

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

Doutorado

Raquel Caserta Salviatto

Genes derivados da planta e do patógeno: diferentes abordagens em transgenia visando resistência a *Xylella fastidiosa* em *Citrus sinensis*.

Genes from the plant and pathogen: different approaches in transgenesis aiming resistance against *Xylella fastidiosa* in *Citrus sinensis*.

Campinas, 2014

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



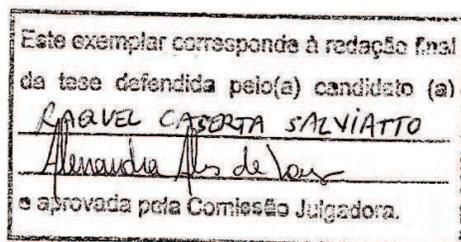
Raquel Caserta Salviatto

Genes derivados da planta e do patógeno: diferentes abordagens em transgenia visando resistência a *Xylella fastidiosa* em *Citrus sinensis*.

Genes from the plant and pathogen: different approaches in transgenesis aiming resistance against *Xylella fastidiosa* in *Citrus sinensis*.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento

Doctorate thesis presented to the Genetics and Molecular Biology Postgraduation Programme of the Biology Institute of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Plant breeding.



Orientadora: Dra. Alessandra Alves de Souza

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C268g Caserta, Raquel, 1982-
Genes derivados da planta e do patógeno : diferentes abordagens em transgenia visando resistência a *Xylella fastidiosa* em *Citrus sinensis* / Raquel Caserta Salviatto. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Alessandra Alves de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Quorum sensing*. 2. *Xylella fastidiosa*. 3. Clorose variegada dos citros. 4. Cancro cítrico. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genes from the plant and pathogen : different approaches in transgenesis aiming resistance against *Xylella fastidiosa* in *Citrus sinensis*

Palavras-chave em inglês:

Quorum sensing

Xylella fastidiosa

Citrus variegated chlorosis

Citrus canker

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Alessandra Alves de Souza [Orientador]

Camila Caldana

Ricardo Harakava

Celso Eduardo Benedetti

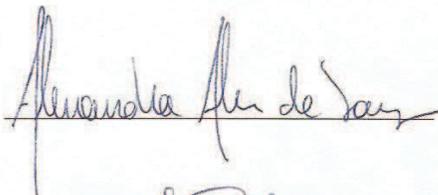
Francisco de Assis Alves Mourão Filho

Data de defesa: 08-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 08 de Agosto de 2014

Dra. Alessandra Alves de Souza



Dra. Camila Caldana



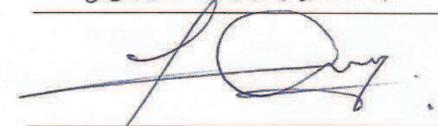
Dr. Ricardo Harakava



Dr. Celso Eduardo Benedetti



Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho



Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo



Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira



Dr. Michel Georges Alberts Vincentz



Resumo

A produção do suco de laranja concentrado é uma das commodities mais importantes para o agronegócio brasileiro, entretanto, os constantes problemas fitossanitários que afetam a citricultura vem aumentando os custos de produção e conseqüentemente a rentabilidade econômica deste setor. É urgente a busca por alternativas para solucionar os problemas fitossanitários da citricultura, nesse sentido, a utilização de transgenia mostra-se uma ferramenta promissora, pois possibilita a obtenção de plantas com genes exógenos que conferem resistência a doenças. Uma das doenças que afetam a citricultura brasileira é a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, onde todas as variedades de *Citrus sinensis* mostram-se suscetíveis a doença. Uma estratégia que vem sendo utilizada para resistência a *X. fastidiosa* que afeta a cultura de uva na Califórnia-EUA envolve a chamada “confusão do patógeno” onde utiliza-se genes do próprio patógeno visando a alteração da sinalização molecular entre as células bacterianas, interferindo em sua patogenicidade. Neste trabalho foram abordadas as transformações de *Nicotiana tabacum* e *Citrus sinensis* com o gene *rpfF* de *X. fastidiosa* causadora da CVC, envolvido na síntese de uma molécula sinalizadora que regula a expressão de genes associados a patogenicidade dessa bactéria.

Eventos dos cultivares de laranja doce Hamlin e Pineapple transformados com *rpfF* foram desafiados com *X. fastidiosa* e, após avaliações nas fases inicial e avançada de sintomas, foi observada uma redução na incidência e na severidade de sintomas de CVC. A movimentação bacteriana ao longo de tais plantas também foi comprometida, sendo que a população bacteriana em pontos distantes do ponto de inoculação foi maior em plantas do tipo selvagem quando comparadas as transgênicas. Esses resultados sugerem que as moléculas produzidas pelas plantas transgênicas foram capazes de alterar o comportamento da bactéria, reduzindo sua patogenicidade. Outro fitopatógeno que ataca pomares brasileiros é *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, que também apresenta o gene *rpfF*, e assim como em *X. fastidiosa*, é responsável pela sinalização molecular. Eventos transgênicos de Carrizo e Pineapple também foram desafiados com *X. citri*. Nesse patógeno, a interrupção da sinalização mediada por DSF, Diffusible Signal Factor - uma molécula de ácido graxo, reduz sua virulência, e interessante, sintomas de cancro cítrico foram reduzidos nas plantas transgênicas. Em folhas transgênicas não foi observado o aparecimento de pústulas, e biofilmes formados na área da inoculação foram

alterados. Genes modulados por DSF em bactérias isoladas de plantas transgênicas foram reprimidos, sugerindo que a sinalização foi comprometida. Por fim, seiva das plantas transgênicas não ativou a expressão do promotor *engA::GFP* em *Xanthomonas campestris* biosensoras, indicando que a molécula produzida por essas plantas foi capaz de alterar a sinalização. Por outro lado, a seiva das plantas transgênicas ativou a expressão do *hxfA::PhoA* em *X. fastidiosa* biosensoras, indicando a funcionalidade dessa molécula para esse fitopatógeno. Portanto, em ensaios com *X. citri*, o DSF das plantas transgênicas atuou como antagonista, diminuindo a virulência da bactéria através da alteração da sinalização molecular. Esses resultados mostram que as moléculas sinalizadoras produzidas por plantas transformadas com *rpfF* de *X. fastidiosa* são promissoras na tentativa de controle de CVC e cancro cítrico.

Abstract

The production of concentrate orange juice is one of the most important commodities for Brazilian agribusiness, however, the constant phytosanitary problems affecting the citrus industry is increasing production costs and consequently the economic profitability of this sector. It is urgent to search for alternatives to solve citrus phytosanitary problems, in this sense, the use of transgenesis shows a promising tool because it enables the production of plants with exogenous genes that confer resistance to diseases. One of the diseases that affect Brazilian citrus industry is the citrus variegated chlorosis (CVC), caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, where all varieties of *Citrus sinensis* are susceptible to this disease. One strategy that has been used for *X. fastidiosa* resistance that affects grape cultures in California-USA involves the so-called "pathogen confusion" that is related to the usage of genes of the pathogen itself aiming to change the molecular signaling between bacterial cells by interfering in its pathogenicity. In this work we will discuss the transformation of *Nicotiana tabacum* and *Citrus sinensis* with the *rpfF* gene isolated from *X. fastidiosa* causing the CVC, involved in the synthesis of a signaling molecule that regulates the expression of genes associated with pathogenicity of these bacteria.

Transgenic events of Hamlin and Pineapple transformed with *rpfF* were inoculated with *X. fastidiosa* and after evaluations in early and advanced stages of symptoms, a reduction was observed in the incidence and severity of symptoms of CVC. Bacterial movement along these plants was also impaired, and the bacterial population analyzed far from the point of inoculation was higher in wild type plants compared to transgenic ones. These results suggest that the molecules produced by the transgenic plants were able to change the behavior of the bacteria, reducing its pathogenicity. Another pathogen that attacks Brazilian orchards is *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which also features *rpfF* gene, and as in *X. fastidiosa* is responsible for molecular signaling. Transformed plants of Carrizo and Pineapple were also challenged with *X. citri*. In this pathogen, the interruption of DSF-mediated signaling reduces its virulence, and interestingly, citrus canker symptoms were reduced in transgenic plants. In transgenic leaves there was no pustules development and alterations in biofilms formed in the area of inoculation were observed. Genes modulated by DSF in bacteria isolated from transgenic plants were repressed, suggesting that signaling was compromised. Finally, sap of transgenic plants did not

activate the expression of the promoter *engA::GFP* in *Xanthomonas campestris* biosensors, indicating that the molecule produced by these plants was able to change the signaling. On the other hand, the sap of transgenic plants activated the expression of *hxfA::PhoA* in *X. fastidiosa* biosensors, indicating the functionality of this molecule for this pathogen. Therefore, in assays with *X. citri*, the DSF of transgenic plants acted as antagonist, decreasing the virulence of the bacteria by changing the molecular signaling. These results show that the signaling molecules produced by plants transformed with *rpfF* of *X. fastidiosa* are promising in the attempt to control CVC and citrus canker.

SUMÁRIO:

Resumo	<i>vii</i>
Abstract	<i>ix</i>
Dedicatória	<i>xiii</i>
Agradecimentos	<i>xiv</i>
Capítulo 1	1
1. Introdução geral	1
Capítulo 2 - Utilização do gene <i>rpfF</i> de <i>Xylella fastidiosa</i> para transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> e <i>Citrus sinensis</i> visando resistência a Clorose Variegada dos Citros	23
Resumo	23
1. Introdução	25
2. Hipótese	31
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Materiais e Método	32
5. Resultados	49
6. Discussão	76
7. Conclusões gerais do patossistema <i>Xylella fastidiosa</i>	80
Capítulo 3 - Expression of <i>Xylella fastidiosa</i> RpfF in citrus disrupts signalling in <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> and thereby its virulence	85
1. Hipótese	85
2. Objetivos	85
2.1. Objetivo Geral	85
2.2. Objetivos específicos	85
Artigo aceito para publicação na revista <i>Molecular Plant-Microbe Interactions</i> no qual participo como primeira autora	87
3. Conclusões gerais do patossistema <i>Xanthomonas citri</i>	128
Apêndice I - Utilização de genes de <i>Citrus reticulata</i> para transformação genética visando resistência a <i>Xylella fastidiosa</i>	129

1. 1. Introdução	129
2. Hipótese	133
3. Objetivos	133
3.1. Objetivo Geral	133
3.2. Objetivos específicos	133
4. Materiais e Método	134
5. Resultados e discussão	139
6. Considerações finais	147
Apêndice II - Utilização de genes de <i>C. reticulata</i> para obtenção de plantas de <i>C. sinensis</i> e <i>N. tabacum</i> resistentes a <i>X. fastidiosa</i> – doutorado sanduíche desenvolvido na Universidade da Flórida	151
1. Introdução	151
2. Objetivos específicos	154
3. Materiais e Método	155
4. Resultados e discussão	161
5. Considerações finais	171
Anexo I - Curva de crescimento de <i>X. citri</i> isoladas de folhas não destacadas de plantas transgênicas e do tipo selvagem inoculadas	174
Anexo II - Sintomatologia de cancro cítrico desenvolvida em folhas não destacadas de plantas transgênicas e do tipo selvagem inoculadas com <i>X. citri</i>.....	176
Conclusões gerais.....	178
Anexo III – Declaração de Bioética.....	179

*À minha mãe, que é meu exemplo de mulher forte,
razão da admiração de muitos
e para mim um espelho,
ofereço*

*Ao meu marido, que me deu a oportunidade de viver
uma história diferente e cheia de amor,
dedico*

*“Assim diz o Senhor: Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força;
não se glorie o rico nas suas riquezas;
Mas, o que se gloriar glorie-se nisto: em Me conhecer e saber que Eu sou o Senhor, que faço
beneficência, juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado, diz o Senhor”. Jeremias
9:23,24*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me capacitar para esse trabalho. Por cuidar dos meus passos e me apresentar pessoas que sempre colaboraram na realização dessa empreitada. Por abençoar tantas idas e vindas e me mostrar, de inúmeras maneiras, o tamanho do Seu amor.

Ao meu marido, Mario João Salviatto Filho, por me convidar para uma nova vida, por ter despertado em mim um sentimento no qual eu já não acreditava e ser esse companheiro inacreditável! Obrigada por entender que os dias inteiros em frente a um computador eram necessários e me dar suporte pra que eu conseguisse terminar essa etapa. Amo você com tudo o que há de mais forte em mim!

À minha família que nunca me desamparou, que me ensinou valores dos quais jamais esquecerei.

À toda a equipe do Centro de Citricultura pelo apoio, pela convivência e pelo aprendizado. Ao Dr. Marcos Machado pela oportunidade de desenvolver meu trabalho aqui no Brasil e na Universidade da Flórida.

À minha orientadora, Dra. Alessandra Alves de Souza, que nesses 10 anos de trabalho me ensinou muito mais que ciência! Obrigada por me motivar, por acreditar em mim, por vibrar com as minhas conquistas e pelos puxões de orelha que fizeram com que o sabor de cada uma delas fosse ímpar!

Ao Dr. Juarez Pires Tomaz pelos rápidos, mas intensos (!), anos de trabalho em equipe!

Ao pessoal da salinha da pós pela convivência, principalmente ao pessoal do grupo Xylella/Xanthomonas que me ajudaram pra valer durante todo o trabalho,

Aos amigos Fiotão, Ursinho e Wilha, pela imensa ajuda, pelos dias (e noites) de trabalho e pela amizade que construímos! Nossa convivência é a prova de que podemos ter uma família também no local de trabalho!

À querida amiga Carolina Sardinha Francisco pela parceria e amizade! Obrigada por todas as noites de companheirismo no lab, com direito a lanche com mortadela e discussões que foram desde maneiras de consertar o Brasil a como melhorar nossa vida com Deus!

Ao prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz pelo apoio com as etapas de transformação e estudo em *Arabidopsis thaliana*,

Ao pessoal do laboratório do prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, principalmente ao Dr. Mourão e à Dra. Liliane Cristina Libório Stipp, pela ajuda com a etapa de transformação de plantas,

Aos profissionais do laboratório da prof. Dra. Gloria Moore que me acolheram e me proporcionaram uma experiência maravilhosa de trabalho e de convívio, me ensinando a cada dia. Mainly to Dr. Gloria Moore, who accepted me and let me work in her lab, to Dr. Vicente Febres, this so kind gold heart friend (!!!) who helped me since the beginning, but did not accepted me on Facebook yet, and Ms Qingshun Shi, with whom I spent very nice talks about soccer and science! Wait me for some extra coffees!

Às súper pernambucanas Alice Maciel e Noely Cavalcanti por tantos e tantos finais de semana maravilhosos no Sun Bay Apartments! Gostaria de perguntar mais uma vez: meninas, cerveja ou vinho pra hoje?

Às minhas irmãs Patrícia Maria Pinto e Julia Maria Baldrighi pelo que o encontro casual de Gainesville fez com as nossas vidas! Aquele lugar foi muito especial pra mim porque me proporcionou ter encontrado em vocês uma outra família,

Aos brasileiros do bloco vizinho, principalmente ao José Tiago das Neves Neto por todo o cuidado, ter salvado a gente de baratas e ao André Aguiar pelas caronas todas naquela UF!

Às meninas do ap de cima – Angélica Pedrico e Helena Pontes Chiebao – e às meninas que tive como filhas – Juliana Pereira (Princesa) e Maria Cortez, pela convivência maravilhosa que tivemos juntas,

Ao casal Cassandra e João pela ajuda em vários momentos e também pela amizade que fizemos

To Dr. Steven Lindow for the precious help with the paper and experiments developed in his lab

À Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Projeto n^o – 09/50253-7) que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Capítulo 1

1. Introdução Geral

1.1 A *Xylella fastidiosa* e a Clorose Variegada dos Citros

Seria possível imaginar a economia brasileira sem o setor citrícola? Certamente não. A citricultura, principalmente a paulista, é um segmento econômico extremamente forte no nosso país. No ano de 2012 o Brasil foi líder nas exportações mundiais de suco de laranja, sendo o responsável por 60% da produção mundial (USDA, 2012). As exportações do produto apresentaram alta no ano de 2013, sendo que em Agosto o setor já havia embarcado 155,1 mil toneladas de suco de laranja. Nesse mesmo mês, foram embarcadas diariamente 9,1 mil toneladas de suco, volume 40,3% maior do que o embarcado no mesmo período em 2012. Entretanto o valor da tonelada do suco de laranja apresentou queda de 17,5% em relação aos preços pagos em 2012 (dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior). De acordo com estimativas da Câmara Setorial de Citricultura, é possível que a safra de 2014 seja de 308 milhões de caixas, valor que supera em três vezes a colheita do maior concorrente de mercado – a Flórida (EUA). Esse montante, se confirmado, será capaz de gerar R\$120 milhões em negócios. Embora pareçam altos, esses números refletem um setor competitivo que enfrenta uma grave crise econômica.

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de citros, mas seu parque citrícola vem diminuindo nos últimos três anos, e a projeção para 2015 é de contínua queda. A área plantada em 2012 era aproximadamente 600 mil hectares, com 173 milhões de árvores produtoras. Entretanto para 2015 estima-se a área plantada seja menor que 520 mil hectares, com redução para 155 milhões árvores produtoras (USDA, 2013). Dentre os fatores que contribuem para o encolhimento do setor estão problemas fitossanitários que a cultura vem sofrendo, os quais aumentam os gastos com manejo das diferentes doenças elevando o custo da produção dos frutos. Atualmente o Greening é o problema de maior destaque, entretando, a Clorose Variegada dos Citros (CVC) ainda é uma realidade nos pomares. Segundo dados do Fundecitrus (<http://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cvc/9>), no ano de 2012, aproximadamente 60% dos talhões da região norte do estado de São Paulo apresentavam incidência de CVC, e em 50% dos talhões das regiões centro, nordeste e leste a doença também estava presente. Atualmente o

número de novas plantas infectadas vem diminuindo devido ao cumprimento de uma lei que determina a produção de mudas de citros em condições de telado, elaborada em 2003 (Carvalho, S. A. 2003), e outras formas de manejo da doença.

A CVC foi inicialmente detectada em plantas de laranja doce nas regiões norte e noroeste do estado de São Paulo em 1987 (Rossetti *et al.*, 1990), associada à bactéria *Xylella fastidiosa*, que cresce limitada a vasos do xilema das plantas, e confirmada após a conclusão do postulado de Koch (Chang *et al.* 1993; Lee *et al.* 1993). Essa bactéria foi reclassificada como *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Schaad *et al.*, 2004). Sua transmissão entre plantas de citros ocorre principalmente por insetos vetores denominados cigarrinhas que se alimentam do conteúdo do xilema (Krugner *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 2002). Quatro espécies de cigarrinhas são consideradas as mais importantes na transmissão da bactéria por serem mais frequentemente encontradas em pomares no estado de São Paulo, *Acrogonia citrina*, *Bucephalogonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, e *Oncometopia facialis* (Lopes *et al.*, 2013).

Sintomas de CVC podem ser vistos na planta como um todo. Em folhas mais velhas, os sintomas se apresentam como manchas cloróticas irregulares na face adaxial da folha correspondidas na, face abaxial, por pontos necróticos. Sintomas similares a deficiência de ferro e zinco podem ser vistos nas folhas afetadas, e murcha no caso das folhas mais jovens como um resultado de estresse, hídrico também podem ser vistos (Machado *et al.*, 1994, De Souza *et al.*, 2009). Embora sintomas foliares sejam evidentes, perdas de produção devido à doença são reflexo de sintomas nos frutos: há uma diminuição drástica de tamanho que inviabiliza comercialmente laranjas produzidas em árvores afetadas.

Sintomas de CVC em plantas de laranja doce são causados, principalmente, pelo bloqueio de vasos do xilema como resultado do crescimento da bactéria (Hopkins *et al.*, 2002). Entretanto, bloqueio de vasos não parece ser a única causa de sintomas, que podem ser resultado de alterações na taxa fotossintética da planta, ou ainda secreção de toxinas pela bactéria (Ribeiro *et al.*, 2003). Estudos envolvendo modelos de interação da bactéria com o hospedeiro e possíveis características de patogenicidade de *X. fastidiosa* apresentaram um salto após o sequenciamento do genoma desse fitopatógeno por cientistas brasileiros. Nesse trabalho, diferentemente do que era observado por fitopatógenos clássicos, o genoma da bactéria revelou ausência de genes pertencentes ao sistema de secreção do tipo III e ausência de genes *avr*, indicando que a patogenicidade de *X. fastidiosa* não obedecia o reconhecimento de uma proteína de avirulência.

Por outro lado, a presença de genes envolvidos com captação de ferro, produção de exopolissacarídeos, toxinas e vários genes responsáveis por adesão sugeriam que a patogenicidade de *X. fastidiosa* era devido a um conjunto de fatores (Simpson *et al.*, 2000). A associação entre presença de sintomas nas plantas, presença de vasos de xilema altamente colonizados pela bactéria e abundante presença de genes que codificam proteínas de adesão fez com que o crescimento em biofilme dessa bactéria fosse posteriormente mais estudado. Além disso, essa característica de bloquear os vasos não é exclusiva de estirpes que infectam citros, mas também já foi relatada para estirpes que infectam outras culturas como uva, café, ameixa e carvalho (Hopkins e Purcell, 2002, Hartman *et al.*, 1991, Alves, 2003).

1.2 Mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa*

Até o momento nenhum estudo atribuiu a patogenicidade de *X. fastidiosa* a apenas um fator. Diferentes trabalhos demonstram que a patogenicidade da bactéria está associada a diferentes características. Uma delas é a produção de exopolissacarídeos (EPS) pela bactéria, e a formação de uma matriz extracelular, que foram detectados obstruindo alguns vasos de videiras infectadas pela estirpe Temecula de *X. fastidiosa* (Roper *et al.*, 2007). Outro fator que pode estar relacionado com a patogenicidade de *X. fastidiosa* é a presença de enzimas que degradam parede celular. Em videiras, por exemplo, já foi reportado que a atividade de poligalacturonase e endo-1,4-b-glucanase, duas enzimas produzidas pela estirpe Temecula de *X. fastidiosa*, está intimamente relacionada com a abertura de poros maiores no xilema de videiras, o que conseqüentemente facilita o movimento da bactéria pelos vasos, sendo um agravante para sintomas de Pierce Disease (Pérez-Donoso *et al.*, 2010). Além disso, poligalacturonase já foi relatada como sendo essencial para patogenicidade e movimento de *X. fastidiosa* em videiras, uma vez que a 30 cm acima do ponto de inoculação a recuperação de bactérias mutadas para o gene *pglA*, responsável por codificar uma poligalacturonase, foi em média 60% menor do que em plantas inoculadas com bactérias do tipo selvagem. Essa movimentação reduzida tem relação com a incapacidade apresentada pela bactéria mutada em degradar pit membranas, e reduzir a degradação dessas membranas também teria relação com a nutrição da bactéria nos vasos do xilema, já que o produto da degradação poderia servir como fonte de carbono para a bactéria (Roper *et al.*, 2007).

Embora ambos os trabalhos ressaltem a importância da atividade das enzimas na degradação da parede do xilema, e suas implicações na sintomatologia das plantas, ambos também discutem movimento como característica de patogenicidade. Na verdade, movimentar-se no interior do xilema também parece ser fator chave para o desenvolvimento de sintomas causados por *X. fastidiosa*. Isso foi demonstrado através da mutação de genes de antivirulência na estirpe Temecula de *X. fastidiosa*, sendo que um deles, o *hxfA*, que codifica uma hemaglutinina que atua na adesão intercelular, demonstrou ser responsável por regular a capacidade de movimentação da bactéria pelos vasos do xilema. A mutação do gene *hxfA* levou a um aumento da colonização dos vasos do xilema de videiras, espalhamento mais rápido da bactéria pela planta e aumento da severidade de sintomas da doença de Pierce (Guilhabert and Kirkpatrick 2005).

Além de movimento na planta, outra característica fundamental para o desenvolvimento de sintomas em infecções causadas por *X. fastidiosa* é a colonização do xilema. Nesse sentido, observações acerca do crescimento da bactéria no interior dos vasos do xilema concordam, independentemente do hospedeiro, que a bactéria forma agregados celulares capazes de causar a oclusão parcial ou completa de vasos (Hopkins 1989, Newman *et al.*, 2003, De Souza *et al.*, 2003). A agregação celular nesse processo de colonização parece ser primordial para o desenvolvimento de sintomas causados por *X. fastidiosa* em videiras. Bactérias que apresentavam mutações em genes relacionados a adesão célula a célula, bem como a adesão bacteriana em superfícies demonstraram reduzida capacidade de causar sintomas da doença de Pierce mesmo após 98 dias de inoculação (Feil *et al.*, 2007). Esses mutantes apresentaram menor capacidade de adesão celular e formação de agregados *in vitro*, por esse motivo, a colonização de vasos do xilema pode ter sido prejudicada, refletindo na redução de sintomas após a inoculação *in planta* (Feil *et al.*, 2007). A extensão de vasos colonizados bem como o tamanho das colônias de *X. fastidiosa* determinam a sintomatologia em videiras, onde foi demonstrado que folhas sintomáticas apresentavam 20 vezes mais vasos bloqueados por grandes agregados celulares do que folhas assintomáticas. Além disso, o número de vasos colonizados em folhas sintomáticas também era maior (Newman *et al.*, 2003).

A formação de agregados celulares não é somente específica da doença de Pierce em videiras, esses agregados já foram vistos também em citros e, assim como densidade da população bacteriana, estão relacionados aos sintomas de CVC (De Souza *et al.*, 2003). Outra

característica associada à doença em citros é a formação de biofilme, condição de crescimento na qual a bactéria é capaz de ativar genes que codificam fatores de virulência, proteínas de adesão e adaptação, permitindo a colonização de plantas e desenvolvimento de sintomas (De Souza *et al.*, 2003, De Souza *et al.*, 2004). A patogenicidade de *X. fastidiosa* está intimamente associada à formação de biofilme, assim como o desenvolvimento de uma população após inoculação em plantas de laranja doce e vinca. Por outro lado, bactérias que perderam a capacidade de formar biofilme após sucessivas repicagens *in vitro*, não foram capazes de colonizar tais plantas, havendo ainda declínio da população após 180 dias de infecção (De Souza *et al.*, 2003).

As fases da formação do biofilme pela estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* foram bem caracterizadas, sendo que o tempo de desenvolvimento desde a fase de adesão inicial até a fase de dispersão celular é em torno de 30 dias (De Souza *et al.*, 2004). A fase de alta densidade populacional da formação do biofilme, apresenta diferenças no perfil de expressão genética quando comparado à células na condição de crescimento livre, ou planctônico. Na fase de alta densidade populacional foi observada a indução da expressão de 202 genes, dentre eles pili e proteínas envolvidas na adesão da bactéria aos vasos do xilema (De Souza *et al.*, 2004).

Foi observado *in vitro* que desde a fase de adesão inicial até a fase de dispersão celular ocorre a participação proteínas de adesão fimbriais e não fimbriais, que de acordo com o tempo em que foram detectadas, sugerem que a formação do biofilme depende de adesão das células à superfície, bem como adesão célula-célula. A detecção dessas proteínas também em cortes de pecíolos de plantas infectadas, sugere que o processo de adesão não é restrito apenas ao desenvolvimento do biofilme *in vitro* (Caserta *et al.*, 2010). Diferenças temporais na detecção de proteínas durante a formação do biofilme corroboram resultados anteriores onde foi observado que a expressão de alguns genes relacionados a adesão foram diferencialmente expressos de acordo com o tempo de desenvolvimento do biofilme, demonstrando que esse é um processo dinâmico onde a densidade populacional determina perfis de expressão gênica (De Souza *et al.*, 2005). A relação entre expressão de genes que codificam diferentes proteínas durante o crescimento bacteriano e sua colonização no hospedeiro já foi discutida, demonstrando que essa regulação da expressão de proteínas nas diferentes fases do biofilme bacteriano alterna fases de colonização dos vasos do xilema e fases de maior probabilidade de aquisição da bactéria pelo inseto vetor (Chatterjee *et al.*, 2008). A **Figura 1** demonstra a dinâmica da expressão de

diferentes proteínas ao longo das fases de colonização do hospedeiro e aquisição da bactéria pelo inseto vetor.

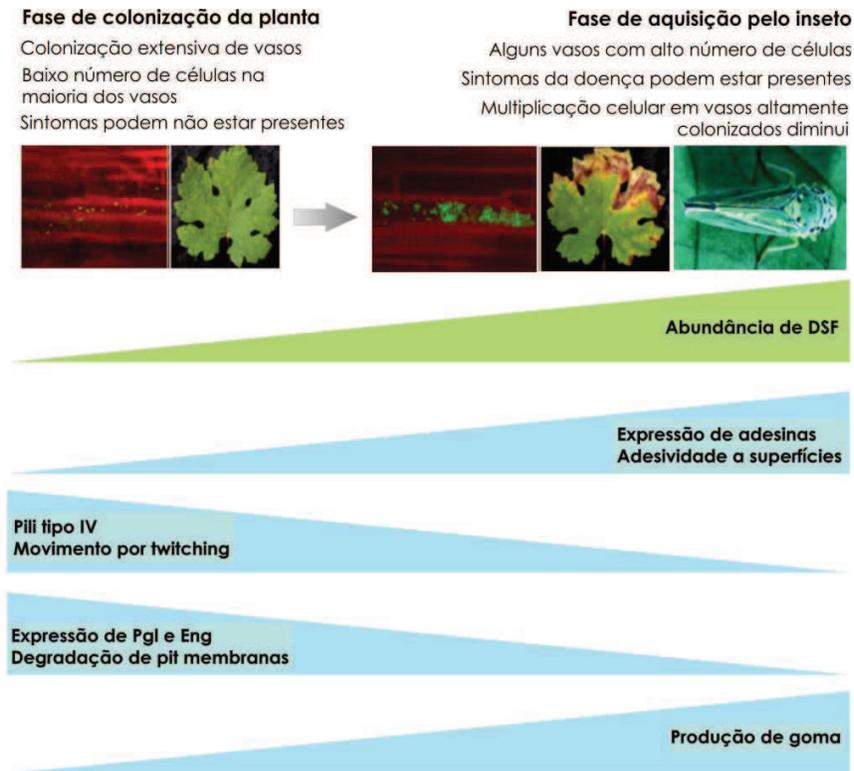


Figura 1: Modelo conceitual ilustrando que a colonização da planta pela bactéria e sua transmissão por vetores são processos mutuamente controlados em grande parte pela extensão de vasos colonizados. (Adaptado de Chatterjee *et al.*, 2008).

1.3 Resistência de *Citrus reticulata* à CVC

Embora a CVC seja um problema fitossanitário preocupante em pomares brasileiros, nem todas as plantas do gênero são afetadas pela doença. Tangerinas e híbridos com laranja doce são tolerantes ou resistentes à *X. fastidiosa* e o mapeamento genético desses híbridos mostrou que a herança genética relacionada a resistência é bastante complexa (Oliveira *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que até oito semanas após inoculação de *X. fastidiosa* foi possível detectar a bactéria por PCR em plantas de “Ponkan” (*C. reticulata*), entretanto, não foi possível o seu

isolamento. Por outro lado, em plantas de “Pêra” (*C. sinensis*) foi possível detectar e isolar a bactéria nesse mesmo período de tempo. Os autores sugerem que a bactéria possa ter um breve período de sobrevivência dentro de plantas de “Ponkan” planta mas não é capaz de se desenvolver (De Souza *et al.*, 2007).

Em plantas de “Ponkan” infectadas por *X. fastidiosa* foram identificados 81 genes superexpressos relacionados a diferentes categorias. Dentre aqueles relacionados ao metabolismo celular foram identificados principalmente genes envolvidos com a fotossíntese. O recrutamento de genes associados ao aparato fotossintético em Ponkans pode estar relacionado à ausência de clorose observada nessa espécie mesmo após infecção, tornando a planta capaz de manter a função fotossintética em níveis adequados (De Souza *et al.*, 2007), tal fato não ocorreu na espécie suscetível, *C. sinensis*, onde alterações na fotossíntese ocorreram mesmo antes do aparecimento dos sintomas (Ribeiro *et al.*, 2003). Essas alterações podem estar relacionadas à repressão de genes envolvidos na fotossíntese em plantas de Pêra infectadas com *X. fastidiosa*, apresentando ou não sintomas da doença após 6 meses de inoculação (De Souza *et al.*, 2007a).

A categoria de genes superexpressos mais significativa foi a de resgate celular, defesa e virulência. O fato de genes relacionados a defesa estarem superexpressos na condição de infecção sugere que a sua ativação esteja relacionada a resistência contra *X. fastidiosa* (De Souza *et al.*, 2007). Genes envolvidos com percepção de padrões moleculares de microrganismos (PAMPs), síntese de ácido jasmônico, sinalização mediada por ácido salicílico, proteção contra stress oxidativo e chaperonas foram alguns dos genes envolvidos nessa categoria (De Souza *et al.*, 2007). A identificação da suprexpressão de um CC-NBS-LRR (De Souza *et al.*, 2007), um receptor citoplasmático envolvido no reconhecimento de uma AvrRpt2 na interação incompatível entre *Pseudomonas syringae* e *Arabidopsis thaliana* (Coaker *et al.*, 2005), sugere que tangerina pode estar reconhecendo algum padrão molecular da bactéria (De Souza *et al.*, 2007), já que no genoma da *X. fastidiosa* não foram identificados genes relacionados a proteínas Avr (Simpson *et al.*, 2000). Esse conjunto de genes sugere que a defesa de *C. reticulata* contra *X. fastidiosa* envolve traços de resposta não – hospedeira, através de reconhecimento de elicitores não específicos (Ingle *et al.*, 2006), e diferentes vias de defesa foram ativadas, agindo de maneira sinérgica (De Souza *et al.*, 2007).

Estudos demonstraram que o reconhecimento do patógeno pela planta ocorreu logo após 1 dia de infecção por *X. fastidiosa* em *C. reticulata*, uma vez que através de análises de RNA-seq

foi visto a superexpressão de um gene similar a uma proteína kinase do tipo LRR-RLK de *Arabidopsis thaliana* envolvida no reconhecimento de EF-Tu e flagelina (Rodrigues *et al.*, 2013). Esse resultado sugere que a planta foi capaz de reconhecer algum padrão molecular da bactéria e pode estar ativando respostas de defesa logo nas primeiras horas após a infecção (Rodrigues *et al.*, 2013). Outro gene encontrado superexpresso nessa condição avaliada foi o RLP12, receptor like protein 12, que também codifica uma proteína de reconhecimento e reforça a hipótese de reconhecimento de algum padrão molecular pela planta (Rodrigues *et al.*, 2013). O gene CC-NBS-LRR anteriormente encontrado por De Souza *et al.*, 2007 também foi superexpresso após 1 dia de inoculação, sugerindo que a proteína codificada por ele pode estar envolvida na percepção de algum padrão molecular associado a degradação de parede (Rodrigues *et al.*, 2013). Padrões moleculares associados a degradação de parede celular são reconhecidos por receptores citosólicos (Boller e Georg 2009) e a colonização por *X. fastidiosa* envolve a produção de enzimas como endoglucanases e celulases, envolvidas na degradação da parede do xilema (Simpson *et al.*, 2000).

Além dos genes de defesa superexpressos demonstrados acima, e o possível envolvimento das vias do ácido salicílico e do ácido jasmônico atuando de maneira sinérgica, foi demonstrado que em tangerinas pode haver ainda a participação de hormônios, incluindo ácido indol acético, na defesa contra *X. fastidiosa* (Rodrigues *et al.*, 2013).

1.4 Obtenção de plantas transgênicas visando o combate a patógenos

Talvez uma das maiores dificuldades encontradas na agricultura seja o combate a patógenos. O ataque de bactérias e vírus a pomares e lavouras diminui a qualidade da produção e gera perdas econômicas. Os diferentes estudos da interação de diversos microrganismos com plantas hospedeiras possibilitou o aumento dos conhecimentos sobre mecanismos utilizados durante a infecção e como as plantas se defendem. Esses conhecimentos, juntamente com técnicas de engenharia genética permitiram a manipulação genética para a geração de plantas com traços de tolerância ou resistência a determinados microrganismos. A descoberta da relação entre as diferentes vias de sinalização de defesa e os patógenos que as ativam permitiu a elaboração de alterações genéticas em plantas hospedeiras através da introdução de um ou alguns genes e elementos regulatórios, ou através do silenciamento de genes endógenos. Em

alguns casos, genes candidatos a resistência de plantas alvo contra determinados patógenos são transferidos para plantas modelo para verificação de sua função.

