilizados plasmídeos pMOG 180 (Mogen International; resistência à ampicilina) e vetores binários pROK (Invitrogen; resistência à canamicina). As construções foram compostas por clones de *AtTPS21* com ou sem a presença *FPPS* controladas pelo promotor constitutivo 35S de *Cauliflower mosaic virus* duplicado – 2x CaMV35S (KAY et al., 1987) e o terminador nopalina sintase (NOS), tendo como gene marcador *neomicina fosfotransferase II* (*nptII*) sob o controle de sequencias promotora e terminadora NOS. Os plasmídeos contendo os cassetes foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 para transformação das plantas.

Três estratégias foram desenhadas para as construções, todas contendo o gene *AtTPS21*, sendo i) construções com a presença ou não do gene *AtFPPS*, com inserção do peptídeo de trânsito da subunidade pequena da ribulose bifosfato carboxilase da ervilha (HERRERA-ESTRELLA et al., 2000). Patente USA 6130366), direcionando o produto proteico aos plastídios; ii) construções

com a presença ou não do gene *AtFPPS*, com peptídeo de trânsito da subunidade IV da citocromo oxidase de *Saccharomyces cerevisiae* (KÖHLER et al., (1997), direcionando o produto proteico à mitocôndria e iii) construções com a presença ou não do gene *AtFPPS*, com produto proteico direcionado ao citosol (sem introdução de peptídeo de trânsito). Adicionalmente, uma terceira construção citosólica sem *AtFPPS*, com a manutenção dos íntrons no gene *AtTPS21* (Figura 9) também foi empregada. As construções se íntrons foram produzidas em colaboração com o Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), em Valência (Espanha) e a construção com íntron foi produzida no Swammerdam Institute for Life Sciences, em Amsterdã (Holanda).

**Figura 9.** T-DNA dos vetores de transformação, com esquema das construções gênicas da sintetase do sesquiterpeno (*AtTPS21*) e da sintetase de farnesil pirofosfato (*AtFPPS*) de *Arabidopsis thaliana* com elementos regulatórios para expressão gênica em plantas (T = terminador da nopalina sintase, P = promotor 35S do Cauliflower mosaic virus para os genes de *A. thaliana* e promotor nopalina sintase para o gene de seleção *nptII*). Peptídeos de trânsito para direcionar os produtos proteicos aos plastídeos (p) ou para a mitocôndria (m), ou para citosol (sem peptídeos de trânsito). Flechas no início e no fim das construções indicam as bordas invertidas do T-DNA.



(Fonte: o autor)

### 3.3 Fonte de tecido para transformação

A escolha do tipo de órgão vegetal a ser transformado é um dos fatores determinantes no processo de regeneração. Órgãos com tecido jovem, obtidos a partir de sementes, como no caso dos hipocótilos, apresentam longo período juvenil, sendo necessários vários anos de cultivo para frutificação e avaliações de suas características agronômicas pós transformação genética. O uso de órgãos com tecido maduro, obtidos de borbulhas de plantas adultas, é uma alternativa eficaz para superar este problema (PEÑA et al., 2008).

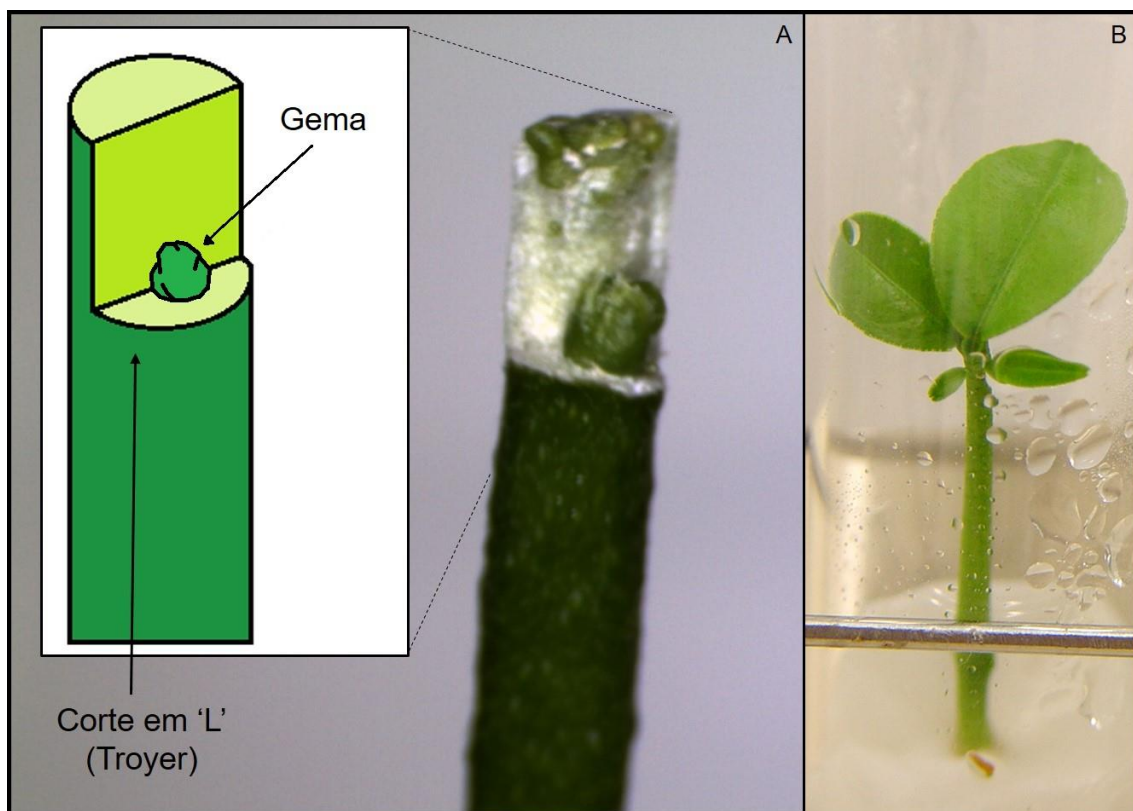
Brotações com tamanho médio de 18-20 cm, retiradas da haste principal de mudas de laranjeira das variedades Pera e Valência foram desinfestadas em hipoclorito comercial a 1% adicionado de 3 gotas de Tween 20, por 15 minutos, seguido de três lavagens com água ultrapura em fluxo laminar. Para a transformação, os segmentos de entrenós foram cortados perpendicularmente com lâminas de bisturi em segmentos de 2 a 4 mm, e mantidos em placas de petri contendo papel filtro embebido com água ultrapura, com a porção basal dos explantes em contato com o papel umedecido. Após este procedimento, explantes foram submetidos à transformação genética.

### 3.4 Transformação genética de tecido adulto de laranja doce

A transformação genética de segmentos de entrenó de laranja doce Pera e Valência foi realizada via *Agrobacterium tumefaciens* contendo as construções desejadas, seguindo protocolo descrito por KOBAYASHI et al. (2003) e RODRIGUEZ et al. (2008), mantendo os explantes em inóculo com D.O. 0,4 adicionado de acetoceringona (200 $\mu$ M) por cinco minutos. Após este período, o excesso de inóculo foi drenado em papel filtro estéril e os explantes transferidos para meio de co-cultivo WPM modificado (LLOYD & McCOWN, 1980), sendo mantidos em câmara aclimatizada (26°C  $\pm$ 1) no escuro por três dias e transferidos para meio WPM suplementado com 1,8  $\mu$ M BAP e 1,16  $\mu$ M GA<sub>3</sub>, adicionado de canamicina (75 mg/L), cefotaxima (150 mg/L), timetin (300 mg/L) e mantidos na mesma condição por três semanas. Após este período, os explantes foram transferidos para luz (~45  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), por quatro semanas em sala com temperatura e umidade controladas (25 °C  $\pm$ 1, 50-75 %,

respectivamente). Repiques foram realizados conforme a necessidade. Após este período, gemas regeneradas nos explantes mantidos em meio de cultura com agente seletivo foram coletadas e microenxertadas em citrange Troyer [*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] sob fluxo unidirecional (NAVARRO et al., 1975; NAVARRO, 1992). Para tanto, foi realizado corte em 'L' na parte superior do caule de citrange Troyer, onde foi depositada a gema extraída do explante (Figura 10). O microenxertado foi mantido nas mesmas condições do explante sob luz.

**Figura 10.** (A) Gema recém-emergida enxertada em citrange Troyer. No detalhe, ilustração do corte e da posição da gema. (B) Gema desenvolvida em broto, com as primeiras folhas expandidas.



(Fonte: Fundecitrus)

### 3.5 Identificação de plantas contendo o cassete de transformação através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Aproximadamente 28 dias após microenxertia, um pequeno fragmento de folhas emitidas da gema foi coletado e seu DNA extraído pelo método CTAB

(MCGARVEY, P.B. & KAPER 1991). Análises de PCR foram conduzidas para confirmação da inserção dos genes, utilizando os *primers* M13F (5' TGTAACGACGGCCAGT 3') e B109R (5' CCAAGATGCTTACACCAACC 3') para detecção do gene *AtTPS21* com produto amplificado de 320 pb. As reações de PCR foram realizadas utilizando 1 µL de DNA (~200 ng) em tampão da enzima 1x, 0,5 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada *primer* iniciador e 0,4 µL da enzima *taq* polimerase (Invitrogen), em volume final de 20 µL. As condições para amplificação foram de um ciclo de 1 minuto a 80°C e dois minutos a 94 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 72 °C e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

A eletroforese do produto da amplificação foi realizada em gel de agarose 1% e a visualização das bandas relativas aos fragmentos amplificados foi feita em equipamento L-PIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia) após tratamento com brometo de etídio.

Plantas positivas na PCR, evidenciando a presença de T-DNA, foram transferidas para casa de vegetação credenciada com Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), conforme normas da CTNBio para cultivo de material GM e sobre-enxertadas em limoeiro Cravo. Cada nova planta transgênica foi referenciada como 'evento'.

### **3.6 Análises de expressão gênica**

#### **3.6.1 Extração do RNA total**

Folhas em estágio V4 (CIFUENTES-ARENAS, 2018) foram coletadas em casa de vegetação e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. A extração do RNA total foi feita com reagente TRIzol (Invitrogen, protocolo segundo fabricante), sendo utilizado um grama de tecido vegetal por amostra. As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e imediatamente foi adicionado 5 mL de TRIzol reagente. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio, e após descanso de três minutos, as amostras foram submetidas a centrifugação a 8.000 x *g* por 30 minutos (4°C). Os sobrenadantes foram transferidos para novo tubo juntamente com isopropanol (v/v), homogeneizados por inversão e mantidos em descanso por 10 minutos. Após centrifugação a 8.000 *g* por 20 min, obteve-se precipitado

que foi lavado com 1 mL de etanol 70% dicarbonato de dimetila (DEPC) e novamente submetido a centrifugação a 8.000 g por 10 min. O precipitado final foi seco e hidratado em 70 µL de água DEPC. Adicionalmente, alíquotas de 1 µg de RNA foram tratadas com DNase (Turbo DNA free, Ambiom), para remoção de contaminantes de DNA, conforme orientação do fabricante.

### 3.6.2 Análise da expressão gênica via RT-qPCR

O cDNA foi obtido a partir da transcrição reversa empregando-se *primers* oligo(dT) e N6 em mistura equimolar e a enzima ImpromII™ (Promega), utilizando-se 25 µg do RNA total, 1 µL de RNase OUT (Invitrogen), 0,5 µM de *primers*, 0,25 mM de dNTPs, tampão ImpromII 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 20 µL. A síntese ocorreu a 42 °C por 1 h e a inativação da enzima se deu por incubação a 70 °C por 5 minutos.

Para amplificação em tempo real da região do gene *AtTPS21* e *AtFPPS* nas plantas GM, foram utilizados os *primers* B136F (5' CAAGAACTTTGTGTAGCTC 3'), B137R (5' CGTACTATGCTTCTCTTTG 3'), B138F (TAGTATTACGAGTAACGGC 3'), B139R (5' GTACATTGTAGTCCAGCAT 3') e AtCSF (5' GCATGGGGAGTGAAGTCAAC 3'), nas seguintes configurações:

- **Plastídeos:** B138F/B137R para detecção de *AtTPS21* e B138F/B139R para detecção de *AtFPPS* (construções FTA e TA, Figura 9).
- **Mitocôndria:** B136F/B137R para detecção de *AtTPS21* e B136F/B139R para detecção de *AtFPPS* (construções MFA e MA, Figura 9).
- **Citosol:** AtCSF/B137R para detecção de *AtTPS21* e B136F/B139R para detecção de *AtFPPS* (construções FA, A e HB21, Figura 9).

Para a amplificação dos genes de referência endógenos de citros gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2, foram utilizados os *primers*: GAPC2F (5' TCTTGCCTGCTTTGAATGGA 3') / GAPC2R (5' TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT 3') (MAFRA, et al., 2012) e actina ACT\_F (5' CATGAAGTGTGATGTGGATATTAG 3') / ACT\_R (5' TGATTCCTTGCTCATACGG 3') (GenBank Acc: CX289161). A reação de

qPCR foi realizada em equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems), com kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) a partir de 100 ng de cDNA. As condições de amplificação foram: 10 min a 95 °C; 40 ciclos de amplificação do cDNA de 15 seg a 95 °C para desnaturação; 1 min a 60 °C para anelamento dos *primers*; 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C, etapa de extensão dos fragmentos e captação do sinal de fluorescência. Ao final realizou-se a curva de *melting* dos produtos das amplificações na faixa de temperatura de 60 °C a 90 °C com incremento de 0,3 °C por segundo.

Adicionalmente, foi avaliada a expressão dos genes dos precursores endógenos da via dos terpenos de laranjeira dos eventos GM obtidos com as construções genéticas (Figura 9). As análises foram trimestrais, totalizando quatro amostragens no período de 12 meses. As condições de coleta, extração de RNA e qPCR seguiram o mesmo protocolo utilizado para expressão de *AtTPS21/AtFPPS*, com os *primers*: DXSF2 (5' GG CCAGTTCTGATCCATGTTGTAA 3') / DXSR2 (5' GATCGAACTTGA CAACTCCATGCA 3') para amplificação de parte do gene da *1-deoxixilulose 5-fosfato sintase (DXS)*; GDPF2 (5' GACAAGAGAACTGGCCGTGA 3') / GDPR2 (5' AAGTGCACGCCTTGACTTTG 3') para amplificação do fragmento correspondente à *geranil difosfato sintase (GDPS)* e FPPF (5' GCTGC TGAATGATCCTGCATTT 3') / FPPR (5' TAGCCCTCGGTTTCAGCTTTC 3') para amplificação do fragmento correspondente à *farnesil pirofosfato sintase (FPPS)* (RODRÍGUEZ et al., 2013).

Os primers foram validados pela curva de eficiência de amplificação e os valores de slope (ideal entre -3,8 a -3,1), eficiência da reação (ideal entre 90% e 115%) e R<sup>2</sup>, que é o coeficiente de reação (ideal próximo a 1) foram obtidos em reações tendo como molde diluições de cDNA a 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng.

Para a análise dos resultados e quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de 2<sup>-ΔΔCt</sup> (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), sendo que as expressões relativas dos genes alvos foram normalizadas em relação aos genes referência. Os cálculos se baseiam na equação, ER=2<sup>-ΔCt</sup> onde:

ER = expressão relativa

C<sub>t</sub> = *threshold cycle*

$$\Delta C_t = (\text{alvo} - \text{referência (gene normalizador)})$$

$$\Delta\Delta C_t = C_t \text{ gene-alvo} - C_t \text{ amostra controle (vetor vazio)}$$

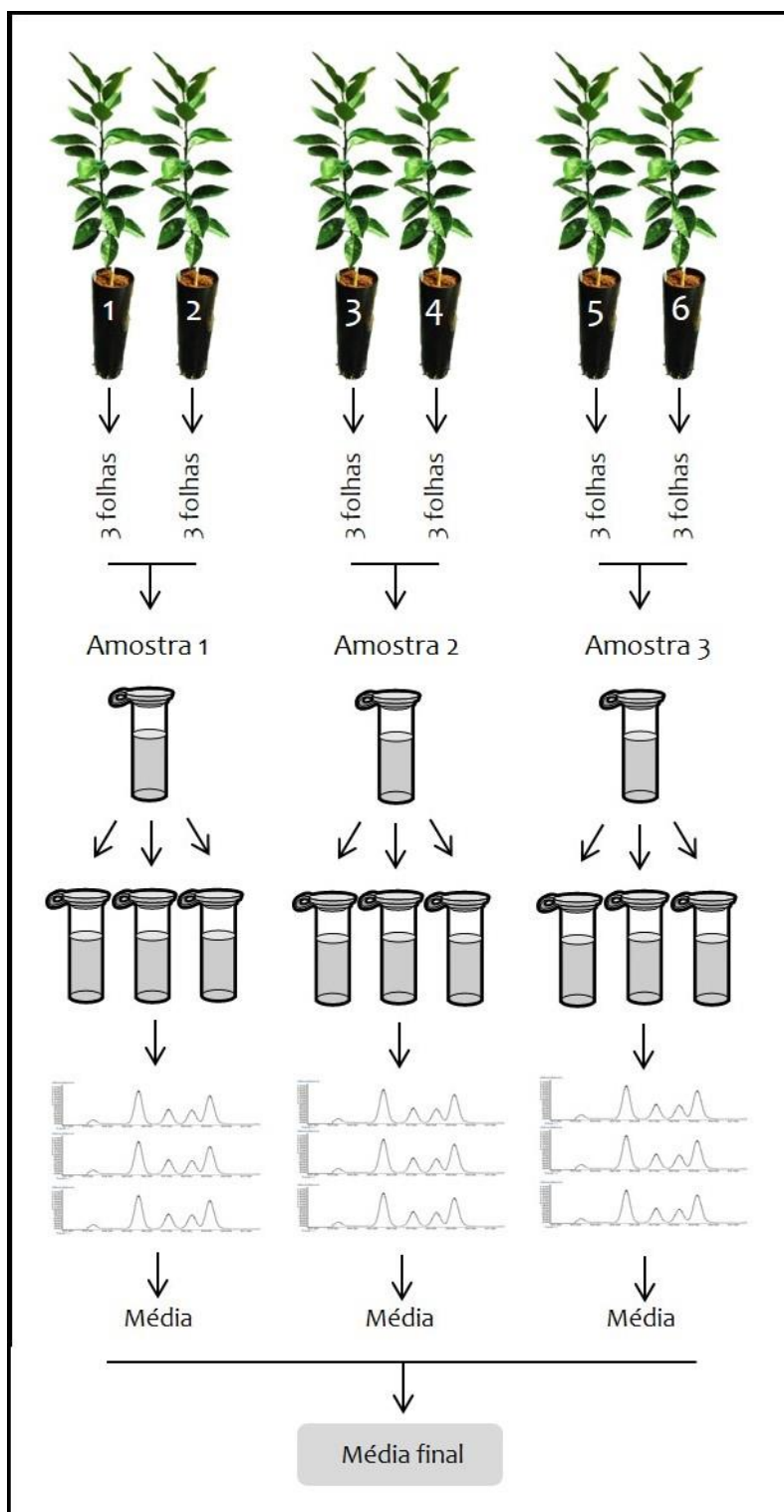
$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

### 3.7 Análises químicas nas folhas de laranjeiras geneticamente modificadas

#### 3.7.1 Análise de conteúdo de terpenos das folhas de citros

Análises de conteúdo químico foram realizadas em parceria com o pesquisador Rodrigo F. Magnani, para avaliar a produção de sesquiterpenos, particularmente quanto a quantidade de  $\beta$ -cariofileno, frente às plantas controle com vetor vazio. Para tanto, foram utilizadas seis plantas de cada evento, e seis plantas controle. De cada planta, foram coletadas três folhas, somando nove folhas ao final (Figura 11). As folhas foram trituradas em N<sub>2</sub> líquido e 50 mg do tecido triturado, ainda congelado, foram transferidos para tubos eppendorf contendo 1 mL de hexano + eicosano como padrão interno (1 mg de eicosano para 100 mL de hexano). Após agitação por 5 minutos a 2000 rpm em mesa agitadora, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4 °C e 750  $\mu$ L foram transferidos para vial de 1,5 mL. Foi utilizada uma coluna capilar 467 de dimetil polissiloxano (filme Rxi®-5ms 10 m x 0,10 mm id x 0,10  $\mu$ m, Restek Corporation, 468 Bellefonte, PA, EUA) com temperatura mantida a 40 °C por 1 minuto, com acréscimo de 30 °C/minuto-1 a 150 °C, posteriormente aumentada 10 °C/minuto-1 a 180 °C e, por fim, aumentada a 70°C/minuto-1 a 250 °C mantendo-se esta temperatura por 1 minuto. Interface de detector e temperatura da fonte de íons foram 250 472 e 200 °C, respectivamente, com gás hélio (0,45 mL/min-1). Espectros de massa foram registrados em 70 eV com faixa de varredura em massa de m/z 40 a 500. Todo procedimento foi realizado no laboratório LaBioMMi (UFSCar).

**Figura 11.** Ilustração das etapas da extração de conteúdo foliar com solvente.



(Fonte: Rodrigo Facchini Magnani)

A identificação dos compostos foi realizada confrontando os dados obtidos com a base de dados de bibliotecas de espectros de massas comerciais como a NIST e Adams, e ainda, com a determinação do índice de retenção de Kováts

(KOVÁTS, 1965). Os índices de retenção foram calculados em relação aos padrões de *n*-alcanos da série homóloga de cadeia linear C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>.

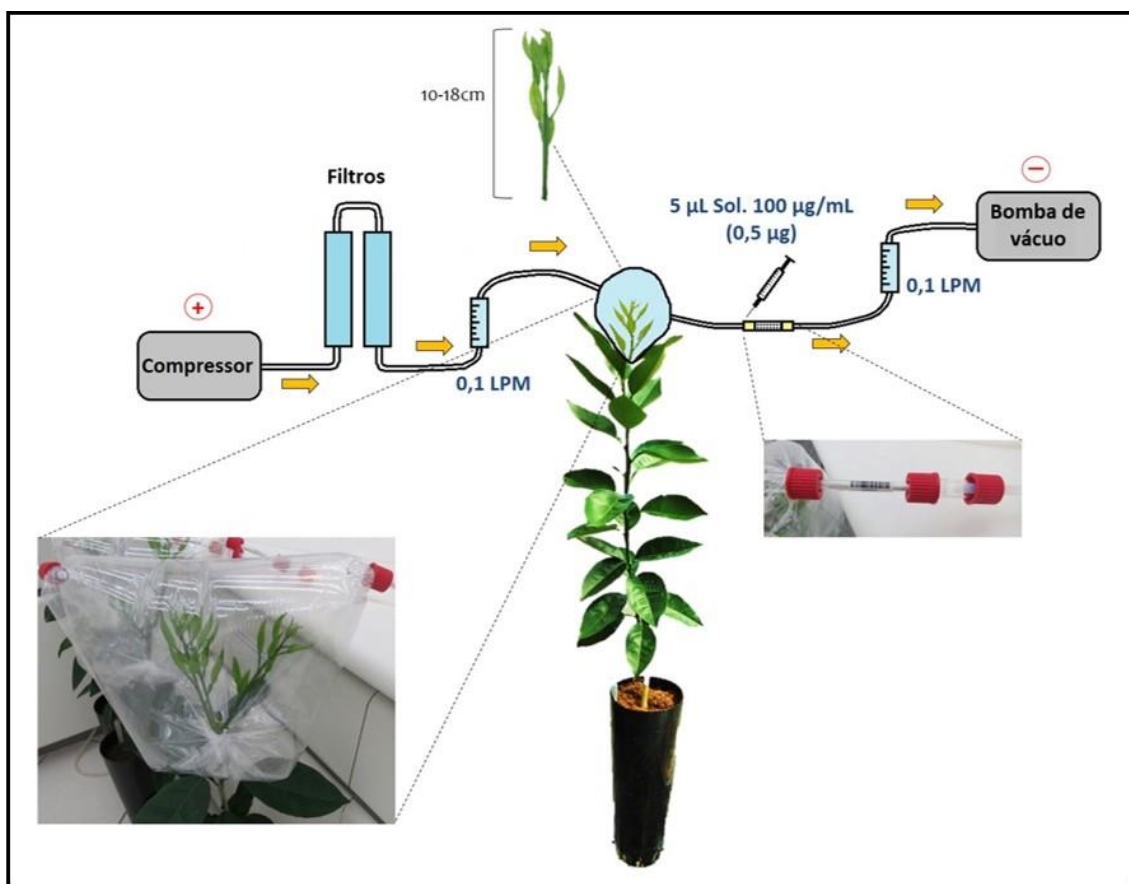
### 3.7.2 Análise de emissão de voláteis

As plantas em casa de vegetação foram podadas para surgimento de novas brotações. Para a coleta de voláteis, três brotos em estágio V4/V5 foram isolados em sacos de poliéster (Wyda). As coletas de voláteis foram realizadas empregando o método de *headspace* dinâmico, que consistiu de fluxo de ar contínuo a 0,1 litros por minuto (pressão positiva), gerado por um compressor de ar livre de óleo (Schulz S.A.), após a filtragem para eliminação de contaminação proveniente do ambiente através de filtros Norgren® (filtro de carvão ativado, adsorvente de umidade, partículas físicas e odores) (Figura 12). Os ensaios foram conduzidos em sala com temperatura a 25 °C e luminosidade a 3 mil luxes. Após passagem do fluxo de ar pelos brotos, os voláteis carregados foram capturados em tubos de vidro 0.635 × 8.89 cm contendo 200 mg do polímero adsorvedor Tenax® TA: óxido de 2,6-difenil-p-fenilene 35-60 mesh (Supelco) durante 30 minutos. Na saída do tubo de vidro o fluxo de ar foi succionado por uma bomba de vácuo acoplada a um fluxômetro calibrado para 0,1 litros por minuto (pressão negativa).