Em tomate, diferentes estudos possibilitaram a identificação de uma série de MAP kinases, proteínas regulatórias envolvidas com a percepção e ativação de defesa, envolvidas na defesa contra bactérias como *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, contra insetos e fungos (Ekengren *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2013; Stulemeijer *et al.*, 2007; Virk *et al.*, 2013). A identificação da ativação de 4 MAP kinases SIMKK1-4 (*Solanum lycopersicum* Mitogen-activated protein kinase) em tomates durante a infecção por *Botrytis cinerea* levou à elaboração de um trabalho visando determinar o papel de tais proteínas na resistência de tomates contra esse fungo. O silenciamento de alguns desses genes em tomates levou ao aumento da suscetibilidade contra esse fungo e a expressão transiente de SIMKK2 e SIMKK4 em plantas de tabaco resultou na diminuição de lesões causadas por *B. cinerea*, demonstrando seu envolvimento na defesa (Li *et al.*, 2014). Em um outro estudo, autores demonstraram dupla função de uma proteína do tipo DNAJ de tomate através da sua superexpressão em tabaco. O gene *Lycopersicon esculentum* chloroplast DnaJ protein 2 (LeCDJ2) isolado de tomates foi clonado sob o domínio do promotor 35S, um promotor forte oriundo do vírus do mosaico da couve flor, e transformado em plantas de tabaco. Resultados desse estudo demonstraram envolvimento desse gene na resistência a seca e também contra a bactéria *Pseudomonas solanacearum*, possivelmente através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de proteínas do tipo PR 1 e 2 (Guodong *et al.*, 2014). Além desses, a superexpressão de *rolB*, um gene de *Agrobacterium rhizogenes* cuja função exata é desconhecida, quando transformado em plantas apresenta envolvimento com dominância apical, indução de florescimento e alterações no tamanho de folhas e frutos. A transformação de tomates com *rolB* a gerou linhagens transgênicas mais baixas e que produziram frutos menores, entretanto os frutos apresentaram maior valor nutricional e as plantas foram mais resistentes a dois fungos diferentes *Fusarium oxysporum* e *Alternaria solani* (Arshad *et al.*, 2014). O silenciamento do gene SAMT (salicylic acid methyl transferase) em tomates levou a um aumento na resistência contra infecção por ácaros. Plantas com SAMT silenciado apresentaram redução no acúmulo de MeSA (metil salicilato) e também redução na emissão de compostos voláteis, tais compostos são atrativos para ácaros e estes apresentaram preferência para se alimentar em plantas do tipo selvagem e não naquelas com SAMT silenciado. Além disso, essas plantas foram mais resistentes do que plantas do tipo

selvagem após infecção por *F. oxysporum*, indicando que o bloqueio da atividade de SAMT nessas plantas foi benéfica para o aumento da resistência contra esse fungo (Ament *et al.*, 2010).

Genes de arroz também já foram reportados como envolvidos na defesa de bactérias e fungos. A infecção por bactérias induz a expressão de receptores do tipo LRR em diferentes plantas, e em arroz, a interação entre *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ativa a expressão em uma proteína com domínio eLRR codificada pelo gene OsLRP (*Oryza sativa* leucine-rich repeat protein) sugerindo seu envolvimento no processo de defesa contra esse microrganismo. O gene isolado de arroz foi clonado sob o domínio de um promotor 35S e transformado em repolho chinês, a fim de obter linhagens mais resistentes a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Essa bactéria é a causadora de podridão – mole em repolhos e linhagens transgênicas obtidas foram mais resistentes à infecção causada por essa bactéria após inoculação. Repolhos super expressando o gene de arroz demonstraram redução nos sintomas provocados após inoculação das folhas com uma suspensão bacteriana de *P. carotovorum*, além disso, isolamento após infiltração da bactéria em folhas demonstrou que a população bacteriana após 3 dias de inoculação diminuiu 20 vezes quando comparadas ao controle demonstrando aumento de resistência nas plantas transgênicas (Park *et al.*, 2012).

Em alguns casos, genes de plantas do mesmo gênero foram transferidos entre espécies diferentes e resultaram no aumento da resistência contra patógenos. Em batatas de espécies não domesticadas existem relatos de resistência a *Phytophthora infestans*, o fungo causador da praga das batatas, doença que ocasiona o apodrecimento dos tubérculos (Jansky, 2000). Em 2001, estimativa de danos causados por esse fungo em produtores de batatas excedeu 280 milhões de dólares (Guenther *et al.*, 2001). A variedade Potae9, originária da Coreia, apresenta alguns genes R envolvidos na resistência a *P. infestans*. Foram isolados 2 desses genes, *Rpi-vnt1.1* e *Rpi-sto1*, genes de resistência de amplo espectro contra requeima da batata, para clonagem e construção de um cassete de expressão que após transformado nas variedades Atlantic e Bintje, ambas suscetíveis ao fungo, originou linhagens resistentes (Ryong Jo *et al.*, 2014). Em maçãs, a transferência do gene Riv6, originário da variedade de Florina, para plantas da variedade Gala conferiu resistência contra, *Venturia inaequalis*, o fungo causador da sarna da macieira. Todas as linhagens obtidas apresentaram baixos níveis de expressão de Riv6 e ainda assim apresentaram maiores níveis de tolerância ao fungo, entretanto, a total resistência não foi observada (Vanblaere *et al.*, 2014). Ambos os trabalhos utilizam a estratégia de transformação denominada cisgenia,

que envolve a clonagem do gene alvo contendo seus próprios elementos regulatórios entre espécies sexualmente compatíveis (Schouten *et al.*, 2006). Essa técnica é melhor aceita pela opinião pública, já que é vista como uma maneira de acelerar o melhoramento genético clássico e não envolve a utilização de genes marcadores (Schouten *et al.*, 2006).

Alguns genes responsáveis por sinalização em microrganismos também já foram transformados em plantas a fim de obter aumento da resistência. Essa sinalização, conhecida por *quorum sensing* (QS), ocorre quando a população bacteriana se encontra em alta densidade celular em biofilmes e é responsável por respostas a alterações ambientais através da comunicação célula a célula, controlando a modulação de genes frente à estímulos (Whitehead *et al.*, 2001). A comunicação entre as células em bactérias é baseada em pequenas moléculas secretadas, cuja percepção inicia uma resposta coordenada na população que contribui diretamente na patogenicidade através da produção de determinantes de virulência como toxinas, proteases e exoenzimas. A sinalização através de QS pode ainda contribuir para o aumento da resistência contra antibióticos pelo aumento do biofilme ou expressão de genes que codificam bombas efluxo. Em algumas bactérias, o trabalho coordenado em grupo fornece uma maneira de criar defesas para sobrepor barreiras que células individualizadas não conseguiriam (LaSarre e Federle, 2013). Diferentes moléculas associadas a QS já foram caracterizadas e se agrupam em: Acil Homoserina Lactonas (AHL) ou autoindutores 1 (AI-1), geralmente produzidas por bactérias gram-negativas; peptídeos sinal, geralmente produzidos por bactérias gram-positivas; autoindutores do tipo 2 (AI-2), produzidos por bactérias gram positivas e negativas; pequenas moléculas difusíveis (DSF) e autoindutores do tipo 3 (LaSarre e Federle, 2013). Dessa maneira, bloquear a comunicação entre bactéria seria uma maneira efetiva de alterar sua virulência e capacidade de adaptação a um hospedeiro. Essa estratégia foi bem sucedida em tabaco e batatas superexpressando o gene *aiiA* oriundo de *Bacillus sp.* 240B1, que codifica uma AHL-lactonase capaz de inativar AHLs. Plantas transgênicas contendo *aiiA* foram desafiadas com diferentes concentrações de população de *Erwinia carotovora*, uma bactéria que causa doenças em diversas culturas e utiliza como sinal de QS uma molécula da família das AHLs denominada OHHL. Plantas transgênicas expressando AHL-lactonase demonstraram redução na severidade de sintomas quando comparadas as plantas do tipo selvagem. Tanto tabacos quanto batatas apresentaram um retardo no aparecimento dos sintomas e também menor área de lesão causada pela bactéria (Dong *et al.*, 2001). Em um trabalho recente, alterações no comportamento de *X.*

fastidiosa foram reportadas em videiras superexpressando uma DSF sintase isolada da própria bactéria. Essa enzima é codificada pelo gene *rpfF* em *X. fastidiosa* e foi demonstrado que mutantes para esse gene foram capazes de colonizar videiras mais facilmente, sendo mais virulentos (Newman *et al.*, 2004). Por outro lado, videiras superexpressando *rpfF* após inoculação com *X. fastidiosa* apresentaram redução nos sintomas de doença de Pierce e a bactéria não foi capaz de se movimentar a longas distâncias do ponto de inoculação, como em plantas do tipo selvagem, sugerindo que o aumento de DSF na planta resultou em alterações na virulência da bactéria (Lindow *et al.*, 2014).

Em citros, diferentes abordagens foram publicadas demonstrando a obtenção de plantas mais tolerantes ao *Citrus tristeza virus*, causador da tristeza do citros, e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a bactéria causadora do cancro cítrico. A tristeza do citros é uma doença que foi capaz de mudar o curso da indústria de citros. Devido aos grandes prejuízos econômicos causados pela doença, foram necessárias alterações na utilização de porta enxertos, adoção de programas de controle fitossanitário de borbulhas e proteção cruzada de plantas com isolados atenuados do vírus na tentativa de combate a esse patógeno (Moreno *et al.*, 2008). Outra tentativa de combater esse patógeno contou com a produção de plantas transgênicas, e nesse caso, a técnica de silenciamento por RNA de interferência foi utilizada na obtenção de citros mais tolerantes ao vírus. As plantas foram transformadas com uma construção desenhada para a formação de um hairpin contendo sequências de três genes do vírus, p20, p23 e p25, responsáveis pela movimentação e formação do envelope. Em plantas transformadas foram detectados RNAs de interferência e após a garfagem dessas plantas em porta enxertos infectados não foi possível observar o desenvolvimento de sintomas nem a presença do vírus (Soler *et al.*, 2012).

Já o cancro cítrico é uma doença que está presente nas maiores regiões produtoras de citros no mundo, como por exemplo a Flórida nos Estados Unidos, e vem crescendo no estado de São Paulo desde 2009. Alguns dos principais sintomas dessa doença são a desfolha de plantas e a queda prematura de frutos, a desfolha leva à queda da taxa fotossintética e a queda de frutos antes da colheita causa danos econômicos aos produtores. Além disso, frutos com lesões de cancro cítrico não podem ser comercializados em áreas do país onde a doença não está presente, e também não podem ser comercializados no mercado internacional (Behlau e Belasque Jr, 2014). Estudos envolvendo a obtenção de plantas transgênicas com algum nível de tolerância ao cancro já foram reportados. Em um deles, os autores isolaram o gene *AtNPR-1* de *Arabidopsis*

thaliana e clonaram sob o domínio do promotor 35S para transformação da variedade de toranja Duncan e laranja doce Hamlin. Esse gene codifica a proteína de defesa PR-1, associada a resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR), e por estar envolvido em uma resposta de amplo espectro foi escolhido no trabalho. Plantas transformadas apresentaram níveis diferentes de expressão do transgene, e tanto em Duncan quanto em Hamlin com níveis altos e médios de expressão, houve redução no número de lesões de cancro e redução do crescimento da população de *X. citri*, avaliado por isolamento. Em plantas com altos níveis de expressão do *AtNPR-1* a severidade das lesões foi menor. Os níveis de ácido salicílico e a expressão do gene que codifica a proteína PR-2 não foram diferentes em plantas do tipo selvagem e transgênicas, sugerindo que *AtNPR-1* não ativou constitutivamente a defesa nas plantas transformadas, mas sua superexpressão foi capaz de reduzir sintomas de cancro (Zhang *et al.*, 2010).

Além da clonagem de proteínas de defesa como estratégia de aumento da tolerância contra *X. citri*, outro alvo interessante poderia estar relacionado a atividade da proteína PthA. Essa proteína de avirulência é codificada pelo gene *pthA*, e sua presença é fundamental para o desenvolvimento dos sintomas clássicos de cancro cítrico, já que bactérias com esse gene mutado não apresentam virulência (Swarup *et al.* 1991). Essa proteína é reconhecida como o principal determinante de patogenicidade de *X. axonopodis* pv. *citri* (Brunings and Gabriel, 2003) e faz parte da família AvrBs3/PthA, cujos membros são reconhecidos como efetores do tipo ativadores transcricionais (TAL), e são translocados para a célula hospedeira pelo Sistema de Secreção Tipo III, onde atuam como ativadores transcricionais (Kay *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006). Uma característica de proteínas da família of AvrBs3/PthA é a presença de regiões contendo unidades repetitivas de 34 aminoácidos, variáveis e praticamente idênticas, que determinam patogenicidade e avirulência (Kay and Bonas, 2009). Várias bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam múltiplas variantes das proteínas AvrBs3/PthA. A presença de de diferentes cópias do gene *avrBs3/ pthA* em uma mesma estirpe bacteriana sugere facilidade para a adaptação em diferentes hospedeiros, além disso, múltiplas variações de efetores do tipo TAL afetam diretamente a transcrição de genes alvo nos hospedeiros, e conseqüentemente, o início do processo da doença e o desenvolvimento de sintomas (Yang e Gabriel, 1995; Boch *et al.*, 2009; Yang e White, 2004).

Na estirpe 306 de *X. axonopodis* pv. *citri* foram identificados 4 tipos de proteínas PthAs PthA 1–4, diferentes entre si acerca de suas unidades repetitivas de 34 aminoácidos e dos

resíduos polimórficos nas unidades repetitiva (da Silva *et al.*, 2002). Foi demonstrado que proteínas PthAs 1 e 4 formam homodímeros, e que PthAs 2 e 3 formam heterodímeros entre si ou com aquelas do tipo 1 e 4 antes de seu transporte para o núcleo da célula hospedeira. Além disso foram identificadas interações entre as diferentes PthAs e proteínas de citros, sendo que PthAs do tipo 2, 3 e 4 interagiram com proteínas relacionadas a dobramento protéico, transporte nuclear, controle transcricional e reparo de DNA (Domingues *et al.*, 2010). PthAs do tipo 2 e 3 mostraram interação com uma α -Importina, que apresentou 87% de identidade com aquela descrita para *Capsicum annuum* onde foi demonstrada sua capacidade de interação e importação nuclear de uma AvrBs3 (Szurek *et al.*, 2001; Domingues *et al.*, 2010).

Etapas do transporte de PthA no interior da célula do hospedeiro foram descritas anteriormente e sabe-se que ela é levada ao núcleo da célula pela importina α , uma proteína do hospedeiro que reconhece um sinal de localização nuclear (NLS) presente em PthA (Lahaye e Bonas 2001). Em um trabalho recente, os autores elaboraram uma maneira de impedir a correta atuação da proteína de avirulência PthA de *X. citri* a fim de obter plantas mais tolerantes. Os autores clonaram a sequência de NLS sob o domínio de um promotor 35S para transformação das variedades de laranja doce ‘Succari’ e ‘Bingtang’, e desafiaram as plantas através de inoculação por agulha em folhas destacadas e não destacadas, além de inoculação por spray no caso dessas últimas. As lesões de cancro desenvolvidas nas plantas transgênicas foram menores e morfologicamente distintas daquelas observadas nas plantas do tipo selvagem. Em casa de vegetação, experimentos com inoculação por spray demonstraram um atraso no desenvolvimento dos sintomas e uma redução significativa na incidência de sintomas em plantas transgênicas. Os autores discutem que a expressão constitutiva de uma região NLS pelas plantas acabou por ocupar esse sítio de ligação na proteína importina α , impedindo assim a ligação de PthA quando injetado por *X. citri* no interior da célula hospedeira e, por consequência, reduzindo a virulência da bactéria (Yang *et al.*, 2011).

O aumento da tolerância de *C. sinensis* contra *X. axonopodis* pv. *citri* já foi reportada com sucesso em plantas transformadas com um gene de resistência isolado de arroz. O gene Xa21, presente em variedades selvagens de arroz, codifica um receptor kinase contendo repetições de leucina (LRR), envolvido na resistência de diferentes variedades de arroz contra a queima causada por bactérias (Ronald *et al.*, 1992). A transformação de diferentes variedades de laranja doce com o gene Xa21 mostrou redução da área foliar de lesão após inoculação bacteriana por

spray nos sete eventos de Hamlin obtidos. No caso dos eventos transgênicos das variedades Pêra e Natal, apenas um evento de cada variedade apresentou aumento da tolerância contra a bactéria. Os autores demonstraram que a transformação com um gene de resistência levou a um aumento da tolerância das plantas e que esse aumento foi dependente da variedade utilizada para transformação. Entretanto, apesar de vários eventos apresentarem redução na área foliar de lesão, não houve um evento completamente resistente (Mendes *et al.*, 2010). Além de genes de resistência reportados na geração do aumento da tolerância de *C. sinensis* contra *X. axonopodis* pv. *citri*, a utilização de um peptídeo antimicrobiano para transformação de plantas alvo também apresentou bons resultados. Atacina A, um peptídeo antimicrobiano isolado de *Trichoplusia ni* (Kang *et al.*, 1996) é codificado pelo gene *attA* e ao ser inserido no genoma de variedades de laranja doce como Hamlin (Boscariol *et al.*, 2006), Natal, Pêra e Valência demonstrou ser eficaz no aumento da tolerância dos sintomas causados pela bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* (Cardoso *et al.*, 2010). Nos casos de linhagens obtidas dos cultivares Hamlin, Valência e Natal foi possível observar uma redução da área de sintomas foliares de cancro que variou, aproximadamente, entre 45% a 70% dependendo do cultivar analisado (Boscariol *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010).

Ainda visando resistência a cancro cítrico, foi realizado um trabalho envolvendo a ativação da sinalização por uma MAP kinase no combate a *X. citri*. Essa MAP kinase, CsMAPK1, é expressa em laranjas – doce após a inoculação com *X. aurantifolii*, uma bactéria que não é capaz de infectar variedades comerciais brasileiras de laranja, e a interação dessa bactéria com laranja doce ativa a expressão de genes envolvidos com resposta de hipersensibilidade. Por outro lado, a via de defesa relacionada ao ácido salicílico foi suprimida em laranjas doce após algumas horas da infecção por *X. citri* (Cernadas *et al.*, 2008). A infecção de laranjas doce por *X. citri* ativa a expressão da proteína PR-5, podendo ser esta utilizada como marcadora da interação (Cernadas *et al.*, 2008). Visando tolerância a *X. citri* os autores clonaram CsMAPK1 sob o domínio do promotor da proteína PR-5 e após inoculação com a bactéria plantas transgênicas apresentaram altos níveis de expressão de CsMAPK1, indicando que o promotor da PR-5 foi induzido nessa interação, e a severidade dos sintomas de cancro nessas plantas também apresentou redução, com ausência de ruptura de tecido foliar nas pústulas formadas em uma das linhagens transgênicas obtidas. A população bacteriana recuperada após isolamento de plantas transgênicas foi cerca de 50 vezes menor do que em plantas do tipo selvagem. Além disso, essas plantas apresentaram um aumento na produção de espécies reativas

de oxigênio, o que possivelmente contribuiu para o aumento da resistência (de Oliveira *et al.*, 2013).

Diante do exposto acima fica evidente que esforços vem sendo feitos a fim de encontrar alternativas no combate a alguns patógenos que causam sérios danos a citricultura, e todos eles apresentaram resultados interessantes, aumentando a tolerância das plantas transformadas. Plantas transgênicas mais resistentes ao cancro cítrico já foram desenvolvidas utilizando diferentes estratégias de abordagem genética, demonstrando aumento de tolerância das plantas através do uso de diferentes genes alvo. Entretanto, embora a clorose variegada dos citros seja também uma doença extremamente preocupante pelos danos econômicos que causa, e haja o conhecimento de alguns mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa* em plantas hospedeiras, nenhum trabalho apresentando plantas de *C. sinensis* tolerantes a *X. fastidiosa* foi reportado até o momento. Portanto, é necessário o desenvolvimento de plantas de citros mais tolerantes a *X. fastidiosa* e a utilização de genes que sintetizam sinais que controlam o comportamento de virulência da bactéria *in planta* seriam bons alvos. Nesse caso, plantas super produzindo sinais moleculares capazes de alterar a comunicação intercelular também poderiam ser mais tolerantes a *Xanthomonas citri*, e essa abordagem também será reportada neste trabalho.

Bibliografia consultada

- Ament K., Krasikov V., Allmann S., Rep M., Takken F. L. W. e Schuurink R. C. 2010. Methyl salicylate production in tomato affects biotic Interactions. *The Plant Journal* 62: 124–134.
- Arshad W., Haq I., Waheed M. T., Mysore K. S. e Mirza B. 2014. Agrobacterium-Mediated Transformation of Tomato with *rolB* Gene Results in Enhancement of Fruit Quality and Foliar Resistance against Fungal Pathogens. *PLOS ONE* 9: e96979.
- Boscariol, R. L., Monteiro, M., Takahashi E. K. *et al.*, 2006. Attacin A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 530–6.
- Boller T. e Georg F. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60:379–406.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. 2009. Breaking the code of DNA-binding specificity of TAL-Type III effectors. *Science*, 326: 1509– 1512.
- Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4: 141–157.
- Cardoso, S. C.; Barbosa-Mendes, J. M.; Boscariol-Camargo, R. L.; Christiano, R. S. C.; Bergamin Filho, A.; Vieira, M. L. C.; Mendes, B. M. J.; Mourao Filho, F. A. A. 2010. Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp *citri*. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 185-192.
- Carvalho, S. A., Regulamentação atual da Agência de Defesa Agropecuária para a produção, estocagem, comércio, transporte e plantio de mudas cítricas no Estado de São Paulo, *Laranja*, 24, 199, 2003.
- Caserta R., Takita M. A., Targon M. L., Rosselli-Murai L. K., de Souza A. P., Peroni L., Stach-Machado, D. R., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima E. W., Machado, M. A. e A. A. de Souza. 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 76: 4250-4259.
- Cernadas, R. A., Camillo, L. R. e Benedetti, C. E. 2008. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol. Plant Pathol.* 9:609-631
- Chang C. J. e Donaldson R. C. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. *Phytopathology* 83, 192-194

Coaker G., Falick A. e Staskawicz B. 2005. Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by an eukaryotic cyclophilin. *Science* 22:548-50.

de Oliveira M. L., de Lima Silva C. C., Abe V. Y., Costa M. G., Cernadas R. A. e Benedetti C. E. 2013. Increased resistance against citrus canker mediated by a citrus mitogen-activated protein kinase. *Mol Plant Microbe Interact.* 26:1190-9.

De Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Carlos, E. F., Locali-Fabris, E. C., Amaral, A. M., Freitas-Astúa J., Silva-Pinhati A. C. O., Boscariol-Camargo R. L., Berger I. J., Rodrigues, C. M., Reis, M. S. e Machado M. A. 2007a. Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 957-964.

De Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta-Filho, Campos, M. A., Teixeira, J. E. C., Targon, M. L. P. N., Carlos, E. F., Ravasi, J. F., Fischer, Carlos N. e Machado e M. A. 2007b. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 965-971.

De Souza A. A., Takita M. A., Coletta-Filho H. D., Caldana C., Yanai G. M., Muto N. H., De Oliveira R. C., Nunes L. R. e Machado M. A., 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* **237**: 341-353.

De Souza A. A., Takita M. A., Coletta-Filho H. D., Caldana C., Goldman G. H., Yanai G. M., Muto N. H., Oliveira R. C., Nunes L. R. e Machado M. A., 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular and Plant Microorganism Interaction* **16**: 867-875.

De Souza A. A., Takita M. A., Amaral A. A., Coletta-Filho H. D. e Machado M. A., 2009. Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent of citrus variegated chlorosis. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* (Special Issue 2) 3: 73-80.

Domingues M. N., De Souza T. A., Cernadas R. A., De Oliveira M. L. P., Docena C., Farah C. S. e Benedetti C. E. 2010. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Molecular Plant Pathology* 11: 663-675.

Dong Y., Wang L., Xu J., Zhang H., Zhang X. e Zhang L. 2001. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-817.

- Ekegren S. K., Liu Y. L., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P. e Martin G. B. 2003. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J* 36:905–917
- Franklin Behlau e José Belasque Jr. 2014. Cancro cítrico: a doença e seu controle. 1^o edição, Fundecitrus, Araraquara – SP.
- Guenther J. F., Michael K. C. e Nolte P. 2001. The economic impact of potato late blight on US growers. *Potato Research* 44: 121 – 125.
- Hartman, J. R., Kaiser, C. A., Jarlfors, U. E., Eshenaur, B. C., Bachi, P. A. e Dunwell, W. C. 1991. Occurrence of oak bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* in Kentucky. *Plant Dis.* 75:862.
- Hopkins D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:271–90.
- Hopkins, D. L. e Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce’s disease of grapevine and other emergent diseases, *Plant Dis.*, 86:1056.
- Ingle R. A., Carstens M. e Denby K. J. 2006. PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* 28:880-889.
- Jansky, S., 2000: Breeding for disease resistance in potato. *Plant Breed. Rev.* 19, 69—155.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318, 648–651.
- Kay, S. and Bonas, U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 37–43.
- Krugner, R. *et al.*, 2000. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species, *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, Campinas, Brazil, September 13–18, 1998, p. 423.
- Lahaye T. e Bonas U. 2001. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci* 6:479–485.
- LaSarre B. e Federle M. J. 2013. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77: 73–111.
- Lee, R. F., Beretta, M. J. G., Hartung, J. H., Hooker, M. E. e Derrick, K. S. 1993. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathologica* 19:123-125.

- Lindow, S., Newman, K., Chatterjee, S., Baccari, C., Lavarone, A. T. e Ionescu, M. 2014. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease. *MPMI* 27: 244–254.
- Li X., Zhang Y., Huang L., Ouyang Z., Hong Y., Zhang H., Li D. e Song F. 2014. Tomato SIMKK2 and SIMKK4 contribute to disease resistance against *Botrytis cinerea*. *BMC Plant Biology*, 14:166.
- Lopes, J. R. S. e Krugner, R. 2013. Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*, *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*, J.K. Brown (ed.), APS Press, Saint Paul, MN.
- Lopes S. A, et al. 2000. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant–*Xylella fastidiosa* interactions. *Plant Dis* 84:827–830.
- Machado, E. C.; Quaggio, J. A.; Lagôa, A. M. M. A.; Ticelli, M. e Furlani, P. R. 1994. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6:53-57.
- Mendes, B. M. J., Cardoso, S. C., Boscariol-Camargo, R. L., Cruz, R. B., Mourão Filho F. A. A. e Bergamin Filho, A. 2010. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathology* 59:68-75.
- Moreno, P., Ambro's, S., Albiach-Marti', M.R., Guerri, J. e Peña, L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant. Pathol.* 9, 251–268.
- Neil A. Whitehead, Anne M. L. Barnard, Slater H., Simpson N. J. L. e Salmond G. P. C. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 365-404.
- Newman K. L., Almeida R. P. P., Purcell A. H. e Lindow S. E. 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xyella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7319–27.
- Newman K. L, Almeida R. P. P., Purcell A. H. e Lindow S. E. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*101:1737–42.
- Oliveira R. P., Cristofani M. e Machado M. A. 2005. Integrated genetic map of citrus based on RAPD markers. *Fruits* 60:187-193.
- Oh C. S., Hwang J., Choi M. S., Kang B. C. e Martin G.B. 2013. Two leucines in the N-terminal MAPK-docking site of tomato SIMKK2 are critical for interaction with a downstream MAPK to elicit programmed cell death associated with plant immunity. *FEBS Lett* 587:1460–1465.

Park Y. H., Choi C., Park E. M., Kim H. S., Park H. J., Bae S. C., Ahn I., Kim M. G., Park S. R. e Hwang D. J. 2012. Over-expression of rice leucine-rich repeat protein results in activation of defense response, thereby enhancing resistance to bacterial soft rot in *Chinese cabbage*. *Plant Cell Rep* 31:1845–1850.

Ribeiro, R. V., Machado, E. C. e Oliveira, R. F. 2003. Early photosynthesis responses of sweet orange plants inoculated with *Xylella fastidiosa*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 62, 167.

Ronald P. C., Albano B., Tabien R. *et al.*, 1992. Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, Xa21. *Science* 270, 1804-6.

Roper, M. C., Greve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C. 2007. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 411–419.

Rossetti V., Garnier M., Bové J. M., Beretta M. J. G., Teixeira A. R. R., Quaggio, J. A. e De-Negri, J. D. 1990. Présence de bactéries dans le xylème d'oranges atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 310: 345-349.

Ryong Jo K., Kim C., Kim S., Kim T., Bergervoet M., Jongsma M. A., Visser R. G. F., Jacobsen E. e Vossen J. H. 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology*, 14:50.

Schaad N. W., Postnikova E., Lacy G., Fatmi M.B. e Chang C.J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 290-300.

Schouten H. J., Krens, F. e Jacobsen E. 2006. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nat Biotechnol*, 24, 753.

Simpson A. J.G., Reinach F. C., Abreu F. A., Acencio M., Alvarenga R., et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151–59.

Stulemeijer I. J. E., Stratmann J. W. e Joosten M. H. A. J. 2007. Tomato mitogen-activated protein kinases LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 are activated during the Cf-4/Avr4-induced hypersensitive response and have distinct phosphorylation specificities. *Plant Physiol* 144:1481–1494.

Swarup S., De Feyter R., Brlansky R. H. e Gabriel D. W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker like lesions on citrus. *Phytopathology* 81:802–809

Soler N., Plomer M., Fagoaga C., Moreno P., Navarro L., Flores R. e Peña L. 2012. Transformation of *Mexican lime* with an intron-hairpin construct expressing untranslatable

versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnology Journal* 10: 597–608.

USDA., 2012. Gain report of global agricultural information network. http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Citrus%20Semiannual_Sao%20Paulo%20ATO_Brazil_5-30-2012.pdf.

USDA., 2013, Gain report of global agricultural information network. http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Citrus%20Annual_Sao%20Paulo%20ATO_Brazil_12-16-2013.pdf.

Vanblaere T., Flachowsky H., Gessler C. e Broggini G. A. L. 2014. Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the Rvi6 scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal* 12: 2–9.

Virk N., Zhang H. J., Li X. H., Zhang Y. F., Li D. Y. e Song F. M. 2013. Tomato SIMPK4 is required for resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to drought stress. *Acta Physiol Plant* 35:1211–1221.

Wang, G., Cai G., Kong F., Deng, Y., Ma, N. e Meng, Q. 2014. Overexpression of tomato chloroplast-targeted DnaJ protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 82: 95–104.

Yang, B., Sugio, A. e White, F. F. 2006. Os8N3 is a host diseasesusceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10 503–10 508.

Yang, Y. and Gabriel, D.W. 1995. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *J. Bacteriol.* 177, 4963–4968.

Yang, B. and White, F.F. 2004. Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 17, 1192–1200.

Yang L., Hu C., Li N., Zhang J., Yan J. e Deng Z. 2011. Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. *Plant Mol Biol* 75:11–23.

Yamamoto, P.T. et al. 2002. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas, *Summa Phytopathol.*, 28, 178.

Zhang X., Francis M., Dawson W. O., Graham J. H., Orbović V., Triplett E. W. e Mou Z. 2010. Over-expression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur J Plant Pathol*, 128:91–100.

Capítulo 2: Utilização do gene *rpfF* de *Xylella fastidiosa* para transformação de *Nicotiana tabacum* e *Citrus sinensis* visando resistência a Clorose Variegada dos Citros

Resumo

Xylella fastidiosa é uma bactéria presente nos pomares brasileiros há mais de 20 anos. Muitos estudos foram realizados a fim de se elucidar seus mecanismos de colonização tanto em plantas de citros como em outras culturas que essa bactéria também afeta, como por exemplo videiras. Estudos demonstraram que essa bactéria cresce formando biofilmes, condição de crescimento na qual *X. fastidiosa* é capaz de colonizar os vasos do xilema mais eficientemente. Essa condição de crescimento agregado permite que a bactéria se comporte como um organismo multicelular, através da sincronia entre percepção de sinais moleculares e ativação de genes para as mais diferentes respostas, em um mecanismo de comunicação intercelular chamado *Quorum Sensing*. Em *X. fastidiosa* esse mecanismo é dependente de uma molécula de ácido graxo denominada “Diffusible Signal Factor” (DSF), responsável por regular a expressão de genes associados tanto na sua capacidade em colonizar os hospedeiros como na sua aquisição pelo inseto vetor, demonstrando que a sinalização mediada por DSF é importantíssima para o ciclo de vida dessa bactéria. A própria virulência da bactéria é controlada pela produção de DSF, uma vez que mutantes não expressando *rpfF*, o gene que codifica uma DSF sintase, são mais virulentos quando inoculados em videiras, pois a bactéria se movimenta pelo xilema mais rapidamente, e conseqüentemente causa mais sintomas. Dessa forma, a utilização desse gene para transformação de videiras visando resistência contra *X. fastidiosa* se mostrou eficiente, uma vez que sintomas da doença de Pierce foram reduzidos em plantas transgênicas após a inoculação com o patógeno, pois o movimento da bactéria foi significativamente reduzido nas plantas.

A estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* que coloniza citros também apresenta o gene *rpfF*, entretanto não há estudos envolvendo mutações nessa estirpe e por isso não se tem relatos diretos sobre as funções de alguns genes. Por outro lado, similaridades entre os mecanismos de patogenicidade e colonização das estirpes Temecula, causadora da doença de Pierce em uva, e 9a5c auxiliam no desenvolvimento de hipóteses acerca da função de genes na estirpe 9a5c. Nesse sentido, a inserção do gene *rpfF* da estirpe 9a5c em laranja doce, a fim de se produzir uma planta

que sintetize DSF, pode ser uma alternativa na tentativa de obtenção de plantas com algum grau de tolerância a *X. fastidiosa*, e possível redução de sintomas de CVC, uma vez que as bactérias no interior de tais plantas também poderiam apresentar regulação genética determinada pelo DSF.

No capítulo 2 serão demonstrados os resultados obtidos da transformação de plantas de tabaco, utilizadas como modelo, e de plantas de citros, transformadas com o gene *rpfF*, assim como resultados do desafio dessas plantas com *X. fastidiosa*. Assim como demonstrado em videiras, houve redução da incidência e severidade da doença relacionada à infecção por *X. fastidiosa* tanto em tabaco quanto em citros, além de menor movimento da bactéria no hospedeiro, indicando que o *rpfF* é um gene promissor para transformação de citros visando resistência contra esse patógeno.

1. Introdução

1.1 Regulação e *quorum sensing* em biofilmes

Na condição de biofilme, bactérias são capazes de se comunicar quando estão em baixa ou em alta população, favorecendo traços de comportamento individual ou de comportamento social. Essa comunicação é chamada de *Quorum Sensing* (QS) (Leung e Bassler, 2009). Tal sinalização pode ter origem ambiental ou da própria bactéria, e permite a modulação da transcrição de acordo com alterações percebidas (Newton *et al.*, 2004, Kaplan and Greenberg 1985). Os genes relacionados tanto com a síntese como com a percepção de sinais extracelulares são codificados por clusters de genes específicos (Novick *et al.*, 1995; Seed *et al.*, 1995). Várias bactérias sintetizam diferentes moléculas sinalizadoras, como acil homoserina lactonas (AHL), dipeptídeos cíclicos e ácidos graxos insaturados conhecidos como pequenos sinais difusíveis (DSF) (Gonzales e Keshavan 2006). De acordo com o aumento da densidade populacional do biofilme, os sinais moleculares se acumulam permitindo que sejam detectados na superfície bacteriana através de sua ligação a proteínas da membrana celular, essas proteínas receptoras formam um sistema de dois componentes que ativa uma cascata de transdução de sinais de forforilação e defosforilação, e como resultado ocorre a modulação da expressão de uma variedade de genes (Taga *et al.*, 2003). Portanto, QS permite que uma população bacteriana se comporte de maneira coletiva (Leung e Bassler, 2009).

O genoma de *X. fastidiosa* apresenta um cluster de genes que regula a síntese de fatores de patogenicidade, denominado *rpf* (regulator of pathogenicity factors). Dentre os genes que compõe esse cluster estão *rpfF*, *rpfC* e *rpfG*, que atuam como um sistema de três componentes (Simpson *et al.*, 2000). Nesse sistema, o sinal molecular é um ácido graxo conhecido como DSF produzido por uma enzima da família das crotonases denominada DSF sintase resultante da transcrição de *rpfF*. Ao ser produzido, o DSF é exportado para fora da célula onde se acumula em condições de alta densidade populacional, sendo detectado por uma proteína sensora codificada por *rpfC*. Essa proteína apresenta um domínio extracelular responsável por detectar o DSF, um domínio transmembrana e um domínio intracelular que, a partir de fosforilações ativa a proteína RpfG, uma proteína de função regulatória codificada por *rpfG*. As proteínas codificadas por *rpfC* e *rpfG* atuam como um sensor kinase e um regulador intracelular, respectivamente (He

et al., 2006; Cheng *et al.*, 2010; Chatterjee *et al.*, 2008a; Chatterjee *et al.*, 2008b; Ryan *et al.*, 2006). De acordo com análises de similaridade, a enzima codificada por *rpfF* de *X. fastidiosa* pertence a família das crotonases, responsável por hidratar cadeias de ácidos graxos. Em *Burkholderia cenocepacia*, ensaios utilizando uma crotonase similar a RpfF, a enzima Bcam0581, revelaram outras funções além de hidratase para tal enzima. Foram demonstradas atividades tioesterásica e desidratase para Bcam0581, sobre o substrato 3-hidroxi-dodecanoil-ACP, com a produção de cis-2-dodecenoil-ACP (Bi *et al.*, 2012). RpfF de *X. fastidiosa* tem os dois resíduos conservados de ácido glutâmico responsáveis pela função tioesterásica e de desidratação de Bcam0581 de *B. cenocepacia*, entretanto além de síntese de DSF, a RpfF apresenta ainda a função de percepção de DSF, juntamente com RpfC (Ionescu *et al.*, 2013). Na estirpe Temecula de *X. fastidiosa* a atuação de alguns genes desse cluster já foi demonstrada como sendo importante para interações da bactéria tanto em plantas hospedeiras como no inseto vetor (Newman *et al.*, 2004). Foi demonstrado que a síntese de DSF, a molécula sinalizadora de *X. fastidiosa*, é realizada por uma proteína codificada pelo gene *rpfF* e a mutação impedindo sua atividade, implica em dificuldades de aquisição e transmissão da bactéria pelo inseto vetor. Além disso, foi verificado que esses mutantes de *rpfF* não formaram biofilme no pré-cibário de insetos vetores, não sendo capazes de colonizar a região de maneira eficiente, e quando inoculados em videira de maneira mecânica, os mutantes apresentaram maior virulência (Newman *et al.*, 2004).