Para a identificação e quantificação relativa dos voláteis, foram empregadas a dessorção térmica dos polímeros em equipamento Dessorvedor Térmico (TD) TD-20 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e análise dos compostos voláteis em cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os compostos voláteis foram termicamente dessorvidos dos tubos de Tenax® TA no equipamento de TD sob um fluxo de gás Hélio (He) de 20 mL/min aquecido à 250 °C durante 5 min. Os VOCs dessorvidos na etapa anterior foram direcionados à um segundo tubo instalado no TD chamado de *cold trap* contendo Tenax® TA, onde foram criogenicamente capturados à uma temperatura de -20 °C. O *cold trap* foi dessorvido à uma taxa de 40 °C.s<sup>-1</sup> até 250 °C durante 5 min. e a temperatura da linha de transferência foi mantida à 200 °C, enquanto que os voláteis foram diretamente injetados na coluna cromatográfica capilar instalada no GC-MS (Rtx-5ms, 30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de espessura do filme,

Restek, Bellefonte, PA) no modo *split* na proporção de 1:10. O programa de temperatura do GC consistiu em temperatura inicial de 40 °C mantida durante 1 min e seguindo com uma taxa de aquecimento de 7 °C/min até atingir 250 °C, onde esta temperatura final foi mantida durante 5 min. A temperatura da interface entre o GC e o detector de MS foi ajustada para 250 °C e o fluxo do gás de arraste He foi mantido à 1.01 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos à uma energia de colisão de 70 eV e todas as análises foram registradas no modo de cromatogramas de íons totais (TIC), com intervalo de varredura de relação massa carga de  $m/z$  40 até  $m/z$  500. As análises de TD-GC-MS foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Química de Produtos Naturais no Departamento de Química da USP-FFCLRP.

**Figura 12.** Ilustração do processo de captura de voláteis emitidos por brotações de citros, com caminho percorrido pelo fluxo de ar, desde o compressor de ar, até a bomba de vácuo.

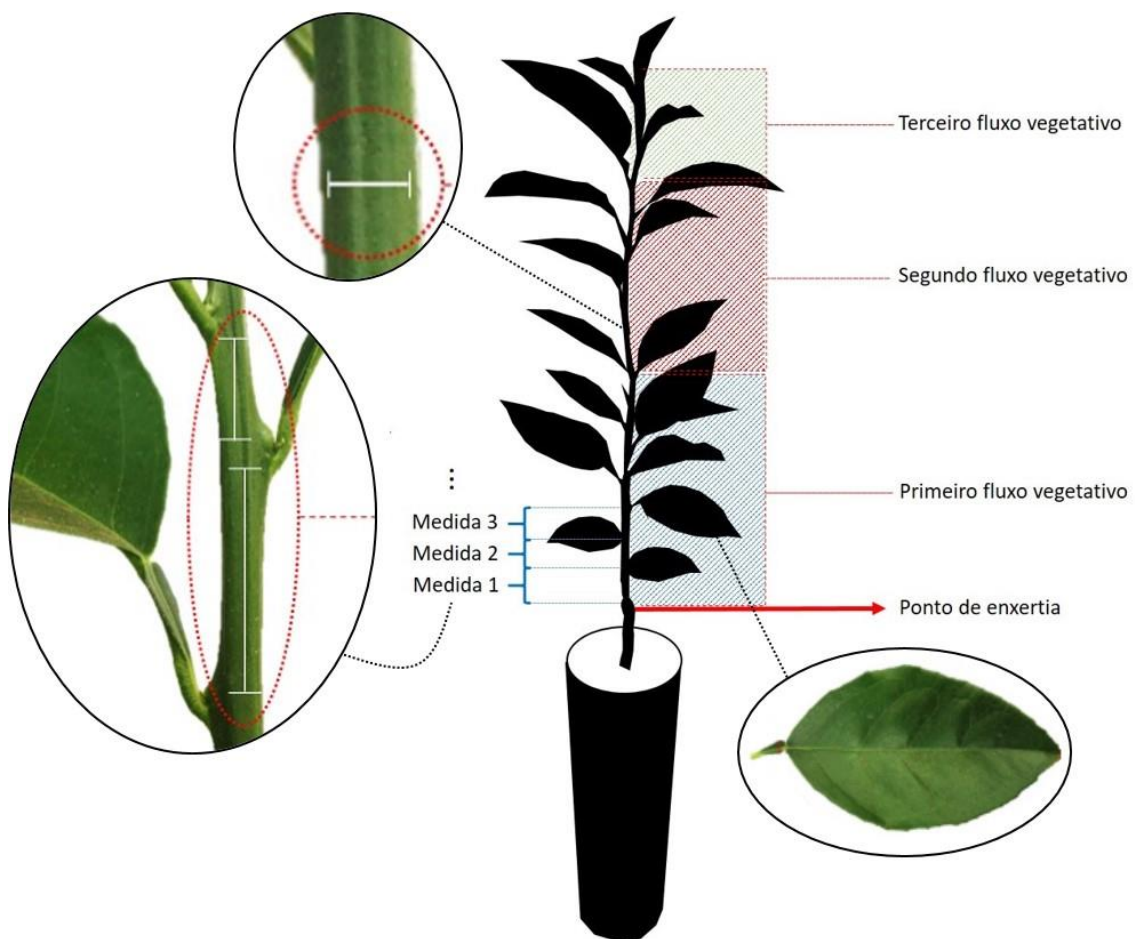


(Fonte: Rodrigo Facchini Magnani / Mateus Santos)

### 3.8 Análise de fenótipo

Eventos GM HB21 da variedade Valência foram avaliados quanto ao fenótipo comparadas aos controles vetor vazio. O diâmetro do ramo principal foi mensurado em 10 pontos diferentes, desde o ponto de enxertia até o ápice do ramo. Foram tomadas as medidas dos 50 primeiros entrenós do mesmo ramo principal, a partir da enxertia; e finalmente foi avaliada a área de 12 folhas aleatórias coletadas por toda a extensão do ramo principal (Figura 13). As folhas foram digitalizadas e a área foi calculada no software 'ImageJ' (<https://imagej.nih.gov/ij>). Os dados foram coletados de oito propagações de cada evento (oito repetições ou oito plantas), além de oito propagações de dois eventos controle vetor vazio.

**Figura 13.** Esquema das medidas para avaliação fenotípica dos eventos GM e controles vetor vazio, com avaliação do tamanho dos entrenós.



(Fonte: o autor)

### 3.9 Determinação do número de cópias via Southern Blotting

Análises de Southern Blotting foram realizadas para avaliar o número de cópias e a integridade do T-DNA inserido no genoma das plantas, conforme protocolo de Trijatmiko et al., (2016). De cada matriz representando um único evento de transformação genética, 50 µg de DNA foram digeridos com enzimas de restrição *NheI* e *PvuI* para avaliar número de cópias e integridade do T-DNA das construções direcionadas à mitocôndria e plastídeos (construções FTA, TA, MFA e MA, Figura 9), *NheI* e *Eco81I* para construções direcionadas ao citosol sem íntron (construções FA e A, Figura 9) e *NheI* e *NheI*+*SacI* para construção citosólica com íntrons (construção HB21). As digestões de clivagens foram conforme as recomendações do fabricante (New England Biolabs).

### 3.10 Avaliação do título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de laranja doce com superexpressão de $\beta$ -cariofileno

No intuito de avaliar a possível ação bactericida ou bacteriostática do  $\beta$ -cariofileno sobre *Liberibacter*, oito plantas de cada evento HB21-5, 15 e 16 da variedade Valência e oito plantas controle da mesma variedade foram propagadas. Após seis meses da propagação, foi realizada a inoculação de *Ca. L. asiaticus* nos eventos HB21 e controles por meio de enxertia de borbulhas provenientes de mudas da variedade Valência com sintomas de HLB e presença da bactéria confirmada via qPCR. Cada planta recebeu duas borbulhas. Amostras de folhas das plantas inoculadas foram coletadas 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação para detecção de *Ca. L. asiaticus* por qPCR.

#### 3.10.1 Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* via qPCR

A detecção de *Ca. L. asiaticus* foi feita via qPCR em equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems), utilizando Mastermix TaqMan® Genotyping Master Mix. O protocolo foi realizado conforme Li, et. al. (2006), com *primers* HLBas (TCGAGCGCGTATGCAATACG), HLB<sub>r</sub> (GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG) e sonda HLB<sub>p</sub> (FAM-AGACGGG

TGAGTAACGCGBHQ-NFQ) para amplificação da região 16S rDNA de *Ca. Liberibacter asiaticus*.

### 3.11 Plantio em campo

Eventos selecionados com potencial repelência a *D. citri* foram plantados em área experimental do Fundecitrus, respeitando a norma vigente definida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), de acordo com a resolução normativa 10, que trata de normas para isolamento de área com citros GM. O plantio foi realizado em parcelas únicas de 10 plantas, com espaçamento de 2,5 m entre plantas e 6,5 m entre linhas (Figura 14). O objetivo deste plantio é avaliar as características agrônômicas da planta, como crescimento, arquitetura e produtividade, inferindo se houve prejuízo ao desenvolvimento da planta pela inserção do T-DNA ou pela expressão do(s) transgene(s). Adicionalmente, é possível avaliar a expressão dos transgenes *AtTPS21* / *AtFPPS* e dos genes dos precursores dos sesquiterpenos em condições agrícolas, com pleno desenvolvimento das características da planta.

**Figura 14.** Plantio dos eventos de laranja doce com a construção HB21 nas variedades Valência e Pera em campo experimental na região central do estado de São Paulo.



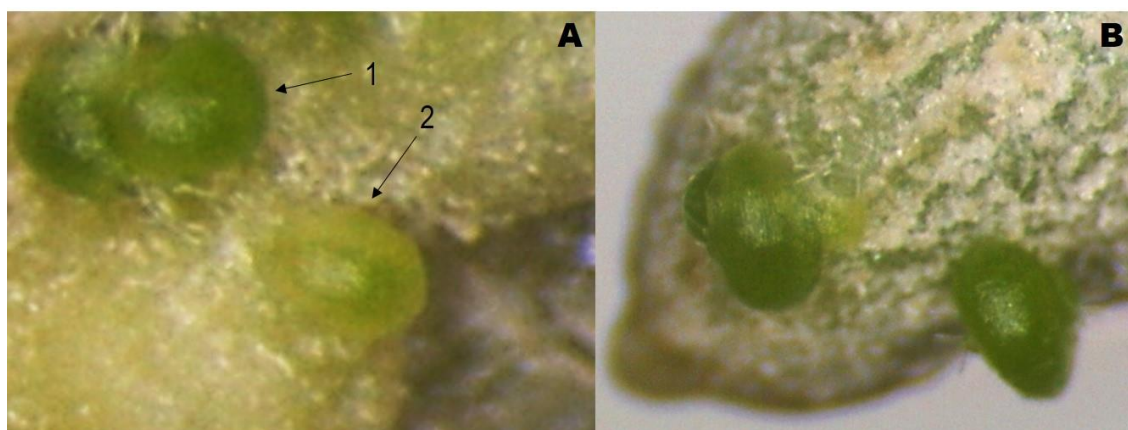
(Fonte: o autor)

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Transformação genética em explantes de tecido adulto de laranja doce

Os explantes submetidos ao co-cultivo com *A. tumefaciens* e nos quais ocorreu a transformação genética, geraram gemas no meio de cultivo contendo o antibiótico canamicina. Foi possível notar diferenças de coloração nas gemas que regeneraram neste meio seletivo. As gemas provenientes de células transformadas apresentavam um verde mais escuro, enquanto as gemas escape, que regeneravam mesmo na presença do antibiótico, apresentavam coloração verde pálido (Figura 15).

**Figura 15.** Gemas geradas em explantes de tecido maduro de laranja doce transformados com *Agrobacterium tumefaciens*. (A) a seta com número 1 indica uma gema advinda de célula geneticamente modificada, posteriormente confirmada através de PCR. A seta com número 2 indica gema escape, que não foi transformada, mostrando uma coloração mais pálida (negativa para a presença do transgene na PCR). (B) duas gemas geneticamente modificadas.



(Fonte: Fundecitrus)

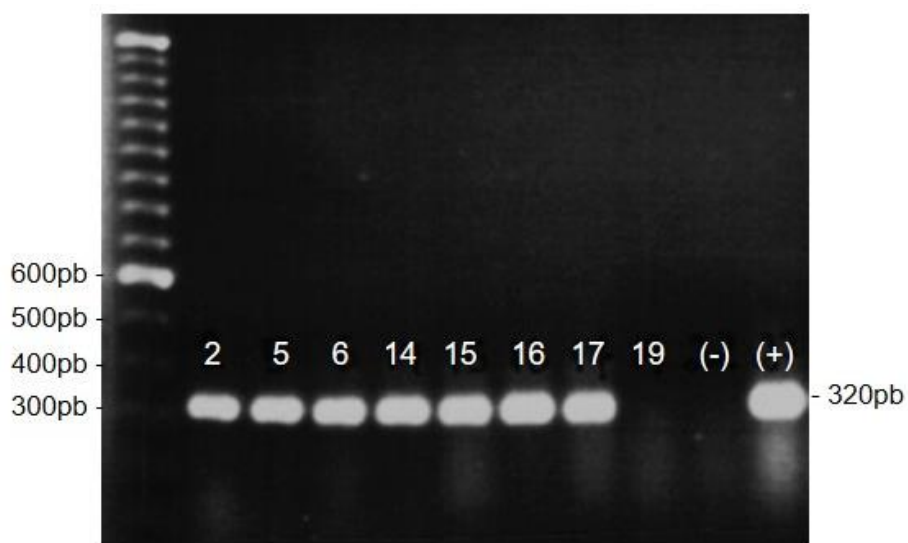
Foram obtidos 130 eventos positivos na PCR para a presença dos transgenes da variedade Pera e 136 eventos da variedade Valência (Tabela 2). A Figura 16 ilustra a amplificação por PCR do fragmento correspondente ao gene

*AtTPS21* em eventos da variedade Valência HB21. Esta PCR para confirmação da inserção do gene foi realizada para todos os eventos gerados, mas os resultados de PCR não são mostrados.

**Tabela 2.** Eventos GM em laranja doce das variedades Pêra e Valência gerados em função da construção genética e estratégia empregada.

Estratégia	Construção	Código	Eventos Pera	Eventos Valência
Plastídeos	<i>AtTPS21</i>	TA	28	14
	<i>AtTPS21+AtFPPS</i>	FTA	11	20
Mitocôndria	<i>AtTPS21</i>	MA	21	23
	<i>AtTPS21+AtFPPS</i>	MFA	27	34
Citosol	<i>AtTPS21</i>	A	27	18
	<i>AtTPS21+AtFPPS</i>	FA	6	17
	<i>AtTPS21</i> íntron	HB21	10	10

**Figura 16.** Revelação de gel de agarose após eletroforese de ácidos nucleicos amplificados em reação em cadeia da polimerase. As bandas na altura de 320 pb são resultado da amplificação do fragmento correspondente ao gene *AtTPS21*. Os números das amostras correspondem à identificação dos eventos HB21 (Valência). Controle negativo: planta com vetor vazio. Controle positivo: plasmídeo. Marcador de peso molecular: 1 kb plus (Invitrogen).

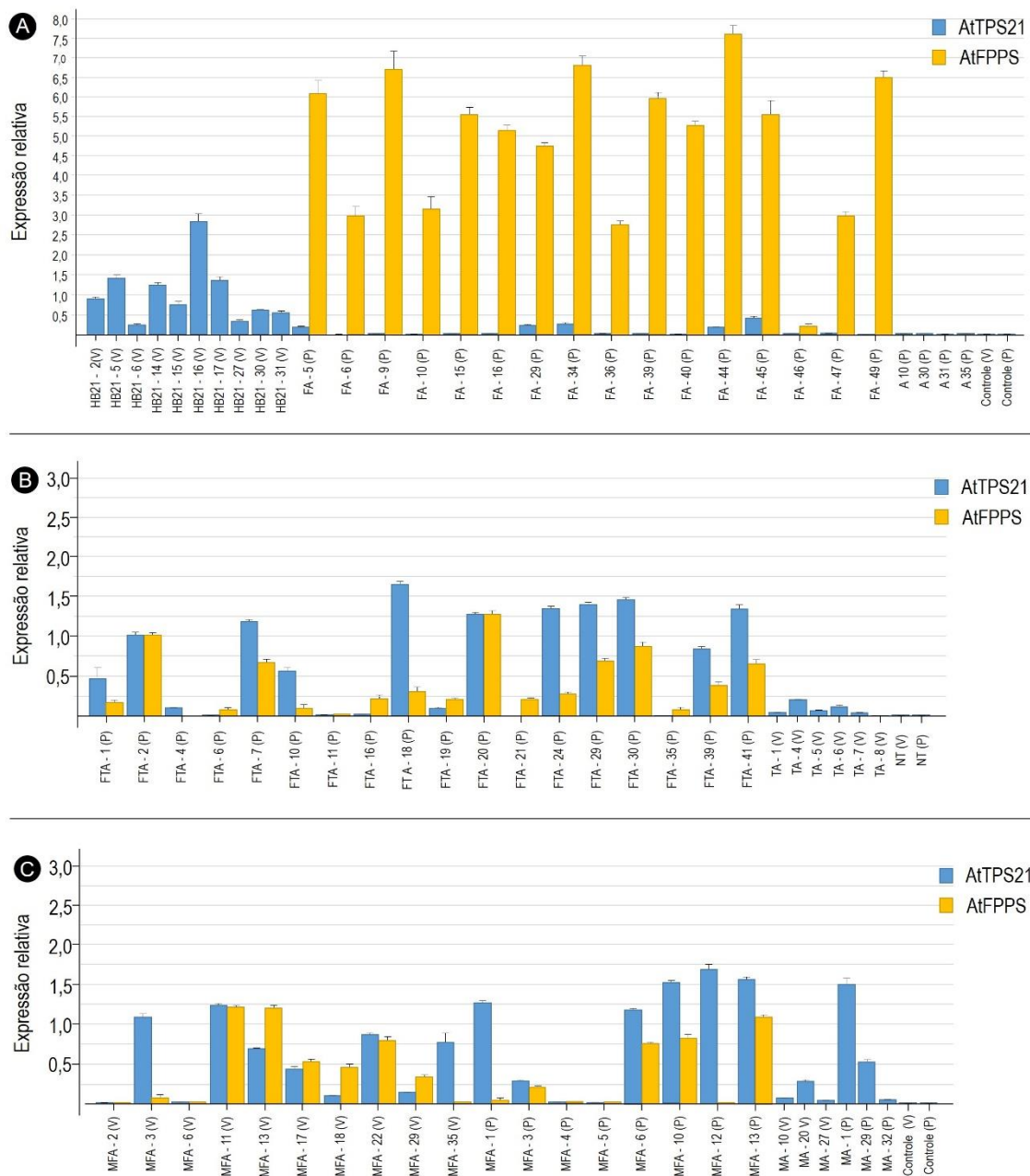


(Fonte: o autor)

## 4.2 Análises de expressão gênica

A avaliação dos transcritos do(s) transgene(s) foi efetuada em todos os eventos obtidos (Tabela 2). Os níveis de expressão relativa do gene *AtTPS21* foram variáveis nos eventos para as diferentes construções (Figura 17). Transcritos do(s) gene(s) foram detectados em 78 eventos. O restante dos eventos apresentou transcritos em quantidades muito baixas ou mesmo ausência de expressão. Os eventos HB21 da variedade Valência foram os que apresentaram os maiores níveis de expressão de *AtTPS21*. Os eventos HB21 da variedade Pera por serem os últimos eventos obtidos, não atingiram estágio para análise. Os eventos FA, apresentaram baixo nível de expressão relativa para *AtTPS21*, porém alto nível de expressão de *AtFPPS*, fato não observado nas demais plantas que tiveram o gene *AtFPPS* inserido (construção FTA e MFA).

**Figura 17.** Expressão gênica relativa dos genes *AtTPS21* e *AtFPPS* em eventos de laranja doce geneticamente modificados das variedades Pera (P) e Valência (V) com cassetes para direcionamento dos produtos ao citosol (**A**; eventos HB21, FA e A); plastídios (**B**; eventos FTA e TA) e à mitocôndria (**C**; eventos MFA e MA).

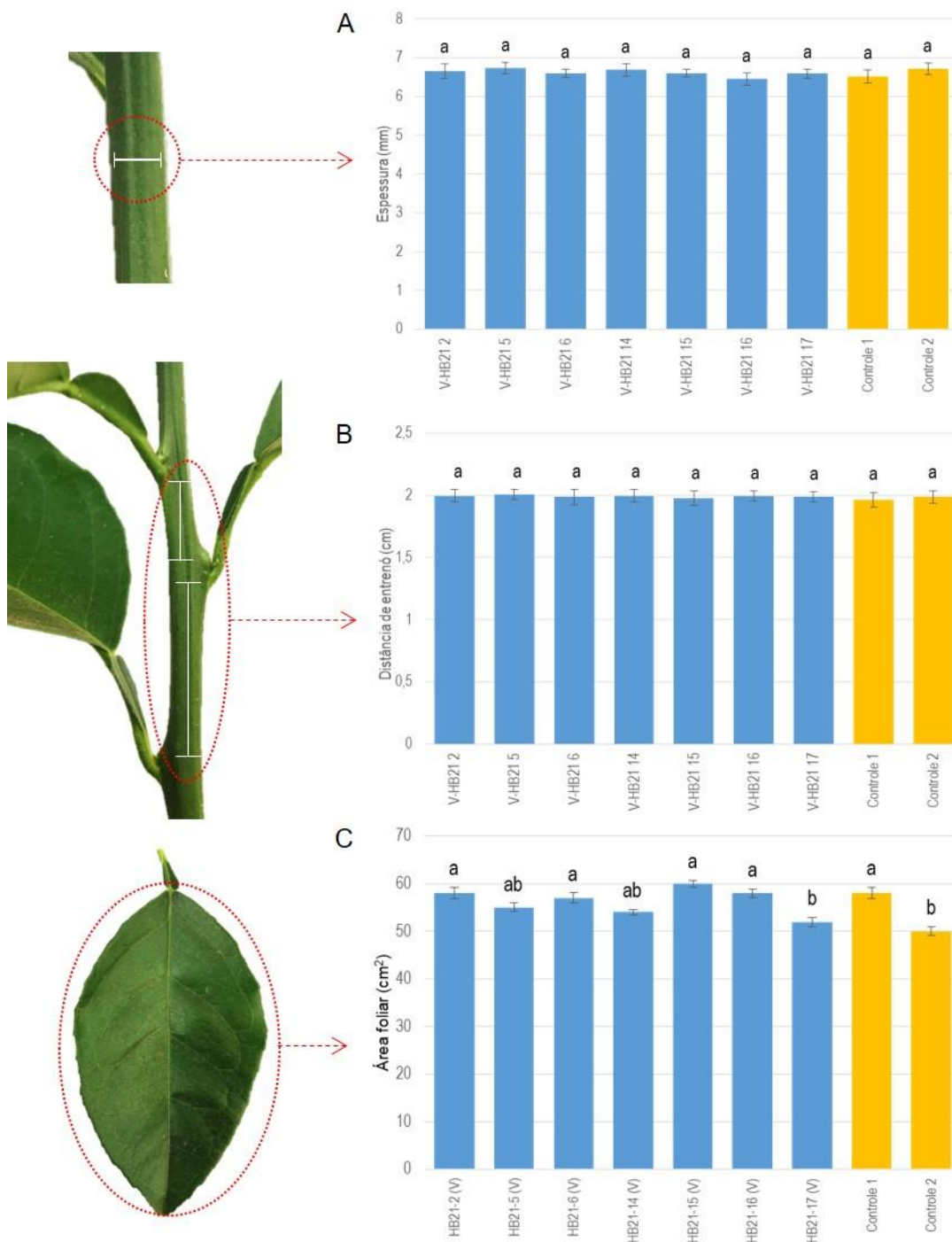


Devido ao fato dos eventos GM com a construção HB21, da variedade Valência (identificados com os números 2, 5, 6, 14, 15, 16 e 17), terem sido os únicos a mostrarem resultados que os diferenciavam dos controles nas demais análises, os próximos resultados estarão restritos a estes eventos.

### **4.3 Análise de fenótipo**

As plantas de laranja doce das variedades Valência dos eventos HB21 avaliadas visualmente mostraram arquitetura, desde tamanho das plantas, formato das folhas e copa, indistinguíveis das plantas não transformadas e dos controles vetor vazio. Os resultados obtidos nas avaliações métricas também mostraram ausência de anormalidade fenotípica (Figura 18).

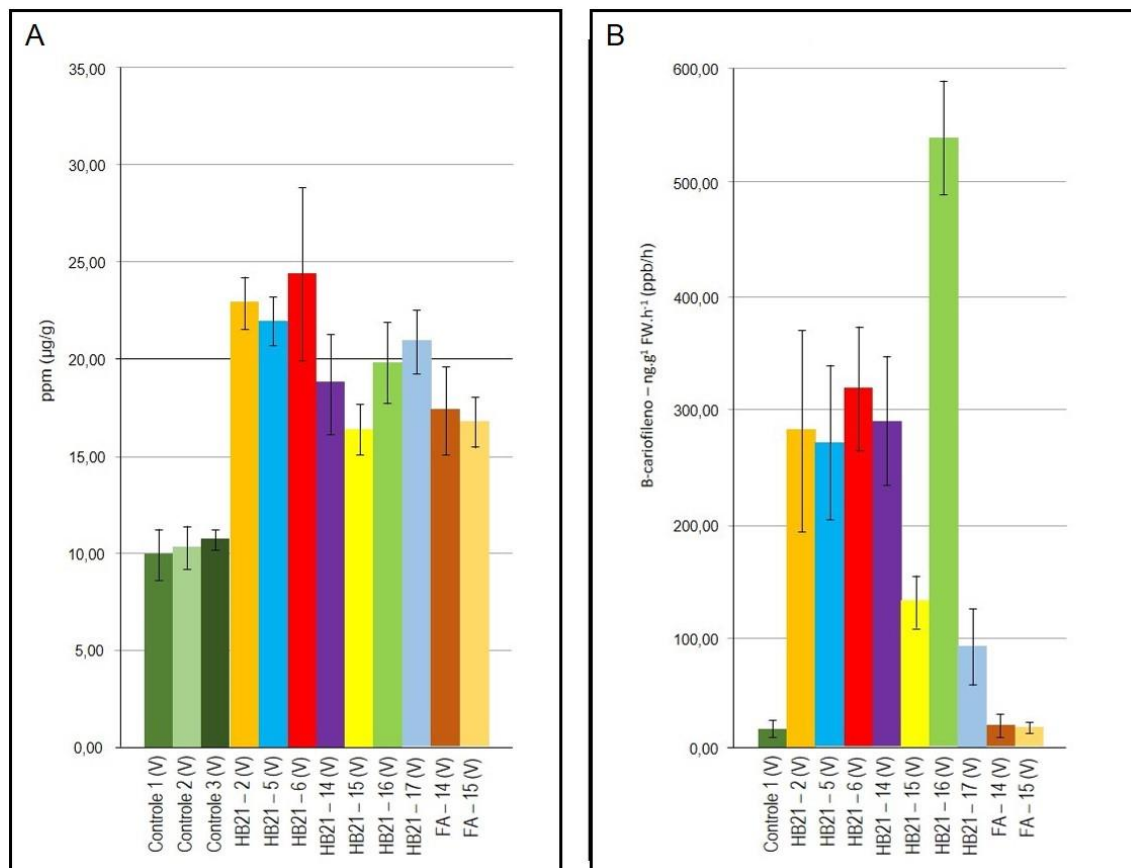
**Figura 18.** Medidas da espessura do caule, distância entre entrenós e área foliar de plantas GM da variedade Valência, construção HB21, e plantas controle vetor vazio. As barras seguidas de mesma letra indicam não diferirem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).



#### 4.4 Análise química de conteúdo e emissão de terpenos

Plantas de todos os eventos foram avaliadas para o acúmulo de compostos sesquiterpênicos voláteis em folhas, com ênfase na quantificação do  $\beta$ -cariofileno. Sete eventos HB21 na variedade Valência e dois eventos FA na variedade Valência apresentaram conteúdo de  $\beta$ -cariofileno notadamente acima dos controles (Figura 19 A). Por outro lado, somente plantas dos eventos HB21 apresentaram taxas de emissão de sesquiterpenos, particularmente de  $\beta$ -cariofileno, em quantidade significativamente superior ao controle, com destaque para o evento HB21-16. Nas plantas dos dois eventos FA a emissão de  $\beta$ -cariofileno manteve-se nos mesmos níveis do controle (Figura 19 B). Devido ao número elevado de plantas e tempo necessário para análise de emissão de voláteis, somente uma fração das plantas foi avaliada quanto a emissão de terpenos. As plantas que não foram mostradas, ou não tiveram quantidades marcantes de sesquiterpenos nas análises ou não foram amostradas.

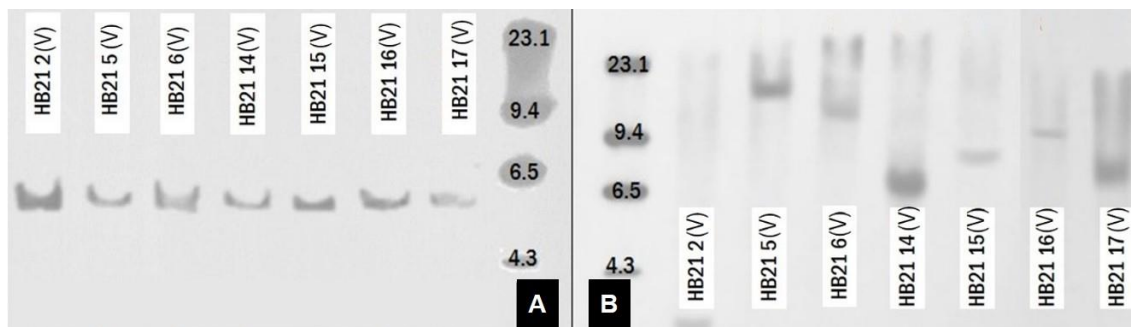
**Figura 19.** Conteúdo de  $\beta$ -cariofileno em ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) acumulado nas folhas de laranjeira (A) e emissão de  $\beta$ -cariofileno a partir de ramos de laranjeira (em  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$  (ppb/h) (B).



#### 4.5 Determinação do número de cópias via Southern Blotting

Os eventos que apresentaram acúmulo de  $\beta$ -cariofileno foram avaliados em Southern blotting para obtenção do número de cópias e da integridade do T-DNA inserido no genoma. Todos os eventos apresentaram apenas uma cópia íntegra do transgene (Figura 20).

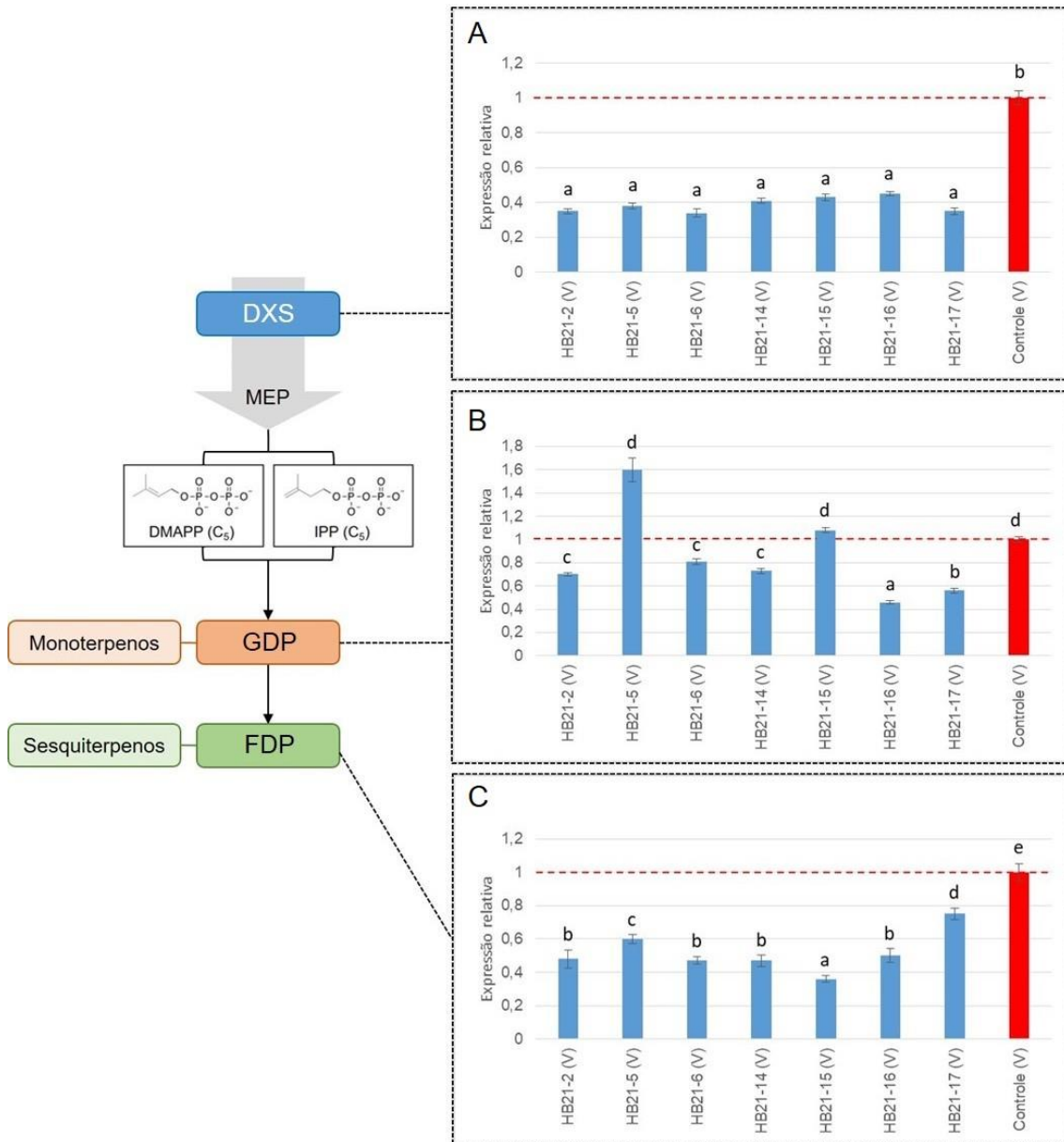
**Figura 20.** Southern blotting para avaliação da integridade do T-DNA (A) e número de cópias (B) dos eventos HB21.



#### 4.6 Análises de expressão gênica dos precursores endógenos de citros

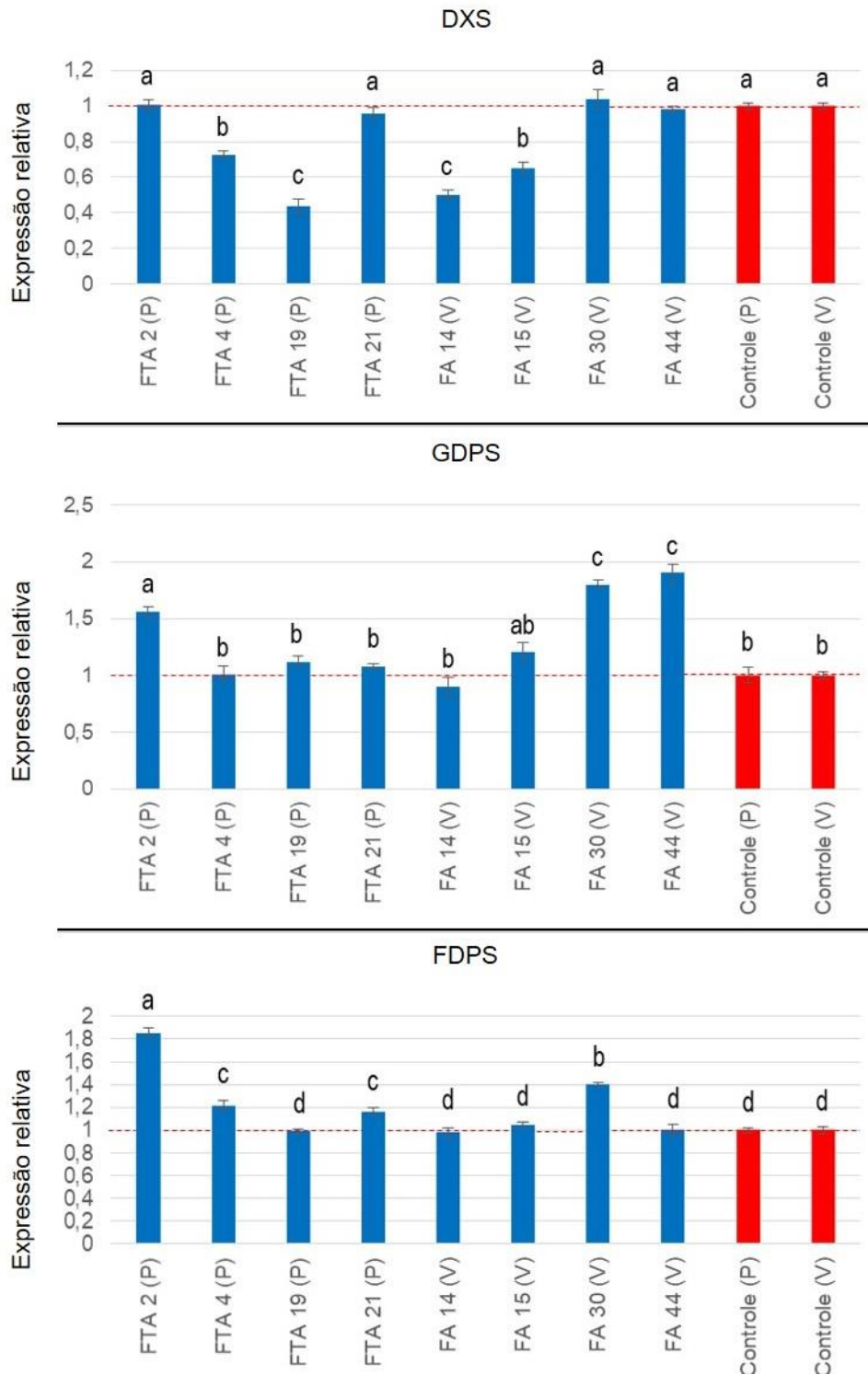
A análise dos transcritos dos genes da via do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) dos eventos de laranja doce Valência com incremento na emissão de  $\beta$ -cariofileno evidenciou a sub-expressão do gene da *1-deoxixilulose 5-fosfato sintase* – *DXS*. De forma semelhante, a *geranyl difosfato sintase* – *GDPS* foi subexpressa na maioria dos eventos, exceto nos eventos HB21-5 e 15. A expressão da *farnesil difosfato sintase* - *FPPS* foi subexpressa em níveis variáveis nos distintos eventos (Figura 21).

**Figura 21.** Análise de expressão gênica nos eventos HB21 (Valência) para os genes de laranja *DXS* (A), *GDPS* (B) e *FPPS* (C). A linha tracejada em vermelho é apenas uma referência do controle para as demais amostras. As barras seguidas de letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).



Quando analisados outros eventos, poucos apresentaram sub-expressão de algum dos três genes ou mesmo superexpressão (Figura 22). Os demais eventos não tiveram alteração na expressão destes genes.

**Figura 22.** Análise de expressão gênica de eventos que também apresentaram diferenças nos níveis de expressão para os genes de laranja *DXS*, *GDPS* e *FDPS*. A linha tracejada em vermelho é apenas uma referência do controle para as demais amostras. As barras seguidas de letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).



#### 4.7 Avaliação do título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas com superexpressão do $\beta$ -cariofileno

Após 60 dias da data de inoculação, apenas uma planta do evento HB21-15 foi positiva para *Ca. L. asiaticus*. Após esta coleta, todas as plantas foram podadas para emissão de novas brotações. A terceira análise ocorrida aos 90 dias pós-inoculação foi positiva na qPCR para praticamente todos os eventos e controle, e a maioria dos eventos e controles apresentavam plantas com sintomas de mosqueado, principalmente nos ramos novos (Figura 23). Aos 120 dias, os valores de Ct foram menores e similares entre os tratamentos (Tabela3).

**Tabela 3.** Valores de Ct obtidos na qPCR nas avaliações de 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação via borbulha. Amostras com valores de Ct menores ou iguais a 35,0 são consideradas 'positivas' para a presença de *Ca. L. asiaticus*.

	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
V-HB21 5 (1)	-	-	23,9	21,2
V-HB21 5 (2)	-	-	23,9	19,4
V-HB21 5 (3)	-	-	22,5	18,1
V-HB21 5 (4)	-	-	24,6	22,1
V-HB21 5 (5)	-	38,4	24,1	22,0
V-HB21 5 (6)	-	-	24,2	20,1
V-HB21 5 (7)	-	-	22,3	18,0
V-HB21 5 (8)	-	-	24,9	22,2
V-HB21 15 (1)	-	-	23,9	19,6
V-HB21 15 (2)	-	-	23,9	20,0
V-HB21 15 (3)	-	33,0	23,0	19,5
V-HB21 15 (4)	-	-	26,0	21,2
V-HB21 15 (5)	-	-	23,3	20,3
V-HB21 15 (6)	-	-	22,3	18,2
V-HB21 15 (7)	-	-	24,8	20,9
V-HB21 15 (8)	-	38,3	24,4	21,4
V-HB21 16 (1)	-	39,4	22,7	21,1
V-HB21 16 (2)	-	-	36,5	26,6
V-HB21 16 (3)	-	-	23,7	19,1
V-HB21 16 (4)	-	-	21,1	17,9
V-HB21 16 (5)	-	-	36,9	29,9
V-HB21 16 (6)	-	-	23,0	19,1
V-HB21 16 (7)	-	-	24,5	20,5
V-HB21 16 (8)	-	36,3	21,1	16,8
V-NT 42 (1)	-	-	23,3	20,4
V-NT 42 (2)	-	-	22,2	20,0
V-NT 42 (3)	-	38,2	22,4	19,8
V-NT 42 (4)	-	-	23,3	20,7
V-NT 42 (5)	-	-	22,3	19,1
V-NT 42 (6)	-	-	23,0	20,9
V-NT 42 (7)	-	-	22,0	16,5
V-NT 42 (8)	-	-	22,5	20,0

O símbolo '-' representa valor de Ct indeterminado.

**Figura 23.** Folhas de plantas GM HB21 inoculadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* apresentando sintomas de mosqueado.

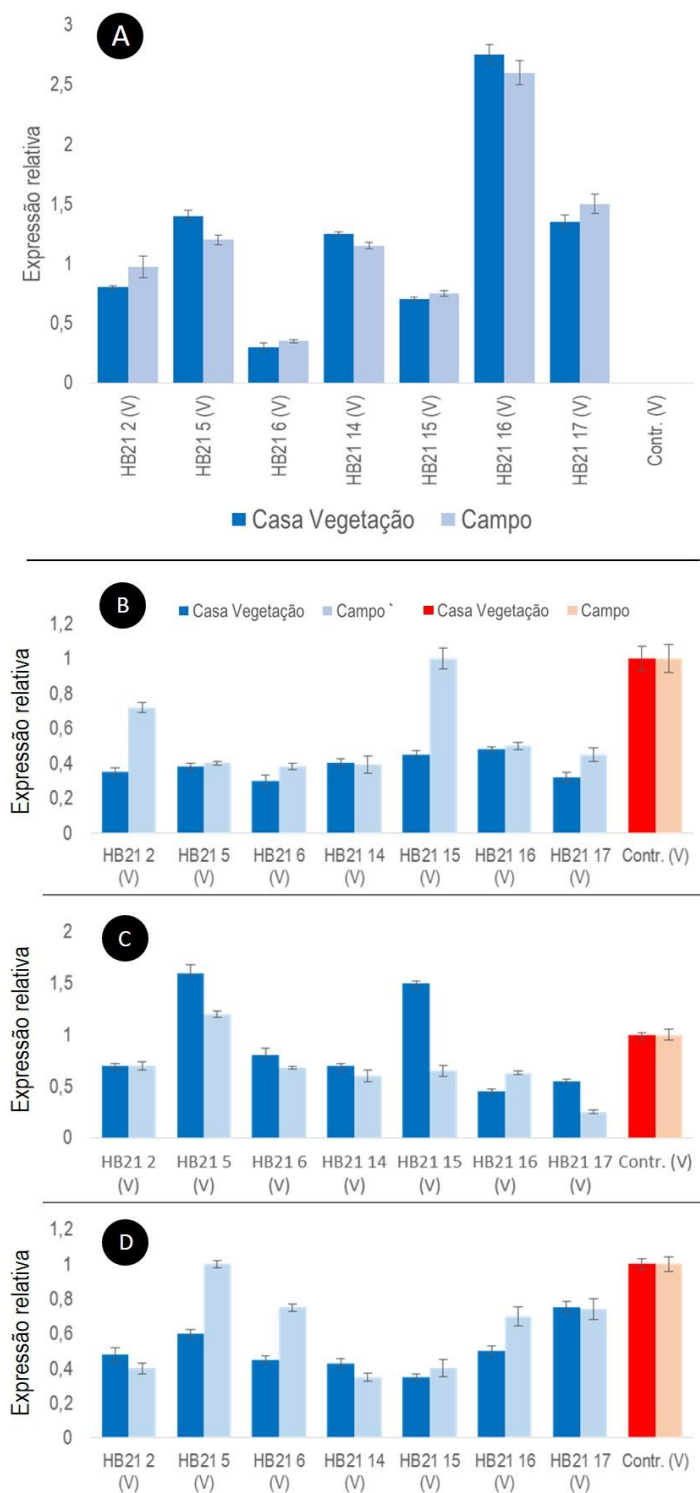


(Fonte: o autor)

#### **4.8 Análise de expressão gênica pós-plantio**

As avaliações de expressão gênica, das plantas de Valência transformadas com a construção HB21, apresentaram resultados similares aos obtidos em casa de vegetação, não havendo alterações significativas nos níveis de expressão para o gene *AtTPS21*. Avaliações para os genes *DXS*, *GDPS* e *FPPS* apresentaram pequenas alterações nos níveis de expressão (Figura 24).