A sinalização celular mediada por DSF é fundamental para o movimento de *X. fastidiosa* em videiras e alterações nessa sinalização determinam graus de virulência (Chatterjee *et al.*, 2008). Mutantes de *rpfC*, incapazes de codificar corretamente a proteína sensora de DSF, apresentaram reduzida capacidade de movimento e virulência em videiras, quando comparados à bactérias do tipo selvagem ou mutantes de *rpfF*, indicando que a virulência de *X. fastidiosa* é controlada pelo sinal molecular. As bactérias mutadas para *rpfC* apresentaram super expressão de *rpfF*, e superprodução de DSF, indicando que esses genes funcionam de maneira coordenada. Nos mutantes *rpfC* foi observado um comportamento super adesivo e também ocorreram diferenças no padrão de expressão de proteínas de adesão quando comparados mutantes de *rpfC*, *rpfF* e bactérias do tipo selvagem. Esses resultados sugerem que a produção de um sinal molecular e sua percepção modulam o comportamento de *X. fastidiosa* tanto com relação à aquisição pelo inseto vetor, quanto sua colonização em videiras (Chatterjee *et al.*, 2008b).

A relação de *rpfF* na formação do biofilme de *X. fastidiosa* também já foi reportada, uma vez que mutantes para esse gene exibiram menor formação de biofilme *in vitro* (Wang *et al.*, 2012). Mutantes de *rpfF* também apresentaram redução da produção de EPS e aumento da suscetibilidade ao antibiótico tobramicina em fases avançadas da formação do biofilme, sugerindo que a presença de DSF no biofilme controla também traços relacionados com resistência a esse composto (De Souza *et al.* 2013). Interessantemente a produção de pili tipo IV, envolvido na movimentação celular do tipo twitching, foi maior em mutantes *rpfF*, assim como a expressão de *pilY1* o que permitiria a movimentação ao longo da planta com mais facilidade quando comparados ao tipo selvagem. Além disso, a mutação de *rpfF* também reprimiu genes relacionados a adesão, como *hxfB* e *fimA*. Esses resultados demonstram que a presença de DSF em biofilmes de *X. fastidiosa* regula a própria formação de biofilme, adesividade celular e movimento de *X. fastidiosa* (De Souza *et al.*, 2013).

Na verdade, a expressão de uma gama bastante grande de genes é dependente de DSF em *X. fastidiosa*, demonstrando claramente seu papel no comportamento da bactéria. Genes envolvidos com virulência, adesão, movimento, formação de goma além de 3 genes relacionados a hemolisinas foram reprimidos na ausência de DSF (Wang *et al.*, 2012). DSF não é produzido apenas por *X. fastidiosa*, outro fitopatógeno como *Xanthomonas citri* também produz tal molécula (Wang *et al.*, 2004). O sinal molecular produzido por *Xanthomonas sp.* também é resultado da atividade de genes pertencentes a um cluster denominado *rpf*, entretanto em *Xanthomonas* existem mais genes configurando tal cluster do que em *X. fastidiosa* (Da Silva *et al.*, 2002, Simpson *et al.*, 2000). Embora exista a sintonia entre genes desses clusters em ambos os microrganismos, a variedade de genes regulados pela síntese de DSF em *Xylella* e *Xanthomonas* é bastante diferente. Dos 164 genes cuja regulação é dependente de RpfF em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (He *et al.*, 2006), 91 tem homologia com genes de *X. fastidiosa*, 7 apresentam similaridades na tendência da expressão, 26 apresentam tendência oposta e 58 não são regulados por RpfF em *X. fastidiosa* (Wang *et al.*, 2012). RpfF regula positivamente genes relacionados a quimiotaxia (*cheY*), captação de ferro (*tonB*), resistência a drogas (*ftsL* and *acrD*), e metabolismo de ácidos graxos (*phaF*) em ambas espécies. Entretanto, RpfF regula negativamente genes *gum* e *pil* em *X. fastidiosa* enquanto que o contrário ocorre para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ou *X. citri* (He *et al.*, 2006, Guo *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2012). Certamente, a maior diferença entre a regulação mediada por DSF entre *X. fastidiosa*

e *Xanthomonas* seja relacionada ao comportamento de virulência da bactéria, uma vez que a mutação em *rpfF* leva a estirpes hipervirulentas em *X. fastidiosa* e atenua ou extingue virulência em *Xanthomonas campestris* ou *X. citri* (Newman *et al.*, 2004, He *et al.*, 2006, Guo *et al.*, 2012).

Em *X. citri*, a mutação de *rpfF*, *rpfC* e *rpfG* levou a elucidação de um conjunto de genes estritamente regulados por DSF, uma vez que bactérias que não produziam, percebiam ou traduziam o sinal molecular apresentaram a mesma tendência na expressão de alguns genes. Dentre esses genes foram reprimidos alguns relacionados a movimento, virulência e degradação de celulose, e a falta de um dos genes relacionados ao sistema de sinalização de DSF gerou estirpes menos virulentas. Esses resultados sugerem que a regulação via DSF é responsável pela virulência de *X. citri* (Guo *et al.*, 2012).

A estrutura das moléculas sinalizadoras de QS já foi resolvida para algumas espécies de *Xanthomonas* e para as estirpes 9a5c e Temecula de *X. fastidiosa* (Wang *et al.*, 2004, Simionato *et al.*, 2006, He *et al.*, 2010, Beaulieu *et al.*, 2013). No caso de *Xanthomonas*, mais de uma molécula foi identificada e todas são atribuídas à sinalização (Wang *et al.*, 2004), sendo que em *Xanthomonas campestris* foi isolada ácido *cis*-11-methyl-2-dodecenóico, conhecido como DSF (Wang *et al.*, 2004), e em *X. oryzae* foram isolados, ácido 2(*Z*)-dodecenóico (BDSF), e ácido (2*Z*, 5*Z*)-11-methyldodecadienóico (CDSF) (He *et al.*, 2010). Ensaio *in vivo* demonstraram que depois de isoladas essas moléculas eram capazes de ativar resposta nas espécies de *Xanthomonas* testadas, comprovando sua função biológica (Wang *et al.*, 2004, He *et al.*, 2010). No caso de *X. fastidiosa*, a estrutura das moléculas resolvidas indicou que a estirpe 9a5c produz o ácido 12-methyl-tetradecanóico (Simionato *et al.*, 2007), enquanto a estirpe *Temecula* produz o ácido 2(*Z*)-tetradecenóico, denominado *Xf*DSF (Beaulieu *et al.*, 2013). Embora a estrutura de ambas as moléculas tenha sido resolvida, apenas o *Xf*DSF apresentou funções biológicas em ensaios *in vivo*, a atuação da molécula de DSF descrita para a estirpe 9a5c não foi comprovada (Simionato *et al.*, 2007). A **Figura 2** mostra a estrutura das moléculas de DSF citadas anteriormente.

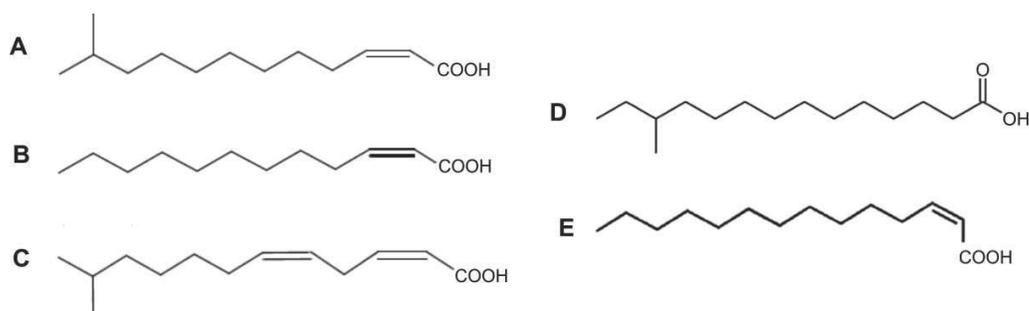


Figura 2: Estrutura das moléculas de DSF de *Xanthomonas* e *X. fastidiosa* determinadas. **A.** Molécula de DSF isolada de *Xanthomonas campestris*. **B.** Molécula de BDSF isolada de *X. oryzae*. **C.** Molécula de CDSF isolada de *X. oryzae*. **D.** Molécula de DSF determinada para a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*. **E.** Molécula de XfDSF determinada para a estirpe *Temecula* de *X. fastidiosa* em plantas de tabaco.

1.2 Obtenção de plantas transgênicas visando resistência a *X. fastidiosa*

Embora *X. fastidiosa* cause sérios danos econômicos à citricultura brasileira (Bové e Ayres, 2007), até o momento não há relato de plantas de citros transformadas com o objetivo de resistência contra esse patógeno. Como essa bactéria também causa danos à indústria vinícola nos Estados Unidos, já foram reportados alguns estudos de transgenia visando resistência *X. fastidiosa*, como serão abordados a seguir.

Em um deles, foi desenvolvida uma proteína quimérica capaz de reconhecer a bactéria através de uma proteína de reconhecimento de neutrófilos humana, denominada HNE, e desencadear o processo de lise da bactéria através de um peptídeo denominado cecropina. Plantas de tabaco foram utilizadas como modelo para verificar se a construção que codificava a proteína quimérica seria capaz de conferir algum nível de resistência contra o patógeno. Os resultados demonstraram que o uso de tabaco como planta modelo para testes com genes candidatos foi uma ferramenta interessante, uma vez que foi possível observar redução de sintomas foliares nas plantas transgênicas quando comparadas à plantas do tipo selvagem. No caso de videiras transformadas esse resultado se manteve, e foi possível observar redução da

severidade de sintomas da doença de Pierce, segundo notas atribuídas aos níveis de escaldadura nas folhas de plantas infectadas com *X. fastidiosa* (Dandekar *et al.*, 2012).

Em outro trabalho envolvendo a obtenção de videiras transgênicas, uma nova abordagem contra *X. fastidiosa* foi apresentada – foi utilizada uma estratégia para “confundir o patógeno”. Nesse caso, todo do conhecimento prévio acerca das funções do *rpfF* elucidadas para a estirpe *Temecula* de *X. fastidiosa* contribuiu para a possibilidade do uso desse gene como candidato para a transformação, visando obter plantas que produzissem moléculas de *XfDSF* de *X. fastidiosa*. Além do *rpfF* isolado de *X. fastidiosa* foi utilizado também na transformação aquele obtido de *X. campestris*, uma vez que foi demonstrado previamente que o DSF de *Xanthomonas* era capaz de ativar genes responsivos de *X. fastidiosa* (Beulieu *et al.*, 2013). Os resultados do trabalho mostraram que plantas de videiras transformadas com *rpfF* de *X. fastidiosa* produziram mais de uma espécie do ácido graxo, incluindo a molécula de DSF similar à produzida por *X. campestris*, indicando que a transformação de um único gene em videiras pode resultar na produção de mais de um composto (Lindow *et al.*, 2014). Plantas transformadas com o gene oriundo de *X. fastidiosa* ou de *X. campestris* apresentaram redução no número de folhas com sintomas da doença de Pierce após 12 semanas de inoculação. Esse resultado foi obtido em diferentes experimentos onde foi possível observar que o número de folhas sintomáticas era sempre maior em planta do tipo selvagem. Além disso, de acordo com resultados que demonstraram a diferença entre o número de células isoladas de segmentos do caule e células liberadas por agitação entre plantas transgênicas e do tipo selvagem, foi possível verificar que a adesividade da bactéria inoculada em plantas transgênicas foi mais alta. A adesividade da bactéria ao vaso do xilema tem relação com sua capacidade de movimento, e em plantas transgênicas foi possível observar que o movimento de *X. fastidiosa* era menor, quando comparado à bactérias inoculadas em plantas do tipo selvagem. De acordo com os resultados obtidos, o comportamento de *X. fastidiosa* foi alterado em plantas transgênicas que produziam *XfDSF* ou nas que produziam DSF de *X. campestris*, sugerindo que ambas moléculas foram capazes de confundir a sinalização do patógeno (Lindow *et al.*, 2014). Uma vez que a similaridade das sequências de nucleotídeos entre *rpfF* das estirpes *Temecula* e *9a5c* é de 92% e as proteínas que codificam apresentam 88% de aminoácidos equivalente é possível que esse modelo de “confusão do patógeno” também funcione para o patossistema envolvendo citros. Além disso, testes da atuação do DSF de *X. fastidiosa* em *Xanthomonas* ainda não foram estudados nesse patossistema.

2. Hipótese

O gene *rpfF*, envolvido na síntese de DSF, uma molécula envolvida na comunicação entre as células de *X. fastidiosa* em biofilme, quando superexpresso em *N. tabacum* e *C. sinensis* pode interferir na patogenicidade de *X. fastidiosa* visto que a produção constitutiva de DSF causaria alterações na comunicação celular.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Obter plantas de *N. tabacum* e *C. sinensis* superexpressando o gene *rpfF* de *X. fastidiosa* causadora da CVC e verificar o possível aumento da tolerância a doença causada por essa bactéria nos diferentes hospedeiros.

3.2. Objetivos específicos

- Montar um cassete de expressão através da clonagem do gene *rpfF* de *X. fastidiosa* sob o promotor constitutivo 35S e cauda poliA
- Obter o vetor binário pCambia2301 contendo o cassete de expressão
- Transformar plantas *N. tabacum* e *C. sinensis* com a construção através de infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e validar as plantas positivas por ensaios de GUS, testes de PCR e RT-qPCR
- Desafiar as plantas positivas com *X. fastidiosa* e avaliar o grau de tolerância através da colonização da bactéria *in planta* por sintomatologia e qPCR.

4. Materiais e métodos

4.1. Clonagem do gene alvo

Para a amplificação do gene *rpfF* de *X. fastidiosa*, utilizou-se o DNA total da estirpe 9a5c da bactéria como molde. *Primers* foram desenhados para a amplificação dos genes, utilizando o programa Primer Select da suíte Lasergene 99 (DNASTAR, Inc.) e sítios de *KpnI* e *BamHI* foram adicionados aos primers direto e reverso, respectivamente, para a clonagem direcional no vetor pRT101. O tamanho esperado da banda após a amplificação do gene utilizando o primer direto: 5' AGAGGTACCAATGTCCGCTGTACAT 3' e o primer reverso: 5' AGCGGATCCTGCTCAGTTTTTTAGTG 3' era 900pb.

Após certificação da especificidade dos *primers* desenhados, o *rpfF* foi amplificado com a enzima *Taq Platinun High Fidelity* (Invitrogen). O amplicon obtido foi clonado em pGEM-T (Promega) e inserido na linhagem DH5 α de *Escherichia coli* por choque térmico, as colônias foram selecionadas em meio LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina e após PCR de colônia, para avaliar aquelas que continham o gene de interesse, foi realizada uma mini preparação plasmidial (mini prep) seguindo as instruções do kit Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega). Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados de acordo com as instruções da ABI para o “DNA Sequencing Kit Big Dye Trminator Cycle Sequencing Ready Reaction”, v 3.0 utilizando o ABI 3730 – Applied Biosystems. As seqüências obtidas foram analisadas por Phred Phrap e Consed e os clones que apresentaram seqüência totalmente similar à do banco de dados após realização de BlastN foram digeridos segundo especificações com *KpnI* e *BamHI* (New England Biolabs), separados em gel de agarose 1% e purificados com o kit ‘GFX PCR and Gel Band Purification’ (Ge Healthcare).

O vetor de construção pRT101 também foi digerido com *KpnI* e *BamHI*, purificado e ligado ao gene de interesse seguindo especificações para a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). O vetor foi inserido na linhagem DH5 α de *E. coli* por choque térmico e a seleção dos transformantes foi feita em meio de cultura LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina. PCR de colônia foi realizada para avaliar a presença do gene nas colônias e aquelas que foram positivas foram submetidas a mini prep, de acordo com o descrito anteriormente, para posterior digestão do cassete de interesse, que foi realizada de acordo com especificações para a enzima *HindIII*

(New England Biolabs). O cassete obtido foi separado em gel de agarose 1%, e purificado como descrito anteriormente.

O vetor binário pCambia 2301 foi previamente digerido com *Hind*III e, a fim de minimizar a autoligação do vetor, este foi defosforilado segundo especificações para a enzima CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase - Invitrogen) e purificado como descrito anteriormente. A ligação com o cassete contendo o gene alvo foi procedida imediatamente após a purificação do vetor defosforilado, e para a ligação, a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) foi novamente utilizada. O vetor obtido foi inserido por choque térmico na linhagem DH5 α de *E. coli* e as colônias foram selecionadas em meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina. PCR de colônia foi realizada para a avaliação da presença do gene de interesse e as colônias positivas foram submetidas a mini prep, utilizando o mesmo kit descrito anteriormente. Os plasmídeos obtidos foram analisados por PCR utilizando o conjunto de primers que amplificavam o gene alvo e a combinação do primer direto desenhado para o promotor 35S (F-ACACTCTCGTCTACTCCAAG) e o reverso do gene alvo, e também foram analisados por digestão teste, realizada com a mesma enzima utilizada na clonagem do cassete de interesse para avaliar sua presença. Após a digestão teste, os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% para verificação da correspondência entre o tamanho do fragmento liberado após a digestão, e seu tamanho predito através da soma dos tamanhos dos fragmentos no vetor de construção. A **Figura 3** ilustra a estratégia de obtenção do vetor pCambia 2301 contendo o cassete de expressão com *rpfF* para transformação em planta.

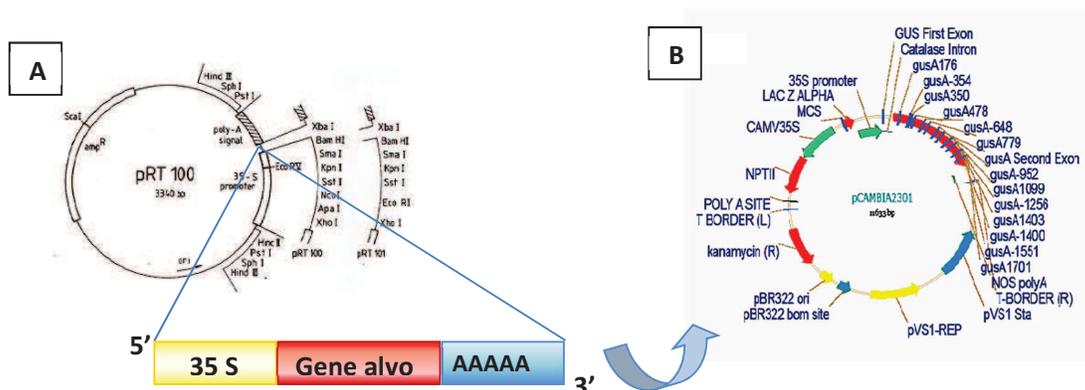


Figura 3: Estratégia de obtenção do vetor binário contendo o gene *rpfF* de *X. fastidiosa*. A. Vetor pRT101, onde o gene alvo foi inserido entre um promotor 35S e uma cauda poliA. O

cassete após digerido foi inserido no vetor binário. **B.** Vetor binário pCambia2301, utilizado para a transformação das plantas neste trabalho.

4.2. Introdução da construção em *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor pCambia2301 contendo os cassetes com os genes alvo foi introduzido na estirpe EHA105 de *A. tumefaciens*, por choque térmico da seguinte maneira: cerca de 1µg de plasmídeo foi adicionado às células competentes de *A. tumefaciens* e os eppendorfs contendo essa mistura foram deixados no gelo por 30 minutos. Depois disso, os eppendorfs foram mergulhados por 2 minutos em nitrogênio líquido e transferidos imediatamente para banho seco a 37⁰C por 5 minutos. As células foram recuperadas em 800µL de meio YEP (5g/L de NaCl, 5g/L de Peptona, 10g/L de Extrato de Levedura) e deixadas sob agitação de 140rpm a 28⁰C por 2 horas. As culturas foram centrifugadas por 1 minuto a 6.000rpm e 600µL de meio foi descartado. As células foram ressuspensas nos 200µL restantes de meio de cultura e selecionadas em meio YEP sólido (YEP contendo 15g/L de Agar) contendo 300µg/µL de rifampicina e 100µg/µL de canamicina. A verificação das colônias transformadas foi feita por PCR utilizando primers específicos para os genes alvo.

4.3. Transformação das plantas alvo e seleção de transformantes

4.3.1 Transformação e seleção de *Nicotiana tabacum*

Optamos pela variedade RP-1 de *N. tabacum* para transformação por ser esta conhecida um hospedeiro alternativo de *X. fastidiosa* (Lopes *et al.* 2000). A estirpe EHA 105 de *A. tumefaciens* transformada com o vetor pCambia2301_*rpfF* foi utilizada para transformação.

Inicialmente, sementes de tabaco foram desinfestadas com hipoclorito 10% por 3 minutos, sob agitação, e posteriormente com etanol 70% por 5 minutos. Quatro lavagens com água autoclavada foram feitas para que resíduos dos produtos fossem retirados das sementes, que foram semeadas em meio MS/2 até que se obtivessem plantas com limbos foliares bem desenvolvidos. Estas foram utilizadas para a transformação genética. Para isso, pequenos discos

foliares foram retirados das plantas crescidas no meio de cultura e colocados em meio de co-cultivo MS (MS contendo 1mg/L de BAP). Os discos foram infectados individualmente com 20µL de uma cultura da linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* carregando o vetor pCambia2301_*rpfF*, crescida como descrito anteriormente. As placas contendo os discos infectados ficaram no co-cultivo por 2 dias a 24⁰C na ausência de luz e após esse período, os discos foram transferidos para placas de meio de seleção MS (contendo 1µg/mL de BAP, 100µg/mL de canamicina e 100µg/mL de cefotaxima) para selecionar os transformantes. As placas foram transferidas para luz e os discos foliares transferidos para novo meio de cultura a cada dez dias. Brotos regenerados foram individualizados em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento. Para a obtenção dos controles negativos a etapa de infecção com a cultura de agrobactéria não foi realizada, as demais etapas de cultivo seguiram o mesmo protocolo de discos foliares infectados.

Foi preciso selecionar os brotos positivos após sua individualização, e para isso foram coletados pequenos pedaços de folhas para realização do teste GUS, como descrito anteriormente. Brotos cujas folhas apresentaram coloração azul no teste foram transferidos para magentas contendo meio de enraizamento (MS/2 contendo 100µg/mL de canamicina e 100µg/mL de cefotaxima) e mantidos até o desenvolvimento de raízes. Após esse período, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato onde foram aclimatados através de câmara úmida por três semanas.

Após atingirem tamanho ideal, foi realizado um screening inicial das plantas utilizando o kit REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR (Sigma – Aldrich), que consiste em uma rápida extração de DNA e posterior PCR de pequenos pedaços de folhas dos tabacos analisados. Folhas de plantas positivas para esse primeiro teste foram coletadas para extração de RNA, segundo especificações do kit Rneasy Plant Mini (Qiagen), para posterior síntese de cDNA utilizando SuperScript II (Invitrogen). Esse cDNA foi utilizado para realização de nova PCR utilizando os primers para o gene alvo e também a combinação do primer direto desenhado para o promotor 35S e reverso do gene alvo. A representação das etapas de transformação e seleção das plantas está esquematizada na **Figura 4**.

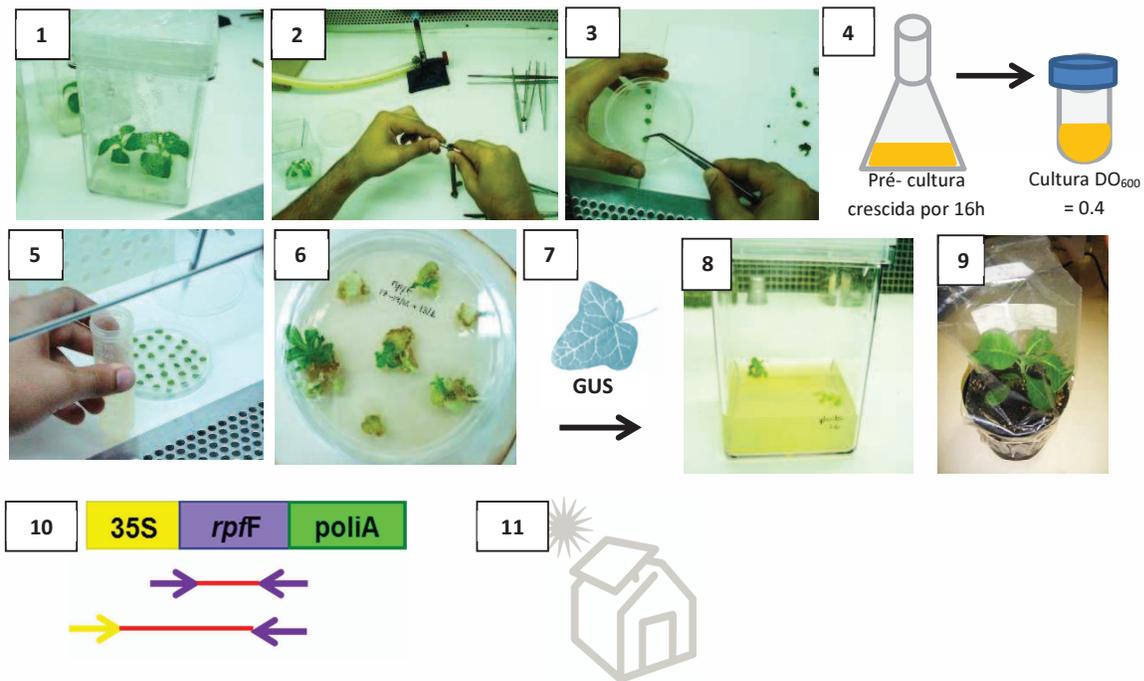


Figura 4: Etapas do processo de transformação de tabaco. **1.** Crescimento das plantas a partir de sementes cultivadas em meio MS/2; **2.** Obtenção dos discos foliares referentes aos explantes para transformação; **3.** Acomodação dos explantes em meio de co-cultivo MS; **4.** Obtenção da cultura de agrobactéria a partir de uma pré-cultura crescida por 16 horas; **5.** Infecção dos explantes com a cultura de agrobactéria; **6.** Brotação dos explantes infectados em meio de seleção após período de luz; **7.** Teste GUS de alguns segmentos de folhas; **8.** Enraizamento de brotos cujas folhas foram positivas no teste GUS; **9.** Aclimação das plantas enraizadas para posterior teste por PCR da presença do gene alvo; **10.** Esquema dos pares de *primers* utilizados para amplificação do gene alvo através de PCR usando como molde cDNA. As setas roxas, esquematizam o par de *primers* utilizado para amplificar o gene apenas, as setas amarelas e roxas esquematizam o par referente à amplificação do fragmento contendo o promotor 35S e o gene alvo; **11.** Plantas positivas para todos os testes foram destinadas à casa de vegetação.

A expressão do transgene inserido nas plantas matrizes (F0) foi avaliada por qPCR utilizando o sistema SyberGreen em reações contendo 10µl de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 50ng de cada um dos primers específicos *rpfF* F (5'- 3') – TCGGCAGCAAATCACTCCGA ACTA e *rpfF* R (5'- 3') – CAGCACAGCTTTGAGTGCTCAGTT, (Tabela 1) e 500ng da amostra de cDNA obtida após extração de RNA de cada planta testada. O volume final da reação foi de 20 µl. A amplificação e captura do sinal foi realizada em triplicata, usando ABI PRISM 7500 Sequence Detector System

(Applied Biosystems), de acordo com especificações do fabricante. Como controles endógenos foram utilizados genes os Ntactina e ARPC 3 de tabaco (Tabela 1).

Tabela 1: Relação de primers utilizados para análises da expressão do transgene por qPCR e tamanho da sequência que amplificam

Nome do gene	Sequencia do primer 5'-3'	Tamanho do amplicon
NtActin	F- TCCATGCTCAATGGGATACT	100pb
	R - TTCAACCCCTTGTCTGTGAT	
ARPC3	F - CTGCAGAGGGTGATTTTGCT	100pb
	R - ATTGTGCATCACCAGCCATT	
Ciclofilina	F – AGAGTATGCAGAGGAATGG	100pb
	R – GTCCTTAACAGAAGTCCGT	
Ubiquitina	F - TTCGTCAGTTGACTAATCCT	100pb
	R – GTTGCTGTGTTGACTGTG	
<i>rpfF</i>	F - TCGGCAGCAAATCACTCCGAATA	100pb
	R - CAGCACAGCTTTGAGTGCTCAGTT	

F – primer direto (forward)

R - primer reverso

4.3.2 Transformação e seleção de *Citrus sinensis*

A transformação de citros foi realizada utilizando como explantes segmentos de epicótilos das variedades Hamlin, Pêra e Pineapple para transformação com o vetor pCambia2301_*rpfF*. Foram realizados 5 eventos de transformação para obtenção das plantas utilizando epicótilos de citros.

Para a transformação utilizando epicótilos de citros, as sementes foram obtidas de frutos maduros e tratadas por 25 minutos com solução comercial de hipoclorito de sódio, sob agitação. Os tegumentos foram retirados e as sementes foram novamente tratadas por 5min com uma solução de hipoclorito a 10%, lavadas com água autoclavada, tratadas por 15 min com uma solução de etanol 70%, lavadas por três vezes em água autoclavada, secas em fluxo laminar e colocadas para germinação em tubos contendo meio de cultura Murashige Skoog (Sigma – Aldrich) (MS)/2 (para 1L - 2,15g de meio MS, 50g de Sacarose e 8g Agar). Após a inoculação

em meio, as sementes foram mantidas a 27°C no escuro para estiolamento. Após um período de 4 a 6 semanas, as sementes estioladas ficaram sob fotoperíodo de 16 horas até que o tecido ficasse verde. Segmentos de epicótilo, de 0,8 – 1 cm, foram utilizados para transformação genética. Após cortados, os segmentos de epicótilos ficaram imersos por 3 horas em uma solução de MS (4,3g/L de MS) contendo 100µg/mL de ácido indol acético (AIA).

Colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os genes alvo foram crescidas separadamente em 15mL de meio YEP contendo os antibióticos mencionados durante a noite. Dessa alíquota foram retirados 5mL e adicionados a 50mL de meio YEP contendo antibióticos para que o crescimento da bactéria fosse acompanhado durante o dia, até que a densidade ótica (OD₆₀₀) desejada fosse atingida, entre 0,3 e 0,6. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada e ressuspendida em meio MS, corrigindo-se a população para 10⁸ bactérias. A solução contendo AIA onde os explantes estavam imersos foi retirada e a solução contendo bactérias foi adicionada aos explantes, onde permaneceram por 5 minutos e depois de secos em papel toalha em fluxo laminar foram transferidos para placas contendo meio MT de co-cultivo (4,3g de MS , 10⁻⁴g/L de Tiamina-HCl, 5x10⁻⁴ g/L de Piridoxina-HCl, 5x10⁻⁴ g/L de Ácido nicotínico, 2x10⁻³ g/L de Glicina, 10⁻³g/L de 6-Benzylaminopurine (BAP) e 8g/L de Agar). As placas permaneceram por um período de 2 dias no escuro a 24⁰C. Depois do co-cultivo os explantes foram transferidos para placas de meio de cultura MT contendo 100mg/L de canamicina e 300mg/L de cefotaxima, e deixados no escuro a 28⁰C até que os brotos comecem a se desenvolver. Quando a brotação iniciou, as placas foram transferidas para um fotoperíodo de 16 horas de luz. Os explantes foram transferidos para novas placas de meio de cultura seletivo a cada 10 dias, até que as brotações estivessem desenvolvidas para serem testadas. A **Figura 5** mostra os passos da transformação por epicótilos.

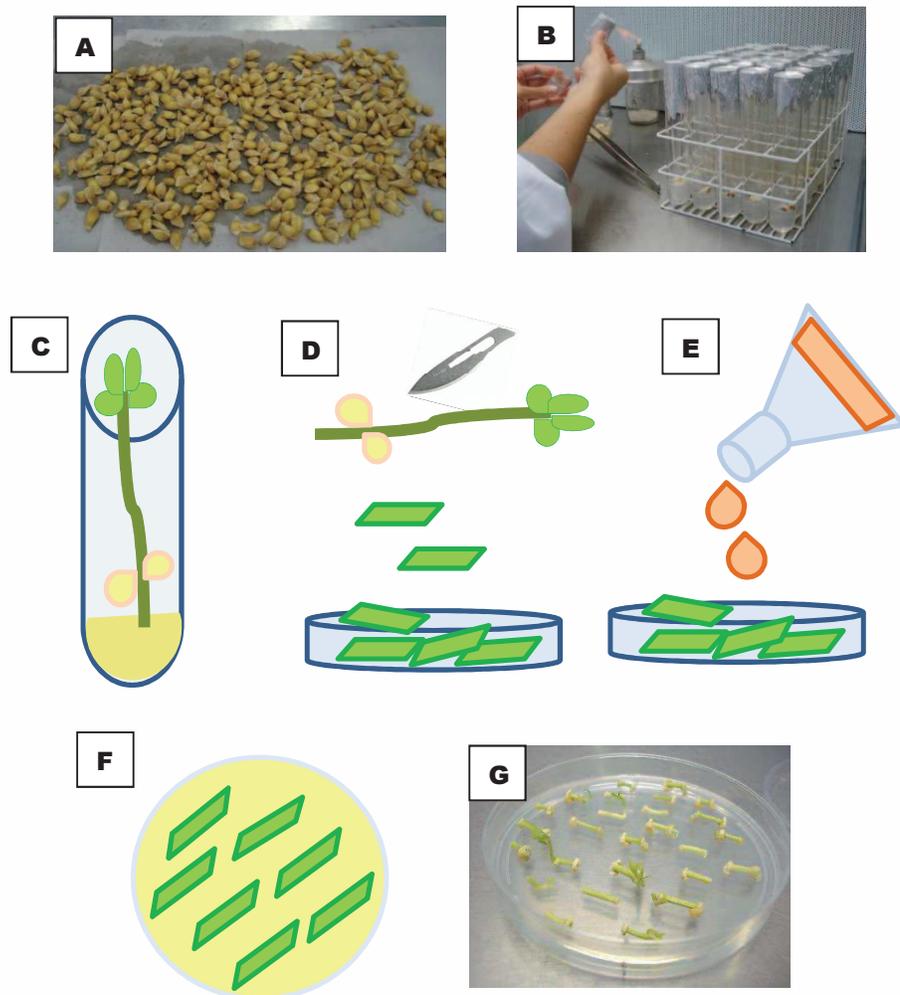


Figura 5: Etapas do processo de transformação de citros. **A.** Desinfestação e preparo das sementes. **B.** Germinação das sementes em meio MS/2; **C.** Plântulas estioladas após o período de luz, quando atingem coloração verde escura. **D.** Obtenção dos explantes a partir de segmentos das plântulas. Esses explantes ficam por aproximadamente 3 horas em solução de MS contendo AIA. **E.** Infecção dos explantes com uma cultura de agrobactéria a partir de uma pré-cultura crescida por 16 horas. **F.** Acomodação dos explantes em meio de co-cultivo, onde permanecem por 2 dias, a 24⁰C na ausência de luz. **G.** Brotação dos explantes infectados em meio de seleção após período de luz.

As brotações que se desenvolveram de epicótilos transformados foram testadas para a presença da atividade do gene *gusA*, repórter do vetor pCambia2301, utilizado para as

transformações nesse trabalho. Esse teste será referido como teste GUS, e consiste na imersão de pequenos pedaços de folhas ou segmentos transversais dos brotos em uma solução que testa a atividade do gene repórter (b-glucuronidase) sobre o substrato 5-bromo-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-Gluc). Após incubação nessa solução os tecidos foram transferidos para uma solução 1:1 (v/v) de ácido acético e etanol para que a coloração verde fosse retirada. Brotos transformados apresentaram coloração azul na região onde houve o corte ou em todo o tecido após o teste.

Os brotos cujas folhas apresentaram alguma coloração azul foram separados até que suas hastes se desenvolvessem a ponto de possibilitar a microenxertia. Os brotos foram microenxertados sobre cavalos de Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) previamente preparados. Após a cicatrização da região da enxertia, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato e foram aclimatadas para que suas folhas se desenvolvessem e fossem testadas por PCR, para avaliar a presença do transgene. Pedacinhos das folhas dos brotos foram cortados e a avaliação foi realizada de acordo com instruções do kit REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR (Sigma – Aldrich), que consiste em uma rápida extração de DNA e posterior PCR. Essa PCR foi realizada utilizando os primers que amplificaram o gene alvo e a combinação do primer direto desenhado para o promotor 35S (F-ACACTCTCGTCTACTCCAAG) e o reverso do gene alvo.

A validação das plantas de citros transformadas com *rpfF* ainda contou com os testes de PCR utilizando cDNA como molde. Para esse teste, pedaços de folhas coletadas foram masserados e processados de acordo com as instruções do kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). A taxa de eficiência de transformação foi calculada como a porcentagem de brotos positivos após PCR utilizando cDNA como molde, em comparação com o número de brotos testados pelo teste histoquímico do GUS. As plantas positivas para esses três testes foram transportadas para a casa de vegetação para posterior teste da atividade do transgene. Para isso RNA das plantas foi novamente extraído para síntese de cDNA, e foi realizado um qPCR utilizando o sistema SyberGreen, como descrito anteriormente, e o par de primers desenhado especificamente para esse teste, descrito na Tabela 1. Como controles endógenos de citros foram utilizados os genes ciclofilina (CAS-PT-301486) e ubiquitina (CAS-PT-300961), amplificados com o auxílio das seguintes sequências de primers diretos (F) e reversos (R): Ciclof (F) – 5'

AGAGTATGCAGAGGAATGG 3' e Ciclof (R) – 5' GTCCTTAACAGAAGTCCGT 3'; e Ubiq (F) – 5' TTCGTCAGTTGACTAATCCT 3' e Ubiq (R) – 5' GTTGCTGTGTTGACTGTG 3' .

4.4. Cultivo de *X. fastidiosa* para inoculação nas plantas transgênicas

Para o desafio de plantas transgênicas, *X. fastidiosa* foi crescida em meio de cultura PW por 7 dias, a 28^oC. As bactérias foram raspadas das placas com auxílio de uma alça e ressuspensas em tampão PBS. A cultura foi ajustada para uma DO₆₀₀ = 0,7 e a inoculação foi realizada com auxílio de uma agulha, segundo descrito anteriormente (Almeida et al. 2001).

4.4.1. Desafio de tabacos transgênicos e análise da infecção pela bactéria

Nem todos os eventos transgênicos obtidos foram desafiados, alguns deles apresentaram fenótipo alterado e por isso não foram utilizados nesse teste. Apenas as plantas fenotipicamente iguais ao tipo selvagem foram desafiadas com *X. fastidiosa*. Nesse primeiro screening, 14 eventos da geração F0 foram inoculados, para que pudéssemos fazer uma avaliação daqueles com maior tolerância a bactéria. Eventos que apresentaram menos sintomas em comparação ao tipo selvagem tiveram suas sementes coletadas para o experimento posterior de desafio.

Sementes de 5 eventos foram selecionadas por apresentarem menos sintomas após inoculação de *X. fastidiosa*. Essas sementes foram desinfestadas, como descrito anteriormente, e semeadas em magentas contendo meio MS/2 com 100µg/mL de canamicina. As plântulas, após desenvolvidas, foram transplantadas para vasos contendo substrato. A aclimação das plantas foi feita por câmara úmida e após três semanas foi realizado um teste GUS para verificar se todas elas apresentavam o transgene. Ao todo 19 plantas, de 5 eventos diferentes, foram utilizadas nesse primeiro experimento. Elas permaneceram por aproximadamente 2 meses em casa de vegetação para que fossem bem aclimatadas, e então foram inoculadas com a bactéria. A inoculação foi realizada na base do pecíolo da folha mais velha da planta, através de uma gota de 15µL pingada na face abaxial do pecíolo, sobre a qual foram feitos 5 furos com agulha

entomológica. As plantas foram mantidas na posição horizontal até que a gota fosse absorvida pela planta. A **Figura 6** demonstra a inoculação de *X. fastidiosa* em tabacos.

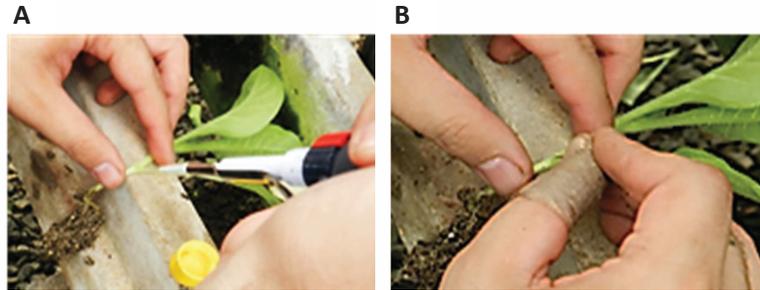


Figura 6: Inoculação de *X. fastidiosa* em plantas de tabaco. **A.** Uma gota contendo a suspensão da bactéria foi pingada na face abaxial do pecíolo da folha mais velha da planta. **B.** Sobre a gota, são feitos 5 furos com agulha entomológica para que a bactéria possa penetrar no tecido.

O aparecimento de sintomas foi acompanhado semanalmente e comparado com sintomas de plantas do tipo selvagem. Esse acompanhamento consistiu em contabilizar o número total de folhas de cada planta e o número de folhas com sintoma, que em tabaco são representados por pontos necróticos inicialmente observados nas margens das folhas e posteriormente ocupam o limbo. Dessa maneira, pudemos fazer o cálculo da incidência de sintomas em cada planta avaliada, como sendo o número de folhas com sintomas dividido pelo número total de folhas da planta.

Após 14 semanas de infecção, foi realizada a extração de DNA de folhas de diferentes partes das plantas infectadas. A fim de analisar a movimentação bacteriana ao longo das plantas, folhas foram coletadas em diferentes pontos para extração de DNA total dos pecíolos e avaliação da população bacteriana por qPCR da seguinte maneira: as plantas foram medidas individualmente, o ponto de inoculação de cada uma foi determinado e a partir dele, a cada 15cm, foram coletadas duas folhas em posições opostas, denominadas P1, P2, P3 e assim por diante, sendo o P1 o ponto mais próximo ao ponto de inoculação. A **Figura 7** demonstra os pontos de coleta das plantas de tabaco.

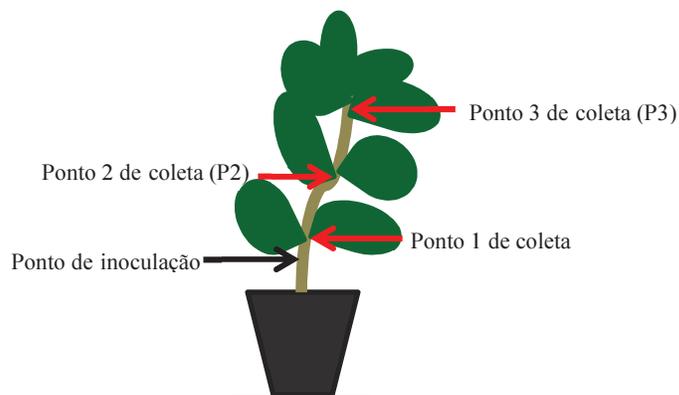


Figura 7: Esquema representativo das coletas de folhas realizadas nas plantas infectadas de tabaco do tipo selvagem e da geração F1 de plantas transgênicas para análise de movimentação e quantidade da população de *X. fastidiosa*.

De acordo com resultados obtidos de cada planta, demonstrados no item seguinte, foram selecionadas 5 plantas de 2 eventos diferentes para o experimento 2, que foi realizado definindo-se novos critérios de avaliação. As plantas selecionadas para o segundo experimento foram 1AB2, 1AB3, 1AB4 e 1AB10, do evento 1AB e a planta 2AB3, do evento 2AB. Sementes dessas plantas foram novamente semeadas, seguindo as condições anteriormente descritas. Para esse segundo experimento foram avaliados 15 indivíduos obtidos de sementes de cada uma das 5 plantas dos 2 diferentes eventos transgênicos escolhidos, totalizando 75 plantas transgênicas da geração F2 a serem inoculadas e 10 plantas do tipo selvagem, que foram utilizadas como controles. Etapas de aclimação das plantas e inoculação de *X. fastidiosa* também seguiram os parâmetros descritos para o experimento 1. Entretanto, para a avaliação da sintomatologia apresentada pelas plantas nesse segundo experimento, nova metodologia foi realizada. Foi definida, em um estudo paralelo do nosso grupo de pesquisa, uma escala diagramática de severidade de sintomas em folhas de tabaco (**Figura 8**). Essa escala foi feita com base na relação entre a porcentagem da área da folha de tabaco que apresentava lesões e a área total da folha. Esses valores foram comparados a quantidades de bactéria determinadas por qPCR e a eficácia da escala foi testada por 5 avaliadores diferentes (Pereira *et al*, 2014 submetido). A severidade dos sintomas foi definida como a razão entre a nota de sintomas conferida a cada planta e o número de folhas com sintomas. Incidência e severidade foram analisados por 3 avaliadores diferentes uma única vez, no momento em que todas as plantas do experimento apresentaram

pelo menos 1 folha com sintoma. Todas as análises estatísticas para comparação de médias foram realizadas por teste de Tukey ($P < 0,05$).

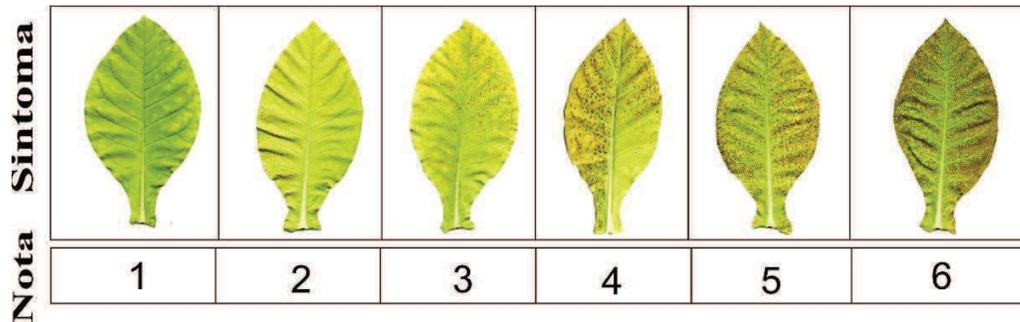


Figura 8: Escala diagramática utilizadas para avaliação de notas de severidade de sintomas causados por *X. fastidiosa* em plantas de tabaco. Sintomas são representados por pontos necróticos que se iniciam nas margens da folha – notas 1 e 2 – e a medida que evoluem ocupam todo o limbo – notas 3 a 6.

Os pecíolos referentes a cada ponto de coleta, dos experimentos 1 e 2, foram cortados e masserados em nitrogênio líquido, as amostras foram pesadas e foi realizada a extração de DNA total seguindo o método CTAB, como descrito anteriormente no Capítulo 1. Para determinar a quantidade de bactéria em cada ponto de coleta foi construída inicialmente uma curva padrão com concentrações conhecidas de DNA da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* misturado ao DNA de uma planta saudável de tabaco. A estimativa do número de células de tecido vegetal (tabaco) por microlitro de DNA total obtido após extração foi obtida através da relação entre o genoma de *N. tabacum* e seu peso em Daltons. Esse mesmo cálculo foi realizado para estimar o número de células de *X. fastidiosa* e foi realizada a diluição seriada e a mistura de ambos os DNAs para se obter uma faixa de 10^2 a 10^8 células/mg de tecido vegetal. A **Figura 9** exemplifica a construção da curva padrão.

A $4.500.000.000$ (tamanho do genoma de tabaco) $\times 660$ (conversão para Daltons) = 2.970×10^9 Da = 0.004930497 ng

$$\frac{(\quad)}{\text{nanograma}} \text{DNA de tabaco} = \text{Número de células de tabaco} / \mu\text{L}$$

$2.679.305$ (tamanho do genoma da bactéria) $\times 660$ (conversão para Daltons) = $1.768.341.300$ Da = 0.000002936 ng

$$\frac{(\quad)}{\text{nanograma}} \text{DNA da bactéria} = \text{Número de células de } X. \textit{fastidiosa} / \mu\text{L}$$

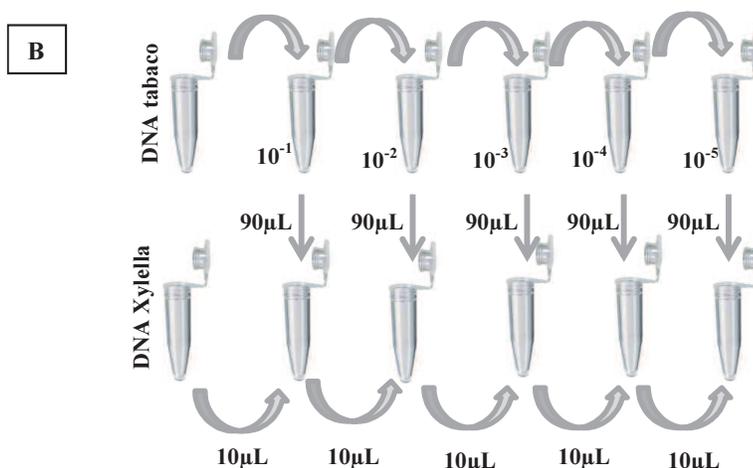


Figura 9: Esquema representativo da construção da curva padrão para determinação da quantidade de *X. fastidiosa* em pontos de coleta de plantas de *N. tabacum* inoculadas. **A.** Cálculos para determinação da quantidade de células da planta e da bactéria foram obtidas após extração de DNA. **B.** Montagem da curva através de diluições seriadas.

A amplificação do DNA das amostras da curva foi realizada em um volume de $13\mu\text{L}$ contendo $6,5\mu\text{L}$ de TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 525 nM dos primers CVC-1 (AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA) e CCSM-1 (GCGCATGCCAAGTCCATATTT) (Oliveira *et al.*, 2002), $1,5\mu\text{L}$ da Sonda TAQCVC 5'- (6FAM)AACCGCAGCAGAAGCCGC TCATC(TAMRA)-3' (Applied Biosystems) e 150 ng da amostra de DNA da curva. A

amplificação e captura do sinal foi realizada em triplicata, usando ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Foi realizada uma regressão linear para correlacionar os valores dos CTs obtidos com as concentrações de DNA utilizadas em cada ponto da curva.

A avaliação do movimento da bactéria no interior de plantas de tabaco foi realizada utilizando como molde o DNA extraído dos pecíolos das folhas dos pontos de coleta, e as mesmas condições de qPCR citadas acima para a realização da curva padrão foram mantidas. O valor de CT obtido nas análises de população de *X. fastidiosa* em cada ponto de coleta nas plantas transgênicas e do tipo selvagem foi utilizado para estimar a quantidade de bactéria encontrada, de acordo com a curva padrão previamente estabelecida.

4.4.2. Desafio de citros transgênicos e análise da infecção pela bactéria

Para o desafio das plantas de citros transgênicas foi realizada a propagação das matrizes que apresentaram expressão do transgene após qPCR. De cada planta matriz foram retiradas 10 borbulhas que foram enxertadas sobre limão – cravo. Após período de pegamento e desenvolvimento dessas plantas propagadas foi realizado um teste GUS, utilizando pedaços de folhas de todas as plantas propagadas para que se evitasse a inoculação de *X. fastidiosa* em plantas que não fossem transformadas.

Foram inoculadas apenas as plantas de citros que apresentaram coloração azul após o teste GUS. A inoculação foi realizada seguindo as condições descritas no início deste item e feita na face abaxial do pecíolo das folhas mais velhas da planta. No caso de citros, como a taxa de infecção é baixa, foram feitos dois pontos de inoculação. A presença de *X. fastidiosa* nas plantas foi verificada após 5 e 8 meses após a infecção por PCR convencional utilizando primers de detecção RST31 F – 5'GCGTTAATTTTCGAAGTGATTTCGATTGC3' e RST33 R - 5'CACCATTCGTATCCCGGTG3'.

As avaliações de incidência e severidade de CVC foram feitas duas vezes para citros, uma após 9 meses de inoculação e a outra após 18 meses. Isso foi adotado para citros porque os sintomas demoram mais a se desenvolver e dessa maneira foi possível avaliar diferenças no início de aparecimento de sintomas e também em sintomas avançados. A incidência foi calculada como a razão entre o número de folhas com sintomas na planta e o número total de

folhas. A severidade de CVC foi calculada como a razão entre a nota dada aos sintomas de CVC e o número de folhas com sintomas. A nota foi dada de acordo com duas escalas diagramáticas dependendo do tempo em que a severidade foi avaliada. Aos nove meses, utilizamos a escala publicada por Amorin *et al.*, 1993, e aos 18 meses desenvolvemos uma escala de severidade baseada nos sintomas apresentados pelas plantas. As escalas utilizadas aos 9 e aos 18 meses de avaliação estão demonstradas na **Figura 10**.

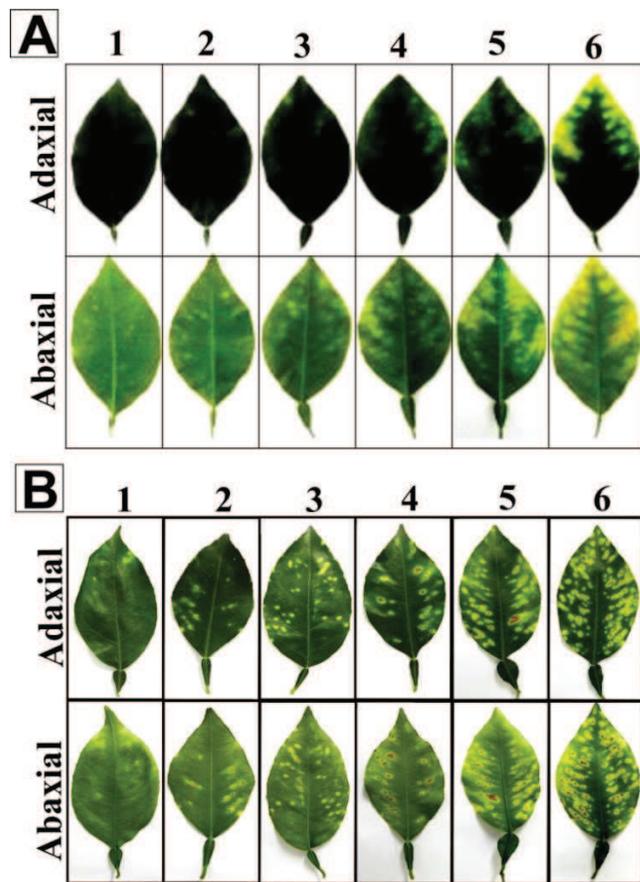


Figura 10: Escalas diagramáticas utilizadas para avaliação de notas de severidade de CVC nas plantas inoculadas. **A.** Escala utilizada na avaliação após 9 meses de inoculação, publicada por Amorin *et al.*, 1993 e Muranaka *et al.*, 2012. **B.** Escala desenvolvida para este trabalho contendo folhas com níveis avançados de CVC, utilizada na avaliação após 18 meses de inoculação.

Para a análise de movimento da bactéria na planta, foi realizado o mesmo procedimento descrito para tabaco, no item anterior, com coleta de duas folhas a cada 15 cm. A curva padrão

confeccionada para detecção da bactéria em citros também foi construída como demonstrado para tabaco, entretanto, utilizou-se DNA de Hamlin sadia para a diluição da bactéria e obtenção de uma faixa equivalente a populações entre 10^2 e 10^8 células de *X. fastidiosa*.

5. Resultados

5.1. Construção do vetor pCambia2301_*rpfF* e transformação de *A. tumefaciens*

O gene alvo para a construção do vetor binário foi obtido a partir de amplificação do genoma de 9a5c, gerando um fragmento de 900pb condizente com o tamanho do gene predito em análises *in silico*. Foi feita a clonagem do *rpfF* em pGEMT (Promega) para certificação da qualidade de sua sequencia, e análises revelaram que a totalidade dos clones obtidos teve 100% de similaridade com a sequencia predita pelo site <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>. Após a certificação da sequencia, foi realizada a subclonagem para montagem do cassete de expressão submetendo o gene ao domínio do promotor 35S em vetor pRT101. O cassete foi digerido do vetor de construção e ligado ao pCambia 2301. Os resultados das etapas de amplificação e clonagem e a obtenção do vetor binário estão demonstrados na **Figura 11**.

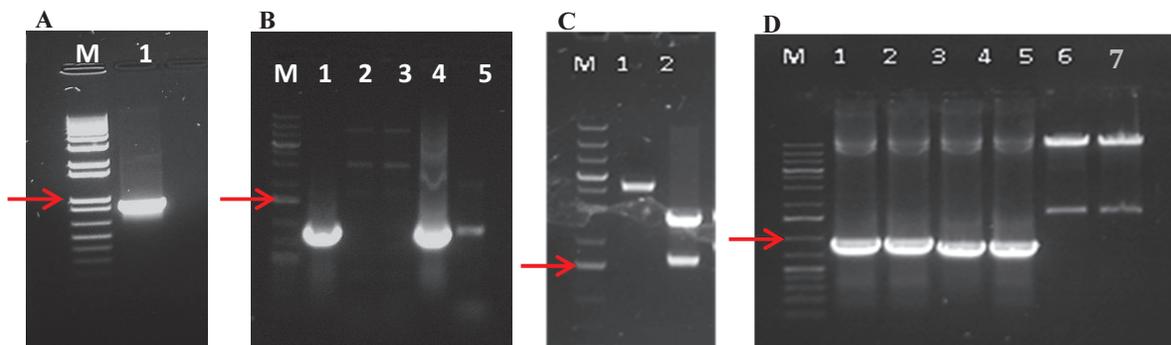


Figura 11: Etapas da obtenção do vetor pCambia2301_*rpfF*. **A.** Amplificação do gene alvo a partir do genoma da estirpe 9a5c de *X. fastidiosa*. O tamanho esperado do *rpfF* é 900pb. A seta indica banda de 1Kb. M indica Marcador Molecular 1Kb plus (Invitrogen). **B.** PCR de colônias de *E. coli* transformadas com vetores pRT101 ligados a *rpfF*. A seta indica banda de 1,5Kb. M indica Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). **1 a 5** indicam as colônias testadas. **C.** Digestão do cassete de expressão construído em pRT101. M indica Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). 1. Vetor pRT101, de tamanho 3.340pb, digerido com a enzima *HindIII*. 2. Vetor pRT101 obtido de *E. coli* transformada e igualmente digerido com a enzima *HindIII*, o tamanho esperado do cassete era 1,6Kb. A seta indica banda de 1,5Kb. **D.** PCR de colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pCambia2301_*rpfF*. M indica Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). **1 a 5** indicam colônias amplificadas com o par de primers utilizados para obter o

gene alvo, 6 e 7 indicam amplificação do cassete utilizando primers para o promotor 35S e o gene *rpfF*.

Depois de obtido, o vetor pCambia2301_*rpfF* foi inserido em *A. tumefaciens* por choque térmico. Foi realizada uma PCR de colônia para certificação da presença do gene nas colônias obtidas. Todas as colônias que cresceram nas placas de meio de cultura foram testadas, entretanto, nem todas apresentaram a banda referente a 900pb. A **Figura 12** mostra o resultado obtido.

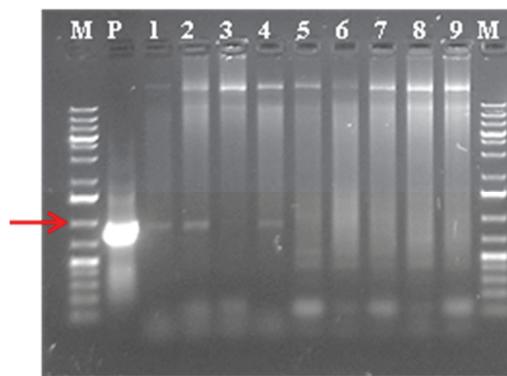


Figura 12: PCR de colônias de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pCambia2301_*rpfF*. **M** indicam Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). **P** indica o controle positivo da reação e 1 a 9 indicam as colônias testadas.

Colônias que apresentaram a banda de interesse após PCR foram crescidas para transformação das plantas alvo.

5.2. Transformação das plantas alvo e seleção de transformantes

5.2.1 Transformação e seleção de *Nicotiana tabacum*

Foram transformados discos foliares da variedade RP-1 de *N. tabacum* crescidos em meio de cultura. A transformação de tabaco com pCambia2301_*rpfF* apresentou resultados bastante satisfatórios, sendo possível obter 24 eventos transgênicos. O processo de transformação de

tabaco apresentou uma taxa de eficiência de 16,21%, uma vez que dos 148 brotos regenerados e avaliados pelo teste histoquímico GUS, 24 foram positivos após PCR utilizando cDNA como molde, a fim de avaliar a presença do transgene. A tabela 2 resume os eventos realizados e os resultados obtidos.

Tabela 2: Eventos de transformação com o gene *rpfF* realizados em tabaco e resultados obtidos

Data do evento	Variedade de tabaco	Número de explantes	Brotos regenerados	Brotos GUS positivos	Brotos positivos - PCR de DNA	Brotos positivos - PCR de cDNA
26/11/2010	RP-1	67	40	12	7	5
18/1/2011	RP-1	93	44	11	8	7
21/3/2011	RP-1	95	64	19	15	12

As plantas obtidas foram testadas primeiramente para avaliação da presença do gene repórter, que quando presente confere coloração azul ao tecido testado. Folhas das plantas positivas foram coletadas para extração de DNA e PCR para detecção da presença do transgene. Folhas das plantas positivas para esta PCR foram novamente coletadas para extração de RNA e síntese de cDNA, que foi utilizado como molde para nova PCR, a fim de avaliar se o transgene estava sendo expresso. A **Figura 13 A e B** demonstram algumas das etapas de testes descritas.

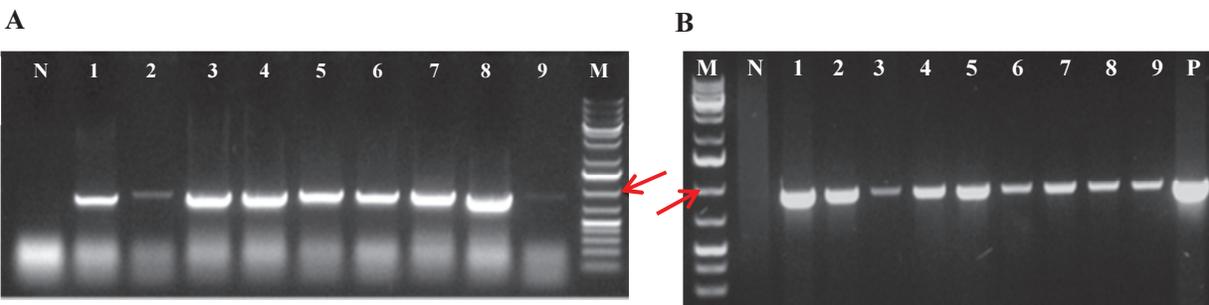


Figura 13: PCRs testes para avaliar a presença do gene *rpfF* nas plantas de tabaco transformadas. O gene alvo apresenta 900pb após amplificação. **A.** PCR utilizando DNA de plantas de tabaco positivas para o teste GUS. **B.** PCR utilizando cDNA das plantas positivas para a primeira PCR. **M** em ambas as figuras indicam Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas) e **N** indicam controles negativos. **P** indica o controle positivo da reação e 1 a 9 indicam plantas testadas. As setas vermelhas indicam bandas de 1Kb.

Alguns dos eventos obtidos foram selecionados para análise da expressão do transgene, como demonstrado na **Figura 14**. Para a comparação da expressão do transgene nas matrizes por PCR quantitativo foram utilizados os controle endógenos NtActin e ARPC3. Inicialmente, utilizamos dois controles endógenos para análise da expressão de *rpfF*, e uma vez que ambos não demonstraram alteração na expressão em plantas transgênicas quando comparadas às plantas do tipo selvagem, apenas NtActin foi utilizado para análises seguintes. O valor da expressão do transgene foi calculado em comparação com plantas do tipo selvagem, para as quais o valor da expressão foi definido como 1, após os cálculos.

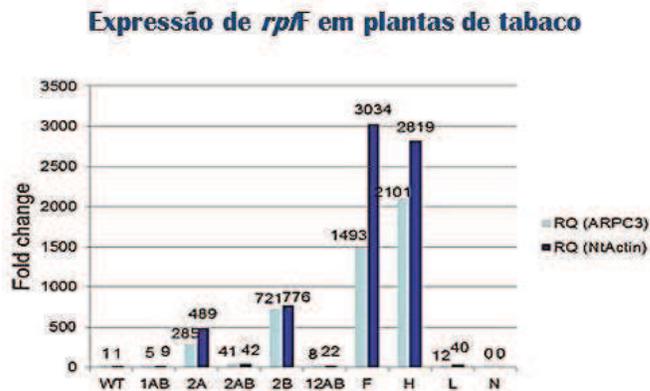


Figura 14: PCR quantitativo em tempo real para avaliação da expressão do transgene em plantas matrizes de tabaco. Para essa análise foram utilizados os controles endógenos ARPC3 e NtActin. 1AB, 2A, 2AB, 2B, 12AB, F, H, L e N correspondem aos eventos testados. WT corresponde a uma planta do tipo selvagem, utilizada como controle negativo. O valor da expressão do transgene foi obtido em comparação com uma planta do tipo selvagem, para a qual o valor da expressão do transgene foi definido como 1.

De acordo com respostas contra *X. fastidiosa* (discutidas no item seguinte), 5 eventos foram selecionados para testes posteriores de desafio contra o patógeno e a geração F1 desses eventos também foi avaliada quanto à expressão do transgene. A **Figura 15** mostra os resultados de expressão do gene *rpfF* na geração F1 dos eventos 1A, 1AB, 2B, 2AB e F.

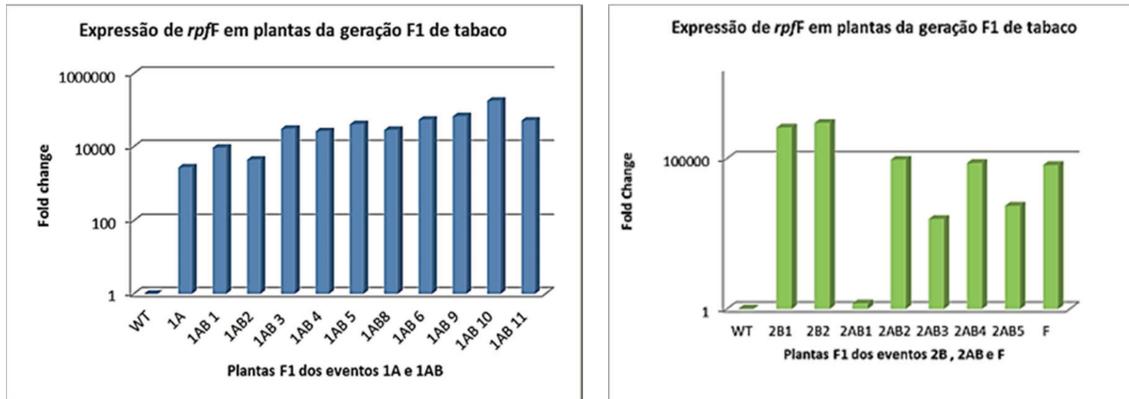


Figura 15: PCR quantitativo em tempo real para avaliação da expressão do transgene na geração F1 dos eventos selecionados para testes posteriores de desafio contra *X. fastidiosa*. Nessa segunda análise de expressão, apenas NtActin foi utilizado como controle endógeno. 1A, 1AB, 2B, 2AB e F correspondem aos eventos testados. WT corresponde a uma planta do tipo selvagem, utilizada como controle negativo.

De acordo com os resultados de PCR quantitativo em tempo real foi possível observar que uma das matrizes transgênicas não apresentou superexpressão do *rpfF* (Figura 14), indicando que além dos testes utilizando PCR convencional é necessária a avaliação da expressão do transgene por PCR quantitativo em tempo real. No caso da geração F1 (Figura 15), diferenças na expressão do transgene podem ser resultado de segregação, uma vez que essas plantas foram geradas a partir de autofecundação das plantas matrizes.

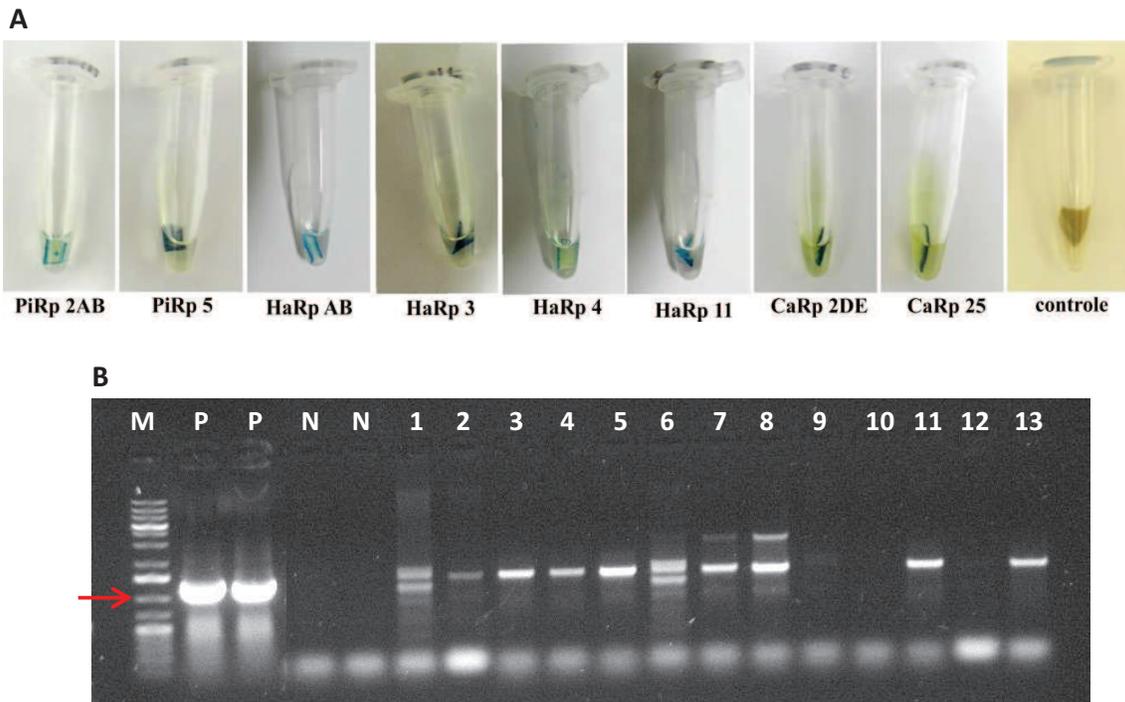
5.2.2. Transformação de *Citrus sinensis*

A utilização de epicótilos como explantes para transformação de citros possibilitou a obtenção de 8 eventos transgênicos. A eficiência de transformação de citros foi diferente de acordo com o cultivar. O cálculo da taxa de eficiência foi realizado como a porcentagem de brotos positivos após PCR utilizando cDNA como molde, com relação ao número total de brotos positivos no teste histoquímico GUS. Para Pineapple a eficiência foi de 0,24%, para Hamlin a eficiência foi de 0,88% e para Carrizo foi de 1,06%. A Tabela 3 resume os eventos realizados e os resultados obtidos.

Tabela 3: Eventos de transformação com o gene *rpfF* realizados em citros e resultados obtidos

Data do evento	Variedade de citros	Número de explantes	Brotos regenerados	Brotos GUS positivos	Brotos positivos - PCR de DNA	Brotos positivos - PCR de cDNA
30/8/2010	Pineapple	466	33	17	3	0
12/1/2011	Hamlin	216	22	11	6	2
15/3/2011	Pineapple	227	19	12	5	1
22/3/2011	Pineapple	131	64	21	7	1
6/4/2011	Hamlin	235	55	18	10	2
6/4/2011	Carrizo	187	23	4	2	2

A sequência de testes dos brotos regenerados foi seguida como descrito para tabaco, realizando inicialmente a avaliação da presença do gene repórter através do teste GUS. Brotos positivos para esse teste foram separados para que se desenvolvessem e pedaços de folhas foram coletados para realização de PCRs utilizando DNA e cDNA como moldes. A **Figura 16** mostra os resultados das etapas de seleção dos brotos obtidos.



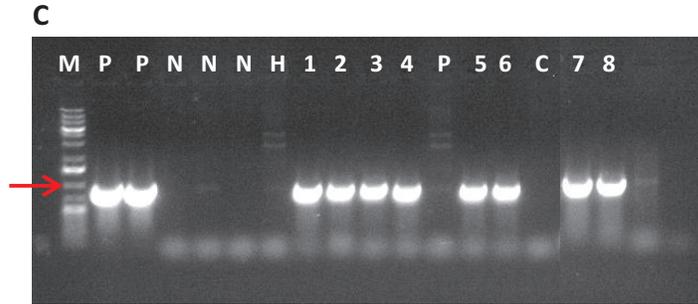
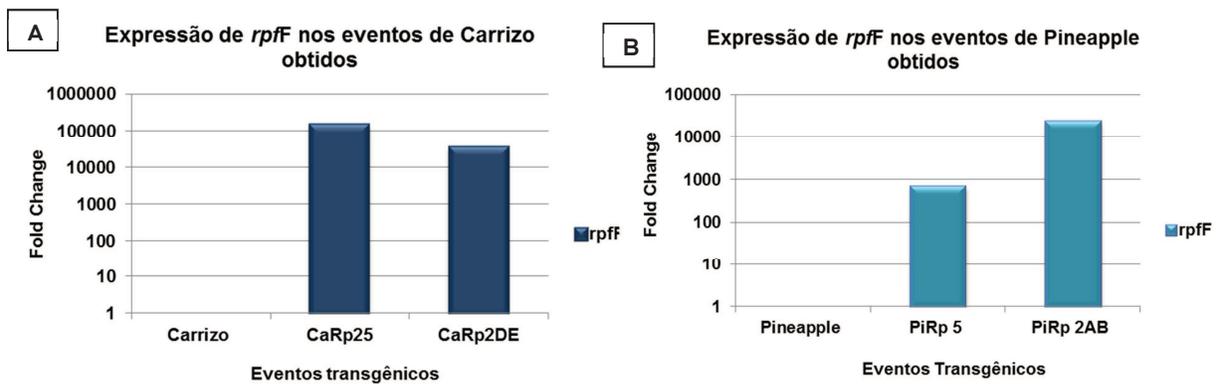


Figura 16: Etapas da avaliação dos brotos de citros. PCRs testes para avaliar a presença do gene *rpfF* nas plantas de tabaco transformadas. O gene alvo apresenta 900pb após amplificação. **A.** PCR utilizando DNA de plantas de tabaco positivas para o teste GUS. **B.** PCR utilizando cDNA das plantas positivas para a primeira PCR. **M** em ambas as figuras indicam Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas) e **N** indicam controles negativos. **P** indica o controle positivo da reação e 1 a 9 indicam plantas testadas. As setas vermelhas indicam bandas de 1Kb.