**Figura 24.** Comparação dos níveis de expressão gênica relativa obtidos em plantas mantidas em casa de vegetação *versus* plantas após sete meses de plantio em campo. Níveis de expressão de *AtTPS21* (A), e dos transcritos endógenos de citros *DXS* (B), *GDPS* (C) e *FPPS* (D). As barras seguidas letras diferentes indicam que os eventos diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).



## 5 DISCUSSÃO

O HLB, pior doença da citricultura, continua invadindo novas áreas de citros nos países produtores, sendo a mais grave ameaça à indústria de suco (BOVÉ, 2006). Em 2015 o psílideo *Trioza erytrae* foi detectado na península ibérica, representando real ameaça à citricultura do mediterrâneo. Devido à falta de alternativa para cura e a impossibilidade de convivência com a doença no campo, gerando perda de produtividade, depreciação do suco e alto custo no manejo do pomar, diversos produtores migraram para novas culturas ou mesmo abandonaram seus pomares. Até o momento fontes de resistência genética à bactéria são limitadas a gêneros de rutáceas sem compatibilidade sexual, o que, aliado à complexidade genética da espécie, alta heterozigosidade, período juvenil prolongado, entre outros fatores, trazem dificuldades às aplicações do melhoramento convencional.

O método mais eficaz de combate ao HLB é o controle químico de *D. citri*. Frequentes aplicações de inseticidas resultam no decréscimo da população do inseto em pelo menos 80% e, por consequência, reduz significativamente a transmissão de *Ca. Liberibacter* sp. (BASSANEZI et al., 2013). O crescente uso de inseticidas, porém, torna a cultura de citros onerosa e pouco sustentável, frente à crescente preocupação com o meio ambiente. O emprego da biotecnologia, gerando plantas geneticamente modificadas, é visto como solução ao avanço assolador do HLB (RICHARDSON & HALL 2013; DURÁN-VILA et al., 2015). Entretanto, até que eventualmente plantas GM resistentes ou tolerantes ao HLB possam ser geradas, é estritamente recomendado que os produtores mantenham as ações de manejo do HLB, de forma a manter a maior parte dos pomares com níveis suportáveis de HLB (BOVÉ, 2012).

A possibilidade de gerar plantas que, ao mesmo tempo sejam eficientes contra o avanço do HLB e proporcionem uma citricultura sustentável, diminuindo a frequência de aplicações de agroquímicos, é um objetivo almejado por toda a cadeia citrícola. Com este propósito, plantas de laranja doce das variedades Pera e Valência foram transformadas geneticamente para produção do sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno com o objetivo de repelir o psílideo *D. citri*, vetor de *Ca. Liberibacter* spp.. O emprego de órgão vegetal com tecido maduro para transformação genética é a primeira vantagem da metodologia aqui empregada.

Após 48 meses da formação da muda geneticamente modificada, já é possível avaliar floração e frutificação dos eventos, o que no caso de órgãos ainda em período juvenil, tomaria ao menos o dobro de tempo (PEÑA et al., 2008). Três estratégias foram empregadas no intuito de aumentar a expressão e produção do sesquiterpeno, cada uma delas direcionando o produto da expressão do(s) gene(s) para um compartimento celular diferente: mitocôndria, plastídeos, além do citosol, onde majoritariamente os sesquiterpenos são produzidos nas plantas. O direcionamento da produção de terpenos ao plastídeo, permitiu notável acúmulo de patchoulol em tabaco, o que não aconteceu quando a produção foi direcionada ao citosol (WU et al., 2006). A produção compartimentalizada pode evitar possíveis efeitos tóxicos devido à acumulação de sesquiterpenos no citosol, podendo comprometer o desenvolvimento da planta (KAPPERS et al., 2005). Em nosso caso, não foram observados efeitos deletérios nas estratégias empregadas. Eventos com produto direcionado ao citosol e que continham íntrons em seu gene, foram os que atingiram melhores resultados.

### 5.1 Expressão gênica de *AtTPS21* e *AtFPPS*

Das plantas dos eventos cujos produtos foram direcionados aos plastídeos (FTA e TA), mitocôndria (MFA e MA) ou citosol (FA, A e HB21), aproximadamente 30% apresentaram expressão do(s) gene(s) de *Arabidopsis*. Nestas plantas geneticamente modificadas com genes *AtTPS21* para produção de  $\beta$ -cariofileno, com ou sem cassete de *AtFPPS*, os níveis de expressão foram importantes apenas para comparação entre os eventos, não sendo possível correlacionar se estes níveis são realmente significativos quando comparados aos controles, já que eventos com vetor vazio não possuem o(s) gene(s). Plantas controle foram utilizadas para composição dos cálculos de expressão, sendo consideradas amostras negativas. Dos 266 eventos obtidos, 78 (29%) apresentaram níveis de expressão significativos quando comparados com os demais, tanto para *AtTPS21*, *AtFPPS* ou para ambos. O restante dos eventos não gerou transcritos do(s) gene(s) ou apresentou quantidades muito baixas. A não expressão pode estar relacionada ao local de inserção no genoma vegetal, inserção parcial ou truncada do T-DNA, assim como silenciamento decorrente do número de cópias do T-DNA (veja mais no item 5.3). Sendo a expressão

gênica um fator de seleção para os testes químicos, estes eventos foram descontinuados. Nenhuma matriz foi descartada, mantendo para futuros testes, caso seja necessário.

Os eventos FA apresentaram em geral baixos níveis de expressão de *AtTPS21*, mas chama a atenção os altos níveis de expressão de *AtFPPS*, o que não ocorreu nas demais construções. A opção de usar adicionalmente uma FPP sintase é fundamentada em diversos trabalhos onde a expressão adicional de uma *FPPS* elevou a síntese de sesquiterpenos em plantas GM (WU et al., 2006). Não foi observado nas plantas cítricas GM distinção no aumento dos níveis de expressão de *AtTPS21* em função da presença de uma FPP sintase. A quantidade de terpenos também não mostrou incremento nesta estratégia (vide item 5.2). Por outro lado, eventos HB21 apresentaram expressão de *AtTPS21* em níveis elevados, embora de maneira não homogênea. Sesquiterpenos têm sua biossíntese majoritariamente localizada no citosol, corroborando os bons resultados obtidos nestes eventos. Exceção se fez na construção A, onde a detecção de transcritos foi baixa ou nula.

Os níveis de expressão dos genes precursores dos terpenos foram avaliados em plantas dos eventos que apresentaram alterações na produção de sesquiterpenos, notadamente na produção de  $\beta$ -cariofileno. Nos eventos da variedade Valência HB21 foram observados menores níveis de expressão dos genes *DXS*, *GDPS* e *FPPS* comparados ao controle, exceto nos eventos 5 e 15, que não mostraram diferença estatística quanto ao controle para o gene *GDPS*. Monoterpenos são sintetizados principalmente pela via MEP, controlando quantitativamente sua produção, através do fornecimento de IPP e DMAPP (MUNOZ-BERTOMEU et al., 2006; BATTILANA et al., 2011; DUDAREVA et al., 2013). *DXS* é considerada a enzima limitante no fluxo da via MEP, portanto, a expressão gênica de *DXS* tem relação direta com o conteúdo de monoterpenos, afetando também a expressão de *GDPS* (XIE et al., 2008; BATTILANA et al., 2009), estando sujeita a regulação negativa por feedback (GUEVARA-GARCIA et al., 2005). Quando observados os incrementos no conteúdo e emissão de  $\beta$ -cariofileno, acima do que é produzido por uma planta não GM, é possível que haja um deslocamento de recursos para compensar este aumento de produção, resultando num menor nível de expressão de outros precursores, a partir de *DXS*, uma vez que enzimas, unidades de IPP e até mesmo substratos podem

ser trocados entre compartimentos celulares na via dos terpenos (MCGARVEY & CROTEAU, 1995; ROHMER, 1999; KAPPERS et al., 2008). Desta forma, o incremento na geração de transcritos e consequente produção de sesquiterpenos, pode estar refletido na expressão desde *DXS*, que por consequência alterará a expressão de *GDPS* e *FPPS*.

Corroborando com esta possibilidade, eventos FTA, TA, MFA, MA, FA e A que não apresentaram incremento no conteúdo ou na emissão de  $\beta$ -cariofileno, também não apresentaram diminuição na expressão de *DXS*, *GDPS* e *FPPS*, com poucas exceções. Nagata e colaboradores (2002) observaram em *Arabidopsis* mutantes com ausência da enzima *DXS*, que vários compostos da via MEP eram sintetizados na via MVA, como forma de compensar a falta dos produtos da outra via. Da mesma forma, Schwarz e Arigoni (1999) já haviam relatado a formação de ginkgolides – lactonas terpênicas presentes em *Ginkgo biloba* – a partir de MVA, mesmo este sendo um composto naturalmente produzido a partir de MEP, deixando mais evidente a dinâmica troca de compostos entre as vias, a fim de compensar eventuais deficiências.

Até o momento, este possível desbalanço na expressão dos genes, não refletiu em prejuízo ao desenvolvimento das plantas que, ao serem analisadas estatisticamente quanto às características fenotípicas, não diferiram das plantas controle.

## 5.2 Análises químicas para conteúdo e emissão de terpenos

Nas análises de conteúdo químico e emissão de compostos sesquiterpênicos, foi possível a comparação frente a controles vetor vazio. Embora a emissão de sesquiterpenos em citros seja baixa (em torno de 18% do total de compostos volatilizados),  $\beta$ -cariofileno pode ser detectado em todos os órgãos da planta (ALQUÉZAR et al., 2017).

Na análise dos extratos obtidos com hexano, eventos FTA e TA não apresentaram acúmulo superior de compostos mono e sesquiterpênicos quando comparados às plantas controle, mesmo nos eventos com bons níveis de expressão dos genes. Eventos MFA e MA seguiram a mesma tendência. Dois eventos FA e sete HB21 na variedade Valência, acumularam compostos sesquiterpênicos em quantidade superior aos controles, com destaque para  $\beta$ -

cariofileno, composto com maior acúmulo e produto direto da ação enzimática da sesquiterpeno sintase codificada pelo gene *AtTPS21*.

Os resultados de emissão dos eventos Valência HB21 foram coerentes com a quantificação para conteúdo – embora a emissão tenha sido maior que o acúmulo – superando as taxas de emissão de  $\beta$ -cariofileno para o controle em todas as amostras. De maneira oposta, os dois eventos FA, apesar de um maior acúmulo de  $\beta$ -cariofileno, emitiram na mesma proporção que o controle. Llusà e Peñuelas (2000) também relatam diferenças entre acumulado e emitido em plantas lenhosas, que podem ocorrer, entre outros fatores, pela conversão do produto acumulado em outros compostos, não sendo então volatilizado. Da mesma forma, Zeng e colaboradores (2016) demonstraram que alguns compostos monoterpênicos encontrados em extratos de solventes, não puderam ser detectados em sua porção volátil.

Os resultados demonstrados, principalmente na emissão de  $\beta$ -cariofileno, colocam os eventos HB21 como potenciais plantas repelentes a *D. citri*. Como já demonstrado por Alquézar e colaboradores (2017), plantas de *A. thaliana*, neutras ao psílídeo, tornaram-se repelentes quando expressavam e emitiam  $\beta$ -cariofileno constitutivamente.

Para maior confiança e solidez dos resultados, os eventos HB21 foram propagados por meio de enxertia, podados, e conduzidos a produzirem brotações em estágio de maior preferência para *D. citri*. Em testes de olfatométrica realizados no Laboratório de Ecologia Química do Fundecitrus, voláteis destes eventos foram oferecidos a fêmeas de *D. citri* juntamente com ar puro (odor neutro). Como já foi demonstrado, plantas cítricas, especialmente brotações com folhas jovens, liberam grande quantidade de voláteis com forte influência sobre o comportamento de adultos de *D. citri*, sendo atraentes especialmente para fêmeas (WENNINGER et al., 2009; NORONHA JR., 2010; SETAMOU, 2010; MANN et al., 2012). Os resultados obtidos nos testes de olfatométrica mostraram o efeito repelente do  $\beta$ -cariofileno produzido pelos eventos HB21, onde fêmeas apresentaram clara preferência ao odor neutro, nos sete eventos testados, superando a forte atratividade das brotações (ALQUÉZAR et. al., artigo submetido).

Quando comparados às plantas transformadas com vetor vazio, bem como com plantas da variedade Valência que não foram geneticamente modificadas,

os eventos HB21 não apresentaram diferenças fenotípicas, não sendo possível distinguir visualmente plantas GM e não GM. Ao avaliar variáveis como espaçamento de internódios, espessura dos ramos e área foliar, diferença estatística não foi obtida, mostrando que o aumento na produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno – mesmo nas plantas onde se detectou diminuição do nível de transcritos dos genes *DXS*, *GDPS* e *FPPS* – não acarretou em prejuízo ao desenvolvimento das plantas.

Ao final da redação deste trabalho, todos os eventos HB21 da variedade Valência, mantidos em casa de vegetação, já apresentavam floração e alguns já haviam produzido frutos, inclusive as plantas controle. Visualmente não foram notadas diferenças morfológicas nas flores, tampouco no tamanho e formato dos frutos.

### **5.3 Avaliação do número de cópias por Southern blotting**

O silenciamento de transgenes é preconizado como um sistema de defesa da planta frente a sequências de DNA ou RNA exógenas, ocorrendo com frequência em eventos de transformação (MATZKE & MATZKE, 1998; DOMÍNGUEZ et al., 2002). Múltiplas cópias do transgene estão associadas com a baixa expressão, assim como podem resultar em silenciamento do T-DNA no genoma da planta (HOBBS et al., 1990). No processo de obtenção de plantas geneticamente modificadas, o número de cópias integradas do transgene no genoma da planta é um dos principais fatores de seleção de eventos, dando preferência para eventos com uma ou duas cópias. Desta forma, os eventos HB21 na variedade Valência foram avaliados quanto à integração e número de cópias do T-DNA. Posteriormente, eventos FTA, TA, MFA, MA FA e A, foram selecionados aleatoriamente e submetidos ao Southern blotting, para avaliação de possível correspondência do baixo número de transcritos, do não-acúmulo e/ou emissão de  $\beta$ -cariofileno à ocorrência de múltiplas cópias do transgene. Destes eventos, grande parte possuía duas ou mais cópias, alguns chegando a 5 cópias. O efeito do número de cópias no silenciamento gênico foi observado no evento FTA – 21 (Pera) onde na primeira análise de expressão gênica, foram detectados transcritos para ambos os genes. Após 24 meses, uma segunda análise foi realizada havendo ausência de transcritos de *AtTPS21*, e um nível de

expressão mais baixo para *AtFPPS* comparado ao primeiro teste. Na avaliação de Southern, o evento apresentou três cópias íntegras e uma parcial do T-DNA.

Os sete eventos HB21 apresentaram apenas uma cópia íntegra do T-DNA, bem como os eventos FA-14 e FA-15 (Valência), que tiveram acréscimo no conteúdo de  $\beta$ -cariofileno.

#### **5.4 Avaliação do título de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de laranja doce com superprodução de $\beta$ -cariofileno**

Nas plantas, diversas classes de terpenos atuam na defesa contra estresses bióticos e abióticos, na atração de polinizadores ou na sinalização às plantas vizinhas por plantas que sofrem herbivoria (BALANDRIN et al., 1985, DUDAREVA et al., 2006). Linhagens de *A. thaliana* com ausência de  $\beta$ -cariofileno sintase mostraram maior crescimento bacteriano em estigmas florais, além de danos nas sementes, enquanto linhagens geneticamente modificadas para emissão constitutiva de  $\beta$ -cariofileno se mostraram mais resistentes às infecções e produziram sementes em maior quantidade (HUANG et al., 2011). Yamagiwa et al., (2011) relataram que plantações de couve-chinesa (*Brassica rapa pekinensis*), colonizadas pelo fungo *Talaromyces* sp., tiveram aumento significativo no crescimento das plântulas e na resistência a *Colletotrichum higginsianum* devido ao  $\beta$ -cariofileno liberado pelo fungo. Em citros, cultivares relatados como tolerantes ao HLB apresentam quantidades superiores de sesquiterpenos, indicando possível efeito antimicrobiano destes compostos à *Ca. L. asiaticus* (HIJAZ et al., 2013). Killiny et al., (2017 e 2018) também discutiram a possibilidade do  $\beta$ -cariofileno, conferir tolerância à *Ca. L. asiaticus*.

Nos testes conduzidos em casa de vegetação, as 24 plantas GM dos eventos HB21-5, 15 e 16 apresentaram resultado positivo na detecção de *Ca. L. asiaticus* nas análises de qPCR, 90 dias após a inoculação. O tempo na detecção molecular da bactéria e aparecimento de sintomas foliares não diferiu em relação às plantas controles. O título bacteriano, avaliado indiretamente pelos valores de Ct obtidos não diferiu entre as plantas controle e os eventos GM com incremento no conteúdo de  $\beta$ -cariofileno. Portanto, o incremento no acúmulo e emissão de  $\beta$ -cariofileno parece não exercer papel bactericida ou bacteriostático sobre *Ca. L. asiaticus*.

## 5.5 Plantio de eventos HB21 (Valência) em campo experimental

O plantio em campo foi realizado em dezembro de 2018 e representa uma importante etapa de avaliação dos eventos. Nos sete primeiros meses em área experimental, as plantas estiveram expostas a intemperes do ambiente, bem como a insetos e pragas. Nesta primeira análise, não houve modificação nos resultados de detecção dos transcritos do gene *AtTPS21*. Continuação dos testes será necessária para avaliar o comportamento das plantas GM no campo, assim como para avaliar seu efeito repelente.

## 5.6 Considerações finais

A utilização de genes para produção de  $\beta$ -cariofileno, em especial *AtTPS21* é uma ferramenta promissora contra o avanço do HLB. Os resultados obtidos nas plantas GM contendo o cassete da construção HB21 reforçam os resultados demonstrados por Alquézar et al., (2017b) utilizando *Arabidopsis* superexpressando  $\beta$ -cariofileno. Em *Arabidopsis* tipo selvagem (WT), a emissão de  $\beta$ -cariofileno é exclusiva das flores e, juntamente com  $\alpha$ -humuleno, compõem os dois principais compostos emitidos por este órgão vegetal (CHEN et al., 2003; THOLL et al., 2005). A utilização de promotor constitutivo (CaMV35S) possibilitou a produção por todos os tecidos da planta que, juntamente à superexpressão do gene, proporcionou uma emissão de até 600 vezes deste sesquiterpeno comparado ao controle WT, havendo por consequência, a repelência de fêmeas de *D. citri* quando expostas aos voláteis de *Arabidopsis* GM (ALQUÉZAR et al., 2017b).

Outros autores haviam demonstrado repelência de plantas contra pragas pela utilização da engenharia genética, pelo incremento na emissão de compostos sesquiterpênicos. Uma variedade hexaplóide de trigo foi modificada geneticamente, direcionando a produção do sesquiterpeno (E)- $\beta$ -farneseno aos plastídeos, utilizando (E)- $\beta$ -farneseno sintase de hortelã-pimenta. Três espécies de pulgões que atacam o trigo foram repelidas em ensaios laboratoriais (BRUCE et al., 2015). Bhatia et al., (2015) superexpressaram o precursor sesquiterpênico *farnesil difosfato sintase2* (*FDS2*) no citosol de *Arabidopsis*, além de direcionarem o produto translacional aos plastídeos, obtendo ganho na síntese

de alguns sesquiterpenos, entre eles o (E)- $\beta$ -farneseno. Como resultado, bioensaios com voláteis ou extratos da planta mostraram repelência ao afídeo *Myzus persicae*.

É notável o desempenho no acúmulo e emissão de  $\beta$ -cariofileno nos eventos com a construção HB21 quando comparados aos eventos Pera e Valência transformados com as outras construções utilizadas neste trabalho. Uma vez que na construção HB21 está ausente o precursor *FPPS*, é desconsiderado seu papel no desempenho destes eventos, assim como da presença deste gene não houve condição *sine qua non* para um melhor resultado das construções que o possuíam (FTA, MFA e FA). Os resultados com incremento no acúmulo de  $\beta$ -cariofileno para a construção FA não foram uniformes entre os eventos e não houve emissão relacionada ao maior acúmulo deste composto.

Pode-se considerar a presença dos íntrons como um fator preponderante no desempenho desta construção. O fenômeno denominado *intron-mediated enhancement*, no qual os íntrons podem aumentar a expressão gênica, a estabilidade de transcrição, bem como a eficiência da tradução de mRNA em muitos eucariotos, inclusive plantas (GALLEGOS & ROSE, 2015; LAXA, 2017; AKUA & SHAUL, 2013), pode explicar a diferença dos resultados entre as construções. Alguns autores demonstraram uma correlação com o número de íntrons e a estabilidade do mRNA em *Arabidopsis thaliana*, além de humanos e ratos (DUAN et al., 2013; SHAROVA et al., 2009; NARSAI et al., 2007). Em mamíferos e plantas, íntrons próximos a promotores tendem a aumentar a eficiência da transcrição (SAMADDER et al., 2008). Entretanto, os mecanismos de atuação dos íntrons na expressão gênica ainda não são totalmente compreendidos (SHAUL, 2017). Da mesma forma, estudos mais aprofundados são necessários para compreender o papel dos íntrons na construção HB21.

Com a recente descrição e caracterização funcional de sete sesquiterpeno sintases de *Citrus sinensis* (ALQUÉZAR et al., 2017a), torna-se viável a reprodução dos experimentos de transformação genética descritos neste trabalho utilizando sesquiterpeno sintase de laranjeira doce para produção de  $\beta$ -cariofileno, beneficiando-se dos resultados obtidos com *AtTPS21*. A reinserção de um gene clonado a partir da própria planta é viável, como demonstrado em *Arabidopsis* superexpressando uma *AtTPS*, levando ao acréscimo na emissão

de  $\beta$ -cariofileno. Ademais, essa estratégia poderia representar vantagem frente à resistência existente em diversos países às plantas geneticamente modificadas, por se tratar de cisgenia - procedimento que envolve o melhoramento genético, utilizando genes de espécies que podem ser cruzadas naturalmente (CIB, 2019).

## 6 CONCLUSÃO

- Eventos com direcionamento dos produtos ao citosol foram os que apresentaram acúmulo superior de compostos sesquiterpênicos, com destaque para o  $\beta$ -cariofileno, quando comparados aos eventos controle.
- Eventos HB21 emitiram  $\beta$ -cariofileno em quantidades superiores aos eventos controle.
- O aumento na produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno parece demandar recursos diminuindo a expressão de outros genes, como *DXS*, *GDPS* e *FPPS*.
- Nas avaliações do fenótipo, não houve diferença estatística em relação aos mesmos parâmetros avaliados nos controles vetor vazio.
- Estudos complementares devem ser realizados para compreender o papel dos íntrons nas construções HB21.
- Aparentemente, o precursor *AtFPPS* não foi relevante para o incremento de transcritos e consequente aumento na síntese de  $\beta$ -cariofileno.
- Após sete meses expostas às condições de campo, os eventos HB21 continuam expressando o gene *AtTPS21* nos mesmos níveis observados em ambiente controlado.