Após validação por PCR convencional, as plantas foram transferidas para casa de vegetação para que se desenvolvessem. A análise seguinte foi realizada a fim de avaliar os níveis de transcrição do transgene. Para isso, utilizamos qPCR e os primers citados anteriormente. A **Figura 17** mostra os resultados da expressão do *rpfF* nas plantas dse citros obtidas.



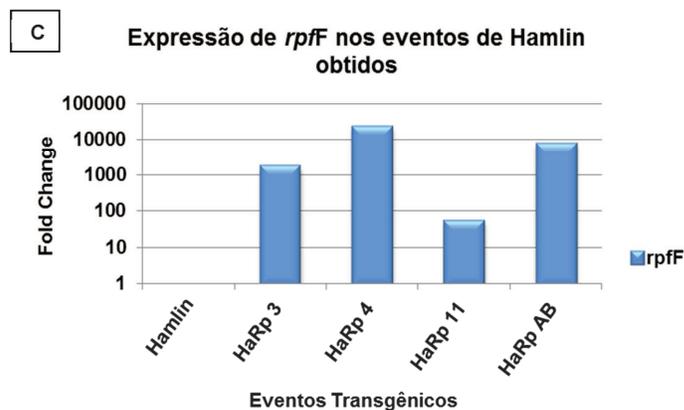


Figura 17: PCR quantitativo em tempo real para avaliação da expressão do *rpfF* nos eventos de citros obtidos. **A.** Expressão do transgene nos eventos de Carrizo obtidos. **B.** Expressão do transgene nos eventos de Pineapple obtidos. **C.** Expressão do transgene nos eventos de Hamlin obtidos. Carrizo, Pineapple e Hamlin se referem à plantas do tipo selvagem, utilizadas como controles negativos nos testes. A expressão do transgene nos eventos de Carrizo, Pineapple e Hamlin foi obtida em comparação com as respectivas variedades do tipo tipo selvagem, para as quais o valor da expressão foi definido como 1, após os cálculos.

A expressão do transgene, embora alta em todos os eventos obtidos, apresentou diferenças entre as plantas testadas. Após a validação das plantas foram realizados os experimentos de desafio contra os patógenos *X. fastidiosa* e *X. citri*. Resultados do desafio dessas plantas contra *X. fastidiosa* serão demonstrados no item seguinte, e resultados do desafio contra *X. citri* serão demonstrados e discutidos no capítulo 3.

5.3. Desafio de plantas transgênicas com *X. fastidiosa* e análise da colonização

5.3.1. Desafio e análises de *N. tabacum* transformados

As plantas de tabaco da geração F0 que expressaram o gene *rpfF* foram transferidas para casa de vegetação e aquelas fenotipicamente iguais as do tipo selvagem foram inoculadas com a bactéria para um screening inicial de plantas mais tolerantes ao patógeno. Ao todo, 14, dos 24 eventos transgênicos foram inoculados com a bactéria. Destes, apenas 5 eventos apresentaram

resultados de maior tolerância ao patógeno, já que sintomas de pontos de necrose foliar foram menores nesses eventos, e por isso foram selecionados para o experimento 1.

Para este experimento, sementes dos 5 eventos selecionados foram semeadas e crescidas como descrito anteriormente. Depois de brotadas e transplantadas para vasos, foi feito um teste GUS em pedaços de folhas para que brotos negativos não fossem utilizados para o desafio. Nem todas as folhas testadas apresentaram coloração azul após o teste GUS (dados não mostrados), indicando que escapes de sementes podem ocorrer mesmo em meio contendo antibiótico e que o gene *rpfF* estava segregando na população F1. Os brotos cujas folhas não apresentaram coloração azul foram descartados, e os positivos foram desafiados com a bactéria. Após 50 dias da inoculação, foi possível observar o aparecimento de pontos necróticos ao redor do limbo de algumas folhas, característicos da infecção por *X. fastidiosa* (Lopes *et al.* 2000).

De maneira geral, as plantas transgênicas de tabaco da geração F1 apresentaram um aspecto mais vigoroso do que as plantas do tipo selvagem, mesmo após o aparecimento de alguns sintomas provocados pela bactéria. Algumas plantas transgênicas demonstraram aparente redução de deficiência hídrica (**Figura 18C**), observado por folhas com maior turgescência quando comparadas às do tipo selvagem. Além disso, as folhas com sintomas em algumas plantas transgênicas se localizavam preferencialmente na parte inferior, mais próximo ao solo (**Figura 18B**), sendo que poucas folhas distais apresentavam sintomas. Outra característica observada foi a redução do número de folhas mortas quando comparadas às plantas do tipo selvagem (**Figura 18 B e C**). A **Figura 18** demonstra os sintomas causados por *X. fastidiosa* observados em tabaco e aspectos comparativos entre as plantas do tipo selvagem e transgênicas.

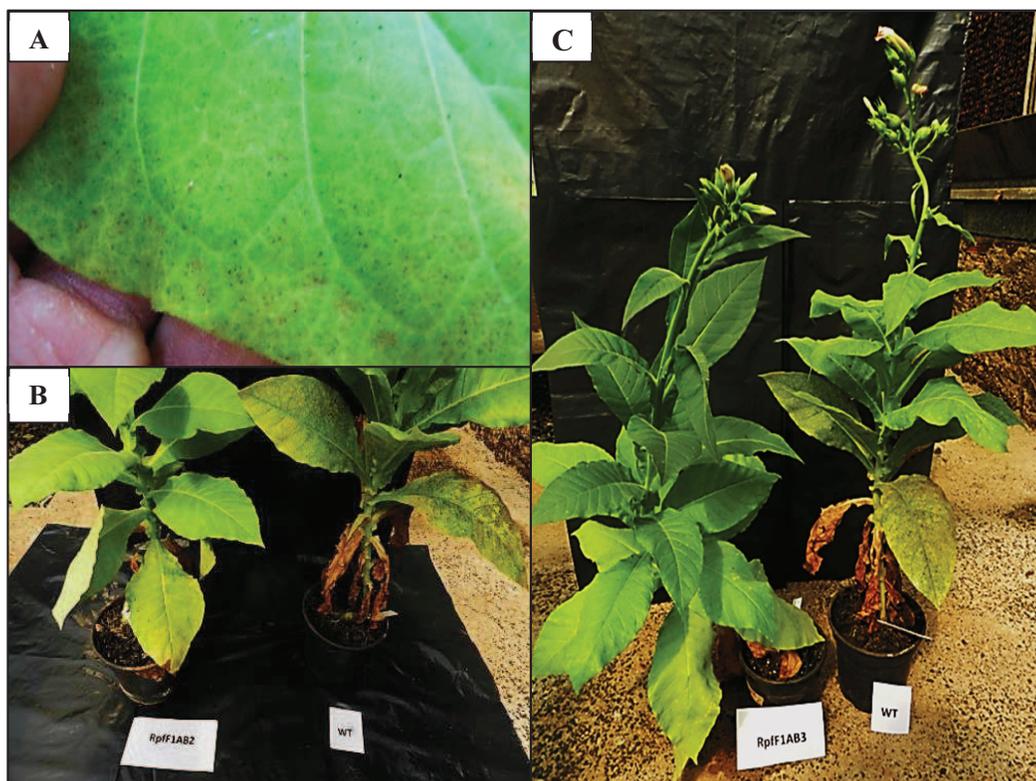


Figura 18: Aspectos das diferenças de sintomatologia observados no experimento 1 entre plantas do tipo selvagem e plantas transgênicas da geração F1. **A.** Pontos necróticos ao redor do limbo foliar, característicos da infecção por *X. fastidiosa*. **B.** Comparação entre a planta 2 do evento 1AB, à esquerda, e uma planta do tipo selvagem, ambas apresentando sintomas. **C.** Aspecto geral de uma planta do tipo selvagem em comparação com a planta 3 do evento 1AB, à esquerda, demonstrando diferenças no aspecto geral da planta. As folhas mortas eram mais numerosas em plantas não transgênicas e estas apresentavam maior aparência de deficiência hídrica.

A partir do início do aparecimento de sintomas, aos 50 dias após a inoculação, avaliações semanais da incidência foram realizadas até o final do experimento. A incidência foi calculada como a razão entre o número de folhas com sintomas em relação ao número total de folhas vivas da planta. Eventos como o 1A e o F apresentaram apenas uma planta. A incidência foi analisada por três avaliadores diferentes.

Foram realizadas coletas de folhas ao longo de diferentes pontos de algumas plantas que apresentaram menores resultados de incidência de sintomas, a fim de avaliar a movimentação bacteriana. Foi extraído o DNA total dessas folhas, e a quantidade de bactéria foi determinada por qPCR segundo a comparação com uma curva padrão construída com quantidades referentes a uma faixa de 10^2 a 10^8 células de *X. fastidiosa*/mg de tecido vegetal. A curva padrão obtida [$y = -3.3483x$ (número de cópias de DNA) + 38.196] mostrou uma variação linear correlacionando DNA (número de cópias) com a medida de fluorescência (valores de CT), além de um coeficiente R^2 de 0,9955. Todas as análises estatísticas para comparação de médias foram realizadas por teste de Tukey ($P < 0,05$). A curva padrão utilizada para cálculos das quantidades de *X. fastidiosa* por ponto de coleta está demonstrada na **Figura 19**.

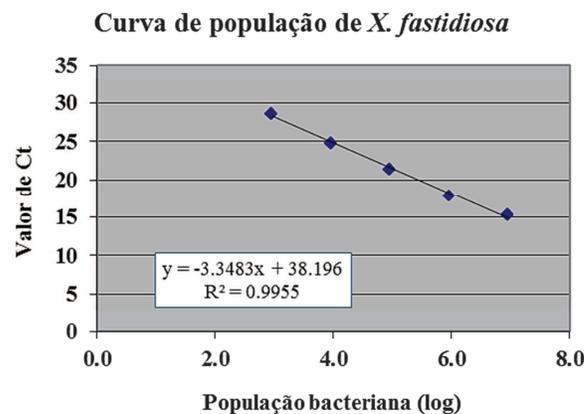


Figura 19: Curva de população de *X. fastidiosa* construída para análises das plantas transgênicas de tabaco inoculadas com a bactéria. A curva apresentou um valor de $R^2 = 0.9955$.

Foram eleitas as plantas 2, 3, 4 e 10 do evento 1AB e a planta 4 do evento 2AB para a análise de movimentação da bactéria, segundo resultados de incidência de sintomas e aparência geral. A partir da comparação de valores de CTs obtidos após qPCR das amostras de DNA extraído de pecíolos das folhas dos diferentes pontos das plantas inoculadas, foi possível determinar a quantidade de bactérias. Os resultados demonstraram que foi possível detectar *X. fastidiosa* até o ponto 4 de coleta de plantas do tipo selvagem, revelando grande capacidade de movimento dessa bactéria em tabaco, uma vez que o ponto 4 está a, aproximadamente, 1 metro

acima do ponto de inoculação. Por outro lado, a detecção de *X. fastidiosa* em plantas transgênicas não ultrapassou o ponto 2 de coleta, indicando que apresentaram menor movimentação, uma vez que foram detectadas preferencialmente mais próximas ao ponto de inoculação. Esse resultado corrobora o que foi observado e descrito acima, uma vez que sintomas foram observados preferencialmente na parte inferior dessas plantas transgênicas e em alguns casos não foi possível detectar sintomas em folhas distais. A **Figura 20** demonstra os resultados de detecção de *X. fastidiosa* nos pontos de coleta de tabacos.

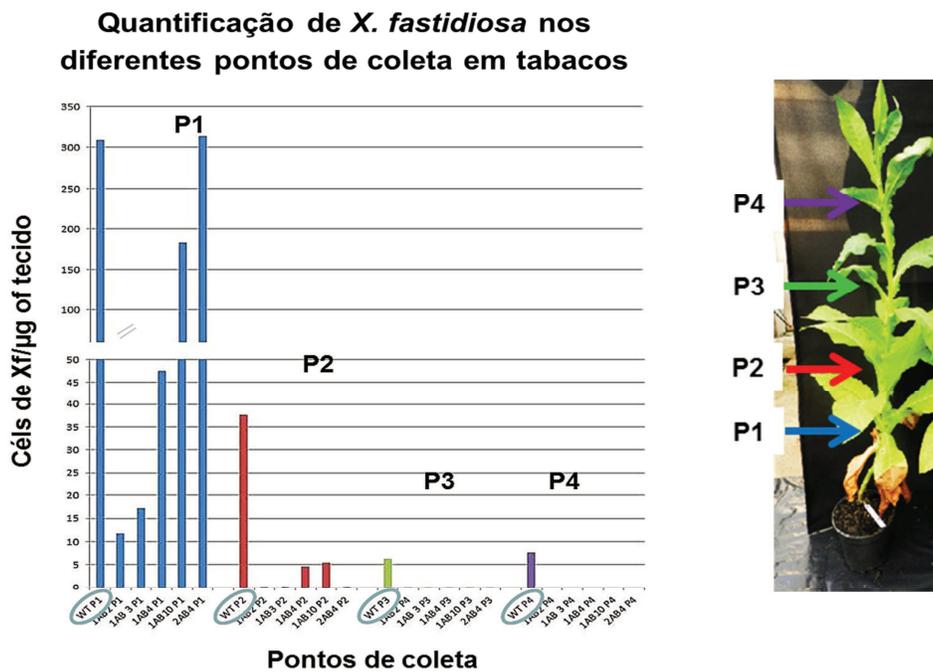


Figura 20: Detecção de *X. fastidiosa* nos diferentes pontos de coleta analisados de plantas transgênicas da geração F1 e plantas do tipo selvagem. P1, P2, P3 e P4 referem-se aos pontos de onde as folhas foram retiradas, sendo P1 o ponto mais próximo ao ponto de inoculação e P4 o mais distante.

A fim de avaliar se os resultados obtidos para os eventos testados eram consistentes, foi realizado um novo experimento de inoculação, que será referido como experimento 2. Sementes das plantas 2, 3, 4 e 10 do evento 1AB e da planta 3, do evento 2AB, que apresentaram menor movimento bacteriano foram coletadas e novamente semeadas, seguindo parâmetros

anteriormente descritos. Nesse segundo experimento, 15 plantas obtidas das sementes, portanto a geração F2 das plantas transgênicas, foram inoculadas e 15 plantas do tipo selvagem. A Incidência no experimento 2 também foi calculada com base na média da observação de 3 avaliadores diferentes, entretanto não foram feitas avaliações semanais e sim uma única avaliação, aos 110 dias após inoculação. Todas as análises estatísticas para comparação de médias foram realizadas por teste de Tukey ($P < 0,05$).

A incidência de sintomas foi menor nos 2 eventos transgênicos avaliados, sendo que no evento 1AB a média de incidência de sintomas da população obtida das sementes das plantas 3, 4 e 10 apresentaram diferença estatística significativa, assim como a média da incidência de sintomas da população originada das sementes da planta 3, do evento 2AB quando comparados ao tipo selvagem. Plantas desses dois eventos já haviam demonstrado tal comportamento no experimento 1, indicando que essas plantas mantiveram a característica de maior tolerância ao patógeno. A **Figura 21** mostra os resultados da média de incidência de sintomas nas plantas avaliadas.

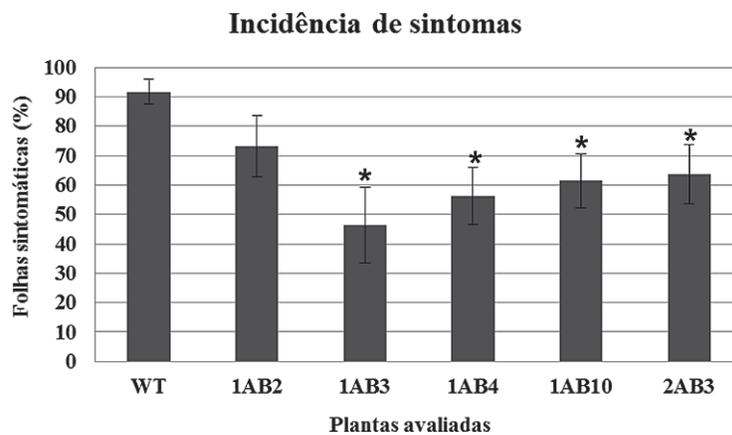


Figura 21: Média da incidência de sintomas de *X. fastidiosa* nas plantas transgênicas de tabaco da geração F2 selecionadas a partir do experimento 1. 1AB 2, 1AB 3, 1AB 4, 1AB 10 e 2AB 3 são referentes às plantas transgênicas que apresentaram maior tolerância ao patógeno no experimento 1. WT refere-se ao tipo selvagem. Asteriscos demonstram diferença estatística significativa.

Foi possível observar novamente que mesmo após o aparecimento de sintomas, plantas transgênicas apresentavam redução de sintomas e maior vigora quando comparadas às plantas do

tipo selvagem. Sintomas de infecção por *X. fastidiosa* em tabaco referem-se a pontos necróticos nas folhas. Esses sintomas se iniciam nas margens das folhas e conforme se agravam ocupam toda a área do limbo. Em algumas plantas transgênicas, os sintomas que apareceram nas margens das folhas não evoluíram para o limbo todo e era evidente a diminuição de sintomas observados por folhas, mesmo em casos onde o número de folhas sintomáticas era alto. Alguns exemplos comparativos entre plantas do tipo selvagem e transgênicas estão demonstrados na **Figura 22**.

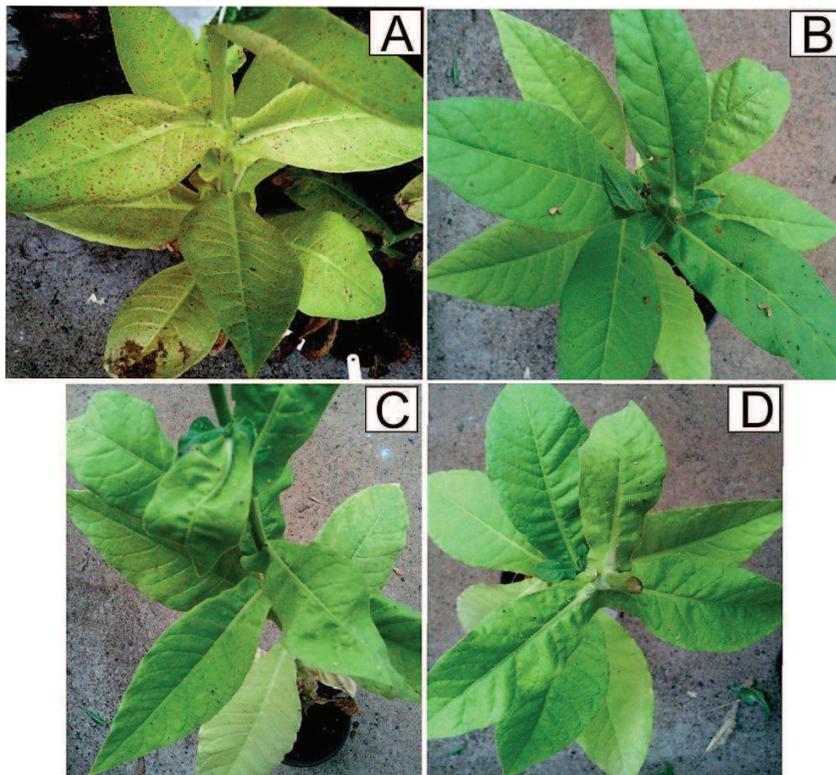


Figura 22: Aspectos de algumas plantas transgênicas da geração F2 dos eventos 1AB e 2AB em comparação à planta do tipo selvagem, após aparecimento de sintomas causados por *X. fastidiosa*. **A.** Planta do tipo selvagem. **B.** Planta 2 da geração F2 do evento 2AB, selecionado no experimento 1. **C.** Planta 5 da geração F2 do evento 1AB, selecionado no experimento 1. **D.** Planta 11 da geração F2 do evento 1AB, selecionado no experimento 1. Sintomas de infecção por *X. fastidiosa* se referem a pontos necróticos, evidentes na figura A.

Outro parâmetro avaliado no segundo experimento foi a severidade dos sintomas causados por *X. fastidiosa* nas plantas. Para essa análise, 3 diferentes avaliadores conferiram notas aos sintomas foliares, de acordo com uma escala que definia notas entre 1 a 6, dependendo

da área da folha ocupada pelos sintomas. A partir dos valores obtidos foi possível calcular a média da severidade entre as plantas do tipo selvagem e transgênicas avaliadas. A **Figura 23** mostra os resultados da média de severidade obtidos para o experimento 2.

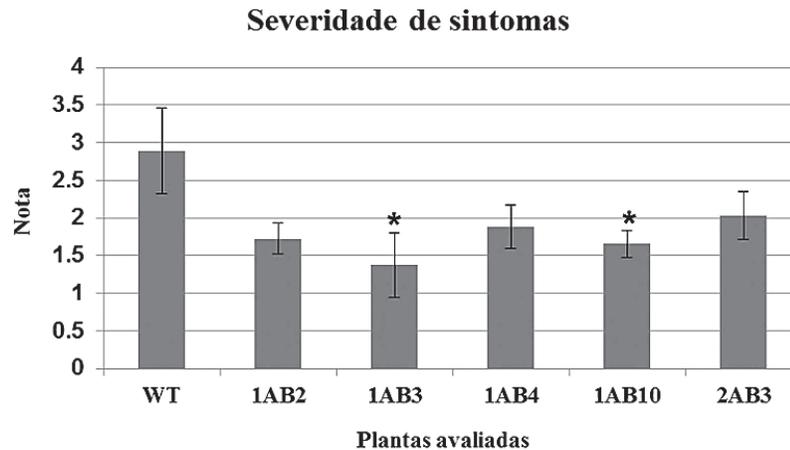


Figura 23: Média da severidade de sintomas de *X. fastidiosa* nas plantas de tabaco da geração F2 de transgênicas selecionadas a partir do experimento 1. 1AB2, 1AB3, 1AB4, 1AB10 e 2AB3 são referentes às populações da geração F2 das plantas transgênicas dos eventos 1AB e 2AB, que apresentaram maior tolerância ao patógeno no experimento 1. WT refere-se ao tipo selvagem. Asteriscos demonstram diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

A utilização da escala de sintomas de tabaco permitiu que a severidade dos sintomas pudesse ser classificada e comparada entre os eventos transgênicos e as plantas do tipo selvagem. Dessa maneira foi possível avaliar quantitativamente o que era observado com relação aos sintomas em plantas transgênicas. Embora apenas 2 populações, ambas do evento 1AB, apresentaram valor significativamente diferente ($P < 0,05$) entre as médias das notas de severidade dadas à plantas do tipo selvagem, as médias de notas de todas as outras populações apresentaram valor de P próximo a 0,05, sugerindo uma menor severidade para todas (**Figura 23**).

Sintomas causados por *X. fastidiosa* em plantas hospedeiras são resultado de movimentação da bactéria ao longo da planta e a colonização dos vasos do xilema. Para avaliar a movimentação da bactéria nas plantas de tabaco do tipo selvagem e transgênicas foram coletadas folhas ao longo das plantas, iniciando a 15 cm do ponto de inoculação até o ápice da planta, aproximadamente entre 65 e 70 cm. DNA foi extraído do pecíolo dessas folhas e utilizado em

análises da população da bactéria através de qPCR. O resultado de Ct foi utilizado para estimar a quantidade de bactérias, através da comparação com uma curva padrão previamente estabelecida. Resultados da movimentação de *X. fastidiosa* está demonstrado na **Figura 24**.

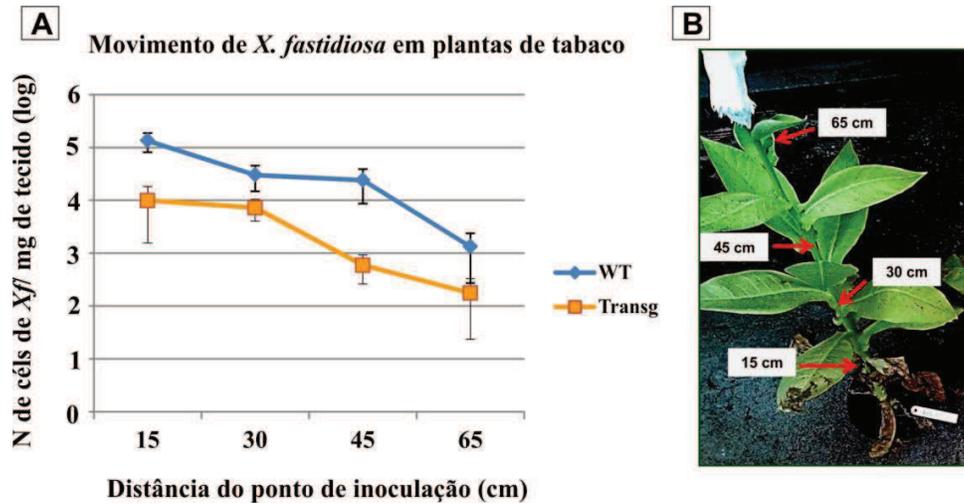


Figura 24: Média da população de *X. fastidiosa* detectada por qPCR nas plantas de tabaco do tipo selvagem e nas plantas da geração F2 dos dois eventos transgênicos avaliados. O número de células foi estimado em comparação com uma curva padrão previamente estabelecida. 15, 30, 45 e 65 cm foram as distâncias em que as folhas foram coletadas. Valor da média da população de *X. fastidiosa* encontrada nos pontos avaliados foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15 foi possível observar uma redução na quantidade de bactérias detectadas em todos os pontos de coleta das plantas transgênicas quando comparadas às plantas do tipo selvagem. Essa redução pôde ser observada já no primeiro ponto acima do ponto de inoculação, mas foi mais discrepante aos 45cm, referente ao terceiro ponto. Esse resultado reflete a dificuldade da bactéria em se movimentar em plantas transgênicas, visto que uma população menor de bactéria foi detectada em pontos mais distais.

5.3.2. Desafio e análises de *C. sinensis* transformados

As plantas de citros validadas para a expressão do gene *rpjF* foram transferidas para casa de vegetação. Dez borbulhas de cada evento transgênico, tanto Hamlin como Pineapple, e

dez borbulhas não transgênicas foram enxertadas sobre limão cravo para posterior desafio com *X. fastidiosa*. A fim de evitarmos quimeras, pequenos pedaços de folhas foram coletados das plantas propagadas para a realização de novo teste GUS (dados não mostrados). Apenas as plantas que apresentaram coloração azul após o teste foram inoculadas.

Após cinco meses de inoculação, foi realizada a primeira PCR teste para diagnóstico de *X. fastidiosa* nas plantas inoculadas. A folha imediatamente acima do ponto de inoculação foi coletada e foi realizada extração de DNA de seu pecíolo, que foi usado como molde para uma PCR, utilizando os primers RST31 (GCGTTAATTTTCGAAGTGATTTCGATTGC) e RST33 (CACCATTTCGTATCCCGGTG). A **Figura 25** exemplifica o resultado da PCR de diagnóstico de algumas plantas. Interessantemente, algumas plantas apresentavam a bactéria, mas ainda não haviam sintomas de CVC.

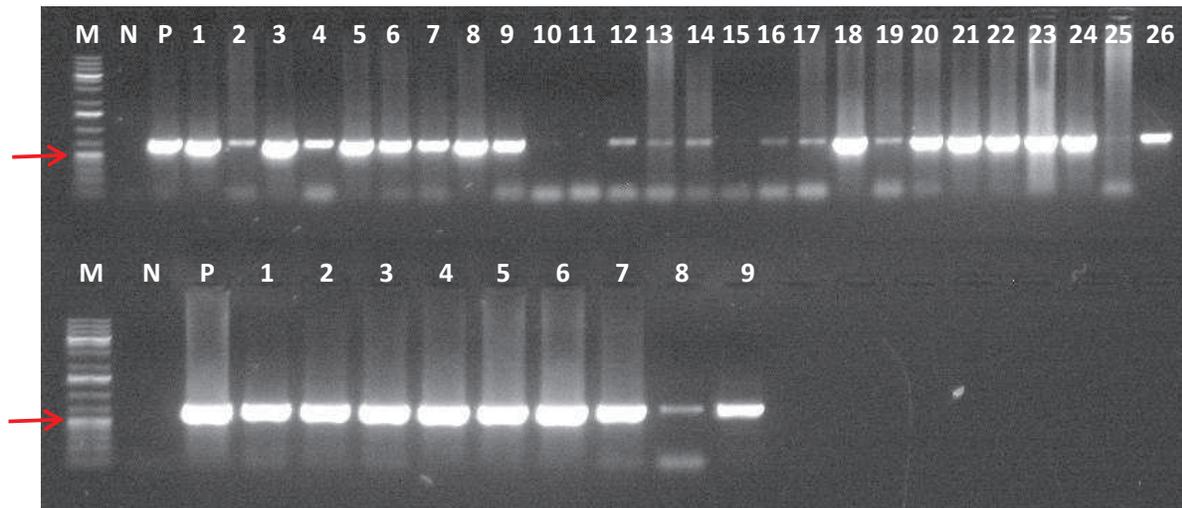


Figura 25: PCR de diagnóstico de *X. fastidiosa* nas plantas de citros do tipo selvagem e transgênicas após 5 meses da inoculação da bactéria. **M.** Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). **N.** DNA de planta sadia, utilizado como controle negativo. **P.** DNA da bactéria, utilizado como controle positivo da reação. Os demais poços representam as plantas testadas. As setas indicam bandas de 500pb.

Após 8 meses de inoculação, a maioria das plantas apresentavam sintomas de CVC, entretanto, algumas plantas transgênicas de eventos de Hamlin continuavam sem sintomas. A fim

de analisar se a bactéria ainda estava presente nessas plantas foi realizada nova PCR de diagnóstico. A **Figura 26** mostra os resultados obtidos.

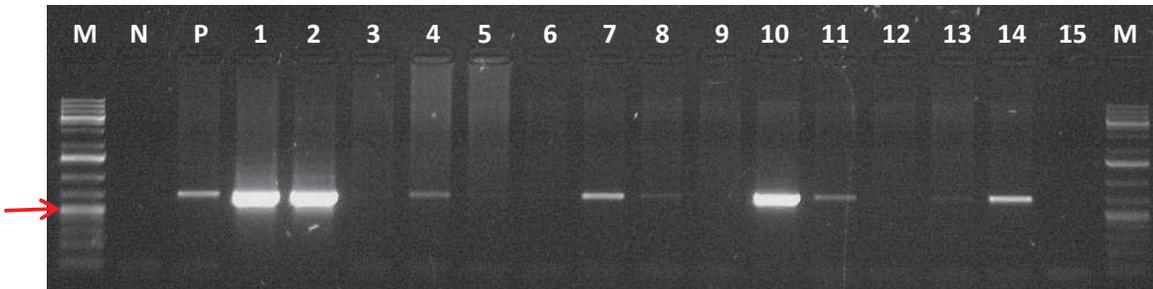


Figura 26: PCR de diagnóstico de *X. fastidiosa* após 8 meses de inoculação nas plantas de citros sem sintomas ed CVC. **M.** Marcador Molecular O Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). **N.** DNA de planta sadia, utilizado como controle negativo. **P.** DNA da bactéria, utilizado como controle positivo da reação. **1 e 2.** DNA de plantas sintomáticas do tipo selvagem, também utilizados como controles. Os demais poços representam as plantas testadas. A seta indica banda de 500pb.

De acordo com a **Figura 26** é possível observar que algumas plantas não apresentaram banda de 733pb referente à presença de *X. fastidiosa* e por isso foram descartadas do experimento. Por outro lado, várias plantas foram positivas para o diagnóstico da bactéria, e como mencionado anteriormente, não apresentavam sintomas de CVC. Das 13 plantas que não apresentavam sintomas, 8 foram positivas para o diagnóstico de *X. fastidiosa*, dentre as positivas, 4 faziam parte de um mesmo evento transgênico denominado HaRpAB. Após análises da presença da bactéria, foram avaliadas incidência e severidade de sintomas de CVC.

Sintomas de CVC começaram a aparecer 7 meses após a inoculação tanto em plantas do tipo selvagem como nas transgênicas. A fim de avaliar diferenças na incidência e severidade de sintomas de CVC entre plantas transgênicas e do tipo selvagem, foram realizadas duas avaliações nas plantas – uma aos 9 meses após a inoculação de *X. fastidiosa* e outra aos 18 meses. Esses dois tempos foram escolhidos porque representam fase inicial e avançada de sintomas.

Aos nove meses, a quase totalidade de plantas apresentava pelo menos uma folha com sintomas e todas as plantas já haviam sido testadas acerca da presença da bactéria. Aos 18 meses, todas as plantas já apresentavam sintomas. A incidência foi calculada como a razão entre o

número de folhas com sintoma e o total de folhas das plantas. A **Figura 27** mostra os resultados das avaliações de incidência de CVC aos 9 e aos 18 meses.

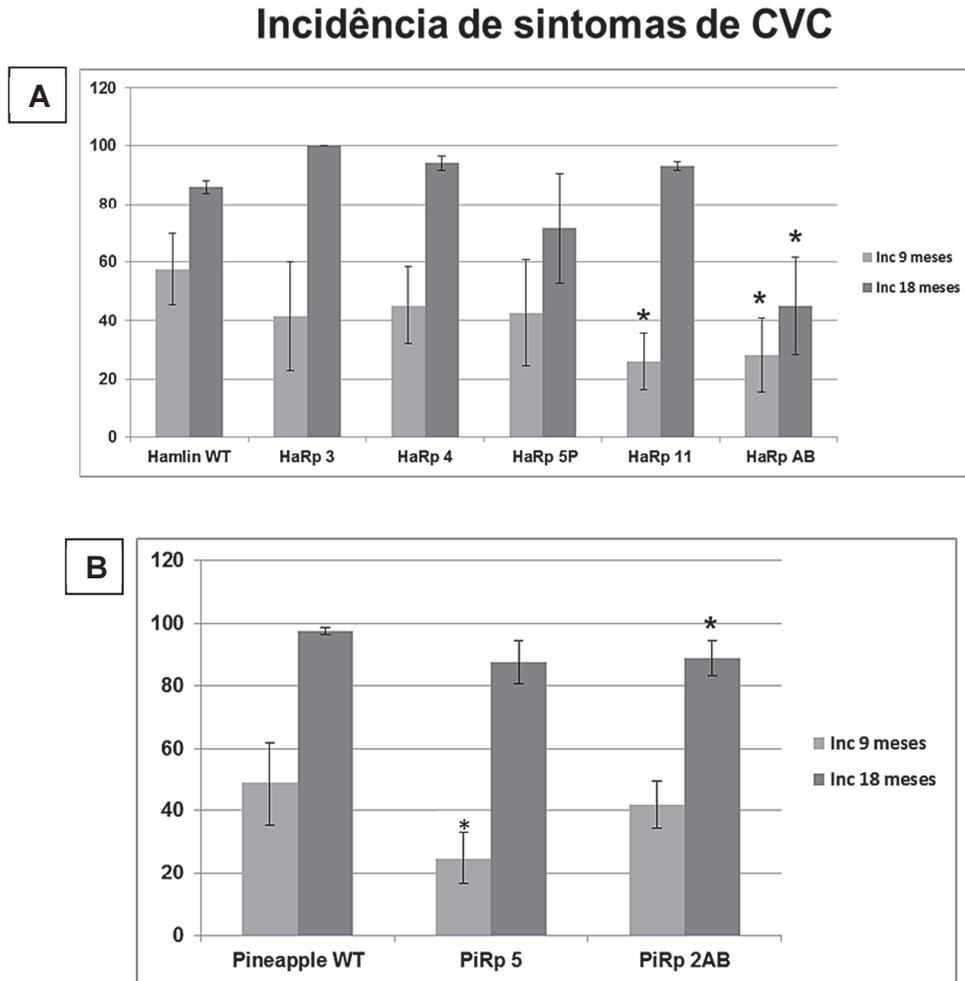


Figura 27: Médias das avaliações de três observadores com relação à incidência de sintomas de CVC nas plantas transgênicas aos 9 e aos 18 meses após a inoculação da bactéria. **A.** Média da incidência de CVC nas plantas de Hamlin transgênicas e do tipo selvagem. Hamlin WT, se refere à plantas do tipo selvagem e HaRp3, HaRp4, HaRp5P, HaRp11 e HaRpAB são os eventos transgênicos avaliados. **B.** Média da incidência de CVC nas plantas de Pineapple transgênicas e do tipo selvagem. Pineapple WT, se refere à plantas do tipo selvagem e PiRp5 e PiRp2AB são os eventos transgênicos avaliados. As barras demonstram erro padrão entre as amostras avaliadas e asteriscos representam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 27** foi possível observar que de maneira geral, aos nove meses de avaliação (barras claras dos gráficos em **A** e **B**), tanto as plantas transgênicas de Hamlin quanto as de Pineapple apresentaram redução na incidência de sintomas de CVC. Essa redução apresentou diferença estatística apenas nos eventos HaRp11 e HaRpAB nesse período analisado (**Figura 27 A**). No entanto, aos 18 meses após a inoculação por *X. fastidiosa*, essa redução da incidência de sintomas de CVC não foi mantida em três dos eventos transgênicos de Hamlin (HaRp3, HaRp4 e HaRp11) quando comparados à plantas de Hamlin do tipo selvagem, apresentando sintomas em aproximadamente todas as folhas (**Figura 27 A**). O evento HaRpAB foi o único que apresentou diferenças estatisticamente significativas entre incidência de CVC aos 9 e aos 18 meses, sendo que aos 18 meses, enquanto a média da incidência de sintomas era de aproximadamente 80% nas plantas do tipo selvagem o evento HaRpAB apresentou média de aproximadamente 40% (**Figura 27 A**). Foi possível observar também que as plantas dos dois eventos transgênicos de Pineapple apresentaram redução na incidência de sintomas de CVC tanto aos 9 quanto aos 18 meses após a inoculação de *X. fastidiosa* (**Figura 27 B**). Entretanto, diferença estatística significativa foi apresentada apenas após 18 meses pelo evento PiRp2AB (**Figura 27 B**).

Além de análises da incidência de sintomas de CVC nas plantas inoculadas, foram realizadas também avaliações da severidade dos sintomas. A severidade foi calculada como a razão entre as notas dadas aos sintomas e o número de folhas sintomáticas. Essas notas foram atribuídas de acordo com duas escalas diagramáticas, a primeira representa sintomas iniciais de CVC (Amorin *et al.*, 1993; Muranaka *et al.*, 2013) e por isso foi utilizada na avaliação após 9 meses de inoculação. A segunda escala foi estabelecida no atual trabalho e representa sintomas mais avançados de CVC, por isso foi utilizada em análises após 18 meses de inoculação. A **Figura 28** demonstra os resultados de severidade de sintomas ed CVC nas duas análises realizadas.

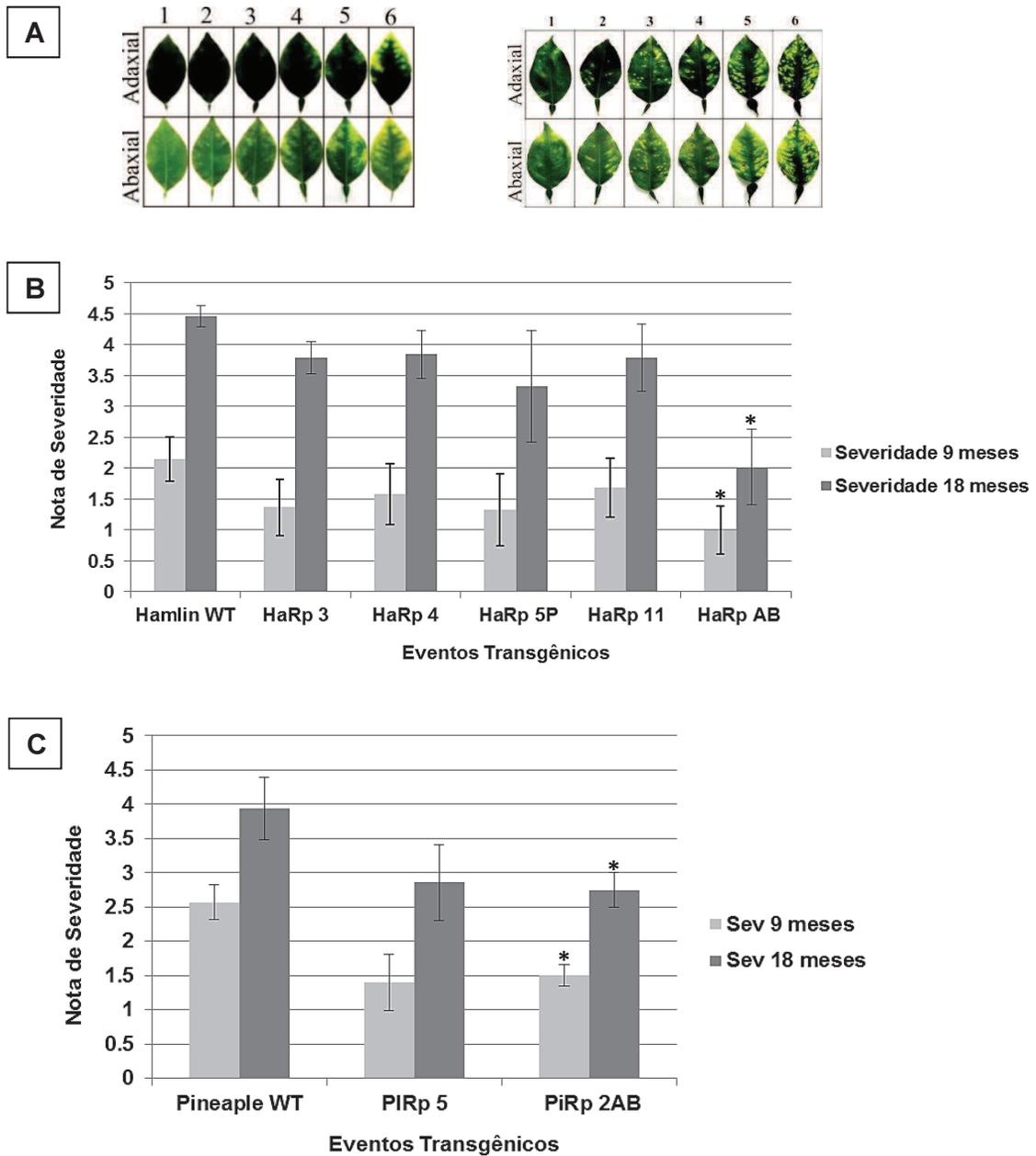


Figura 28: Médias das notas de severidade dadas por três avaliadores aos sintomas de CVC nas plantas transgênicas e do tipo selvagem aos 9 e aos 18 meses após a inoculação da bactéria. **A.** Escalas diagramáticas utilizadas pelos avaliadores em análises de severidade aos 9 meses, escala à esquerda, e aos 18 meses, escala à direita. **B.** Médias das notas de severidade conferidas aos sintomas de CVC de plantas de Hamlin do tipo selvagem e dos eventos transgênicos obtidos. Hamlin WT, se refere à plantas do tipo selvagem e HaRp3, HaRp4, HaRp5P, HaRp11 e

HaRpAB são os eventos transgênicos avaliados. **C.** Médias das notas de severidade conferidas aos sintomas de CVC de plantas de Pineapple do tipo selvagem e dos eventos transgênicos obtidos. Pineapple WT, se refere à plantas do tipo selvagem e PiRp5 e PiRp2AB são os eventos transgênicos avaliados. As barras demonstram erro padrão entre as amostras avaliadas e asteriscos representam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

De acordo com os resultados demonstrados na **Figura 28**, foi possível observar que a severidade dos sintomas de CVC nos eventos transgênicos, de maneira geral, se manteve menor do que nas plantas do tipo selvagem aos 9 e aos 18 meses após a inoculação com *X. fastidiosa*. Notas mais baixas de severidade foram estatisticamente significativa nas duas análises realizadas para pelo menos um evento transgênico obtido de cada cultivar, os eventos HaRpAB e PiRp2AB, apresentaram severidade reduzida tanto aos 9 quanto aos 18 meses após inoculação de *X. fastidiosa* (**Figura 28 B e C**). O evento HaRpAB apresentou média de nota de severidade igual a 1 (**Figura 28 B**), o que pode ser reflexo da presença de plantas que, mesmo positivas para diagnóstico da bactéria, não apresentaram sintomas até os 6 meses após inoculação de *X. fastidiosa*. No caso das análises de severidade de Pineapple, foi possível observar que mesmo aos 18 meses, quando os sintomas de CVC estavam em fase avançada, a média da nota do evento PiRp2AB foi próxima a 2,5, enquanto a média da nota de Pineapple do tipo selvagem foi aproximadamente 4. Diferentemente do que ocorreu para incidência de CVC, a severidade dos sintomas nas plantas transgênicas se manteve mais baixa mesmo após 18 meses de inoculação. Esse resultado demonstra que mesmo apresentando muitas folhas com sintomas nas plantas transgênicas (incidência) a severidade desses sintomas não foi tão grande como observado nas plantas do tipo selvagem.

Quando se comparam as médias das notas de severidade das plantas do tipo selvagem e das plantas transgênicas, essa redução apresentada pelas plantas contendo o gene *rpfF* fica ainda mais evidente. A **Figura 29** mostra as médias das notas de severidade de CVC nas plantas transgênicas e do tipo selvagem nas duas avaliações realizadas, e folhas com notas representativas das médias alcançadas.

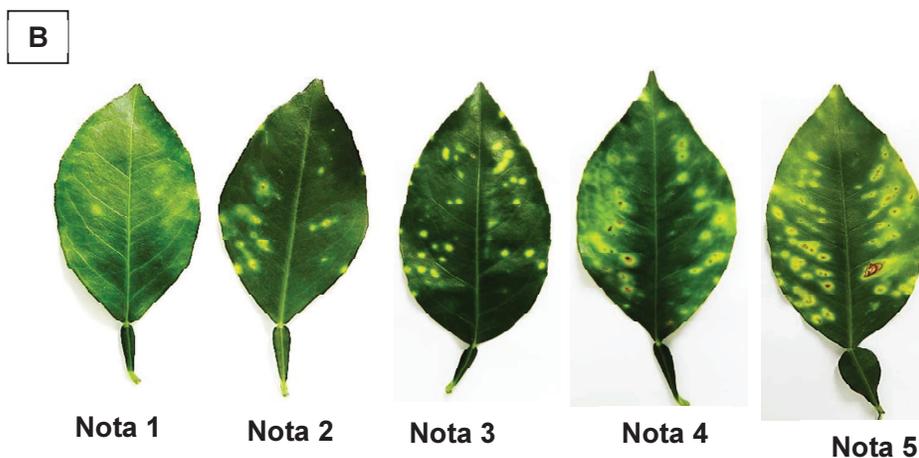
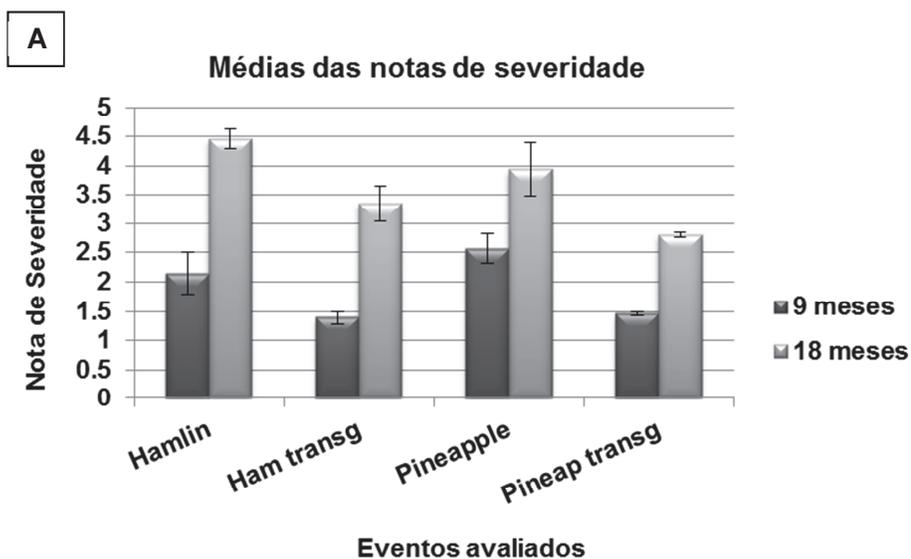


Figura 29: Médias das notas de severidade dos sintomas de CVC nas plantas transgênicas e do tipo selvagem aos 9 e aos 18 meses após a inoculação da bactéria. **A.** Comparação entre as médias das notas de plantas do tipo selvagem dos cultivares Hamlin e Pineapple, e dos eventos transgênicos obtidos desses cultivares. **B.** Folhas representativas de notas 1 a 4 para sintomas de CVC.

A média das notas das plantas de Hamlin transgênicas aos 9 meses de análise ficou próxima a 1,4 enquanto a média de severidade de plantas do tipo selvagem ultrapassou a nota 2. No caso das plantas transgênicas de Pineapple, a média das notas de severidade aos 9 meses de avaliação ficou em torno de 1,45 e a média das notas das plantas do tipo selvagem foi

aproximadamente 3. Já aos 18 meses de avaliação, as plantas do tipo selvagem alcançaram médias de sintoma ao redor de 4, por outro lado, plantas transgênicas apresentaram médias de nota de severidade ao redor de 3 (**Figura 29 A**). Quando se comparam as médias de severidade obtidas e as folhas representativas das notas de sintomas (**Figura 29 B**) é possível observar como essa redução é significativa. Médias de severidade ao redor de 4 refletem folhas com grau de amarelecimento mais generalizado, além de necrose evidente nos pontos cloróticos. Quando observamos os resultados de incidência e severidade dos sintomas de CVC na planta (**Figura 30**) é possível notar claramente o que dados quantitativos demonstraram. A **Figura 30** mostra comparações entre plantas dos cultivares Hamlin e Pineapple do tipo selvagem e plantas transgênicas após 18 meses de inoculação de *X. fastidiosa*.

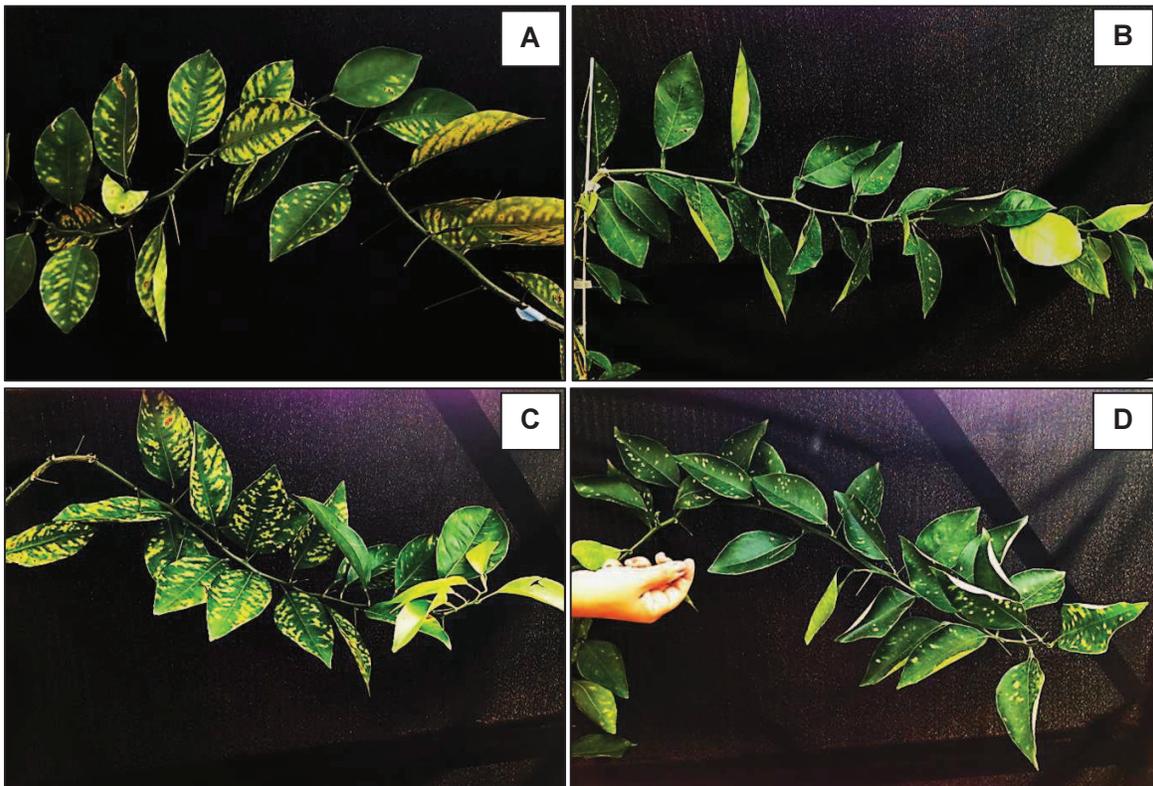


Figura 30: Aspecto de incidência e severidade de sintomas de CVC em plantas dos cultivares Hamlin e Pineapple do tipo selvagem e transgênicas aos 18 meses após a inoculação por *X. fastidiosa*. **A.** Planta de Hamlin do tipo selvagem. **B.** Planta de Hamlin do evento transgênico HaRp11. **C.** Planta de Pineapple do tipo selvagem. **D.** Planta de Pineapple evento transgênico PiRp2AB.

A **Figura 30** representa as diferenças demonstradas pelos dados de incidência e severidade dos sintomas de CVC. Aos 18 meses após inoculação da bactéria, a incidência de sintomas não foi drasticamente diferente entre plantas do tipo selvagem e plantas transgênicas, indicando que sintomas estavam presentes em muitas folhas das plantas. Entretanto, a severidade desses sintomas foi bastante diferente entre plantas do tipo selvagem e transgênicas, nos dois cultivares testados. É possível observar na **Figura 30 A**, representativa de plantas de Hamlin do tipo selvagem, que sintomas de CVC estão presentes em todas as folhas da planta, apresentando clorose bastante avançada, característica de alto grau de severidade. Já na **Figura 30 B**, representativa de um evento transgênico de Hamlin, também é possível observar que todas as folhas da planta apresentam sintomas de CVC, entretanto, a severidade desses sintomas é bem menor do que na planta do tipo selvagem. Essas observações também são evidentes nas **Figura 30 C e D**, onde diferenças na severidade de sintomas entre Pineapple do tipo selvagem (**C**) e uma planta representativa de um evento transgênico de Pineapple (**D**) são comparadas. Essas imagens ilustram claramente diferenças na incidência, calculada como a razão entre o número de folhas com sintomas e o total de folhas da planta, e a severidade dos sintomas, avaliada de acordo com graus de danos causados à folha.

Sintomas de CVC são o resultado da colonização dos vasos do xilema e da movimentação bacteriana ao longo da planta. Resultados prévios obtidos das plantas modelo transgênicas demonstraram reduzida capacidade de movimento de *X. fastidiosa*, sugerindo que tal comportamento também poderia ocorrer nas plantas de citros. Para avaliar a movimentação de *X. fastidiosa* em citros, folhas foram coletadas ao longo de diferentes pontos da planta, respeitando distâncias de aproximadamente 15 centímetros entre eles. A quantidade de tecido foliar utilizada para extração de DNA foi pesada. Foi realizada a extração de DNA do pecíolo das folhas e a quantidade de bactérias foi determinada por qPCR segundo comparação com uma curva padrão construída com quantidades referentes a uma faixa de 10^2 a 10^8 células de *X. fastidiosa*/mg de tecido vegetal. A curva padrão obtida [$y = -3.6023x$ (número de cópias de DNA) + 39.252] mostrou uma variação linear correlacionando DNA (número de cópias) com a medida de fluorescência (valores de CT), além de um coeficiente R^2 de 0,9988. Todas as análises estatísticas para comparação de médias foram realizadas por teste de Tukey ($P < 0,05$). A curva padrão utilizada para cálculos das quantidades de *X. fastidiosa* por ponto de coleta está demonstrada na **Figura 31**.

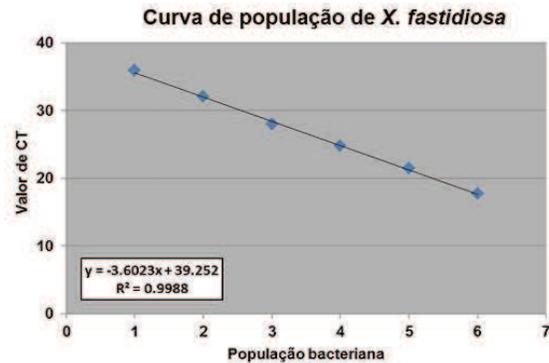


Figura 31: Curva de população de *X. fastidiosa* construída para análises das plantas transgênicas de citros inoculadas com a bactéria. A curva apresentou um valor de $R^2 = 0.9988$.

Para avaliação do movimento bacteriano nas plantas de citros obtidas foi escolhida uma planta de cada cultivar transgênico. Foram escolhidas plantas dos eventos transgênicos HaRpAB, de Hamlin e PiRp2AB, de Pineapple, pois apresentaram redução de incidência de sintomas após 9 e 18 meses de inoculação, e também apresentaram redução na severidade dos sintomas de CVC nas duas análises realizadas. Amostras de DNA obtidas de folhas coletadas em diferentes pontos das plantas transgênicas foram comparadas às amostras de pontos equivalentes nas plantas do tipo selvagem utilizando PCR quantitativo em tempo real e primers específicos para detecção de *X. fastidiosa*. Análises foram feitas para ambos os cultivares obtidos. Os resultados estão demonstrados na **Figura 32**.

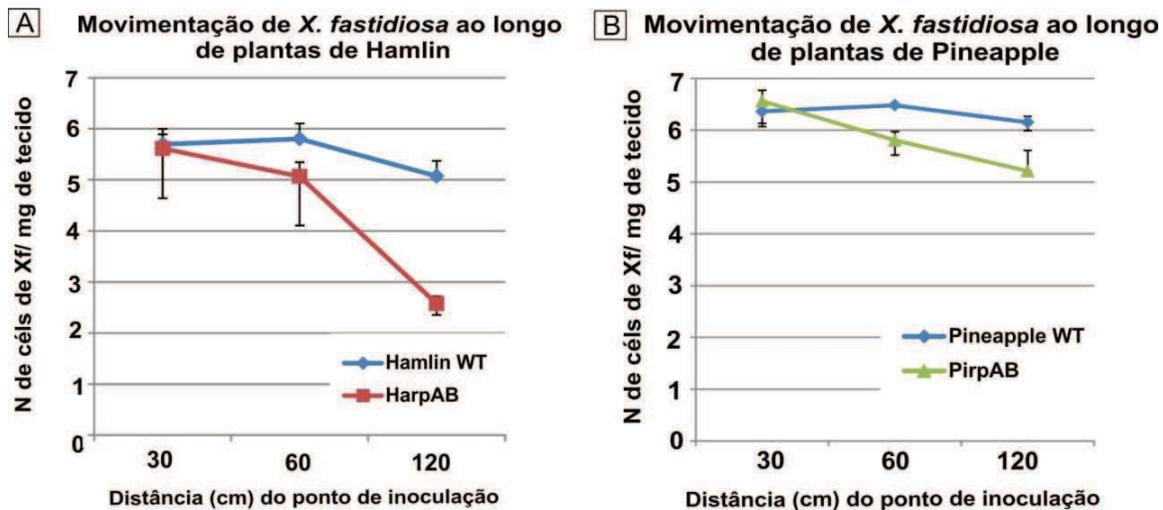


Figura 32: Movimentação de *X. fastidiosa* em plantas de citros do tipo selvagem e transgênicas. **A.** Resultados da média da quantificação de *X. fastidiosa* nos pontos de coleta de plantas de Hamlin do tipo selvagem e do evento HaRpAB. **B.** Resultados da média da quantificação de *X. fastidiosa* nos pontos de coleta de plantas de Pineapple do tipo selvagem e do evento PiRp2AB. As barras refere-se ao erro padrão entre as amostras.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 32**, foi possível observar que células de *X. fastidiosa* foram detectadas em maiores quantidades nos pontos de coleta das plantas do tipo selvagem. Em Hamlin, **Figura 32 A**, os resultados demonstraram que a partir do segundo ponto de coleta foram detectadas 10 vezes menos células da bactéria no evento transgênico HaRpAB do que em plantas do tipo selvagem, e essa diferença foi de aproximadamente 100 vezes maior aos 120 cm do ponto de inoculação. No caso de Pineapple, também foi possível observar uma redução na quantidade de células da bactéria detectada nos pontos acima do ponto de inoculação e, nas plantas avaliadas do evento transgênico, essa redução foi de 10 vezes a partir do segundo ponto de coleta e se manteve até o ápice da planta. Os resultados de qPCR para detecção de *X. fastidiosa* nas plantas de citros sugerem que a movimentação da bactéria ao longo das plantas transgênicas foi dificultada. Esse fato possivelmente contribuiu para a redução da severidade dos sintomas de CVC observado nas plantas.

6. Discussão

No Capítulo 2 foram analisados aspectos de desenvolvimento de *X. fastidiosa* quando inoculadas em plantas transgênicas de tabaco e de citros, em comparação com plantas do tipo selvagem. Tabaco foi escolhido como modelo por ser um hospedeiro alternativo da bactéria e por ter se mostrado um bom modelo para estudos com genes candidatos à transformação de plantas alvo (Dandekar *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014 submetido).

Para a obtenção das plantas transgênicas foi escolhido o gene *rpfF* de *X. fastidiosa* por ser este o responsável pela síntese de DSF, um sinal molecular que modula o comportamento do patógeno através da ativação ou repressão de genes responsivos (Wang *et al.*, 2012). O gene alvo para este trabalho foi isolado do genoma da estirpe 9a5c e utilizado na montagem de um cassete de expressão utilizando o promotor 35S, que possibilita a expressão do transgene de maneira constitutiva na planta. O vetor binário pCambia 2301 foi o vetor final utilizado para transformação em *A. tumefaciens*. Metodologias envolvendo essa bactéria foram utilizadas na transformação do cultivar RP-1 tabaco e dos cultivares Hamlin e Pineapple, de laranja doce, e do porta enxerto Carrizo. Diferentes metodologias de transformação foram utilizadas durante o processo, e a transformação de tabaco foi mais fácil do que a de citros, sendo possível obter mais plantas transformadas com menos explantes infectados. As avaliações das plantas obtidas foram idênticas tanto para tabaco como para citros e contaram com etapas de teste do gene repórter (GUS), a fim de avaliar brotações positivas, PCR utilizando DNA como molde para avaliar a presença do transgene, PCR utilizando cDNA como molde, para verificar se o transgene estava sendo expresso e PCR quantitativo em tempo real para avaliar a taxa de expressão do transgene. Essas etapas de teste se mostraram bastante importantes, uma vez que mesmo apresentando coloração azul após ensaios para verificação de GUS, algumas plantas não apresentaram banda positiva após PCR de detecção do transgene indicando que o cassete de expressão pode ter sofrido quebra durante a inserção no genoma das plantas.

Foi possível observar que houve diferença no nível de expressão do transgene tanto em plantas de tabaco quanto em plantas citros, o que sugere que o local de inserção do transgene no genoma das plantas transformadas pode ter interferência na expressão do transgene. Inicialmente, nas análises de transcrição em tabacos e em citros, utilizamos dois controles endógenos para verificar os níveis da expressão de *rpfF*, e uma vez que ambos não demonstraram

alteração na expressão em função da presença de um transgene, apenas um deles, o ARPC3, foi escolhido para as análises seguintes. No caso de tabaco, o PCR quantitativo em tempo real foi repetido para plantas da geração F1 para certificação que as sementes regeneradas ainda estavam expressando *rpfF*, e novamente foram observadas diferenças nos níveis de expressão do transgene o que pode ser resultado de segregação, uma vez que essas plantas foram geradas a partir de autofecundação das plantas matrizes. Em citros os níveis de expressão do transgene foram avaliados apenas para as plantas matrizes. As plantas propagadas de citros foram avaliadas por teste GUS (dados não mostrados) para que fosse evitada a utilização de borbulhas não transformadas devido a possíveis quimeras que podem ocorrer durante o processo de regeneração (Dominguez *et al.*, 2004)

Resultados das análises de incidência demonstraram que, de maneira geral, houve redução no número de folhas sintomáticas nas plantas transgênicas, tanto em tabacos quanto em citros. No caso de citros, embora algumas plantas não apresentaram uma redução drástica na incidência após 18 meses de inoculação da bactéria um evento de cada cultivar manteve porcentagens baixas de incidência de CVC. Resultados de redução da incidência de sintomas causados por *X. fastidiosa* também foram reportados no caso de videiras superexpressando *rpfF* (Lindow *et al.*, 2014). Nesse trabalho, os autores obtiveram redução no número de folhas de videiras transgênicas apresentando sintomas de doença de Pierce em três experimentos independentes, e demonstraram que o desenvolvimento de sintomas nas plantas transgênicas foi mais lento. De acordo com os autores, a superexpressão do *rpfF* não previniu o aparecimento de sintomas, mas foi importante para diminuir a dispersão ao longo da planta (Lindow *et al.*, 2014).

A severidade de sintomas no presente trabalho foi calculada de acordo com as médias das notas dadas aos sintomas em tabacos e em citros. Para atribuição das notas, escalas de severidade de sintomas foram utilizadas por três avaliadores diferentes. Interessantemente, a diferença entre as notas de severidade de plantas do tipo selvagem e plantas transgênicas foi mais drástica do que a diferença observada na incidência de sintomas. Esse resultado foi visto tanto em tabaco quanto em citros. A redução da severidade de sintomas pode estar relacionada com a menor incidência de folhas sintomáticas nas plantas transgênicas e sugere que a colonização da bactéria nessas plantas não está ocorrendo de maneira eficiente. Embora escala de notas para doença de Pierce já foi demonstrada como sendo um bom parâmetro para avaliação de severidade em

videiras transformadas (Dandekare *et al.*, 2012), a severidade de sintomas tal qual como foi calculada no presente trabalho não foi utilizada para videiras superexpressando *rpfF*. Nesse caso os autores discutem severidade como número de folhas com sintomas na planta, não atribuindo notas aos níveis de escaldadura nas folhas (Lindow *et al.*, 2014). Escala de notas para avaliação de sintomas de CVC já foi demonstrada em outros trabalhos onde apresentou-se como uma boa ferramenta para avaliação da severidade dessa doença em laranjeiras infectadas (Amorin *et al.*, 1993 ; Muranaka *et al.*, 2013). A alteração da eficiência de colonização pela bactéria pode ter sido influenciada por diferentes espécies de ácidos graxos que a enzima codificada pelo transgene possa estar produzindo em tabacos e nos diferentes cultivares de citros. Em amostras de seiva de videiras superexpressando *rpfF* de Temecula foram identificadas mais de uma molécula de ácido graxo, que não estavam presentes em plantas do tipo selvagem. Essas moléculas, segundo os autores, poderiam estar alterando a sinalização mediada por QS em *X. fastidiosa* resultando na redução de sintomas da doença de Pierce observados em plantas transgênicas (Lindow *et al.*, 2014).

Sintomas da infecção por *X. fastidiosa* resultam da combinação entre a capacidade de colonização da bactéria e seu movimento no interior da planta. A redução da severidade de CVC em plantas transgênicas sugere que a capacidade de colonização da bactéria pode estar comprometida, e análises da movimentação de *X. fastidiosa* demonstraram que esse fator também pode ter contribuído para a redução da severidade. Tanto em tabaco quanto em citros foi possível observar que a movimentação da bactéria ao longo das plantas transgênicas foi dificultado, sugerindo que a expressão do transgene foi capaz de alterar o comportamento da bactéria. Interessantemente em citros, houve diferença também na movimentação entre os cultivares testados. O evento transgênico PiRp 2AB, referente a plantas transgênicas de Pineapple, apresentou uma população de *X. fastidiosa* maior, segundo análises de qPCR, do que o evento HaRp AB, de plantas transgênicas de Hamlin, nos pontos de detecção. Esse resultado sugere que a colonização em Pineapple foi mais eficiente do que em Hamlin, demonstrando que o cultivar de citros pode determinar maior ou menor desenvolvimento da bactéria. Resultados na diminuição do movimento de *X. fastidiosa* em plantas superexpressando *rpfF* foram similares para o que foi observado em videiras. Nas plantas transgênicas de videira foi possível observar uma drástica redução na quantidade de bactérias isoladas a 120 cm acima do ponto de inoculação, sendo que a população de *X. fastidiosa* recuperada desse ponto em plantas do tipo

selvagem foi dez vezes maior. Isso demonstra a reduzida capacidade de movimentação das bactérias nas plantas transgênicas (Lindow *et al.*, 2014). Nossos resultados também apresentaram padrão similar no deslocamento da bactéria ao longo das plantas transgênicas dos eventos HaRpAB e PiRp2AB, escolhidos para essa análise por se apresentarem com reduzida incidência e severidade de sintomas de CVC nas duas análises realizadas. A população de *X. fastidiosa* detectada por qPCR se mostrou diferente entre as plantas transgênicas e do tipo selvagem já no segundo ponto de avaliação, 60 cm acima do ponto de inoculação, onde a quantidade de bactérias nas plantas transgênicas foi menor. Essa diferença foi ainda maior no evento HaRpAB, aos 120 cm acima do ponto de inoculação, onde a população bacteriana detectada foi 1000 vezes menor do que a detectada em plantas do tipo selvagem.

Os resultados apresentados nesse capítulo demonstraram que a abordagem de “confundir o patógeno” através da utilização de um gene que codifica a enzima que atua na síntese de uma molécula envolvida na regulação do QS da bactéria se apresentou bastante promissora. A superexpressão do gene, resultando na geração de uma enzima envolvida com o metabolismo de DSF tanto em plantas modelo quanto em plantas de citros, resultou em diferenças no padrão de colonização de *X. fastidiosa* que levaram à redução da severidade de sintomas causados pela bactéria. A movimentação da bactéria também foi menor nas plantas transgênicas indicando que o DSF produzido estava atuando de maneira a potencializar a modulação dos genes naturalmente responsivos a esse sinal molecular em *X. fastidiosa* (Wang *et al.*, 2012), sugerindo que o *rpfF* é um bom gene candidato a abordagens futuras visando resistência contra esse patógeno. Vale ressaltar que os resultados obtidos em citros no presente trabalho envolveram a utilização de plantas podadas para permanecerem em haste única, o que pode ter favorecido a movimentação bacteriana e a colonização dos vasos do xilema, esses resultados podem ser ainda mais promissores em plantas onde o crescimento cambial com a natural brotação dos ramos possa ser permitido, como o que ocorre em condições de campo.

7. Conclusões gerais do patossistema *Xylella fastidiosa*

- ✓ O gene *rpfF* foi facilmente clonado e sua detecção por técnicas moleculares não apresentou dificuldades.

- ✓ Foi possível transformar tabaco e citros com o gene *rpfF*.

- ✓ Tanto em tabaco quanto em citros a resposta de redução de movimento, redução de incidência e severidade de sintomas causados pela bactéria foi semelhante, sugerindo que tabaco pode ser um bom modelo indicativo de resposta a *X. fastidiosa*.

- ✓ O gene *rpfF* conferiu diminuição de movimento de *X. fastidiosa* no interior da planta e redução da severidade de sintomas, demonstrando que ele pode ser utilizado como um possível candidato para controle da bactéria.

Bibliografia consultada

- Beaulieu, E. D., Ionescu, M., Chatterjee, S., Yokota, K., Trauner, D. e Lindow, S. 2013. Characterization of a diffusible signaling factor (DSF) from *Xylella fastidiosa*. *mBio* 4:e00539 12
- Bi H., Christensen Q. H., Feng Y., Wang H. e Cronan J. E. 2012. The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase homologue having both dehydratase and thioesterase activities. *Mol. Microbiol.* 83:840–855.
- Bové, J. M. e Ayres, A. J. 2007. Etiology of three recent disease of citrus in São Paulo: Sudden Death, Variegated Chlorosis an Huanglongbing. *IUBMB Life* 59: 346-354,.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P. e Lindow, S. 2008. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa* *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:243–271.
- Chatterjee, S., Wistrom, C. e Lindow, S. E. 2008b. A cell– cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *PNAS* 105: 2670–2675.
- Cheng, Z., He Y. W., Lim S. C., Qamra R., Walsh M. A., Zhang L. H. e Song H. 2010. Structural Basis of the Sensor-Synthase Interaction in Autoinduction of the Quorum Sensing Signal DSF Biosynthesis. *Structure* 18: 1199–1209.
- Dandekar, A. M., Gouran, H., Ibáñez, A. M., Uratsu, S. L., Agüero, C. B., McFarland, S., Borhani, Y., Feldstein, P. A., Bruening, G., Nascimento, R., Goulart, L. R., Pardington, P. E., Chaudhary, A., Norvell, M., Civerolo, E., e Gupta, G. 2012. An engineered innate immune defense protects grapevines from Pierce disease *PNAS* vol. 109: 10, 3721–3725.
- De Souza A. A., Ionescu M., Baccari C., da Silva A. M. e Lindow S. E. 2013. Phenotype Overlap in *Xylella fastidiosa* Is Controlled by the Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Eal in Response to Antibiotic Exposure and Diffusible Signal Factor-Mediated Cell-Cell Signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3444-3454.
- Domínguez A, Cervera M, Pérez RM, Romero J, Fagoaga C, Cubero J, *et al.* 2004. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol Breeding* 14:171-183.
- González, J. E. e Keshavan, N. D. 2006. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:859–875.

Guo, Y., Zhang, Y., Li, J. L., e Wang, N. 2012. DSF-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:165-179.

He, Y. W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y. J., Wen, C. M., Wang, L. H., Liu, Z. D., Zhang, H. B., Dong, Y. H., Dow, J. M., e Zhang, L. H. 2006. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Identification of novel cell-cell communication- dependent genes and functions. *Mol. Microbiol.* 59:610-622.

He Y. W, Wu J., Cha J. S. e Zhang L. H. 2010. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiol.* 10:187.

He Y. W., Wang C., Zhou L., Song H., Dow J. M. e Zhang L. H. 2006. Dual Signaling Functions of the Hybrid Sensor Kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* Involve Either Phosphorelay or Receiver Domain-Protein Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 33414–33421.

Ionescu M, Baccari C, Da Silva AM, Garcia A, Yokota K, Lindow SE. 2013. Diffusible signal factor (DSF) synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multifunction protein also required for response to DSF. *J Bacteriol.* 195:5273-5284.