## REFERÊNCIAS

- AKUA T., SHAUL O. (2013). The *Arabidopsis thaliana* MHX gene includes an intronic element that boosts translation when localized in 5' UTR intron. *J. Exp. Bot.*, 64(14) (2013), pp.4255-4270.
- ALQUÉZAR B., VOLPE H., MAGNANI R.F., MIRANDA M.P., SANTOS M.A., MARQUES V.V., ALMEIDA M.R., WULFF N.A., TING H., SCHUURINK R., BOUWMEESTER H., PEÑA L.A. Engineered orange octopically expressing the *Arabidopsis*  $\beta$ -caryophyllene synthase is repelente to *Diaphorina citri*, the vector of the detrimental bacterial pathogen that causes Huanglongbing. *Plant Biotech. Journal*, p.37 (submetido).
- ALQUÉZAR, B., RODRÍGUEZ, A., PEÑA, M., PEÑA, L., 2017a. Genomic Analysis of Terpene Synthase Family and Functional Characterization of Seven Sesquiterpene Synthases from *Citrus sinensis*. *Frontiers in plant Science*, 8 (August), pp.1–20.
- ALQUÉZAR, B., VOLPE, H.X.L., MAGNANI, R.F., MIRANDA, M.P., SANTOS, M.A., WULFF, N.A., BENTO, J.M.S., PARRA, J.R.P., BOUWMEESTER, H., PEÑA, L. 2017b.  $\beta$ -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacters*. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1–9.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J. (1990). Basic alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403-410.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. (1985). Natural plants chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, v.228, p.1154-1160.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GIMENES-FERNANDES, N. (2013). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing on Young sweet orange plantings. *Plant Disease*, v.97, p.789-796.
- BATTILANA, J., COSTANTINI, L., EMANUELLI, F., SEVINI, F., SEGALA, C., MOSER, S., et al. (2009). The 1-deoxy-dxylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 118, 653–669. doi: 10.1007/s00122-008-0927-8
- BATTILANA, J., EMANUELLI, F., GAMBINO, G., GRIBAUDO, I., GASPERI, G., BOSS, P. K., et al. (2011). Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-

phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. *J. Exp. Bot.* 62, 5497–5508. doi: 10.1093/jxb/err231

BHATIA V., MAISNAM J., JAIN A., SHARMA K.K., BHATTACHARYA R. (2015). Aphid-repellent pheromone E- $\beta$ -farnesene is generated in transgenic *Arabidopsis thaliana* over-expressing farnesyl diphosphate synthase2. *Ann Bot.* 2015 Mar; v.115(4), p.581-91. doi: 10.1093/aob/mcu250. Epub 2014 Dec 22. PubMed PMID: 25538111; PubMed Central PMCID: PMC4343287.

BOVÉ, J.M. (2006). Hunglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.*, v.88, p.7-37.

BOVÉ, J.M. (2012). Huanglongbing and the future of citrus in São Paulo State, Brazil. *J. Plant Pathol.* V.94(3), p.465-467.

BRUCE T.J.A., ARADOTTIR G.I., SMART L.E., MARTIN J.L., CAULFIELD J.C., DOHERTY A., SPARKS C.A., WOODCOCK C.M., BIRKETT M.A., NAPIER J.A., JONES H.D., PICKETT J.A. (2015). The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defence. *Sci Rep.* 2015 Jun 25;5:11183. doi: 10.1038/srep11183. PubMed PMID: 26108150; PubMed Central PMCID: PMC4480004.

BUD R. *The Uses of Life: A History of Biotechnology.* Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 27, 301p.

CHEN, FENG.; THOLL, D.; D'AURIA, J.C.; FAROOQ, A.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Cell*, v.15, p.481-494.

CHEN F., Tholl D., D'AURIA J.C., FAROOQ A., PICHERSKY E., GERSHENZON J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell.* 2003 Feb;15(2):481-94. doi: 10.1105/tpc.007989. PubMed PMID: 12566586; PubMed Central PMCID: PMC141215.

CIB (2019). Conselho de Informações sobre Biotecnologia, in: <https://cib.org.br/tag/cisgenia> (acesso em 15/08/2019).

CIFUENTES-ARENAS J.C., GOES A., MIRANDA M.P., BEATTIE G.A.C., LOPES S.A. (2018). Citrus flush shoot ortogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. *PloS ONE* 13(1): e0190563.

CLUSTER, P., O'DELL, M., METZLAFF, M., FLAVELL, R.B. (1996). Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 32: 1197-1203.

CUNILLERA N., BORONAT A., FERRER A. (1996). *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(13):7774-7780.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. (1983). A plant minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Report*. v.1, p.19-20.

DOMÍNGUEZ, A.; FAGOAGA, C.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. (2002). Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular Genetics and Genomics* v.267, p.544–556.

DUAN J.B., SHI J.X., GE X.J., DOLKEN L., MOY W., HE D.L., SHI S., SANDERS A.R., ROSS J., GEJMAN P.V. (2013). Genome-wide survey of interindividual differences of RNA stability in human lymphoblastoid cell lines. *Sci. Rep.*3, 1318.

DUDAREVA, N., KLEMPIEN, A., MUHLEMANN, J. K., AND KAPLAN, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol*, v.198, p.16–32. doi: 10.1111/nph.12145

DURAN-VILA, N.; BOVÉ, J. (2015). Citrus HLB is an emerging disease transmitted by psyllid vectors. Can it be prevented? If not, can it be managed? *International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies, Watch let* (June), p.1–9.

EMBRAPA (2019) in: <https://www.embrapa.br/tema-transgenicos/perguntas-e-respostas> (acesso em 22/04/2019)

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G.A., VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I., PRIETOSAMSÓNOV, D.L., PÉREZ, M. AND SELMAN-HOUSEIN, G. (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnología Aplicada* 14:169-174

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G.A., VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I., PRIETO-SAMSONOV, D.L., DE LA RIVA, G.A. & SELMAN-HOUSSEIN, G. (1998). Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* v.206, p.20-27.

GALLEGOS J.E., ROSE A.B. (2015). The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci.*, v.237, p.8-15.

GUEVARA-GARCIA, A.; ROMÁN, C.S.; ARROYO, A.; CORTÉS, M.E.; GUTIÉRREZ-NAVA, M.L.; LEÓN, P. (2005). Characterization of the *Arabidopsis*

clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. *The Plant Cell*, v.17, p.628-643.

HANSEN M., LAUSTSEN A. M., OLSEN C. E., POLL L., SØRENSEN H., 1997. Chemical and sensory quality of broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*). *Journal of Food Quality*, v.20, p.441-459.

HERRERA-ESTRELLA L., VAN DEN BROECK G., VAN MONTAGU M., SCHREIER P. et al.,(2000). Chimaeric gene coding for a transit peptide and heterologous peptide. US Patent 6,063,601

HIJAZ, F., EL-SHESHENY, I., KILLINY, N., (2013). Herbivory by the insect *Diaphorina citri* induces greater change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Signal Behav* 8, e25677.

HOBBS, S.L.A., KPODAR, P., DELONG, C.M.O. (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.*, v.15, p.851-864.

HUANG, M.; SANCHES-MOREIRAS, A.M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENSON, J.; THOLL, D. (2011). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- $\beta$ -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.*, v.193(4), p.997-1008.

ISAA (2018). Brief 54: Global Status Commercialized Biotech/GM Crops: 2018. (<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/default.asp>). Acesso em: 04/02/2019.

KAY R., CHAN A., DALY M., MCPHERSON J. (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, v.236, Issue 4806 p.1299-1302.

KAPPERS I.F., AHARONI A., LUCKERHOFF L.L.P., DICKE M., BOUWMEESTER H.J., HERPEN T.W.J.M. (2005). Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, v.309, p.2070–2072

KAPPERS IF, DICKE M, BOUWMEESTER HJ (2008). Terpenoids in plant signalling, chemical ecology. In: *Biology TP* (ed) Wiley Encyclopedia of Chemical Begley. Wiley, Hoboken, p 1–8.

KILLINY N., HIJAZ F., EL-SHESHENY I., ALFARESS S., JONES S. E., ROGERS M. E. (2017). Metabolomic analyses of the haemolymph of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, the vector of huanglongbing. *Physiol. Entomol.*, v.42, p.134–145.

KILLINY N., JONES S.E., NEHELA Y., HIJAZ F., DUTT M., GMITTER F.G., GROSSER J.W. (2018). All roads lead to Rome: Towards understanding different avenues of tolerance to huanglongbing in citrus cultivars. *Plant Phys. and Bioch.* v.129, p.1-10.

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

KOBAYASHI, S., UCHIMIYA, H. AND IKEDA, I. (1983) Plant regeneration from Trovita orange protoplasts. *Japanese Journal of Breeding*, v.33, p.119–122.

KOBAYASHI, A.K., BESPALHOK, J.C., PEREIRA, L.F.P., & VIEIRA, L.G.E. 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.74(1), p.99-102.

KÖHLER R.H., ZIPFEL W.R., WEBB W.W., HANSON M.R. (1997) The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *Plant Journal*, v.11, p.613-621.

KONCZ C, MARTINI N, SZABADOS L, HROUDA M, BACHMAIR A, SCHELL J (1994) In: Gedvin S.B, Schilperoort RA, Verma DPS (eds) *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic, Dordrecht (in press).

KOVÁTS, E. (1965) Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In *Advances in Chromatography 1* (J. C. Giddings and R. A. Keller, eds.). Dekker, New York, p. 229–247.

LAXA M. (2017). Intron-mediated enhancement: a tool for heterologous gene expression in plants? *Front. Plant. Sci.*, v.7, p.1977.

LI W, HARTUNG JS, LEVY L (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *J Microbiol Methods.*, v.66(1), p.104-15;

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, v.25(4), p.402–408.

LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. (1980) Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-Tip Culture. Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society, v.30, p.421-427.

LLUSIA, J., PEÑUELAS, J., 2000. Seasonal Patterns of terpene content and emission from seven mediterranean woody species in field conditions. *American Journal and Botany*, v.87(1), p.133–140.

MAFRA, V., KUBO K.S., ALVES-FERREIRA M., RIBEIRO-ALVES M., STUART R.M., BOAVA L.P., RODRIGUES C.M., MACHADO M. A. (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS ONE*, 7(2).

MCGARVEY, P B; KAPER, J.M., 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques*, v.11, p.428–432.

MCGARVEY DJ, CROTEAU R (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, v.7, p.1015-1026

MUNOZ-BERTOMEU, J., ARRILLAGA, I., ROS, R., AND SEGURA, J. (2006). Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.*, v.142, p.890–900. doi: 10.1104/pp.106.086355

NARSAI R., HOWELL K.A., MILLAR A.H., O'TOOLE N., SMALL I., WHELAN J. (2007) Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, v.19(11), p.3418-3436.

MATZKE, A.J.M., MATZKE, M.A. (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Pin. Plant Biol.*, v.1, p.142-148.

MANN R.S., ALI J.G., HERMANN S.L., TIWARI S., PELZ-STELINSKI K.S., ALBORN H.T., STELINSKI L.L. (2012). Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PlosPathogens*, San Francisco, v.8, n.3, p.1-13.

NAGATA N., SUZUKI M., YOSHIDA S., MURANAKA T. (2002). Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta*, v.216, p.345-350.

NAVARRO L., 1992. Citrus shoot tip grafting in vitro. *Biotechnology in Agr. and Forestry*, v.18, p.327–38

NAVARRO L., ROISTACHER C.N., MURASHIGE T., 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus free citrus, *Americ. Soc. Hort. Sci.*, v.100, p.471-79.

NORONHA Jr., N.C. (2010). Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psilidae). 72p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

PEÑA, L., CERVERA, M., FAGOAGA, C., ROMERO, J., BALLESTER, A., SOLER, N., PONS, E., RODRÍGUEZ, A., PERIS, J., JUÁREZ, J., NAVARRO, L. (2008). *Citrus*. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-405-16708-6.

RICHARDSON, M.L. & HALL, D.G., 2013. Resistance of poncirus and citrus × poncirus germplasm to the *Asian citrus psyllid*. *Crop Science*, v.53(1), p.183–188.

RODRÍGUEZ A., SHIMADA T., CERVERA M., ALQUÉZAR B., GADEA J., GÓMEZ-CADENAS A., DE OLLAS C.J., RODRIGO M.J., ZACARÍAS L., PEÑA L. (2013). Terpene Down-Regulation Triggers Defense Responses in Transgenic Orange Leading to Resistance Against Fungal Pathogens. *Plant Phys.* v.164, p.321-339.

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

ROHMER, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep.*, v.16, p.565-574.

SAMADDER P., SIVAMANI E., LU J.L., LI X.G., QU R.D. (2008). Transcriptional and pos-transcriptional enhancement of gene expression. By the 5' UTR intron of rice *rub13* gene in transgenic rice cells. *Mol. Genet. Genomics*, v.279 (4), p.429-439.

SCHWARS M., ARAGONI D. (1999) Ginkgolide biosynthesis. In: Barton SD, Nakanishi K, Menth-Cohn O, Cane DE (eds) *Comprehensive natural products chemistry*. Vol. 2. Isoprenoids including carotenoids and steroids. Elsevier, Amsterdam, p.367-401.

SHAROVA L.V., SHAROV A.A., NEDOREZOV T., PIAO Y., SHAIK N., KO M.S.H. (2009). Database for mRNA half-life of 19,977 genes obtained by DNA

microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.*, v.16(1), p.45-58.

SHAUL O. (2017). How introns enhance gene expression. *The Int. Journ. Bioch. & Cell Biol.*, v.91, part B, p.145-155.

TRIJATMIKO K.R., ARINES F.M., OLIVA N., SLAMET-LOEDIN I.H., KOHLI A. (2016) Molecular Analyses of Transgenic Plants. In: MacDonald J., Kolotilin I., Menassa R. (eds) *Recombinant Proteins from Plants. Methods in Molecular Biology*, vol 1385. Humana Press, New York, NY.

THOLL D., CHEN F., PETRI J., GERSHENZON J., PICHERSKY E. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* 2005 Jun; v.42(5), p.757-71.

TORRES, A.C., FERREIRA, A.T., SÁ, F.G., BUSO, J.A., CALDAS, L.S., NASCIMENTO, A.S., BRÍGIDO, M.M., ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília: Embrapa-CNPq, 2000. p.128.

WENNINGER, E.J., STELINSKI, L.L., HALL, D.G. (2009). Relationships Between Adult Abdominal Color and Reproductive Potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, v.102, n.3, p.476-483.

WU S., SCHALK M., CLARK A., MILES R.B., COATES R., CHAPPELL, J. (2006) Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat. Biotechnol.*, v.24, p.1441–1447.

XIE, Z., KAPTEYN, J., AND GANG, D. R. (2008). A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant J.* v.54, p.349–361.

YAMAGIWA, Y.; INAGAKI, Y.; ICHINOSE, Y.; TOYODA, K.; HYAKUMACHI, M.; SHIRAISHI, T. (2011). *Talaromyces wortmannii* FS2 emits  $\beta$ -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *J. Gen. Plant Pathol.*, v.77, p.336-341.

ZENG, X.; LIU, C.; ZHENG, R.; CAI, X.; LUO, J.; ZOU, J.; WANG, J. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Cell*, v.15. p.481-494.

## CAPÍTULO 3

### EXPRESSÃO DE TERPENO SINTASES DE LARANJEIRA DOCE (CsTPS) EM *Arabidopsis thaliana* PARA SUPEREXPRESSÃO DE $\beta$ -CARIOFILENO

#### 1 INTRODUÇÃO

O aparecimento da mais devastadora doença dos citros nos dois maiores produtores mundiais de laranja, trouxe à tona um problema vivido por produtores de laranja de outras partes do mundo que já enfrentavam o HLB: a falta de solução para um problema tão grave. Não existem medidas de controle que sejam efetivas ou métodos curativos (BELASQUE Jr et al., 2009). Nem mesmo a poda drástica de ramos afetados é eficiente para conter a colonização da bactéria na planta (LOPES et al., 2007). O uso de ferramentas biotecnológicas no combate a doenças e pragas na agricultura, trouxe nova perspectiva aos pomares. Os resultados obtidos nos eventos HB21 geneticamente modificados (GM), são frutos da inovação biotecnológica e trazem a possibilidade da reprodução dos resultados em campo.

O efeito repelente do  $\beta$ -cariofileno foi demonstrado em *Arabidopsis* GM para incremento na emissão de  $\beta$ -cariofileno, tornando a planta, naturalmente neutra à *D. citri*, em repelente. O composto comercial  $\beta$ -cariofileno liberado a partir de dispensadores químicos em baixas doses também foi suficiente para causar repelência em fêmeas de *D. citri*. (ALQUÉZAR et al., 2017b).

Baseando-se no efeito que as goiabeiras produziram sobre os psilídeo nos pomares do Vietnã, laranjeiras GM para incremento na produção e emissão de  $\beta$ -cariofileno se mostraram repelentes quando seus voláteis foram ofertados a fêmeas de *D. citri* (ALQUÉZAR et al., artigo submetido). As fêmeas são as mais atraídas pelo odor das laranjeiras, tanto na busca de alimento como na busca de brotações para ovipositarem (NORONHA JR, 2010). O gene de *AtTPS21* de *Arabidopsis thaliana*, propiciou o aumento de transcritos e a produção de  $\beta$ -cariofileno em laranjeiras. Como os resultados mostraram, o incremento na emissão deste sesquiterpeno foi suficiente para suplantiar o efeito atrativo que compostos voláteis causam nos psilídeos, bem demonstrados na literatura

(WENNINGER et al., 2009; NORONHA JR, 2010; PATT & SÉTAMOU, 2010; MANN et al., 2012; ZHAO et al., 2013).

A descrição de novas terpeno sintases de citros, abre a possibilidade da geração de plantas GM contendo genes da própria laranjeira. Até 2016, 21 terpeno sintases do gênero *Citrus* (*CsTPS*) haviam sido descritas, sendo 18 para monoterpenos e apenas 3 para sesquiterpenos (NASCIMENTO, 2016). Alquézar e colaboradores (2017b) caracterizaram sete *CsTPS* responsáveis pela produção de sesquiterpenos. Esta caracterização em nível funcional, a partir da expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e em ensaios enzimáticos *in vitro* tendo FPP como substrato, possibilitou identificar os produtos gerados por cada *CsTPS*. As informações geradas foram essenciais para a escolha da terpeno sintase utilizada na etapa de construção de um cassete de transformação contendo *CsTPS* que produz majoritariamente  $\beta$ -cariofileno, como proposto neste trabalho. Para tanto, foi escolhido o clone *CsSesquiTPS6b* (acesso nº MF280926), do gene *orange1.1t004360*, cujo produto majoritário da atividade catalítica é  $\beta$ -cariofileno ( $73,51 \pm 0,26\%$  do total) juntamente com  $\alpha$ -humuleno ( $23,14 \pm 0,30\%$  do total). Os trabalhos de transformação, bem como expressão gênica e análises químicas, foram realizados em *Arabidopsis thaliana*, referência para estudos biológicos, tendo seu genoma, metabolismo e método de transformação bem caracterizados (DELATORRE & SILVA 2008; KOORNNEEF & MEINKE, 2010) e por ser um organismo de ciclo curto, otimizando o tempo de obtenção dos resultados, além de não ter o background de terpenos presente em citros.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Construção de cassetes de transformação contendo o gene TPS de citros (*CsTPS*) para transformação genética de *Arabidopsis thaliana* obtendo a superexpressão e emissão de  $\beta$ -cariofileno.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Clonar a sesquiterpeno sintase de laranjeira doce Valência que produza majoritariamente o  $\beta$ -cariofileno em vetores binários.

i) obter o clone com a sequência codificante do RNA mensageiro;

ii) obter o clone genômico cromossomal, contendo a sequência codificante do gene com os íntrons nativos do gene.

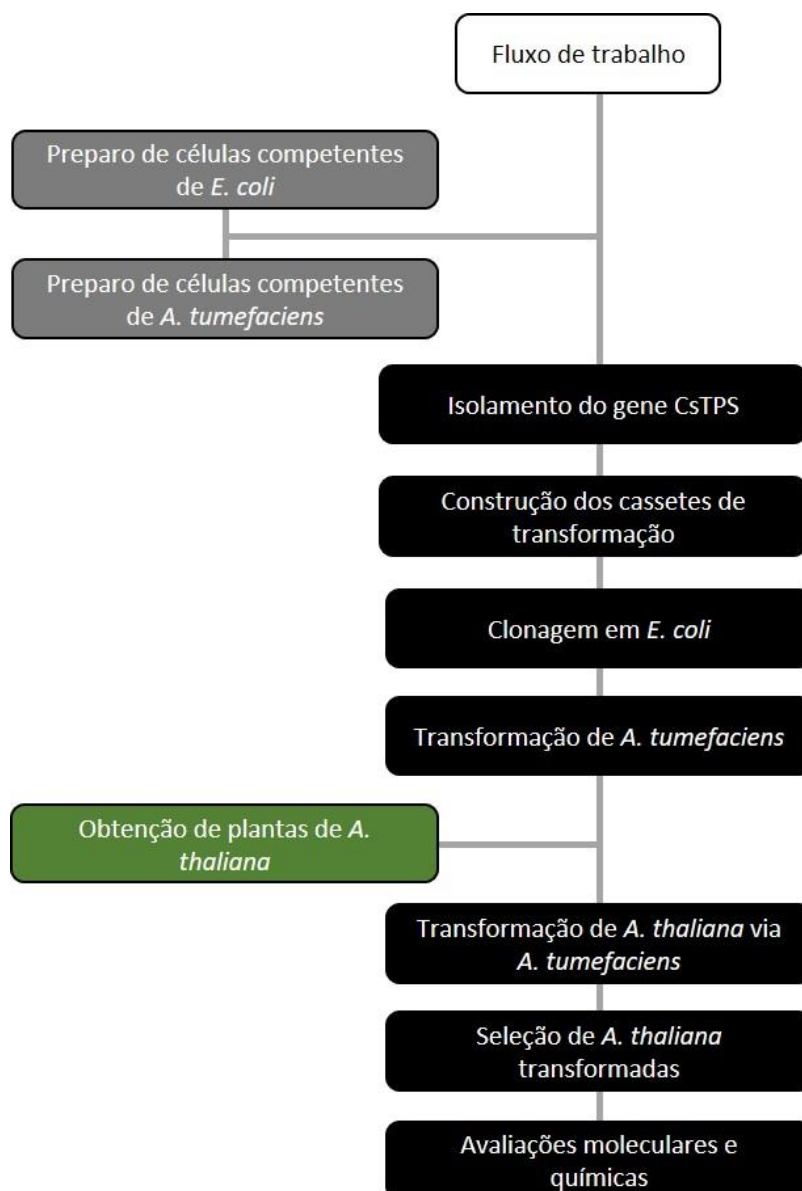
2. Obter plantas de *Arabidopsis thaliana* contendo os cassetes de expressão (T-DNA) mediante transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*.

3. Avaliar a expressão gênica e a taxa de emissão de  $\beta$ -cariofileno em *Arabidopsis* GM comparando as estratégias de expressão da *CsTPS* contendo ou não íntrons.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos para obtenção das construções gênicas e posterior transformação e caracterização do gene *CsTPS* em *A. thaliana*, foram realizados no laboratório de Biotecnologia do Fundecitrus, conforme esquema da Figura 25.