Kaplan, H. B. e Greenberg, E. P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163: 1210–1214.

Leung, W. e Bassler, B. L. 2009. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu. Rev. Genet.* 43:197–222.

Lindow, S., Newman, K., Chatterjee, S., Baccari, C., Lavarone, A. T. e Ionescu, M. 2014. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce’s disease. *MPMI* 27: 244–254.

Muranaka, L. S., Giorgiano, T. E., Takita, M. A., Forim, M. R., Silva, L. F. C., Coletta-Filho H. D., Machado, M. A. e de Souza, A. A. 2013. N-Acetylcysteine in Agriculture, a Novel Use for an Old Molecule: Focus on Controlling the Plant–Pathogen *Xylella fastidiosa*. *PLOS ONE* 8: 1-14.

Newman K. L, Almeida R. P. P., Purcell A. H. e Lindow S. E. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1737–42.

Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch F. e Moghazeh S. 1995. The agr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 248: 446–458.

Pereira, W. E. L., Coletta-Filho, H. D. e De Souza, A. A. *Xylella fastidiosa* colonization in *Nicotiana tabacum*, symptom evolution and diagrammatic scale. *Plant Disease*. Manuscript ID: PDIS-03-14-0321-RE.

Ryan R. P., *et al.* 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:6712– 6717.

Seed, P. C., Passador, L. e Iglewski, B. H. 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas autoinducer* PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 177: 654–659.

Simionato, A. V. C., da Silva, D. S., Lambais, M. R. e Carrilho, E. 2007. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. *J. Mass Spectrom.* 42:1375–1381.

Simpson A. J. G., Reinach F. C., Abreu F. A., Acencio M., Alvarenga R., *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151–59.

Taga, M. E., e B. L. Bassler. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14549–14554.

Wang L. H., He Y., Gao Y., Wu J. E., Dong Y. H., *et al.* 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51:903–12.

Wang N., Li J. e Lindow S. E. 2012. RpfF-Dependent Regulon of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology* Vol. 102:11, 1045 – 1053.

Capítulo 3: Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in citrus disrupts signalling in *Xanthomonas citri* subsp *citri* and thereby its virulence

1. Hipótese

O gene *rpfF*, envolvido na síntese de DSF, uma molécula capaz de realizar a comunicação entre as células de *X. fastidiosa* em biofilme, quando superexpresso em *Citrus sinensis* pode interferir na patogenicidade de *Xanthomonas citri*, visto que essa molécula de sinalização também regula diferentes características da patogenicidade dessa bactéria.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desafiar as plantas de *Citrus sinensis* (variedade Pineapple) e *Carrizo citrange* superexpressando o gene *rpfF* de *X. fastidiosa* com *Xanthomonas citri* e avaliar o desenvolvimento dos sintomas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a sintomatologia desenvolvida por *X. citri* em plantas superexpressando *rpfF* de *X. fastidiosa*.
- Analisar a área da lesão causada pelo desenvolvimento de *X. citri* através de microscopia de varredura e microscopia confocal.
- Avaliar a expressão de genes modulados por DSF de *X. citri* em bactérias isoladas da área da lesão nas plantas transgênicas e tipo selvagem.

- Avaliar o crescimento da população em diferentes tempos após a inoculação através do isolamento da bactéria na área e fora da área de lesão.

- Avaliar o efeito da seiva de plantas transgênicas na ativação do promotor *engA::GFP* responsivo a DSF em *Xanthomonas campestris* biosensora.

- Avaliar o efeito da seiva de plantas transgênicas na ativação do promotor do *hxA::PhoA* responsivo a DSF em *X. fastidiosa* biosensoras.

Esse trabalho foi aceito para publicação na revista *Molecular Plant-Microbe Interactions*
– ID: MPMI-03-14-0090-R.R1.

Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in citrus disrupts signalling in *Xanthomonas citri* subsp *citri* and thereby its virulence

Caserta, R.^{1,2}; Picchi, S. C. ¹; Takita, M. A.¹; Tomaz, J. P.³; Pereira, W.E.L.^{1,2};Machado, M. A. ¹; Ionescu, M.⁴; Lindow, S.⁴; De Souza, A. A.¹

1. Centro de Citricultura Sylvio Moreira /Instituto Agronomico de Campinas, Cordeiropolis, 13490000, Sao Paulo, Brazil; 2. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 13083-970, Sao Paulo, Brazil; 3. Instituto Agronomico do Parana – IAPAR, Londrina, 86047-902, Parana, Brazil; 4. Department of Plant and Microbial Biology University of California, Berkeley, 94720, California, USA.

Correspondent author:

Alessandra Alves de Souza

alessandra@centrodecitricultura.br

ABSTRACT

Xylella fastidiosa and *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, that cause citrus variegated chlorosis (CVC) and citrus canker diseases, respectively, utilize Diffusible Signal Factor (DSF) for quorum sensing. DSFs, produced by RpfF, are similar fatty acids in both organisms although a different set of genes is regulated by DSF in each species. Because of this similarity, *X. fastidiosa* DSF might be recognized and affect the biology of *X. citri*. Therefore transgenic *Citrus sinensis* and *Carrizo citrange* plants over-expressing the *X. fastidiosa* *rpfF* were inoculated with *X. citri* and changes in symptoms of citrus canker were observed. *X. citri* biofilms formed only at wound sites on transgenic leaves and were thicker but bacteria were unable to break through the tissue and form pustules elsewhere. While abundant growth of *X. citri* occurred at wound sites on inoculated transgenic leaves, little growth was observed on unwounded tissue. Genes in the DFS-responsive core in *X. citri* were down-regulated in bacteria isolated from transgenic leaves. DSF-dependent expression of *engA* was suppressed in cells exposed to xylem sap from transgenic plants. Altered symptom development thus appears to be due to reduced expression of virulence genes because of the presence of antagonists of DSF signaling in *X. citri* in *rpfF*-expressing plants.

INTRODUCTION

Intercellular communication mediated by diffusible signals is a well-known feature among bacteria and its use to control cell density-dependent gene expression is often called quorum sensing (QS). Such signaling enables modulation of transcription in an environmental-context manner (Kaplan and Greenberg 1985). Both synthases and sensors of such signals are encoded by specific clusters of genes (Novick *et al.* 1995; Seed *et al.* 1995). Various bacteria synthesize different signal molecules, including acyl homoserine lactones (AHL), cyclic dipeptides, bradyoxetin, and unsaturated fatty acids known as diffusible signal factors (DSF) (Gonzales and Keshavan 2006). Irrespective of the organism, signaling depends on perception of molecular signals, which increase in local concentration along with cell numbers, by a sensory protein. Upon binding, a cascade of phosphorylation is triggered and expression of a variety of downstream genes is differentially modulated. While cognate signal molecules that bind to sensory proteins lead to appropriate changes in gene expression, heterologous molecules similar in structure can also interact with such receptors leading to suppression of downstream signaling. Examples of such antagonistic molecules produced either by bacteria or eukaryotes capable of blocking QS systems have been described (Gonzalez, J. E. and Keshavan, N. D. 2006). For example the furanone produced by the red alga *Delisea pulchra* mimics the acyl AHL produced by the bacterium *Serratia liquefaciens* and thus interferes with its QS behavior due to its unstable binding to LuxR homologs and rapid disruption of QS-mediated gene regulation (Manefield *et al.* 2002). The interference in QS regulation by furanones was also shown for other bacteria resulting in a reduction in biofilm formation and swarming motility in *Escherichia coli* and luminescence in *Vibrio Harvey* (Ren *et al.* 2001). In *Xanthomonas* species as well as in *Xylella fastidiosa*, the cluster involved in production and perception of QS signals is called *rpf*, for regulation of pathogenicity factors. While this system differs somewhat between these species there are many similarities in the structure of the signal molecules and the means by which they are perceived. Three of the genes that comprise this system, *rpfF*, *rpfC* and *rpfG*, are present in both taxa. In both bacteria *rpfF* encodes a DSF synthase, *rpfC* encodes a sensor protein that, when activated by DSF binding, activates the regulatory protein RpfG which in turn, modulates intracellular levels of cyclic di-GMP due to its phosphodiesterase activity (de Souza *et al.* 2013). While RpfF is involved in both production and sensing DSF in *X. fastidiosa* (Ionescu *et al.* 2013), sensing of DSF does not depend on RpfF in *Xanthomonas*. The accumulation of DSF

modulates the expression of different sets of genes in *X. fastidiosa* and *Xanthomonas*. DSF increases the production of cell surface adhesins and suppresses the expression of extracellular enzymes, and thus tends to reduce the virulence of *X. fastidiosa* because these more adherent cells exhibit less movement along and between grapevine xylem vessels. Interestingly, these cells were easily acquired by insect vectors (Chatterjee *et al.* 2008a). In contrast, a variety of virulence genes and motility are up-regulated in the presence of DSF in *Xanthomonas* (Chatterjee *et al.* 2008b; Dow *et al.* 2003; Guo *et al.* 2012). Disruption of DSF signaling in *Xanthomonas citri* pv. *citri* revealed a core of virulence genes associated with movement, endoglucanases, and type III secretion system that are up-regulated by DSF. Blockage of DSF production also reduced attachment to leaves as well as disease symptoms (Guo *et al.* 2012). The DSF molecules produced by *X. fastidiosa* and *Xanthomonas* species are similar, but apparently different. *X. fastidiosa* Temecula strain, causal agent of Pierce disease, produces 2(Z)-tetradecenoic acid, while 12-methyltetradecenoic acid was isolated from a *X. fastidiosa* strain that causes citrus variegated chlorosis (CVC). In contrast, various *Xanthomonas* strains produce 2(Z)-11-methyldodecenoic acid, (2Z,5Z)-11-methyldodecadienoic acid and 2(Z)-dodecenoic acid (Wang *et al.* 2004; He *et al.* 2010; Beaulieu *et al.* 2013; Simionato *et al.* 2007). Perhaps not surprising, a given taxa appears to be maximally responsive to the dominant DSF that they produce. For example, *X. fastidiosa* was responsive to much lower concentrations of 2(Z)-tetradecenoic acid than was *X. campestris* pv. *campestris* (Beaulieu *et al.* 2013). Circumstantial evidence also suggests that the DSF synthase RpfF may be rather promiscuous, with the DSF species produced dependent on the host cell into which it is introduced. For example, when introduced into grape the RpfF conferred the production not only of 2(Z)- tetradecenoic acid, but also 2(Z)-11-methyldodecenoic acid, and 2-Z hexadecenoic acid, two compounds that were not previously found in cultures of *X. fastidiosa* (Lindow *et al.* 2014). Apparently sufficient quantities of DSF species to which *X. fastidiosa* was responsive were produced in these transgenic grapes to alter the behavior of this pathogen, since its movement through the plant and hence its virulence was greatly reduced in the *rpfF*-transformed plants compared to wild type (Lindow *et al.* 2014). Given that CVC strains of *X. fastidiosa* produce DSF species, although perhaps different from those produced by other *X. fastidiosa* and *Xanthomonas* species, we introduced the *rpfF* from a CVC strain of *X. fastidiosa* into citrus genotypes to address whether a process of pathogen confusion might lead to reduced susceptibility to other bacterial diseases of

citrus. However, given that *X. citri* modulates its expression expressing *X. fastidiosa rpfF* might also exhibit altered susceptibility to citrus canker disease, depending on which DSF species would be made in this heterologous host. If the DSF species produced in citrus activated the RpfC-mediated quorum sensing system in *X. citri* it might be expected that the trees would exhibit higher susceptibility to this pathogen. In contrast, heterologous DSF species produced in such transgenic trees might antagonize the native DSF-mediated gene expression system in *X. citri*, resulting in reduced disease susceptibility. In this study we show that these transgenic lines exhibited greatly reduced susceptibility to citrus canker disease, apparently by the suppression of virulence traits in *X. citri*, presumably by interfering with its intrinsic cell-cell communication process.

RESULTS

Transformed citrus plants highly express *rpfF*

The *rpfF* gene from *X. fastidiosa* was successfully introduced into different citrus genotypes by *A. tumefaciens* using the vector pCambia2301. Five Carrizo citrange (*Citrus sinensis* L. Osb x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) and seven Pineapple sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb) transformants were obtained and confirmed by PCR (data not shown). The expression of *rpfF* was determined by quantitative RT-PCR and high levels were observed for two Carrizo citrange and two Pineapple sweet orange plants (Fig. 1). Ten buds from each of these plants were used for grafting onto Rangpur lime plants to enable subsequent studies. GUS assays were performed on the leaves of propagated plants to identify the presence of chimeras; while no chimeric Carrizo citrange plants were obtained, some Pineapple sweet orange plants were chimeric (data not shown) and therefore only GUS positive leaves from non-chimeric plants were used. Plants were also screened for their susceptibility to symptom development conferred by *X. citri* after leaf infiltration. Surprisingly, many such plants exhibited greatly reduced disease susceptibility, and those budded plants with a lower susceptibility were the source of material for subsequent studies; those derived from Carrizo citrange will hereafter be referred to as Ca_*rpfF*-1 and Ca_*rpfF*-2 while those from Pineapple sweet orange will be referred to as Pi_*rpfF*.

Pattern of symptom development differs in *rpfF*-expressing citrus leaves

As the severity of citrus canker in leaves of the *rpfF*-expressing citrus cultivars was noticeably different than that in wild type plants, more detailed measurements of pathogen growth and symptom development in these plants were made to better understand the apparent differences in susceptibility of these lines. Canker symptoms were evaluated in leaves seven and fourteen days after a GFP-marked strain of *X. citri* was infiltrated into leaves. Large differences in the appearance of lesions on *rpfF* expressing plants were observed compared to that on wild type plants. The appearance of lesions formed in leaves of *rpfF*-expressing plants after infiltration differed from the typical symptoms of citrus canker (Brunings and Gabriel 2003). While lesions with eruptant pustules, some of which having water soaked fringes, were apparent on WT leaves by seven days after inoculation, the lesions on the leaves of transgenic plants were smaller and none had any associated water soaking. Those few lesions that had developed on transgenic leaves appeared “dry” and were smaller (Fig. 2A and 2B) and no hyperplasia of leaf tissue was seen within 7 days. Given that relatively low concentrations of cells were infiltrated into the leaves (ca. 500 cells/site) it was noteworthy that discreet sites of GFP fluorescence, apparently associated with localized multiplication of cells of the *X. citri* strain within tissues was apparent seven days after inoculation in both wild type and transgenic leaves. Importantly, while large numbers of punctate sites of GFP fluorescence were observed in wild type plants throughout the region which had been infiltrated with bacterial inoculum, a single large site of GFP fluorescence, coincident with the injured point of inoculation into a given leaf was observed on *rpfF*-expressing plants (Fig. 3). Since the number of discrete sites of GFP fluorescence in wild type leaves was similar to the number of cells that had been infiltrated into the tissue, we presume that these represent microcolony development within the tissue of wild type leaves. The absence of corresponding sites of GFP fluorescence in the transgenic leaves suggested that *X. citri* exhibited much less multiplication in these plants. The differences in the number and appearance of lesions in wild type and transgenic plants were even more striking by 14 days after infiltration. Lesions in WT leaves exhibited dramatic tissue hypertrophy with large pustules and abundant associated water soaking with occasional abscission of the petiole; such characteristics were not observed in transgenic leaves (Fig. 2A and 2B). Intact, non-detached leaves on greenhouse-grown *RpfF* expressing plants exhibited the same difference in disease symptoms observed in detached leaves (data not shown). Given that no punctate fluorescent microcolonies

were observed away from the point of inoculation in transgenic leaves, suggesting a lack of growth of the marked strains of *X. citri*, we directly assessed the population size of this strain at various times in such undamaged tissues. While modest increases (<8- fold) in population size of *X. citri* were observed in wild type Pineapple sweet orange plants as well as in transgenic Pineapple sweet orange and Carrizo citrange plants by seven days after inoculation, large increases in population size (> 50-fold) were observed in wild type Carrizo citrange plants (Fig. 4). Importantly, by 14 days after inoculation the population sizes of *X. citri* in WT Carrizo citrange and Pineapple sweet orange plants were from 200- to 2000-fold higher than in the transgenic *rpfF*-expressing plants; the population size of *X. citri* in the transgenic plants were similar to or lower than that at the time of inoculation in these damaged tissues. Likewise, when infiltrated into intact leaves on RpfF-expressing plants in the greenhouse the population dynamics of *X. citri* was similar to that observed in detached leaves; at 14 days the population sizes of *X. citri* in WT Carrizo citrange in undamaged, infiltrated tissues were approximately 100-fold higher than in the transgenic plant. In fact, no bacterial growth was observed at 14 days after inoculation of transgenic Pineapple sweet orange (data not shown).

Microscopy analyses reveal altered *X. citri* biofilm behavior and absence of leaf tissue

damage on transgenic leaves

As the lesions formed on transgenic leaves differed from WT plants, confocal scanning microscopy were used to better analyze the differences in multiplication of *X. citri* in these lesions. As noted above, in WT plants lesions formed at the damaged site of inoculation were somewhat larger than more peripheral lesions. In contrast, lesions were formed only at the damaged site of inoculation in the transgenic plants. The differences in the size and appearance of the lesions were quite apparent when visualized by scanning electron microscopy (Fig. 5). Cells of *X. citri* inoculated into leaves of transgenic plants were not able to break through leaf tissues to emerge onto leaf surfaces, apparently because they exhibited relatively little growth except at sites of wounding of the leaf. To further explore the process of growth within tissues we examined the spatial pattern of GFP fluorescent cells in erumpant lesions at this point of inoculation (Fig. 6A and 6B). Whereas cells of *X. citri* formed layers with a relatively uniform

thickness in lesions on wild type plants, the layer of cells in lesions on the transgenic leaves was much thicker, but more spatially restricted to the discrete lesions formed on these plants (Fig. 6). Thus, while a much larger area of leaves of wild type plants harbored biofilms of the pathogen, it was restricted to only the point of inoculation on transgenic leaves, but formed a much thicker biofilm at that site. These differences in biofilm formation on WT and transgenic leaves observed at 7 days were even more accentuated when visualized at 14 days after inoculation. By this later time most lesions on transgenic leaves could not be visualized because the thick biofilms that had formed interfered with the microscopy process. It remained apparent however that few cells were present adjacent to these sites of lesion formation in unwounded sites on the leaf (Fig. 5). The results of the fluorescence microscopy of the leaf regions into which a GFP-marked strain of *X. citri* was injected, suggested that growth of this pathogen occurred throughout the inoculated region in wild type plants but was restricted to damaged sites in *rpfF*-expressing plants. Such visualization was unable to document differences in growth of the pathogen at those sites in which it apparently could multiply in these plants. We therefore quantified *X. citri* population sizes in excised disks of leaf tissue, including the region damaged during the infiltration process at which the most prominent lesions subsequently occurred in all plants. Curiously, despite the obvious differences in the types of lesions which had formed, similar numbers of *X. citri* cells were recovered at a given sampling time after inoculation from the wild type and *rpfF*-expressing plants (Fig. 7), what was similarly observed for whole plant leaves (data not shown). It thus appears that while limited to sites of mechanical injury, *X. citri* could exhibit similar rates of growth in transgenic plants as in wild type plants at such wound sites. The larger number of sites where lesions that formed in the wild type plants might have reduced the growth of *X. citri* within a given lesion, but in aggregate, similar overall amounts of bacterial multiplication occurred within a given tissue sample. These results suggest that factors present in the damaged tissues overcame the limitations of *X. citri* to grow in *rpfF*-expressing leaves. Such factors apparently do not occur in regions away of the inoculation site where the bacterial populations in transgenic plants were significantly lower than in wild type plants (Fig. 4).

Down-regulation of genes positively modulated by DSF in *X. citri*

As we expected that the *rpfF*-expressing citrus plants would produce a variety of DSF species similar to that observed in *rpfF*-expressing grape (Lindow *et al.* 2014), and since *X. citri* was observed to have altered behavior in the transgenic citrus, we speculated that the DSF species produced by these plants were affecting cell-cell signaling in the pathogen. We thus assessed transcript abundance of a variety of genes whose transcription was previously shown to be dependent on DSF in *X. citri* (Guo *et al.* 2012) by quantitative RT-PCR. In addition, transcripts of other genes contributing to symptoms of canker disease such as the type III secretion system (T3SS) that are also regulated by *rpfG* (Swarup *et al.* 1992; Gabriel 1999; Guo *et al.* 2012) were assessed. Surprisingly, most of the genes that were known to be up regulated in the presence of DSF exhibited lower levels of expression in the *rpfF*-expressing citrus lines compared to the wild type plant (Fig. 8). For example, genes involved in cell motility such as those conferring flagellar production and function (*fliC* and *fliK*) and type IV pili (*pilM*) were down regulated in bacteria isolated from leaves of the transgenic plants compared to the wild type plant (Fig. 8). Likewise, the transcripts of *eng*, encoding an endoglucanase were also lower in abundance in cells of *X. citri* recovered from leaves of transgenic plants compared to that of the wild type plant (Fig. 8). These results were more evident on both Carrizo citrange transgenic plants sampled 14 days after inoculation (Fig. 8A and 8B) but it was apparent in the transgenic Pineapple sweet orange cultivar when assessed both at 7 and 14 days after inoculation (Fig. 8C). At most sample times, the abundance of transcripts of *gumB* were lower in abundance in transgenic Carrizo citrange and Pineapple sweet orange plants than in the corresponding wild type plants. Given that watersoaking lesions were not observed during infection of the transgenic plants by *X. citri*, it is noteworthy that most of the genes involved in T3SS that contribute to such symptoms and which are regulated by *rpfG* (Guo *et al.* 2012) were down regulated in the transgenic plants compared to the wild type plant. In our work we investigated the modulation of *hrpbXCt*, *hrpB2* and *pthA*. While *hrpbXCt*, a regulator of T3SS, was not modulated in Ca_*rpfF*-1 at 7 and 14 days after inoculation (Fig. 8A), in Ca_*rpfF*-2 it was significantly repressed at both time points (Fig. 8B). *hrpB2* did not show significant change in expression in either Carrizo citrange transformant at 7 days after inoculation but it was repressed in Ca_*rpfF*-2 at 14 days after inoculation (Fig. 8A and 8B). However *pthA*, a virulence determinant, was negatively modulated in both transgenic Carrizo citrange plants at 14 days after inoculation (Fig. 8A and 8B). In Pineapple sweet orange

transgenic plants, on the other hand, down-regulation of all genes related to T3SS was observed both at 7 and 14 days after inoculation (Fig. 8C). It seems likely that the repression of this suite of virulence genes in *X. citri* in the *rpfF*-expressing citrus cultivars is linked to their apparent reduced susceptibility to infection by this pathogen. While the expression of only a subset of the genes in *X. citri* was assessed in these transgenic plants, it is noteworthy that all those genes examined, whose expression is lower in *X. citri* when *rpfF*, *rpfC*, and *rpfG* are disrupted, also exhibited lower apparent expression in *rpfF*-expressing transgenic plants (Table 1), suggesting that one or more factors present in these plants interfered with DSF-mediated QS and hence with the virulence of this pathogen. Given that the process of DSF signaling, and the fatty acids serving as DSF species appear to differ between *X. campestris* and *X. fastidiosa* (Beaulieu *et al.* 2013) and hence by association with *X. citri*, it appeared unlikely that the DSF species produced in the transgenic plants harboring the *rpfF* from *X. fastidiosa* would prove to be inducers of gene expression in *X. citri*. Instead, the suppression of DSF dependent genes in *X. citri* suggested that an antagonist of DSF signaling might be present in the transgenic plants. To test this conjecture the *X. campestris pv. campestris*-based DSF biosensor (Beaulieu *et al.* 2013) was used to assess the biological activity of xylem sap extracts from the transgenic citrus. Indeed, no evidence for inducers of gene expression was observed in such extracts. However, strong evidence was obtained that the signaling that would otherwise have been conferred by 2(*Z*)-11-methyldodecanoic acid was suppressed in the presence of molecules present in the sap of the transgenic citrus, but not in the sap of wild type plants (Fig. 9). In contrast, there was a significant induction of PhoA activity in a *X. fastidiosa*-based DSF biosensor (Beaulieu *et al.* 2013) exposed to the sap from the transgenic plants (Fig. 10), indicating that the DSF from transgenic plants is antagonistic to quorum sensing in *X. citri* but stimulates quorum sensing in *X. fastidiosa*.

DISCUSSION

The ectopic expression of *rpfF* from *X. fastidiosa* in citrus genotypes in an effort to reduce their susceptibility to citrus variegated chlorosis inadvertently and unexpectedly decreased their susceptibility to citrus canker disease caused by *X. citri*. As the main effect of the expression of *rpfF* in the plant would be to alter the pattern of unsaturated fatty acid production, we presume

that the altered pathogen behavior in the transgenic plants was due to a disruption of their DSF-mediated patterns of gene expression. While the various DSF-like molecules present in these transgenic plants are not yet fully elucidated, evidence was obtained that at least one may antagonize the normal DSF-dependent signaling process in *X. citri*. Although the process of DSF-dependent quorum sensing in *X. citri* has not been as thoroughly investigated as in other *Xanthomonas* species such as *X. campestris*, we presume that it shares considerable similarity to that of *X. campestris*, and likely differs substantially from that of *X. fastidiosa*. Thus, we might expect that gene expression in *X. citri* is most responsive to signal molecules such as 2(Z)-11-methyldodecenoic acid (DSF) and 2(Z)-dodecenoic acid (BDSF) as are *X. campestris* strains (Ryan and Dow 2011; He *et al.* 2010), while being relatively unresponsive to molecules such as 2(Z)-tetradecenoic acid (XfDSF) to which *X. fastidiosa* is preferentially responsive (Beaulieu *et al.* 2013). Indeed, we found no evidence of induction of the DSF-dependent *eng* gene in *X. campestris* by extracts of xylem sap from transgenic plants but did find evidence of the suppression of the induction of *eng* by such extracts in the presence of DSF itself (Fig. 9). The nature of the compound(s) responsible for such antagonism remains unknown, but it seems most likely that they are also fatty acids. Some evidence for such a phenomenon has also been observed in the DSF signaling system of grape strains of *X. fastidiosa*, where certain trans-unsaturated fatty acids were found to block induction otherwise conferred by XfDSF (Ionescu *et al.* submitted). The reduced susceptibility of the *rpfF*-expressing citrus plants may in part be due to reduced motility of *X. citri* in and on plants. Among the genes whose expression was reduced the most in cells of the pathogen recovered from the transgenic plants compared to the wild type plants were those involved in motility, including genes encoding the flagella itself and others involved in flagellar function (Table 1). While it was not possible to directly assess cell motility within the plant, such strong repression of these genes would imply that the cells would have exhibited greatly reduced motility. The role of motility in the pathogenesis of plants by bacteria is not well understood. Studies of *Pseudomonas syringae* reveal that non-motile mutants are still virulent to plants and symptom development remains similar to that of the wild type strain in various hosts when they are infiltrated into tissues (Panopoulos and Schroth 1974). In contrast, the incidence of infection of plants when such non-motile mutants are topically applied to leaves is greatly reduced (Panopoulos and Schroth 1974). Additionally, *gumB* is also down regulated and since this gene is important for the sliding movement (Malamud *et al.*, 2011; Malamud *et al.*,

2013), the thicker biofilm observed on transgenic plants could be in part due to the absence of this sliding ability. The apparent virulence of *X. citri* cells within the apoplast of *rpfF*-expressing plants also seemed to be much lower than that of wild type plants. Apparently relatively little spreading of *X. citri* cells occur after infiltration into leaves, as the multiplication of GFP-marked strains of this pathogen after infiltration of leaves, resulted in apparently discrete microcolonies after introduction of relatively low numbers of cells in wild type plants (Fig. 3). We presume that such microcolonies originated from individual cells originally deposited within the intercellular spaces. As equal numbers of cells were also introduced into the transgenic plants, the lack of apparent microcolonies development was taken as evidence of their lack of substantial multiplication in these hosts. This was confirmed by the finding of reduced population of *X. citri* in areas of infiltrated leaves of *RpfF*-expressing plants away from the damage point of inoculation where lesions invariably formed in WT plants (Fig. 4). Apparently, the suppression of a variety of virulence traits such as those in the T3SS were sufficiently suppressed in these transgenic plants that little growth of the pathogen was possible. This is further substantiated by the lack of apparent watersoaking in areas infiltrated with cells of *X. citri* in the *rpfF*-expressing plants. Other studies have suggested that watersoaking contributes to the growth of plant pathogenic bacteria in plant tissues, presumably by aiding the liberation and mobility of nutrients from plant cells (Popham *et al.* 1993; Brunings and Gabriel 2003). It was very curious that the apparent suppression of virulence of *X. citri* in the *rpfF*-expressing citrus plants was abolished in the area around the point of inoculation. The infiltration of leaf tissues with a needle invariably leads to a small region of damage where the needle contacts the leaf, although apparently no damage is conferred elsewhere to the leaf by the introduction of fluids containing bacterial cells which then spread in the intercellular spaces away from this site of introduction. It was noteworthy that while erumpant pustules formed throughout the region infiltrated with cells of *X. citri* in the wild type plants, such pustules formed only at sites of damage in the *rpfF*-expressing plants (Fig. 2 and 3). In fact, such lesions were apparently coincident with that damage tissue in such plants. We speculate that this damage in some way abrogated the need for expression of various virulence factors by *X. citri*. Thus, those cells in which such virulence factors were suppressed in the transgenic plants presumably would have been able to incite disease symptoms at such sites, but only at such sites. Apparently the likelihood of disease initiation in the absence of such a localized damage would have been greatly reduced elsewhere on the plant, as

evidenced by the reduced number of lesions away from the damaged point of inoculation. It is possible that damage locally triggered an induction of Jasmonic acid (JA), a well-known regulator of plant responses to such stresses (Dennes *et al.* 2011). Given that antagonistic relationships between JA-mediated signaling and salicylic acid-mediated signaling are known to be common in plants (Niki *et al.* 1998), it is possible that the mechanical damage of inoculation reduced host defenses that normally require the function of virulence genes such as *hrp* to suppress such defense reactions. In such a setting, *X. citri* might have been able to elicit disease symptoms despite the suppression of the T3SS which occurred in the *rpfF*-expressing plants. It was clear however that *X. citri* was capable of robust growth at such localized sites of damage since its population size at such sites in the transgenic plants were usually as large as that occurring over larger areas of infiltrated tissues of wild type plants, despite the fact that little growth appeared to occur away from such sites of damage (Fig. 7 and 4). The reduced susceptibility of *rpfF*-expressing citrus to *X. citri* observed here appears to be due to altered pathogen behavior that could have influenced the disease process in two different ways. Disease control by so-called “pathogen confusion” has been conferred by either amplification or suppression of cell density-dependent signaling in plant pathogenic bacteria (Beaulieu *et al.* 2013). The production of AHL signal molecules in transgenic tobacco plants increase their resistance to soft rot disease symptoms incited by *Erwinia carotovora* (Mae *et al.* 2001). In such plants this pathogen expressed virulence traits such as extracellular enzymes soon after inoculation, before large population sizes would have developed. As the production of extracellular enzymes needed for the disease symptoms are normally produced only upon the accumulation of the AHL signal as pathogen population increase, it was proposed that the enhanced resistance of these AHL-producing plants was due to an earlier recognition of the virulence factors by the plant, triggering successful defense reactions (Mae *et al.* 2001). Thus, it has been proposed that plants might be made more resistant to pathogens by overcoming their “stealthy” patterns of expression of virulence factors by triggering their production by the omnipresence of signal molecules needed for their production (Mae *et al.* 2001). No evidence for premature induction of such virulence factors in *X. citri* in the *rpfF*-expressing citrus was seen in this study. In fact, such virulence factors appear to be suppressed in the transgenic plants compared to the wild type plant. As such, the process by which the susceptibility of the *rpfF*-expressing citrus was reduced is more likely similar to that conferred by the production of an

AHL acylase in transgenic plants in studies described previously (Dong *et al.* 2001). The destruction of the AHL signal molecule needed for induction of extracellular enzymes of *E. caratorvora* by this enzyme in the transgenic plants apparently prevented the accumulation of sufficient signal molecule to induce virulence factors needed for symptoms development. Given that the virulence of *X. citri* is strongly dependent on DSF-mediated quorum sensing, future strategies of enhanced production of compounds that can antagonize this process appear attractive as a strategy for disease control.

MATERIALS AND METHODS

Construction of *rpfF* vector and *Agrobacterium tumefaciens* transformation

The entire *rpfF* gene was amplified from the *X. fastidiosa* 9a5c strain genome using Taq Platinum (Invitrogen) with the primer pairs F: 5' AGAGGTACCAATGTCCGCTGTACAT 3' containing a *KpnI* restriction site, and R: 5' AGCGGATCCTGCTCAGTTTTTTAGTG 3' containing a *BamHI* restriction site. The expected size of the amplicon was 900bp. After isolation of the fragment from a 1% agarose gel it was purified using a GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences) and cloned into pGEM-T Easy (Promega). This plasmid was transformed into *E. coli* DH5 α competent cells and transformants were selected in LB medium containing 100 μ g/mL of ampicillin. Plasmids were isolated from *E. coli* cells using an InvisorbR Spin Plasmid Mini Two kit (Invitek), sequenced following manufacturer instructions using a BigDye Terminator cycle sequencing Ready Reaction DNA sequencing kit (v 3.0) and the resulting products were separated on an ABI 3730 automatic sequencer (Applied Biosystems). The quality of the cloned DNA fragment was confirmed by comparison with the *X. fastidiosa* database using BlastN and BlastX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). Plasmid containing sequences that exhibited 100% identity with the expected nucleotide sequences were cleaved with *KpnI* and *BamHI* (Invitrogen) for directional cloning into pRT101 harboring a CamMV 35S promoter and a 3' poly A region. The presence of the target gene was confirmed by PCR using specific primers for *rpfF* as well as the entire cassette; the 35S forward primer was 35S F: 5' ACACTCTCGTCTACTCCAAG 3' and the reverse primer was R. Plasmids were then sequenced to confirm the correct orientation of the

target gene. The resultant cassette was digested with *Hind*III and cloned into pCambia 2301 at the polylinker, maintaining the GUS reporter gene to yield *rpfFpCambia2301*. *A. tumefaciens* strain EAH105 was transformed with *rpfFpCambia2301* by a heat shock method and cells were selected on YEP medium (An, *et al.* 1988) containing kanamycin and rifampicin (50 μ g/ml each). Transformants were tested by PCR using primers designed for *rpfF*. A positive colony was grown in 10 ml of YEP containing kanamycin and rifampicin for 16 hours. A 3 ml aliquot was then added to 50 ml of liquid YEP and grown until an OD600 = 0.4. This culture was centrifuged and OD600 corrected to 1.0 with MS basal medium for inoculation of epicotyl segments.

Citrus transformation

Seeds of Pineapple sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) were germinated in half strength MS basal medium (Murashige and Skoog 1962), supplemented with 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose and solidified with 7g/L agar (PhytoTechnology Laboratories, USA) and used as an explant source. Dark green epicotyls were harvested and cut into 1cm long segments to expose the cambial ring. These segments were incubated in liquid MS basal medium supplemented with 100 mg/L of IAA (indole acetic acid) before emersion in suspensions of *A. tumefaciens* (*rpfFpCambia2301*) for 5 min, and dried on sterile paper towels. Dried explants were then placed on solid MT co-cultivation medium (MS salts, 1 g/L Tiamine, 5 g/L Piridoxine, 5 g/L Nicotinic acid, 20 g/L Glycine, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose, 1 mg/L benzylaminopurine (BAP) and 6.0 g/L agar) in the dark at 24⁰C for 3 days before being transferred to MT selection medium (MT co-cultivation with 100mg/L kanamycin and 500 mg/L cefotaxim). Explants in MT selection medium were cultured in the dark at 28⁰C until development of shoots. MT plates were then incubated in the light [16 h light/8 h dark cycle using cool white fluorescent light (75 l mol s⁻¹ m⁻²)] until shoots were well developed. A small piece of each shoot was excised and incubated in 500 μ L of phosphate buffer containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-gluc) for 16 hours at 37⁰C to test β - Glucuronidase (GUS) activity. Samples were then suspended in 500 μ L of a solution of 1:1 acetic acid:ethanol until they turned white. Shoots that became blue, indicative of GUS activity, were considered positive. Transformed Pineapple sweet orange shoots were micrografted onto Carrizo citrange rootstocks and Carrizo citrange shoots

were grafted onto Sunki rootstocks and maintained in 4mL of solid MT medium until development of roots and leaves. Plants carrying the transgene will be referred to as Ca-*rpfF*, for Carrizo citrange, and Pi-*rpfF* for Pineapple sweet orange. Controls were done by the same method but without the *A. tumefaciens* dipping step.

Analysis of transformed plants

Before transfer to the greenhouse, plants were analyzed by PCR using total DNA as template and using specific primers for *rpfF* to confirm the presence of the target gene. Plants that contained the fragment of the size expected for the *rpfF* gene were subjected to a second PCR analysis using cDNA as template. RNA was extracted from 4 leaves from the top of each elite plant using TRIzol Isolation Reagents (Life Technologies), and treated with RNase-Free DNase (Quiagen). cDNAs from control and transgenic leaves were then reverse transcribed using oligo-dT as described in the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Positive plants after this step were again evaluated for the presence of cDNA corresponding to the target gene by qPCR assay using specific primers for *rpfF* designed using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). Ubiquitin was used as an internal control and two qRT-PCR were performed on each mRNA sample using SYBR-green mix and the universal conditions of amplification provided by the 7500 System (Applied Biosystems). Dissociation curves were analyzed in every amplification mixture; when more than one amplicon was observed, the qRT-PCR conditions were changed to obtain a single dissociation product. The results were analyzed by the 7500 System software (Applied Biosystems) using the relative quantification method. Buds of all plants positive in all three tests were grafted onto lemon rootstocks. GUS assays were performed as described above to detect chimeras; only positive buds were used for further screening for susceptibility to *X. citri*.