**Figura 25.** Fluxo de trabalho para obtenção dos cassetes de transformação, transformação genética e avaliação das plantas GM.



(Fonte: o autor)

### **3.1 Preparo de bactérias para transformação**

#### **3.1.1 Preparo de células competentes de *E. coli* para eletrotransformação**

Uma colônia isolada de *E. coli* da linhagem DH5 $\alpha$  foi crescida em 10 mL de meio Luria Bertani (LB) a 37 °C por 16 h, sob agitação. Após o crescimento, os 10 mL foram incubados em 1 L de meio LB a 37 °C, sob agitação, até atingir DO<sub>600nm</sub> de 0,6. A cultura foi incubada por 30 minutos em gelo e centrifugada a 5000 x *g* por 5 minutos. O pélete foi então ressuscitado em 1 litro e 0,5 litro de água estéril consecutivamente, obtendo-se péletes por centrifugação a cada ressuspensão. Uma última centrifugação foi realizada, ressuscitando o pélete em 20 mL de glicerol 10% estéril e estocado em alíquotas de 50  $\mu$ L em tubos eppendorf, a -80 °C.

#### **3.1.2 Preparo de células competentes de *A. tumefaciens***

Uma colônia isolada de *A. tumefaciens* da linhagem EHA105 foi obtida após repique em meio (LB) contendo 50  $\mu$ g de rifampicina e crescida em 10 mL de LB com o mesmo antibiótico a 28 °C por 24 h, sob agitação. Após este período, 8 mL desta cultura foi adicionado a 200 mL de LB e incubado em shaker até atingir DO<sub>600nm</sub> de 1,0. A cultura foi então mantida em gelo por 1 h e centrifugada a 6000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O pélete resultante foi ressuscitado em 5 mL de CaCl<sub>2</sub> gelado, distribuído em alíquotas de 100  $\mu$ L em tubos eppendorf e estocado a -80 °C até o momento de uso.

### **3.2 Isolamento do gene *CsTPS***

Para obtenção do gene *CsTPS* a partir do cDNA, o RNA total de folhas de laranja Valência foi extraído com reagente TRIzol (Invitrogen, protocolo segundo fabricante), sendo utilizado um grama de tecido vegetal por amostra. As folhas em estágio V4 foram trituradas em nitrogênio líquido e imediatamente foi adicionado 5 mL de TRIzol reagente. Adicionou-se 1 mL de clorofórmio, e após descanso de três minutos, as amostras foram submetidas a centrifugação a 8.000 x *g* por 30 minutos (4 °C). Os sobrenadantes foram transferidos para

novo tubo juntamente com isopropanol (v/v), homogeneizados por inversão e mantidos em descanso por 10 minutos. Após centrifugação a 8.000 g por 20 min, obteve-se precipitado que foi lavado com 1 mL de etanol 70% e novamente submetido a centrifugação a 8.000 g por 10 min. O pélete final foi seco parcialmente e hidratado em 70 µL de água DEPC. Adicionalmente, alíquotas de 1 µg de RNA foram tratadas com DNase (Turbo DNA free, Ambiom), para remoção de contaminantes de DNA. O RNA foi submetido à transcriptase reversa empregando-se *primers* universais oligo(dT) e N6 e a enzima ImpromII™ (Promega), utilizando-se 5 µL do RNA total, 1 µL de RNase OUT (Invitrogen), 0,5 µM de primer, 0,25 mM de dNTPs, tampão ImpromII 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 20 µL. A síntese ocorreu a 42 °C por 1 h e a inativação da enzima se deu por incubação de 70 °C por 5 minutos.

Para a obtenção do *CsTPS* a partir do DNA genômico (gDNA), folhas de laranjeira Valência foram submetidas à extração de DNA pelo método CTAB (MCGARVEY, P.B. & KAPER 1991).

A PCR foi empregada para obtenção da *CsTPS* tendo como molde tanto o cDNA como o DNA, foram utilizados os *primers* CsCS2\_F (5' GCGCCGTCTCGCTCGAATGAGGGATCTTAAGAGTGTTTC 3') e CsCS2\_R (5' GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTTACATGGGAAGAGGATCAAC 3'). As reações de PCR foram realizadas utilizando 1 µL de DNA (~200 ng) em tampão da enzima 1x, 0,5 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador e 0,4 µL da enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB), em volume final de 25 µL. As condições para amplificação foram de um ciclo de 30 segundos a 98 °C e 10 segundos a 98 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 98 °C, 30 segundos a 60 °C, dois minutos e meio a 72 °C e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. O produto da amplificação obtido na PCR foi purificado utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

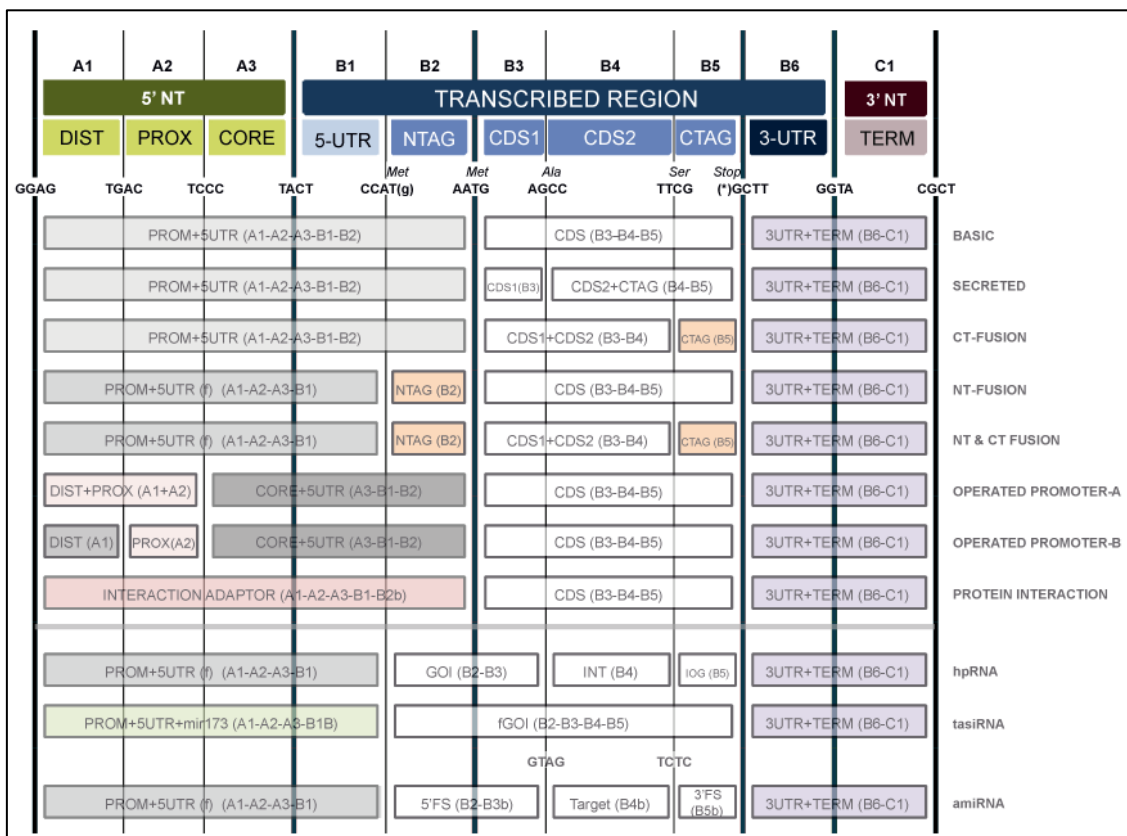
### 3.3 Construção dos cassetes de transformação

Os cassetes foram construídos utilizando o sistema *Golden Braid 3.0* (<https://gbcloning.upv.es/>), que possibilita a construção modular de estruturas de DNA multigênicas formando cassetes para engenharia genética de plantas (SARRION-PERDIGONES et al., 2011). O sistema é baseado em enzimas de

restrição do tipo IIS (*Bsal*, *BsmBI* e *BtgZI*), onde quatro plasmídeos (chamados pDGBs) funcionam em modelos de blocos, que combinados binariamente geram construções multigênicas. As unidades transcricionais (TU) são montadas e unidas para formar o cassete de transformação.

Todo o processo é planejado com a ferramenta de software 'GB Domesticator'. São definidas através do software, as partes ou 'blocos' que vão compor a construção (Figura 26), constando qual tipo de promotor, terminador e qual o tipo de marcador de seleção será utilizado. Os plasmídeos contendo blocos de cada construção são cedidos pela Universidade Politécnica de Valência (Espanha) e as partes são montadas em sequências de digestão e clonagem.

**Figura 26.** Conjunto de blocos disponíveis conforme a estratégia de construção escolhida. Para as construções *CsTPS* foi escolhida a opção *basic*.



(Fonte: <https://gbcloning.upv.es/>)

### 3.3.1 Domesticação do gene *CsTPS*

Domesticação é o termo utilizado para a primeira clonagem no vetor universal pUPD2. Para a domesticação do gene de interesse a partir do molde cDNA e gDNA, 40 ng do produto da PCR com o fragmento do gene *CsTPS* amplificado foram digeridos com 5-10 U de *BsmBI* (NEB), 3 U de T4 ligase (Promega), 1 µL de ligase buffer e 75 ng de pUPD2. As reações foram realizadas em termociclador em 25 ciclos de 37 °C por 2 minutos e 16 °C por 5 minutos. Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α foram transformadas utilizando 3 µL da reação de clonagem. Após crescimento em 800 µL de meio LB a 37 °C sob agitação, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 25 µg/mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol, 0,5 mM de IPTG e 40 µg/mL<sup>-1</sup> de X-gal. Após crescimento *overnight* a 37 °C foi possível distinguir as células transformadas com coloração branca, das células não transformadas na cor azul.

As colônias brancas foram crescidas em 5mL de meio LB contendo 25 µg/mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol *overnight* e o plasmídeo foi extraído com kit Wizard Plus SV (Promega). A confirmação da transformação foi feita por digestão utilizando enzimas de restrição comerciais (NEB), incubadas em condições indicadas pelo fabricante e analisadas através de eletroforese em gel de agarose.

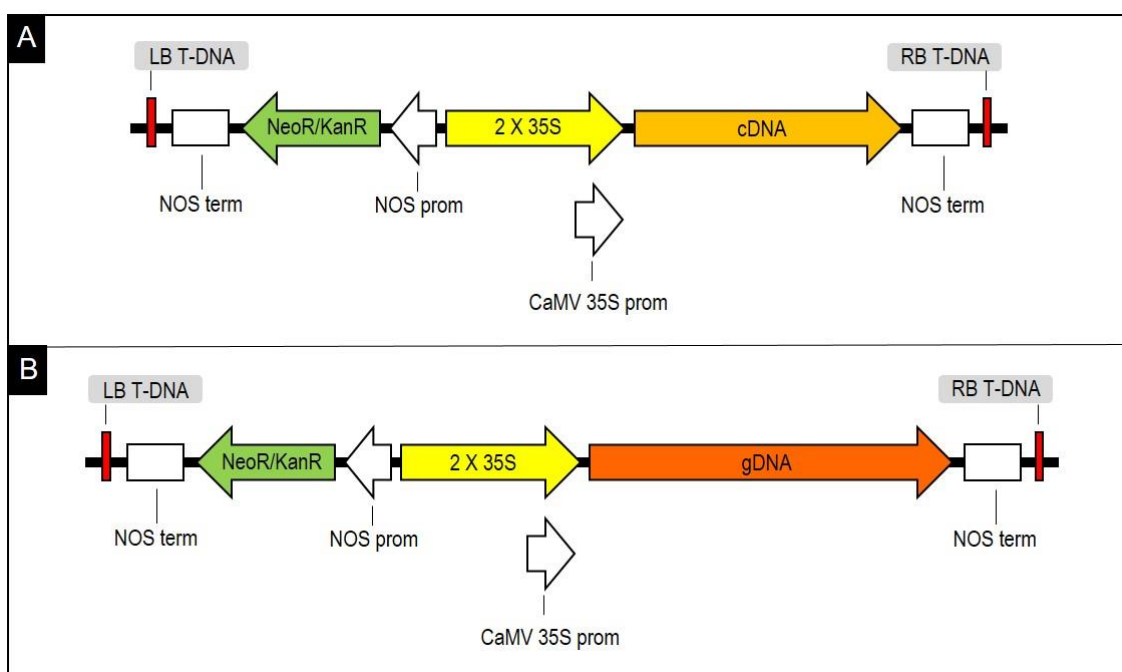
### 3.3.2 Clonagem de *CsTPS* e *gCsTPS* em pDGB3α2

A segunda etapa da construção do cassete foi a clonagem no segundo bloco, chamado de pDGB3α2, que contém o promotor constitutivo 35S do Cauliflower mosaic virus duplicado (2x CaMV35S) e o terminador nopalina sintase (Tnos) de *Agrobacterium tumefaciens*. A clonagem foi realizada utilizando 75 ng do plasmídeo domesticado, adicionado de 75 ng do promotor, 75 ng do terminador, 5-10 U da enzima *Bsal* (NEB) e 3 U de T4 ligase (Promega), 1 µL de ligase buffer e 75 ng do vetor pDGB3α2. As condições de ciclagem foram as mesmas da etapa anterior, assim como a transformação de *E. coli*, sendo a seleção de colônias brancas feita em 50 µg/mL<sup>-1</sup> de canamicina. A checagem por digestão enzimática e eletroforese também seguiram da mesma forma.

### 3.3.3 Clonagem em pDGB3Ω1 e adição do cassete de resistência à canamicina

A última etapa da construção é a clonagem no vetor pDGB3Ω1 e a adição do gene de resistência à canamicina (Figura 27). Para tanto, 75 ng do plasmídeo contendo os cassetes gerados na fase anterior foram adicionados em tubo contendo 75 ng do cassete de resistência neomicina fosfotransferase II (*nptII*), 5-10 U da enzima *Bsm*BI (NEB), 3 U de T4 ligase, 1 μL de ligase buffer e 75 ng do vetor pDGB3Ω1. As condições de ciclagem foram as mesmas da etapa anterior, assim como a transformação de *E. coli*, sendo a seleção de colônias brancas feita em 50 μg/mL-1 de espectinomicina. A checagem por digestão enzimática e eletroforese também seguiram da mesma forma.

**Figura 27.** Mapa do T-DNA com o cassete do gene da sesquiterpeno sintase de *Citrus sinensis* (*CsTPS*) obtido a partir do cDNA, nomeada de TPS (A) e do DNA genômico, nomeada gTPS (B). A *CsTPS* está sob o controle do promotor duplicado 35S do CaMV e do terminador NOS. O cassete de seleção *nptII* (resistência à neomicina ou canamicina) está sob controle do promotor e terminador NOS.



(Fonte: o autor)

### **3.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico e preparo do inóculo para transformação genética**

Foram adicionados 1-2 µg de plasmídeos às células de *A. tumefaciens* ainda congeladas, sendo imediatamente transferidas para banho-maria a 37 °C por 5 minutos e mantidos no gelo posteriormente. A bactéria foi transferida para tubo contendo 1 mL de meio (LB) e mantida a 28 °C sob agitação. Após 4 horas de incubação a cultura foi centrifugada a 5000 x *g* por 5 minutos e ressuspensa em 200 µL de LB líquido, sendo finalmente espalhada em placa de petri contendo meio LB sólido, adicionado de 50 µg/mL de canamicina/rifampicina. As placas foram mantidas em incubação a 28 °C por 48 h. As colônias isoladas foram crescidas em 10 mL de meio LB (50 µg/mL de canamicina/rifampicina). Alíquotas da cultura de *A. tumefaciens* transformadas foram estocadas em freezer -80 °C com adição de glicerol 40% (v/v).

Para o preparo do inóculo de transformação, uma fração da cultura em estoque foi espalhada em placas contendo meio LB acrescido dos respectivos antibióticos de seleção, incubadas por 24-48 h a 28 °C. Uma colônia de *A. tumefaciens* isolada foi então crescida *overnight* em 200 mL de meio LB líquido, adicionado dos respectivos antibióticos, sob agitação. Após atingir a DO<sub>600nm</sub> de 0,8 a cultura foi submetida a centrifugação de 5000 x *g* por vinte minutos e o precipitado bacteriano ressuspensa em 100 mL de meio líquido MS contendo 5% de sacarose, 0,02% de Silwet L-77 (PhytoTechnology Laboratory) e 50 µg/mL de acetoseringona.

### **3.5 Cultivo, transformação e seleção de *Arabidopsis thaliana***

#### **3.5.1 Obtenção de plantas *Arabidopsis thaliana***

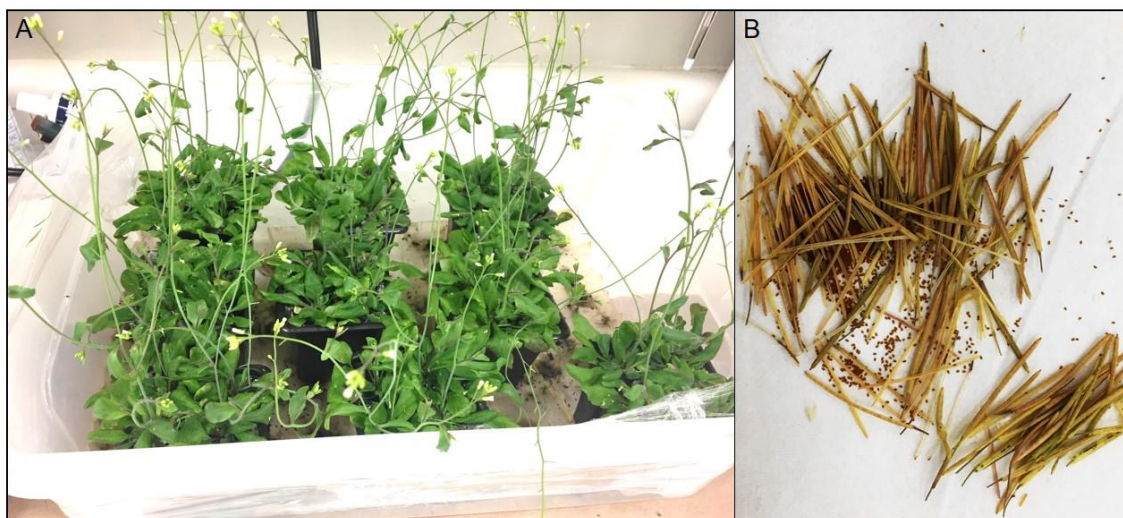
Sementes de *A. thaliana* foram esterilizadas através de lavagem em etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, seguido de três lavagens consecutivas com água mili-Q estéril. Foram então semeadas em placa de petri com meio de cultura MS sólido contendo 30 g/L de sacarose e 10 g/L de ágar, numa quantidade aproximada de 50 sementes por placa. Após 14 dias, as sementes germinadas foram transferidas para vasos contendo substrato de

pinus estéril, sendo três plantas por vaso. Após o transplante, os vasos foram acondicionados em caixas plásticas transparentes, fechadas por filme plástico formando uma câmara úmida e incubadas em câmara de crescimento (Sanyo, modelo MLR-351H) a uma temperatura de  $23 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Após 5 dias a cobertura plástica foi totalmente retirada e as plantas foram conduzidas com regas periódicas até o florescimento.

### **3.5.2 Transformação genética de *Arabidopsis thaliana***

Assim que os primeiros eixos de inflorescência foram emitidos, foram retirados para a quebra da dominância apical, resultando em novos eixos emitidos em aproximadamente uma semana. Com um grande número de botões florais recém-abertos, as plantas de *A. thaliana* (ecótipo Columbia; Figura 28 A) foram transformadas geneticamente seguindo o método *Floral Dip* (CLOUGH & BENT, 1998). Para tanto, os eixos de inflorescência foram mergulhados em solução contendo células de *A. tumefaciens*. As plantas submetidas à transformação foram mantidas em câmara úmida por 24 h. Após uma semana, com o surgimento de novos botões florais, foi realizado mais um processo de transformação, mantendo as plantas novamente em câmara úmida pelo mesmo período. A partir deste momento, as novas florações que surgiram foram retiradas, mantendo na planta apenas as flores submetidas à transformação genética.

**Figura 28.** Plantas de *Arabidopsis* 30 dias após a semeadura prontas para transformação (A). Silíquas e sementes coletadas originadas dos botões florais submetidos à transformação genética (B).



(Fonte: o autor)

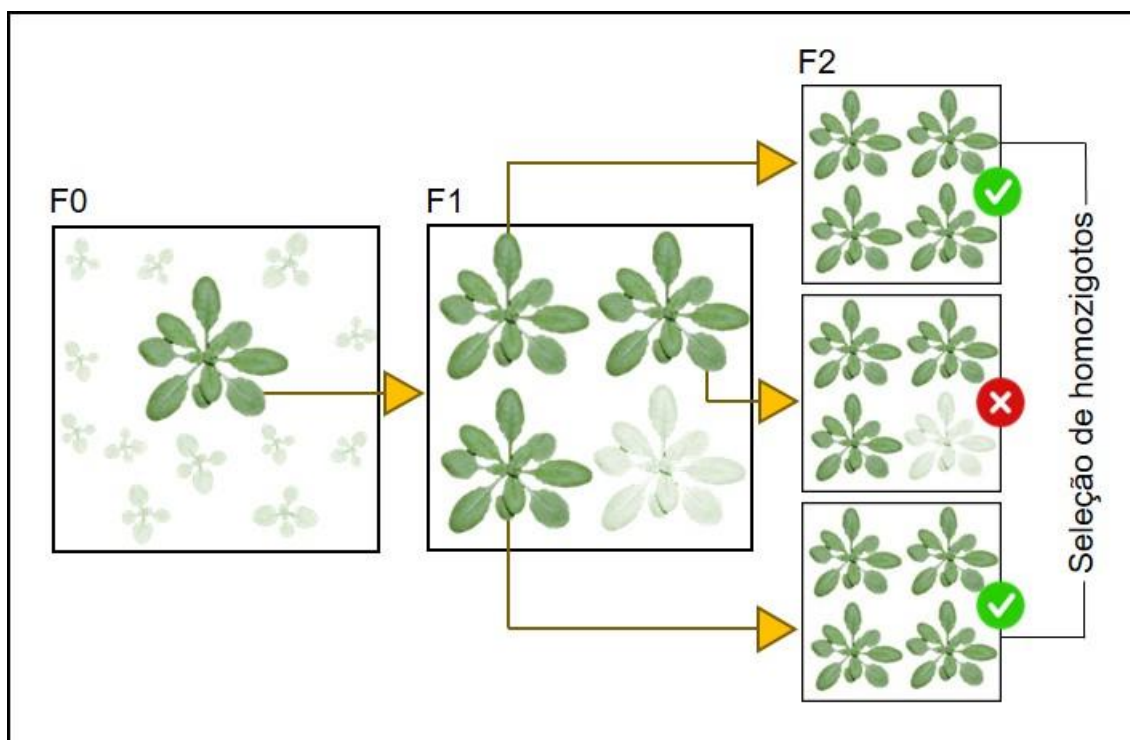
Assim que as silíquas contendo as sementes foram amadurecendo, as sementes foram coletadas (Figura 28 B) e mantidas a 4 °C até o momento do uso.

### 3.5.3 Seleção de plantas geneticamente modificadas

As sementes oriundas das plantas geneticamente modificadas foram semeadas em meio MS sólido contendo 30 g/L de sacarose, 10 g/L de ágar e 50 µg/L de canamicina e incubadas em câmara de crescimento a uma temperatura de  $23 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. As sementes foram esterilizadas previamente conforme descrito no item 3.5.1. As plântulas que germinaram e sobreviveram em meio seletivo, foram da mesma forma transplantadas em substrato até a floração e geração de silíquas maduras.

As sementes desta nova geração (F1) foram semeadas nas mesmas condições e avaliadas quanto à segregação mendeliana da resistência à canamicina. Cada plântula gerada foi selecionada como uma linhagem diferente e conduzidas até a geração de sementes. Desta nova semeadura (F2), foram selecionados os eventos que germinaram apenas plantas homozigotas (Figura 29).

**Figura 29.** Segregação de plantas de *A. thaliana* após transformação genética.



(Fonte: o autor)

### 3.6 Confirmação da transformação genética por PCR e análises de expressão gênica

#### 3.6.1 Extração de DNA e PCR para confirmação da transformação genética

O DNA de *Arabidopsis* GM foi extraído pelo método CTAB (MCGARVEY, P.B. & KAPER 1991) utilizando 0,1 g de tecido foliar. Análises de PCR foram conduzidas para confirmação da inserção dos genes, utilizando os *primers* CsCS2F (5' GCGCCGTCTCGCTCGAATGAGGGATCTTAAGAGTGTTTC 3') e CsCS2R (5' GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTTACATGGGAAGAGGATCAAC 3' - gerados pelo sistema *Golden Braid* com base na sequência do gene) para detecção do gene *CsTPS* com produto amplificado de 1760 pb para a construção TPS e 3599 pb para a construção gTPS. As reações de PCR foram realizadas utilizando 1  $\mu$ L de DNA (~200 ng) em tampão da enzima 1x, 0,5 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ M de cada *primer* e 0,4  $\mu$ L da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Thermo Fischer), em volume final de 35  $\mu$ L. As condições para amplificação foram de um ciclo de 30 segundos a 98 °C e dez minutos a 98 °C;

35 ciclos de 30 segundos a 59 °C, 2 minutos e 30 segundos a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

A eletroforese do produto da amplificação foi realizada em gel de agarose 1% e a visualização das bandas relativas aos fragmentos amplificados foi feita em equipamento L-PIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia) após tratamento com brometo de etídio.

### 3.6.2 Extração do RNA total

Para a extração de RNA foram utilizados 0,1 g de material foliar. A extração do RNA total foi feita com reagente TRIzol (Invitrogen, protocolo segundo fabricante). As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e imediatamente foi adicionado 1 mL de TRIzol reagente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio, e após descanso de três minutos, as amostras foram submetidas a centrifugação a 14000 x *g* por 20 minutos (4 °C). Os sobrenadantes foram transferidos para novo tubo juntamente com isopropanol (v/v), homogeneizados por inversão e mantidos em descanso por 10 minutos. Após centrifugação a 14000 *g* por 20 min, obteve-se precipitado que foi lavado com 1 mL de etanol 70% DEPC e novamente submetido a centrifugação a 10000 *g* por 5 min. O pélete final foi seco parcialmente e hidratado em 30 µL de água DEPC. Adicionalmente, alíquotas de 1 µg de RNA foram tratadas com DNase (Turbo DNA free, Ambiom), para remoção de contaminantes de DNA, conforme orientação do fabricante.

### 3.6.3 Análise de expressão gênica via RT-qPCR

O cDNA foi obtido a partir da transcrição reversa do molde de RNA, empregando-se uma mistura de *primers* universais oligo(dT) e N6 e a enzima ImpromII™ (Promega), utilizando-se 25 µg do RNA total, 1 µL de RNase OUT (Invitrogen), 0,5 µM de primers, 0,25 mM de dNTPs, tampão ImpromII 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 20 µL. A síntese ocorreu a 42 °C por 1 h e a inativação da enzima se deu por incubação de 70 °C por 5 minutos.

Para quantificação da expressão em tempo real do gene de *CsTPS* nas plantas GM, foram utilizados os *primers* CsCS2RT\_F (5'

GAGGGATCTTAAGAGTGTTCC 3'), CsCS2RT\_R (5' CAAACCGCTTTTTCGACTTCCG 3') para amostras cDNA.

Como genes de referência, foram a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase: GAPDH\_F (5' TTGGTGACAACAGGTCAAGCA 3') / GAPDH\_R (5' AAACCTTGTCGCTCAATGCAATC 3') (RAVICHANDRAN et al., 2015) e actina: ACT\_F (5' GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC 3') / ACT\_R (5' GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC 3') (locus: At3g18780). A reação de qPCR foi realizada em equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems), com kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) a partir de 100 ng de cDNA. As condições de amplificação foram: 10 min a 95 °C; 40 ciclos de amplificação do cDNA de 15 seg a 95 °C para desnaturação; 1 min a 60 °C para anelamento dos *primers*; 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C, etapa de extensão dos fragmentos e captação do sinal de fluorescência. Ao final realizou-se a curva de *melting* dos produtos das amplificações na faixa de temperatura de 60 °C a 90 °C com incremento de 0,3 °C por segundo.

Adicionalmente, foi avaliada a expressão gênica dos genes endógenos de *Arabidopsis* da *geranil difosfato sintase (GDPS)*, utilizando os primers: AtGDP\_F (5' AGTATGGGAGGAATCTGGGTTT 3') e AtGDP\_R (5' ACTCTTCCATGGCAAAGAGGAT 3'); e *farnesil difosfato sintase (FPPS)*: FPS2bF (5' AAAAATGTCTGTGAGTTGTTGTTGTAGG 3') e FPS2bR (5' AGCTCTAGATGAAGAGCTTTGGATACG 3') (KEIM et al., 2012).

Os primers foram validados pela curva de eficiência de amplificação e os valores de *slope* (ideal entre -3,8 a -3,1), eficiência da reação (ideal entre 90% e 115%) e o coeficiente de reação  $R^2$  (ideal próximo a 1) foram obtidos em reações tendo como molde diluições de cDNA a 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng.

O cálculo da expressão gênica foi realizado conforme descrito no item 3.6.2, do capítulo 2. Como amostra controle foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, tipo selvagem, identificadas como WT (*wild type*).

### 3.7 Análise de emissão de voláteis

As *Arabidopsis* foram semeadas conforme descrito no item 3.5.1 e transplantadas em copos de vidro contendo uma mistura de casca de pinus e

fibra de coco (1:1) autoclavada. Cada copo recebeu cinco plântulas; em alguns casos, devido ao tamanho reduzido das plantas gTPS, foram transplantadas seis plântulas. As plantas foram crescidas nas condições descritas no item 3.5.1. Para a coleta de voláteis, os copos contendo *Arabidopsis* foram colocados em cubas de vidro hermeticamente fechadas, contendo apenas uma entrada e uma saída para o fluxo de ar contínuo a 0,4 litros por minuto, filtrado previamente à entrada da cuba para eliminação de contaminação proveniente do ambiente. Foram utilizados oito copos para cada uma das três configurações: i. plantas GM TPS; ii. Plantas GM gTPS; iii. Plantas controle tipo selvagem; além de ensaio prévio contendo apenas substrato para garantia de não haver interferência de voláteis que não fossem das plantas.

Os ensaios foram conduzidos em sala com temperatura a 25 °C e luminosidade a 3 mil luxes. Após passagem do ar pelas cubas, os voláteis carregados foram capturados em tubos contendo 200 mg do polímero Tenax® TA: óxido de 2,6-difenil-p-fenilene (Supelco) durante duas horas. As coletas foram realizadas no tempo de duas horas e, após a coleta, a parte aérea das cinco plantas de cada copo foi pesada e seu peso anotado para cálculo de emissão em função da massa vegetal.

Para a identificação e quantificação relativa dos voláteis, foram empregadas a dessorção térmica dos polímeros em equipamento Dessorvedor Térmico (TD) UNITY-xr/ULTRA-xr (Markes International Ltd) e análise dos compostos voláteis em cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os compostos voláteis foram termicamente dessorvidos dos tubos de Tenax® TA no equipamento de TD sob um fluxo de gás Hélio (He) de 50 mL/min aquecido à 280 °C durante 5 min. Os VOCs dessorvidos na etapa anterior foram direcionados à um segundo tubo instalado no TD chamado de *cold trap* contendo Tenax® TA, onde foram criogenicamente capturados à uma temperatura de -20 °C. O *cold trap* foi dessorvido à 300 °C durante 3 min. e a temperatura da linha de transferência foi mantida à 200 °C, enquanto que os voláteis foram diretamente injetados na coluna cromatográfica capilar instalada no GC-MS (Rxi-5ms, 10 m × 0,10 mm d.i. × 0,10 µm de espessura do filme, Restek, Bellefonte, PA) no modo *splitless*. O programa de temperatura do GC consistiu em temperatura inicial de 40 °C seguindo com uma taxa de aquecimento de 20

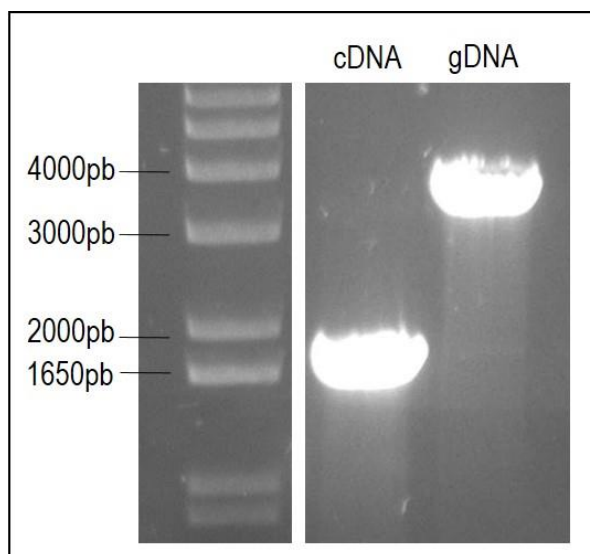
°C/min até atingir 250 °C, onde esta temperatura final foi mantida durante 2 min. A temperatura da interface entre o GC e o detector de MS foi ajustada para 250 °C e o fluxo do gás de arraste He foi mantido à 50 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos à uma energia de colisão de 70 eV e todas as análises foram registradas no modo de cromatogramas de íons totais (TIC), com intervalo de varredura de relação massa carga de  $m/z$  40 até  $m/z$  450. As análises de TD-GC-MS foram realizadas no laboratório LaBioMMi (UFSCar).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento do gene *CsTPS*, construção dos cassetes de transformação e transformação de *A. tumefaciens*

As regiões correspondentes ao gene da terpeno sintase de laranjeira obtido a partir do RNA mensageiro, contendo somente a sequência codificante do gene (cDNA) e do gene obtido do genoma cromossômico, contendo os íntrons originais presentes no gene (gDNA) foram amplificadas via PCR (Figura 30). Os produtos obtidos da amplificação foram purificados e clonados em vetores pelo método *Golden Braid* para montagem dos cassetes de transformação.

**Figura 30.** Revelação de gel de agarose após eletroforese de ácidos nucleicos, amplificados em reação em cadeia da polimerase. As bandas nas alturas de 1.760 pb e 3.599 pb são resultado da amplificação dos fragmentos correspondentes ao gene *CsTPS* a partir do cDNA e gDNA, respectivamente. Marcador de peso molecular: 1 kb plus (Invitrogen).

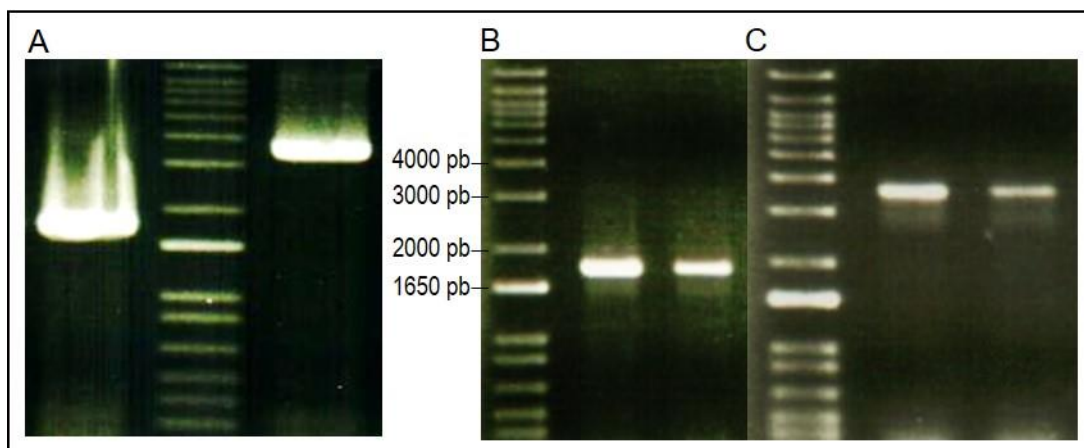


(Fonte: o autor)

Após a etapa de 'domesticação' em vetor pUPD2, os plasmídeos foram sequenciados para confirmação do gene *CsTPS*. Posteriormente, os plasmídeos foram então clonados em vetor pDGB3 $\alpha$ 2 sendo recuperadas 16 colônias de *E. coli* transformadas para a construção TPS e 27 colônias para a construção gTPS,

todas confirmadas quanto a presença dos genes por digestão enzimática. Na última etapa, foi realizada clonagem em vetor pDGB3Ω2, onde foram obtidas 8 colônias positivas para o cassete de transformação TPS e 2 colônias para o cassete gTPS, confirmadas por digestão enzimática e PCR. Após extração dos plasmídeos, um clone positivo de cada estratégia (Figura 31 A) foi utilizado para transformação de células bacterianas de *A. tumefaciens* que resultaram em 17 colônias transformadas com cassete TPS e 3 colônias com cassete gTPS. A confirmação da transformação em *A. tumefaciens* para as duas construções foi feita via PCR (Figura 31 B e C).

**Figura 31.** Revelação de gel de agarose com bandas correspondentes à amplificação dos ácidos nucleicos em cadeia da polimerase dos fragmentos *CsTPS* originados de cDNA e gDNA (1760 pb e 3599 pb). (A) PCR a partir de extração de plasmídeo de *E. coli* contendo a construção em vetor pDGB3Ω2. (B) PCR a partir de plasmídeo extraído de *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção TPS (B) e gTPS (C). Marcador de peso molecular: 1 kb plus (Invitrogen).



(Fonte: o autor)

## 4.2 Seleção de plantas transformadas

Sementes obtidas em plantas GM e semeadas em meio contendo canamicina iniciaram germinação três dias após semeadura. Conforme o crescimento e expansão das primeiras folhas, foi possível diferenciar plântulas GM (de coloração verde) de plântulas não transformadas (de coloração branca), suscetíveis ao agente de seleção canamicina. Estas últimas cessavam o

crescimento e morriam (Figura 32 A). Foram selecionados os eventos transformados que apresentavam maior vigor: quatro eventos TPS e apenas um evento gTPS.

O desenvolvimento foi diferente para plantas transformadas com construções TPS e gTPS. Diversas plântulas gTPS que germinaram e apresentaram coloração verde, não se desenvolveram e estagnaram o crescimento. Ademais, pelo menos sete plantas desta mesma construção cresceram e foram transferidas para vaso, sendo que seis destas plantas cessaram o desenvolvimento e morreram poucos dias após o transplante, restando apenas uma planta (Figura 32). Seu crescimento, entretanto, foi lento, demorando o dobro do tempo para atingir o tamanho das plantas TPS. As gerações F1 e F2 apresentaram as mesmas características

**Figura 32.** Seleção de *Arabidopsis* transformadas geneticamente. (A) germinação de sementes em meio contendo canamicina. As sementes não transformadas morrem logo após a germinação. No detalhe, plântula transformada identificada com número 1 (verde) e plântula não transformada com número 2 (branca). (B) A planta resistente à canamicina transplantada em substrato. (C) *Arabidopsis* transplantadas apresentando botões florais e sílquas contendo sementes. Plantas geneticamente transformadas com a construção TPS apresentaram desenvolvimento compatível com plantas tipo selvagem. Planta geneticamente transformada com construção gTPS apresentou desenvolvimento mais lento (vaso à direita).



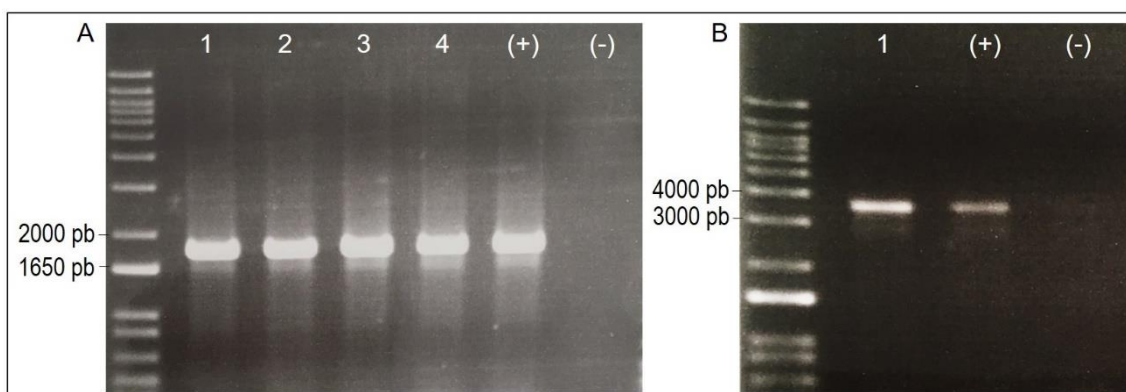
(Fonte: o autor)

### 4.3 Caracterização das plantas geneticamente modificadas

#### 4.3.1 Confirmação da transformação genética via PCR

A confirmação da presença do transgene foi feita via PCR nas quatro plantas para construção TPS e uma planta gTPS (Figura 33) da geração F0.

**Figura 33.** Revelação de gel de agarose após eletroforese de ácidos nucleicos amplificados em reação em cadeia da polimerase. (A) Bandas na altura de 1760 pb resultado da amplificação do fragmento correspondente ao gene *CsTPS* sem íntrons. Números de 1 a 4 correspondem às quatro plantas GM; (+) corresponde ao controle positivo para o gene e (-) o controle negativo. (B) Bandas na altura de 3599 pb resultado da amplificação do fragmento correspondente ao gene *CsTPS* com íntrons. O número 1 corresponde à planta GM, (+) corresponde ao controle positivo e (-) ao controle negativo. Marcador de peso molecular: 1 kb plus (Invitrogen).

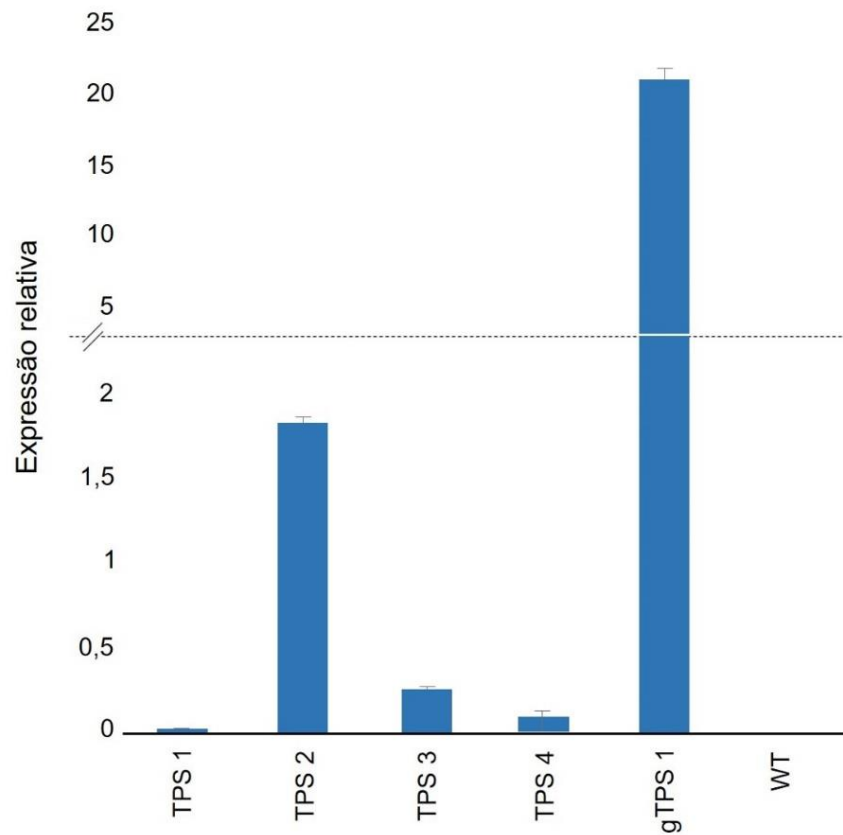


(Fonte: o autor)

#### 4.3.2 Análise de expressão gênica via qPCR

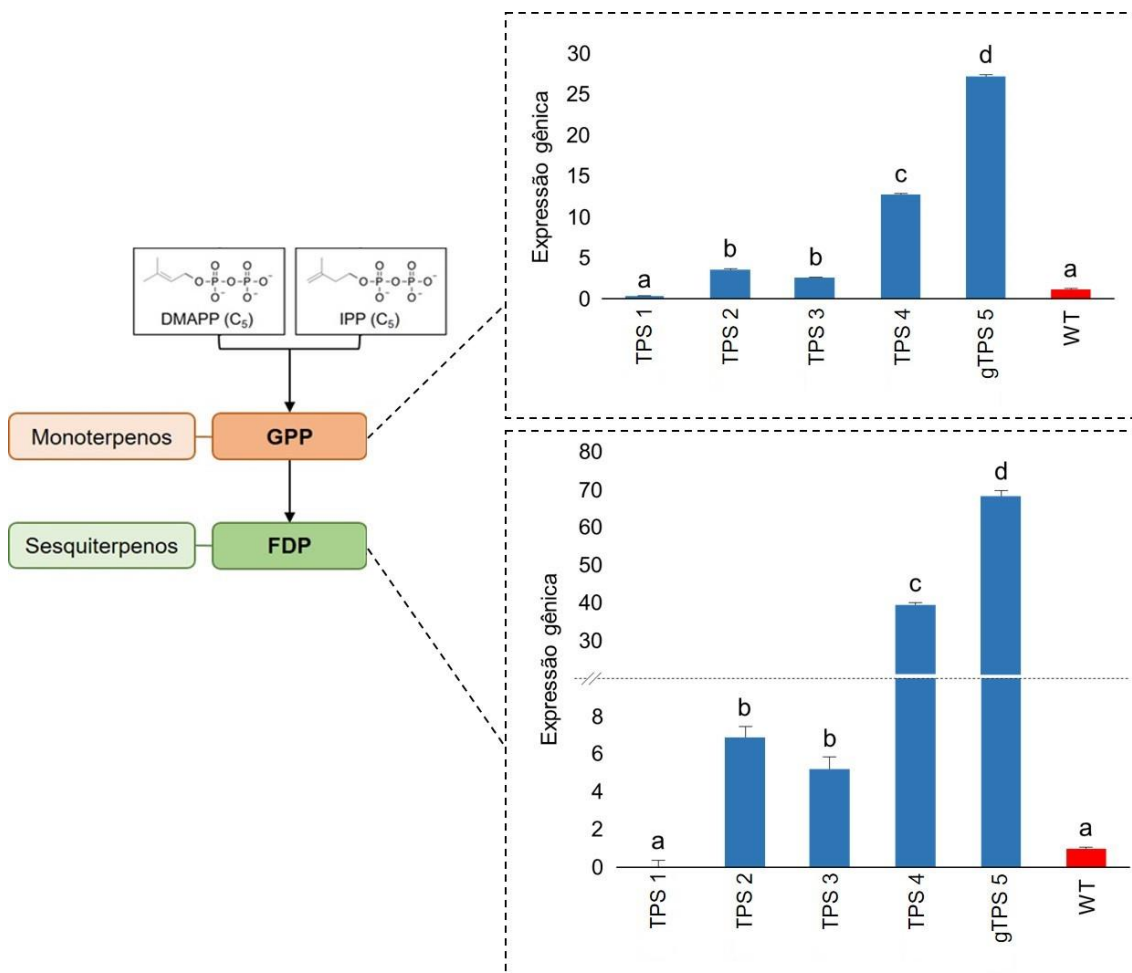
Foram avaliados os transcritos do transgene *CsTPS* nos eventos F0. Os quatro eventos TPS apresentaram níveis variáveis de expressão de *CsTPS*, enquanto que o evento gTPS mostrou o mais alto nível de expressão (Figura 34).

**Figura 34.** Expressão gênica de *CsTPS* em *A. thaliana* transformadas geneticamente.



A análise dos transcritos do gene de *geranil difosfato sintase* (*GDPS*) e *farnesil difosfato sintase* (*FPPS*) em *Arabidopsis* GM apresentou superexpressão gênica das plantas TPS 2, 3 e 4 para *GDPS* e *FPPS*. A planta gTPS apresentou os mais altos níveis de expressão para *GDPS* e *FPPS* (Figura 35).

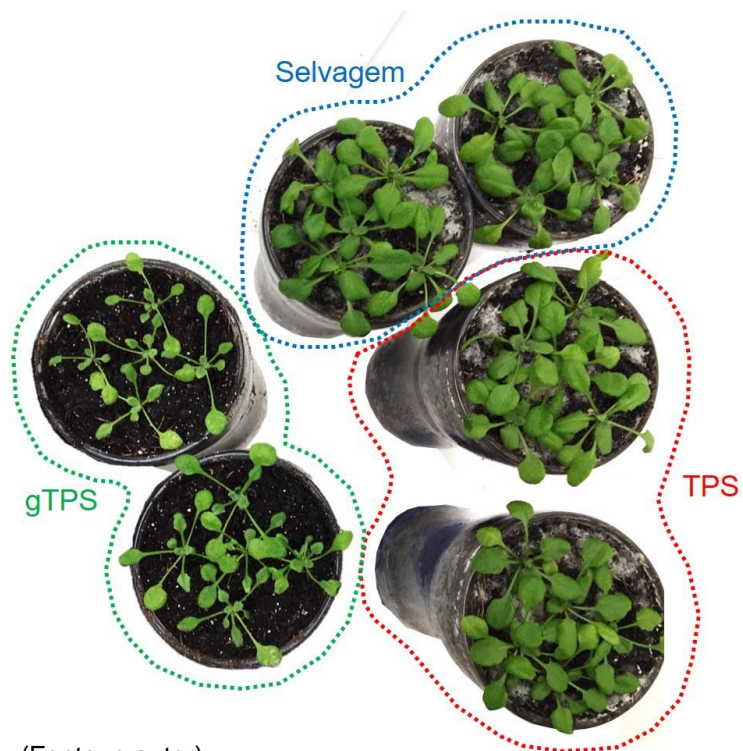
**Figura 35.** Expressão gênica de *GDPS* e *FPPS* em *A. thaliana* transformadas geneticamente. As barras seguidas de mesma letra indicam não diferirem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).



#### 4.4 Análise de emissão de voláteis

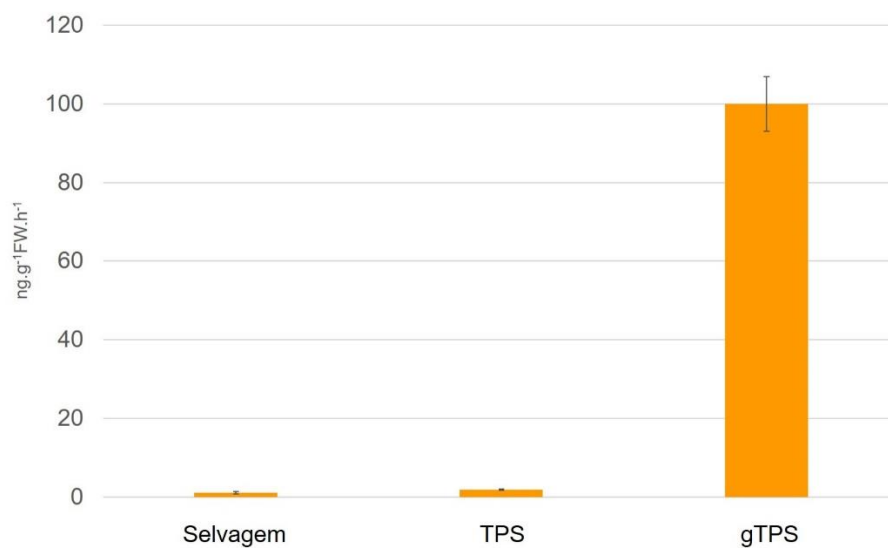
Nos três tratamentos avaliados para emissão de terpenos, apenas nas plantas GM com construção TPS e nas tipo selvagem foi possível uniformizar o tamanho dos indivíduos. As plantas GM com construção gTPS apresentavam tamanho reduzido das folhas e da planta (Figura 36).

**Figura 36.** Plantas de Arabidopsis em copo nos tamanhos que foram utilizadas para os ensaios de emissão de  $\beta$ -cariofileno.



Ainda assim, a taxa de emissão destas plantas superou em quase 100 vezes em relação ao evento TPS e controle (Figura 37).

**Figura 37.** Emissão de  $\beta$ -cariofileno a partir de Arabidopsis GM e controle selvagem (em  $\text{ng.g}^{-1}\text{FW.h}^{-1}$  (ppb/h)



## 5 DISCUSSÃO

A caracterização funcional do gene da *CsTPS* em *A. thaliana* é uma etapa importante na definição da melhor estratégia, seja mantendo os íntrons ou não, para posterior transformação genética de laranjeira doce. Escolhida por ser um organismo modelo, bem caracterizado para estudos genéticos e possuir um ciclo de vida curto – aproximadamente 6 semanas, a *Arabidopsis* requer pouco espaço físico, permitindo manipular dezenas de plantas, transformadas com diferentes construções, ao mesmo tempo (JANAKIRAMA, 2013).

Para tanto, construções gênicas foram obtidas utilizando o clone derivado do RNA mensageiro, contendo somente a sequência codificante do gene *CsTPS*, responsável pela síntese de  $\beta$ -cariofileno. Da mesma forma, foi utilizado o clone genômico cromossomal, contendo os íntrons originais presentes no mesmo gene. As construções foram nomeadas TPS e gTPS, respectivamente.

A construção gTPS demandou grande esforço e tempo na etapa de montagem dos blocos, conforme metodologia do sistema *Golden Braid*, particularmente na etapa de domesticação. Da mesma forma, após obtenção do cassete de transformação, apenas três colônias de *Agrobacterium tumefaciens* foram obtidas para esta construção, contrapondo a construção TPS, de fácil obtenção pelo sistema GB, resultando em 17 colônias positivas de *A. tumefaciens*, parecendo resultar em algum tipo de toxicidade da construção gTPS em *E. coli* e *A. tumefaciens*. A baixa recuperação de plantas geneticamente modificadas com a construção gTPS, assim como o lento desenvolvimento do evento obtido, poderia, da mesma forma, indicar algum nível de toxicidade para a planta. Porém, estas características da mesma forma podem estar atreladas a problemas na integração do T-DNA ao genoma, o que com apenas um evento não possibilita qualquer interpretação mais acurada.

Em *A. thaliana* GM a presença do transgene *CsTPS* resultou em níveis variados de transcritos nos eventos obtidos, com elevado nível de expressão na planta gTPS-1. Este resultado aponta para a viabilidade da transformação genética de laranjeira doce e ratifica a importância das construções contendo íntrons, embora seu papel ainda não esteja claro.

Quando analisados os níveis de expressão gênica para os genes endógenos *GDPS*, responsável pela conversão de geranyl pirofosfato em

monoterpenos e *FPPS* pela conversão de farnesil pirofosfato em sesquiterpenos em *Arabidopsis*, houve superexpressão dos dois genes em todas as plantas com a construção TPS, exceto para a plantas TPS-1. A planta gTPS-1 foi a que apresentou maiores níveis de expressão para os dois genes, assim como observado para o gene *CsTPS*.

Nas análises de emissão de  $\beta$ -cariofileno, o fato do evento gTPS emitir quase 100 vezes mais que o controle selvagem ou mesmo que o evento TPS parece indicar que a presença do íntron é fator preponderante para a maior produção do composto  $\beta$ -cariofileno, da mesma forma que foi observado nos eventos HB21 (capítulo 2).

Possíveis questionamentos à transformação de citros com *CsTPS* podem ser respondidos com bases nos resultados demonstrados no capítulo 2 deste trabalho. Múltiplas cópias do mesmo gene estão associadas ao silenciamento ou à baixa expressão (HOBBS et al., 1990). Neste caso, a inserção de um ou mais genes homólogos poderia resultar em silenciamento gênico, ao invés de promover aumento na produção de  $\beta$ -cariofileno. No caso das laranjeiras com cassete de transformação HB21, a *terpeno sintase* utilizada foi clonada de *A. thaliana*, evitando a duplicidade de genes. Entretanto, Alquézar et al., (2017) utilizaram *Arabidopsis* transformadas geneticamente com terpeno sintase da própria *Arabidopsis*, para superexpressão de  $\beta$ -cariofileno. A linhagem GM emitiu cerca de 600 vezes mais  $\beta$ -cariofileno do que a linhagem selvagem, causando repelência a *D. citri* em testes de olfatométria. Além da eficiência do gene inserido no incremento da produção de  $\beta$ -cariofileno, nenhuma anomalia nas plantas GM foi observada pela presença dos genes homólogos. Assim, a atividade produtora de  $\beta$ -cariofileno, majoritariamente, no evento gTPS-1, representa a funcionalidade do gene em sistema modelo. Este resultado possibilita o uso deste evento para avaliação da repelência em ensaio de olfatométria, assim como coloca o gene como um candidato para gerar citros GM.

A competição por substrato de FPP pela adição de nova *CsTPS* poderia trazer prejuízos ao desenvolvimento da planta, o que justificaria a adição de um gene precursor de sesquiterpenos, além de *CsTPS* (WU et al., 2006). Contudo, o papel da farnesil não foi decisivo para o incremento de  $\beta$ -cariofileno nas

construções FTA, MFA e FA, além de que eventos HB21 produziram e emitiram  $\beta$ -cariofileno independente da presença de FPP adicional.

Os resultados preliminares obtidos em *Arabidopsis* dão boas perspectivas da viabilidade do gene *CsTPS* promover ganhos nos níveis de transcritos, acumulação e emissão de  $\beta$ -cariofileno. Embora a caracterização biológica frente ao psílídeo seja necessária para confirmar o efeito de repelência, os resultados confirmam os dados gerados na análise funcional em *E. coli* (ALQUÉZAR et al., 2017a) e abrem caminho para o uso deste gene em uma estratégia similar a cisgenia, com potencial repelência ao psílídeo *D. citri*.

## 6 CONCLUSÃO

- A manutenção dos íntrons em *CsTPS* parece favorecer a expressão gênica frente ao observado na versão sem íntrons.
- A utilização de uma terpeno sintase de laranja doce contendo íntrons se mostrou viável para aumento nos níveis de expressão e taxa de emissão de  $\beta$ -cariofileno, quando testada em *Arabidopsis* GM.

## REFERÊNCIAS

- ALQUÉZAR, B., RODRÍGUEZ, A., PEÑA, M., PEÑA, L., (2017a). Genomic Analysis of Terpene Synthase Family and Functional Characterization of Seven Sesquiterpene Synthases from *Citrus sinensis*. *Frontiers in plant Science*, v.8, p.1–20.
- ALQUÉZAR, B., VOLPE, H.X.L., MAGNANI, R.F., MIRANDA, M.P., SANTOS, M.A., WULFF, N.A., BENTO, J.M.S., PARRA, J.R.P., BOUWMEESTER, H., PEÑA, L. (2017b).  $\beta$ -caryophyllene emitted from a transgenic *Arabidopsis* or chemical dispenser repels *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacter*. *Scientific Reports*, v.7(1), p.1–9.
- BELASQUE JR J., BERGAMIN FILHO A., BASSANEZI R.B., BARBOSA J.C., FERNANDES N.G., YAMAMOTO P.T, LOPES S.A., MACHADO M.A., JUNIOR R.P.L., AYRES A.J., MASSARI C.A. (2009) Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, v.34, 3, p.137-145.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, v.16, p.735-743.
- DEELATORRE C., SILVA A.A. (2008) *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. *Rev. de Ciências Agrárias*. p.58-67.
- HOBBS S.L.A., KPODAR P., DELONG C.M.O. (1990) The effect of T-DNA number and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol*, v.15, p.851-864.
- JANAKIRAMA P. (2013). Functional characterization of the HUA2 gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Eletronic Thesis and Dissertation Repository*. 1109.
- KEIM V., MANZANO D., FERNÁNDEZ F.J., CLOSA M., ANDRADE P., CAUDEPÓN D., BORTOLOTTI C., VEJA M.C., ARRÓ M., FERRER A. (2012). Characterization of *Arabidopsis* FPS isozymes and *FPS* gene expression. Analysis provide insight into the bioynthesis of isoprenoid precursors in seed. *PlosOne*, v.7, issue 11.
- KOORNNEEF M., MEINKE D. (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.*, v.61(6), p.909-21.

LOPES S.A., FRARE G.F., YAMAMOTO P.T., AYRES A.J., BARBOSA J.C. (2007) Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. *European Journal of Plant Pathology*, v.119, p.463-468.

MANN R.S., ALI J.G., HERMANN S.L., TIWARI S., PELZ-STELINSKI K.S., ALBORN H.T., STELINSKI L.L. (2012). Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PlosPathogens*, San Francisco, v.8, n.3, p.1-13.

MCGARVEY, P B; KAPER, J.M., (1991). A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques*, v.11, p.428–432.

NASCIMENTO C.A. (2016) Caracterização funcional de terpeno sintases de citros. Dissertação (Mestrado em Agricultura tropical e subtropical). Campinas. 49p. Instituto Agrônômico.

NORONHA Jr., N.C. (2010). Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). 2010. 72p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

PATT J.M., SÉTAMOU M. (2010). Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental Entomology*. Lanham, v.39, n.2, p.618-24.

RAVICHANDRAN S., STONE S.L., BENKEL B., ZHANG J., BERRUE F., PRITHIVIRAJ B. (2015). Optimal level of purple acid phosphatase5 is required for maintaining complete resistance to *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Sci.* v.6. p.28-35.

SARRION-PERDIGONES, A., FALCONI, E.E., ZANDALINAS, S.I., JUÁREZ, P., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., GRANELL, A., ORZAES, D. (2011) GoldenBraid: an alternative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PlosOne*. v.6

WENNINGER, E.J., STELINSKI, L.L., HALL, D.G. (2009). Relationships Between Adult Abdominal Color and Reproductive Potential in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, v.102, n.3, p.476-483.

WU S., SCHALK M., CLARK A., MILES R.B., COATES R., CHAPPELL, J. (2006) Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat. Biotechnol.*, v.24, p.1441– 1447.

ZHAO J.-P., WANG H.-T, ZENG X.-N., XUE P.-P. (2013). Differences in selection behaviors and chemical cues of adult Asian citrus psyllids, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected young shoots of citrus plants. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, v.5, n.9, p.83-91.

## APÊNDICE

**Apêndice A.** Eficiência dos primers para qPCR a partir da curva de eficiência de amplificação.

<i>Primer</i>	Slope	Eficiência %	R <sup>2</sup>
B138F/B137R	-3,17	110,711	0,997
B136F/B137R	-3,306	100,96	0,999
B136F/B139R	-3,206	106,392	0,995
AtCSF/B137R	-3,14	101,26	0,995
GAPC2F/GAPC2R	-3,522	99,211	0,998
ACT_F/ACT_R	-3,2	105,1	0,996
CsCS2F/CsCS2R	-3,552	100,15	0,998
GAPDH_F/GAPDH_R	-3,188	97,122	0,997
ACT_F/ACT_R	-3,332	107,89	0,995
AtGDP_F/AtGDP_R	-3,12	101,24	0,998
FPS2bF/FPS2bR	-3,25	105,07	0,997

**Apêndice B.** Sequência do gene *AtTPS21* (*Arabidopsis thaliana*)

GCGCCGTCTCGCTCGAATGAGGGATCTTAAGAGTGTTCTTTCTTCAAAGAAAGCACGAAA  
 GCCGATGTGAACCGTCGATCCTCGAATTATCATCCTAGCATTGGGGTGATCATTTTCATTAA  
 TGTGTCATCAAATGAAAAGGTATGTATCATGTGACTCTAATATATATAGAAAGAGATGTTCTA  
 ATAAGGGATTTTAGATCATATTAAGTTAAAGATAAACTAAAAGATAAAAAATATATATTTTGT  
 CATATATTAATAATATATTTTTTTTTTATCTTTAACTTATTCATAATTTTAATATGGTCATAGATC  
 TCTGAATAAAAATTCAACAATATATGTGATCATGATTTTGATAATTTTATTGATGCAGTACACC  
 AATACGGAAGTCGAAAAGCGGTTTTGAAACATTAAGCAGAAATTGAAAAGTTGCTGGTGA  
 GCAATAATACAGCATGGAAAACACTTGAAGAAATTGTGGCTATTGTTAATCAACTTCAACGC  
 CTTGGTGTGGCCTATCATTTTGAAAATGAGATCAAAGAGGCCTTACAAACAATCTATGATAG  
 CCATGTTAACGGCAATTGTGATGTTAATTACGATCATAATAACGATCTCTACATAGTTGCTC  
 TTCGATTTGCGCTTCTAAGGCAGCATGGTTACAAGGTGTCAGCAGGTATGCATAAGCAAAA  
 GTTTCAATCAATTTTTTTTTTAAACATATATTCAGTGGAATTAATTTTAACTTGAATTACAA  
 CAACGAAACAGATATATTTAAAAAATTCAGAGATGAAAAGGTGAATTCAAGGCCATGTTAA  
 CAAATGACGCGAAAGGCTTGCTATGTTTGTATGAGGCGTCATATCTGAGAGTACAAGGGGA  
 GAATATATTGGAAGAAGCATGTGAATTTCTAGGAAGCACTTAAAATCTTTATTGTCCCATT  
 AAGCACTCCTCTAGCTGACCAAGTTGAGCACTCCCTGGAGATACCTTGCACAGAGGGAT  
 GCCAAGATTGGAGGCAAGGCAGTATATTTCCATCTATGAAGCAGACAATTCAACACGAAAT  
 GAGCTAATATTAGAACTTGCAAAGCTAGATTTTAACTTTTGCAGGCGTTACACCGGATAGA  
 GCTAAGTGAGATCTCAAGGTGATCAAATATCAAACCTCCCCTTGTTTGTGAAATTTATCA

TTTGTCTGTAAGGCTCTTTTACAGT  
TCGATTTTAATTGTATCTTTTTCTATTTTACCGATAAAATCAAATTATGATTTAAAATACTTTT  
GTTTGTAAATTGTTAGTAGCTAACTCCACAGAGATCGGCAATTTTATTATTTTTTTCCCTC  
CATGAAACCTTGATGGATATGAGCGTTTGAACATGAGGCAGTAGACTATTAATTTACTAGA  
ACAACAATGGGGTTTTGATCATATTTCTGCATCAAACCTAGTAATTTATTTTATAAATTTGAA  
ATCAATCCATTATAAGACTGAGAAGATCGATTTTACATTGGAAAATAAATTTTTGCAGGTGG  
TGAAAGATATTGATTTTGCAACAAAGCTACCTTTTGCAAGGGATAGGTTGGTGGAGTGCT  
ACTTTTGGATATTAGGAGTTTATTTTGGCCTAAATATTCCACAACCTAGAAAATTTATGACCA  
AAATCATCGCAATAGCTTCTGTCATAGATGATATCTATGATGTGTATGGCACTTTGGAAGAA  
CTTAAGCTATTCACTCATGCAATCGAGAGGTGTGTGCAAAATAATAAGTATTAATAATGTGG  
CAGTCGATTTTTCGTATAATCAAAGTACAGTATCCACATTGTTTTTGGTAGGTGGGAAGTTG  
TGGCAGCAAATGAGTTACCAAATACATGCAAGTCTGTTATTTTGCCTCTTAGATGTTGTC  
AAAGAAATGGAGGACAAGCTGGTGAATAAAGAACCCTTTGTTGCATGTACTATGCAAAAG  
AGGCGGTAAGTACACTCATAATCATGAATATACTCATTATCAATTTTTTTAATTGATATACA  
CAAATAAATACATATATGGCTATCCAAATTGAATAATTAATTTACTTTATTCTCTCAGATAA  
AAGGGCTGGTAAGGGCTTACTTTGTGGAAGCAAAGTGGTTCCATGCGAAATATGTGCCAAC  
ATTTGAAGAATGTGTGGAGAATTCTACAATGAGCAGTGGATACCCCATGCTTGCTGTTGAA  
GCTCTTGTAGGCTTAGAAGATATGGCAATTACCAAGCGAGCACTTGATTGGGCGATTAGTG  
TTCCTAAAATTATTAGATCTTCCTCCTTGATTGCTCGCCTTGATGACGACGTCATACGTAC  
AAGGTATGACTATATCGATAAAGAATTTATGACCAAATACCAAATTAAGGAATTTAACTAC  
TTAATTTAGGGAGAATGATACGTAAGTCCTTAAATACTTCTTATATTAATCACCTCGGTTCT  
AATTTATTTTAATTACCCAATACATTCATAATGCTATAATTTTAGTTTGAACTTTACTATTGA  
AAGATAGACGTCGTTTTCTAATATACCTTTTCCCACGGGTGAGGCACATTATTTCTCCCTT  
AAATAGATGTAAGGACCAGTACTTTTTTATTGAGTAAAATTTAGATTATATTCTTGTAAT  
TTACTACCTTCAAATCACCTTTTTTACTTCTGAAAACCTCAAGTTACATTGTTTTTTTATTCAA  
AAGACAAGTAAAAATCGGGTAGTTGATTTTATTTTTATTTTGTCTTCTGAATAAAAATGAGG  
ATACATTAAGTTTTAAAAAATATGACGGTGATTTGAAAATAGTCAATTCATGAGGAGAATAT  
ATAATCAAGAATTAACCCATTTAATTAATAAAAATTCCTCAGCAATGTTCTCTGAAAAAATC  
AGGGGTAGAGCGAAGAAATTGTCTCATAGGTGCAACTACGTAAAACCATTATAAGATTAGT  
TTTTTAGTTTGTACGGATCCTTACAGGGGGCAAATTTTTAAATTTATTATGACTGTCATAACT  
TTTTTTAAAAAATACATATTTAAGGTGAAAAAATTAAAAAAATAAATTTATTGTGGGATCAAT  
TGCCTACTCACTTTGTAAGTAAATGCCCTAGCTCCCTAAGTAGACTAATCACAATGAGGTTA  
TAACAGTAAAAGAACTCAAAGACTTTTTTCTTTTGCAATTTAACGGCATATAAATTAAGC  
TAACTGAATTTAATTTATTGCTTCTAAAAAATTTGTTAAGGTGAGCAAGAGAGAGGGGATG  
CACCATCAAGTGTGGAATGTTACGTGCAACAGTATGGCGTGTCTGAAGAAGAAGCGTGCA  
ACAAAATCAAAGGAATGGTGGAAATTGAATGGATGAACATCAATGAAGAATTCAGATCC  
GAACCATCCTCCGTTGCAATGGCTTCTCCTTCCCTGAATCTTGCTCGGATGATGGTGGTG  
TTATATCAAATGGAGATGGTTATACTAACTCGACAGGGAAAACCAAGGATAGAATTGCATC  
ATTGCTTGTTGATCCTCTTCCCATGTAAGCTTTGAGCGAGACGGCGC