***X. citri*_GFP infiltration assays**

Infiltration assays were performed in Carrizo citrange and Pineapple sweet orange wild type (WT) and transgenic leaves using *X. citri* strain 306 harboring a constitutively-expressed GFP

marker gene (referred as *X. citri*_GFP) (kindly provided by Dr. Vojnov - CONICET/Argentina, Rigano *et al.* 2007). *X. citri*_GFP was grown overnight in liquid NBY nutrient medium (0.5% peptone, 0.3% meat extract, 0.2% yeast extract, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% KH₂PO₄), containing 100 µg/ml ampicillin. This inoculum was diluted to an OD₆₀₀= 0.01 in PBS buffer. The culture used to infiltrate detached and whole plant leaves was also plated to determine bacteria population. Three independent experiments were performed in which 100µL of a suspension of 10⁴ CFU/ml was injected at five different points in a given Carrizo citrange leaf and at three different points for a Pineapple sweet orange leaf. Three leaves of similar age were chosen for a given experiment. Symptoms were evaluated 7 and 14 days after infiltration. Microscopic analysis of the lesion was done using an Olympus MVX10 (U-MGFPHQ filter) at a magnification of 16X. Plants were also spray inoculated with a suspension of 10⁶ cells per ml of *X. citri* until leaves were wetted. Symptoms were evaluated 7 and 14 days after inoculation. Lesions were imaged to compare symptomatology at both time points

Confocal scanning laser and scanning electron microscope analysis

Leaves of plants were infected by infiltration with a 10⁴ CFU/mL suspension of GFP-labelled wild type *X. citri*. Lesion development was monitored with a Confocal Laser Scanning Microscope (TCS-SP5 II Leica), using the 488nm Laser and emission filters TD (triple-dichroic 488-543-633) 7 and 14 days after inoculation. Leaf segments of approximately 1cm² that contained the lesion formed at the point of inoculation were cut from the leaves and mounted on the adaxial leaf surface under glass coverslips. The 3D images were obtained by overlaying and aligning several horizontal confocal sections of 1.2 µm. The assay was performed in triplicate. Images were prepared as multichannel and 3D projections using the program LAS-AF, version 2.6.0.7266 to describe the spatial distribution of bacteria within the biofilms as well as differences in biofilm thickness and architecture. All images were done using scaling factor of 1.4. Scanning electron microscopy analyses were done with leaves infiltrated with *X. citri* at 14 days after inoculation. Lesions were excised from WT and transgenic leaves and incubated at room temperature for 2 hours in Karnovsky buffer (2.5% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2), samples were double washed for 5 minutes in the same buffer. For dehydration, samples were incubated 10 minutes in ascending

series of acetone solution (50%, 70%, 90%, 95% and 100%). Dehydration was concluded in Critical Point Dryer Balzers CPD030, fixed on aluminum supports with double-sided carbon tape and coated with gold in "Sputter Coater" Balzers SCD050. The material was examined and photographed in a Scanning Electron Microscope Hitachi TM3000.

Bacterial growth in leaves

To analyze bacterial growth in leaves was assessed by plating serial dilutions of bacteria recovered from leaf discs containing lesions formed at the point of inoculation of leaves, 4, 7, 14 and 21 days after inoculation. A punch was used to excise lesion areas. Discs were homogenized in small tubes containing 1mL of PBS buffer and two glass beads. The suspensions were serially diluted and plated on NBY agar medium containing the appropriate antibiotic. At each time point, samples were determined from three replicate samples and each experiment was done three times. Similar sampling was performed on leaf discs taken at least 6 mm away from the point of inoculation.

***X. citri* gene expression in plants**

Gene expression in *X. citri* was assessed in leaves infiltrated with this pathogen in three independent experiments. All lesions of a given leaf each leaf were collected using a round punch (6 mm of diameter) 7 and 14 days after inoculation. A set of primer pairs targeting genes that had previously been found to positively respond to DSF in *X. citri* (Guo *et al.* 2012) was designed using Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems) (Table 2). Leaf disks taken from a given leaf were put in a mortar and macerated while frozen with liquid nitrogen, and RNA extracted using the specifications for RNeasy Mini Kit (Qiagen). cDNA synthesis was then performed using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). The gene encoding 16S ribosomal RNA was used as an internal control, and two qRT-PCR reactions were performed on each cDNA sample using the SYBR-green mix, using the universal conditions of amplification provided by the 7500 System (Applied Biosystems). Dissociation curves were assessed in every amplification to verify the presence of a single amplicon. The results were

analyzed by the 7500 System software (Applied Biosystems) using the relative quantification mode.

***Xcc*DSF reporter assay**

The methodology was done according to Beaulieu *et al.* (2013). Briefly, cells were recovered from colonies grown in solid medium with 2(Z)-dodecenoic acid (*Xcc*DSF) or sap from WT and Carrizo citrange transgenic plants with or without the *Xcc*DSF. Negative control was biosensor cells grown without sap or DSF. Positive control was biosensor cells incubated with 3 μ M of *Xcc*DSF. The relative DSF abundance was estimated from the cells exhibiting GFP fluorescence from three replicate samples. GFP fluorescence was normalized as relative fluorescence units (RFU)/OD600. RFU was measured using a Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Inc.).

***X. fastidiosa* DSF reporter assay**

Aiming to verify if the sap collected from transgenic plants could trigger the expression of genes regulated by DSF we used a *X. fastidiosa* bioreporter (Beaulieu *et al.*, 2013) in which the *phoA* reporter gene is under control of the DSF-responsive *hxfA* promoter as described by Lindow *et al.* (2014). Inoculum of the *X. fastidiosa* bioreporter strain was grown for 5 to 6 days at 28°C on PWG plates containing gentamicin at 10 μ g/ml. The cells were washed and resuspended in PBS buffer and 15 μ L of the cells were mixed with sap from *Ca_rpfF-1*, *Ca_rpfF-2*, and WT plants and incubated in PWG medium at 28°C for 4 days. The cells were collected with a swab and suspended in 400 μ L of water in wells of a Falcon 48-well tissue culture plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) and centrifuged for 10 min at 2,254 \times g in an Eppendorf model 5804 centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) and water was removed by aspiration. Alkaline phosphatase activity was accessed after 72 h of incubation as described by Lindow *et al.* (2014). Enzyme activity was calculated as the rate of increase of fluorescence with time divided by the cell density.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Francisco de Assis A. Mourao-Filho and Liliane C. L. Stipp from Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” /Universidade de Sao Paulo for assistance in citrus transformation; Luis F. C. da Silva from Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” - IAC for greenhouse plant propagation; and Paulo Henrique Nunes from Universidade Estadual de Sao Paulo-UNESP/Rio Claro for assistance in microscopy analyses . We also thank Elena S. Antonova from University of California, Berkeley, for helping in the biosensor assays. This work was supported by research grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP -2010/50840-7 and 2013/17485-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq - INCT-Citros 08/57909-2, 573848/08-4). R.C. is a fellow Ph.D. from FAPESP (09/50253-7), M.A.T., M.A.M. and A.A.D.S. are recipients of research fellowships from CNPq.

LITERATURE CITED

- An, G., Ebert, P.R., Miltra, A., Ha, S.B. 1988. Binary vectors. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds) Plant molecular biology manual, A3. Kluwer, Dordrecht, pp 1-19.
- Beaulieu, E. D., Ionescu, M., Chatterjee, S., Yokota, K., Trauner, D., Lindow, S. 2013. Characterization of a diffusible signaling factor (DSF) from *Xylella fastidiosa*. mBio 4:e00539-12.
- Brunings, A. M. and Gabriell, D. W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface, Molecular Plant Pathology 4: 141-157.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P. and Lindow, S. 2008a. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa* Annu. Rev. Phytopathol. 46:243-271.

- Chatterjee, S., Wistrom, C. and Lindow, S. E. 2008b. A cell- cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. PNAS 105: 2670-2675.
- Cornelis, G. R. and VanGijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. Annu.Rev. Microbiol. 54: 735-774.
- Da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, 535 R. B., Monteiro- Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., do Amaral A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez- Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis J, Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi. A., Sena, J. A., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C., Kitajima, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417:459-463.
- De Souza A. A., Ionescu M., Baccari C., da Silva A. M., Lindow S. E. 2013. Phenotype Overlap in *Xylella fastidiosa* Is Controlled by the Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Eal in Response to Antibiotic Exposure and Diffusible Signal Factor-Mediated Cell-Cell Signaling. Appl. Environ. Microbiol. 79:3444-3454.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F. & Zhang, L. H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. Nature 411: 813- 817.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X. and Tang, J. L. 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell- cell signaling and is required for full virulence to plants. PNAS 100: 10995-11000.

- Facincani, A. P., Moreira, L. M., Soares, M. R., Ferreira, C. B., Ferreira, R. M., Ferro, M. I. T., Ferro, J. A., Gozzo, F. C., de Oliveira, J. C. F. 2013. Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Funct Integr Genomics*. DOI 10.1007/s10142-013-0340-5.
- Gabriel, D. W. 1999. The *Xanthomonas* avr/pth gene family, p. 39-55. In G. Stacey and N. T. Keen (ed.), *Plant-microbe interactions*, vol. 4. APS Press, St. Paul, MN.
- Gonzalez, J. E. and Keshavan, N. D. 2006. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70:859-875.
- Guo Y., Zhang Y., Li J. L. and Wang N. 2012. Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays Central Role in Coordinating Gene Expression of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *MPMI* 25:165- 179.
- He, Y. W., Wu, J., Cha, J. S., Zhang, L. H. 2010. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC microbiol.* 10:187.
- Ionescu M, Baccari C, Da Silva AM, Garcia A, Yokota K, Lindow SE. 2013. Diffusible signal factor (DSF) synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a multifunction protein also required for response to DSF. *J Bacteriol.* 195:5273-5284.
- Kaplan, H. B., Greenberg, E. P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163: 1210-1214.
- Lindow, S., Newman, K., Chatterjee, S., Baccari, C., Lavarone, A. T., Ionescu, M. 2014. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease. *MPMI* 27: 244-254.

- Mae, A., Montesano, M., Koiv, V. and Palva, E. T. 2001. Transgenic Plants Producing the Bacterial Pheromone *N*-Acyl Homoserine Lactone Exhibit Enhanced Resistance to the Bacterial Phytopathogen *Erwinia carotovora*. MPMI 14:1035-1042.
- Malamud, F., Torres, P. S., Roeschlin, R., Rigano, L. A., Enrique, R., Bonomi, H.R., Castagnaro, A. P., Marano, M. R. and Vojnov, A. A. 2011. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. Microbiology 157: 819-829.
- Malamud, F., Homem, R. A., Conforte, V. P., Yaryura, P. M., Castagnaro, A. P., Marano, M. R., Amaral, A. M., Vojnov, A. A. 2013. Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Microbiology 159:1911-1919.
- Manefield, M., T. B. Rasmussen, M. Henzter, J. B. Andersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. Microbiology 148:1119- 1127.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.
- Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch F., Moghazeh S. 1995. The agr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet 248: 446-458.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N. and Ohashi, Y. 1998. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves Plant Cell Physiol. 39: 500-507.
- Panopoulos, N. J., and Schrost, M.N. 1974. Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves by *Pseudomonas phaseolicola*. Phytopathology 64:1389-1397.

- Ren, D., Sims, J. J., and Wood, T. K. 2001. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* 3:731-736.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P. S., Questa, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A., Marano, M. R. 2007. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. *MPMI* 20: 1222-1230.
- Ryan, R. P., Dow, J. M. 2011. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol* 19: 145-152.
- Simionato, A. V. C., da Silva, D. S., Lambais, M. R. and Carrilho, E. 2007. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. *J. Mass Spectrom.* 42: 1375- 1381.
- Seed, P. C., Passador, L., Iglewski, B. H. 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas autoinducer* PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 177: 654-659.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T. and Gabriel, D.W. 1992 A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 204-213.
- Vojnov, A. A., Zorreguieta, A., Dow, J. M., Daniels, M. J., and Dankert, M. A. 1998. Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* 144:1487-1493.

Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X., Zhang, L. H. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51:903-912.

Fig. 1. Transgene expression in transformed plants. Quantitative expression of *rpfF* in transgenic plants in comparison to WT. *Ca_rpfF-1* and *Ca_rpfF-2* refer to Carrizo citrange transgenic plants and *Pi_rpfF-1* and *Pi_rpfF-2* refer to Pineapple sweet orange transgenic plants.

Fig. 2. Citrus canker symptoms. *X. citri* _GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 7 and 14 days after inoculation (D.A.I.). **A.** Carrizo citrange. **B.** Pineapple sweet orange.

Fig. 3. Microscopy analysis of citrus canker lesions. *X. citri* _GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 7 (**a,b,c,d,e** and **f**) and 14 days (**g,h,i,j,k**, and **l**) after inoculation (D.A.I.) under light (**a,b,c,g,h** and **i**) and fluorescence microscopy (**d,e,f,j,k** and **l**). Panels **A** and **B** represent Carrizo citrange and Pineapple sweet orange plants respectively. Green labeling refers to *X. citri* _GFP.

Fig. 4. Bacterial population analysis from *X. citri* isolated from leaf disks away of lesion area. Serial dilution of isolated bacteria was performed at 7 and 14 days after inoculation for Carrizo citrange and Pineapple sweet orange WT and transgenic plants. Results are means of three repetitions. The bars indicate the standard deviation of the means. The *X. citri* growth observed at 14 days after inoculation in transgenic plants were significantly ($P < 0.05$) less compared with the WT.

Fig. 5. Scanning electron micrographs of canker lesions. *X. citri* _GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 14 days after inoculation. Panels **A** and **B** represent Carrizo citrange and Pineapple sweet orange plants respectively. WT plants are represented in **a**, **b** (**Carrizo citrange**), **g** and **h** (**Pineapple sweet orange**). Black arrows indicate the pustules formed on WT leaves. The biggest injury corresponds to the inoculation point on the leaves. Transgenic *Ca_rpfF-1* is represented in **c** and **d**, *Ca_rpfF-2* in **e** and **f**, and *Pi_rpfF* in **g** and **h**. The magnitudes used were 40x (**a**, **c**, **e**, **g** and **i**) and 80x (**b**, **d**, **f**, **h** and **j**).

Fig. 6. 3D reconstruction of biofilms topography from confocal scanning laser microscopy. *X. citri* _GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 7 and 14 days after inoculation (D.A.I.). Bacterial biofilm layers are represented by different colors and total biofilm is expressed by the color scales where blue and red tones represent the thinnest and thickest respectively. **A.** Biofilms topography on Carrizo citrange WT and transgenic leaves. **B.** Biofilms topography on Pineapple sweet orange WT and transgenic leaves.

Fig. 7. *X. citri* _GFP growth curves in detached leaves. Leaves were infiltrated with 104 718 cells and growth was evaluated at 2, 4, 7, 14 and 21 days after inoculation. **A.** Growth curve of *X. citri* _GFP in Carrizo citrange WT and transgenic plants. **B.** Growth curve of *X. citri* _GFP in Pineapple sweet orange WT and transgenic plant. The standard deviation bar represents the mean of three repetitions. No statistically significant difference was observed.

Fig. 8. Relative quantification of genes responsive to DSF in *X. citri*. Gene expression was evaluated for *Ca_rpfF-1* (**A**), *Ca_rpfF-2* (**B**) and *Pi_rpfF* (**C**) in relation to WT at 7 and 14 days after inoculation (D.A.I.). Results are means of three independent experiments. The bars indicate the standard deviation of the means. (*) indicates significant difference ($P < 0.05$) between the mean values obtained for each gene compared with the WT.

Fig. 9. GFP fluorescence triggered by *Xanthomonas campestris* biosensor cells. Negative control represents untreated cells. Positive control represents cells treated only with *Xcc*DSF. Treatments only with sap without DSF shows no GFP emission from the sensor while treatments with sap plus DSF from transgenic plants significantly decreased the emission of GFP. Results are means of three repetitions. The bars indicate the standard deviation of the means. (*) indicates significant difference ($P < 0.05$) between the mean values obtained for each gene compared with the WT.

Fig. 10. Alkaline phosphatase (AP) activity exhibited by cells of a *X. fastidiosa* DSF 735 biosensor. The sap from WT and transgenic plants were tested for induction of expression of the *phoA* gene under the control of the DSF-induced *hxfA* promoter, by measuring the AP activity. Sap alone (grey bars) or sap to which 3 μ M *Xj*DSF had been added (dark bars) were tested. Negative control (NC) corresponds to AP activity from cells cultured on PWG. The vertical bars

indicate the standard deviation of the means. (*) indicates a significant difference ($P < 0.05$) between the mean values obtained for the transgenic plants compared with the WT.

Table 1. Relative expression of *X. citri* genes responsive to DSF measured

Locus tag	Gene name	<i>rpfC</i>	<i>rpfF</i>	<i>rpfG</i>	<i>Ca_rpfF-1</i> 7 DAI	<i>Ca_rpfF-1</i> 14 DAI	<i>Ca_rpfF-2</i> 7 DAI	<i>Ca_rpfF-2</i> 14 DAI	<i>Pi_rpfF</i> 7 DAI	<i>Pi_rpfF</i> 14 DAI
XAC0612	<i>eng</i>	down	down	down	nr	down	nr	down	down	down
XAC1975	<i>fliC</i>	down	down	down	down	down	down	down	down	down
XAC1949	<i>fliK</i>	down	down	down	down	down	down	down	down	down
XAC2585	<i>gumB</i>	down	down	-	down	nr	down	nr	down	down
XAC0408	<i>hrpB2</i>	down	nr	down	nr	nr	nr	nr	down	down
XAC1266	<i>hrpXct</i>	down	down	nr	nr	nr	down	down	down	down
XACa022	<i>pthA</i>	-	-	-	nr	down	nr	down	down	down
XAC3385	<i>pilM</i>	down	down	nr	down	down	nr	down	down	down
Reference		14, 20, 21	14, 20, 21	14	This work	This work	This work	This work	This work	This work

Down = down regulated; Nr = non responsive; - = no information available

745 DAI = Days after inoculation

Table 2. Gene names and primer sequences used in this work

Gene number	Gene name	Primer sequence 5' - 3'	Size of amplicon
UBIQ CAS-PT- 300961	<i>ubiquitin</i>	F - TTCGTCAGTTGACTAATCCT	100 bp
		R - GTTGCTGTGTTGACTGTG	
	35S	F – ACACTCTCGTCTACTCCAAG	
XF1115	<i>rpfF</i>	F _c - AGAGGTACCAATGTCCGCTGTACAT	900 bp
		R _c - AGCGGATCCTGCTCAGTTTTTTAGTG	
XF1115	<i>rpfF</i>	F _{qPCR} - TCGGCAGCAAATCACTCCGAACTA	100 bp
		R _{qPCR} - CAGCACAGCTTTGAGTGCTCAGTT	
XAC1975	<i>fliC</i>	F - TCAAGCAGCTGACCTCTGAAATC	100 bp
		R - GCGCCGACCTGGAACAG	
XAC1949	<i>fliK</i>	F - GGCTGCGCGAAATGCT	100 bp
		R - TGCCCGCCGAATTCTG	
XCC2454	<i>gumB</i>	F - CATGGTCAACGGGCAAAAG	100 bp
		R - AGATCTCAGGATCCGGATTGG	
XAC0408	<i>hrpB2</i>	F - CCATCGCCGAGCATATCG	100 bp
		R - ATGGTCAGCTCGTGCATCAA	
XAC1266	<i>hrpXct</i>	F - GACGTCGACGGTGTGCAA	100 bp
		R - CTCTGAAAGCCATCGAAAAAATC	
XAC0612	<i>engXCA</i>	F - CGTATTCCGAAGCGCAATG	100 bp
		R - TGCGGCTCGTTCTTCAGAT	
XAC3385	<i>pilM</i>	F - GCGTGAAGGGCTTGCAACT	100 bp
		R- GGTA AAAAGCCCCACGGTAACT	
XAC0022	<i>pthA-1</i>	F - CACCTCAGCGTCGAATTCG	100 bp
		R - TCCTATGATCGGCGAGTACGT	

	16S	F - CCGGATTGGAGTCTGCAACT	100 bp
		R - ACGTATTCACCGCAGCAAT	

Fc = forward primer designed to amplify *rpfF* for cloning

Rc = reverse primer designed to amplify *rpfF* for cloning

FqPCR = forward primer designed for *rpfF* detection by qPCR

RqPCR = reverse primer designed for *rpfF* detection by qPCR

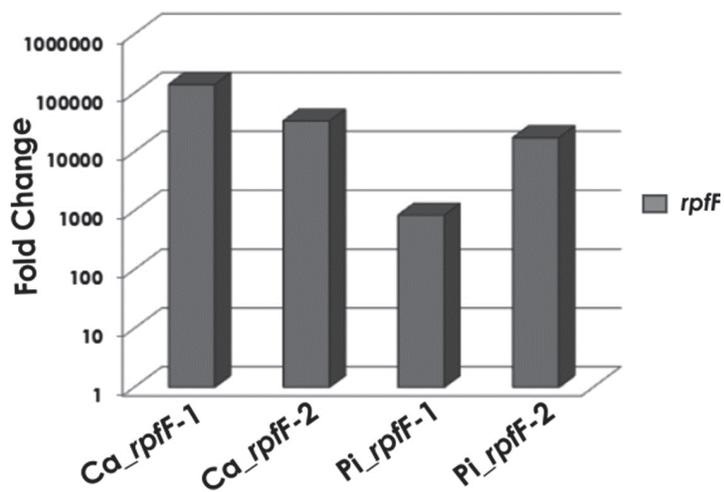


Fig. 1. Transgene expression in transformed plants. Quantitative expression of *rpfF* in transgenic plants in comparison to WT. Ca_*rpfF*-1 and Ca_*rpfF*-2 refer to Carrizo citrange transgenic plants and Pi_*rpfF*-1 and Pi_*rpfF*-2 refer to Pineapple sweet orange transgenic plants.

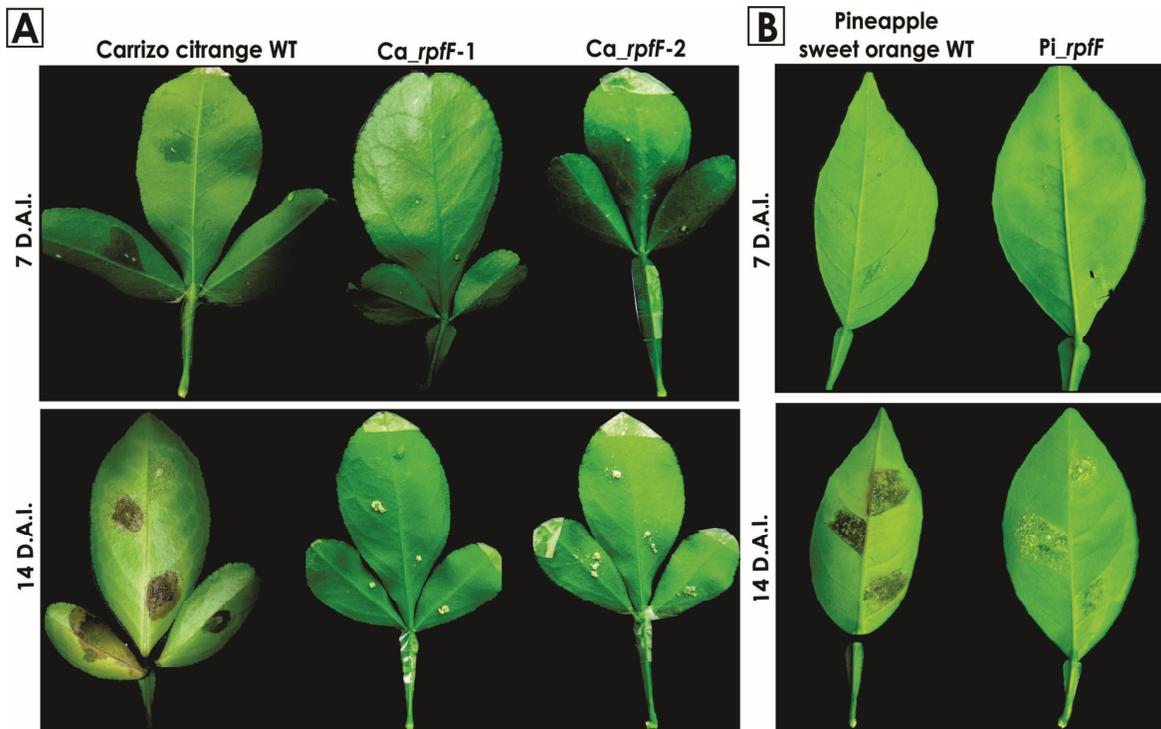


Fig. 2. Citrus canker symptoms. *X. citri* _GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 7 and 14 days after inoculation (D.A.I.). **A.** Carrizo citrange. **B.** Pineapple sweet orange.

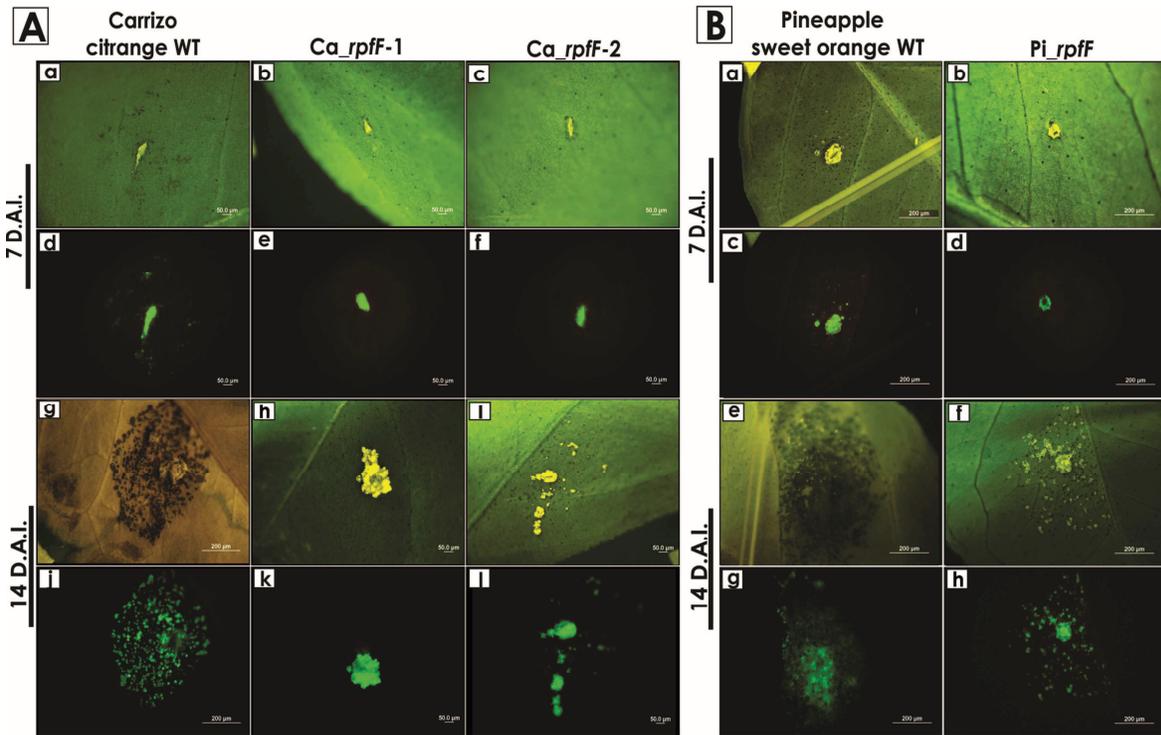


Fig. 3. Microscopy analysis of citrus canker lesions. *X. citri*_GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 7 (a,b,c,d,e and f) and 14 days (g,h,i,j,k, and l) after inoculation (D.A.I.) under light (a,b,c,g,h and i) and fluorescence microscopy (d,e,f,j,k and l). Panels A and B represent Carrizo citrange and Pineapple sweet orange plants respectively. Green labeling refers to *X. citri*_GFP.

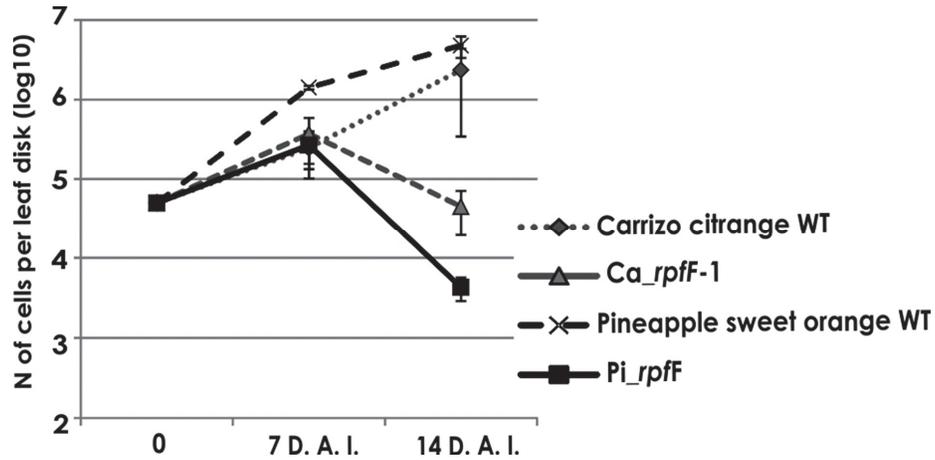


Fig. 4. Bacterial population analysis from *X. citri* isolated from leaf disks away of lesion area. Serial dilution of isolated bacteria was performed at 7 and 14 days after inoculation for Carrizo citrange and Pineapple sweet orange WT and transgenic plants. Results are means of three repetitions. The bars indicate the standard deviation of the means. The *X. citri* growth observed at 14 days after inoculation in transgenic plants were significantly ($P < 0.05$) less compared with the WT.

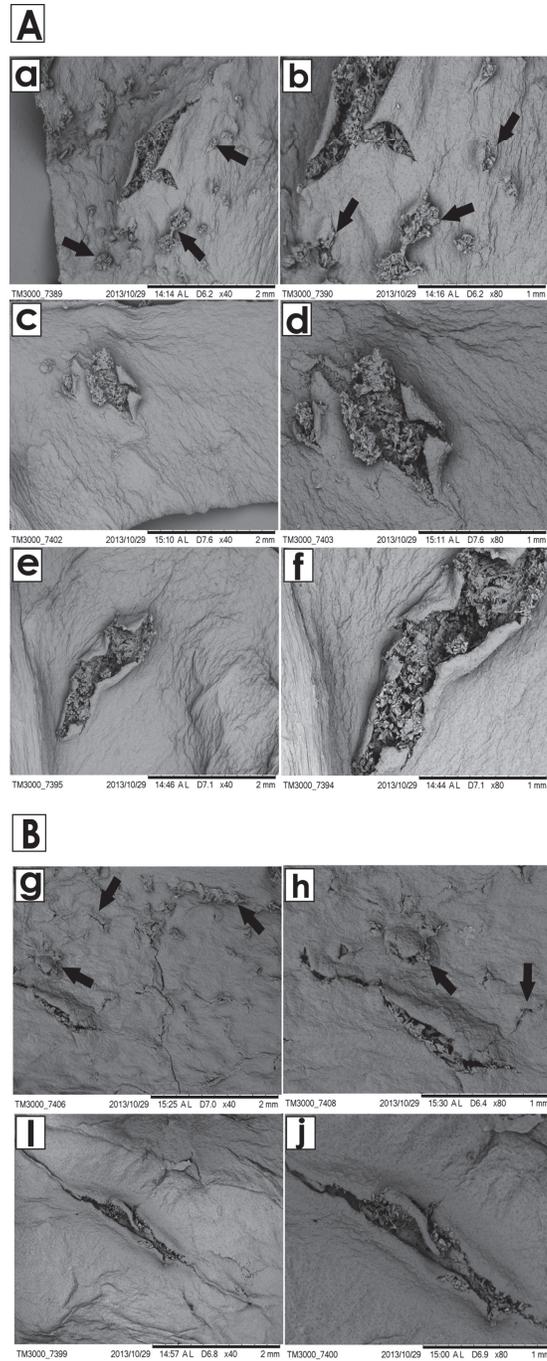


Fig. 5. Scanning electron micrographs of canker lesions. *X. citri*_GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 14 days after inoculation. Panels **A** and **B** represent Carrizo citrange and Pineapple sweet orange plants respectively. WT plants are represented in **a**, **b** (Carrizo citrange), **g** and **h** (Pineapple sweet orange). Black arrows indicate the pustules formed on WT leaves. The biggest injury corresponds to the inoculation point on the leaves. Transgenic *Ca_rpfF-1* is represented in **c** and **d**, *Ca_rpfF-2* in **e** and **f**, and *Pi_rpfF* in **g** and **h**. The magnitudes used were 40x (**a**, **c**, **e**, **g** and **i**) and 80x (**b**, **d**, **f**, **h** and **j**).

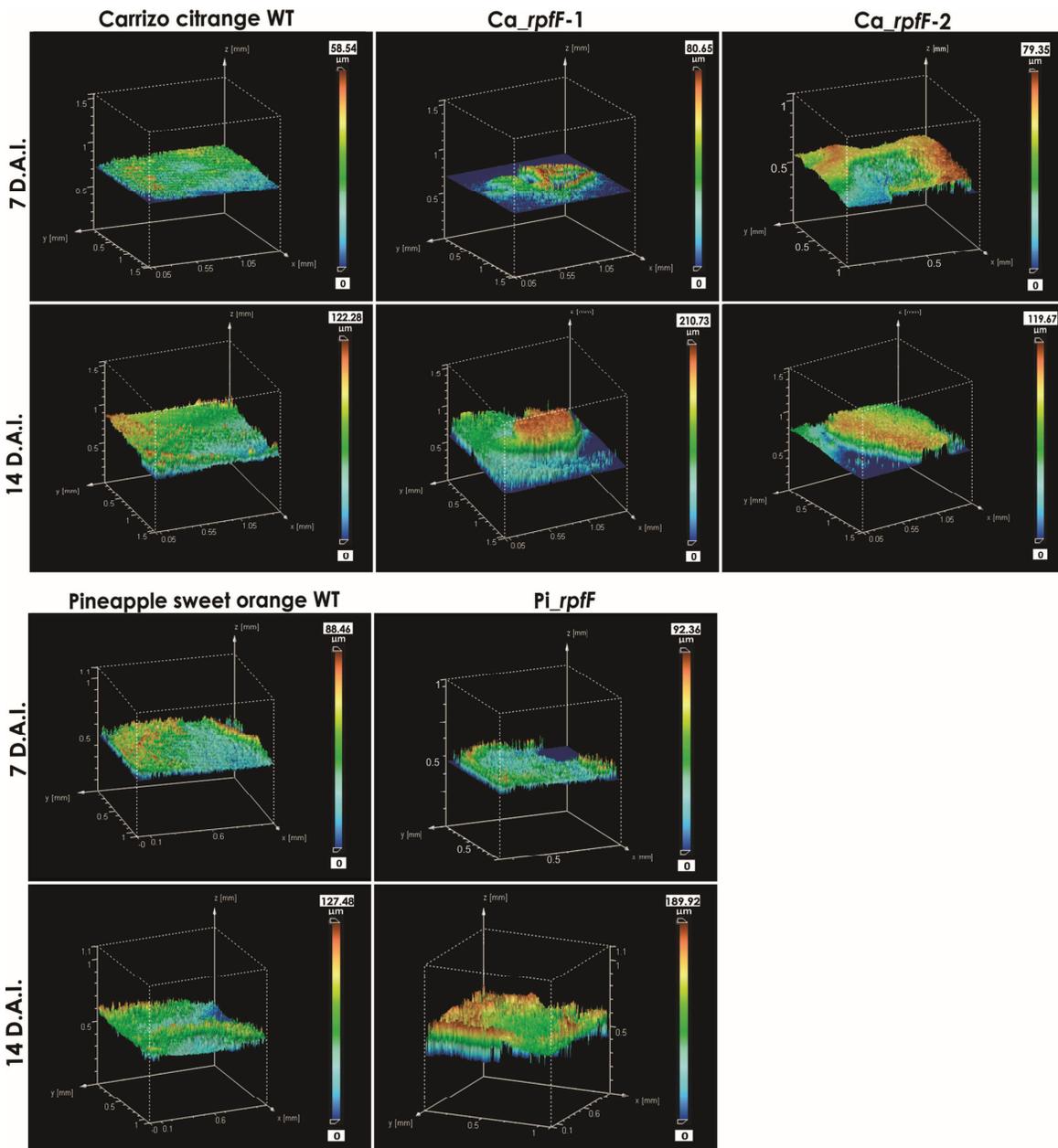


Fig. 6. 3D reconstruction of biofilms topography from confocal scanning laser microscopy. *X. citri*_GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 7 and 14 days after inoculation (D.A.I.). Bacterial biofilm layers are represented by different colors and total biofilm is expressed by the color scales where blue and red tones represent the thinnest and thickest respectively. **A.** Biofilms topography on Carrizo citrange WT and transgenic leaves. **B.** Biofilms topography on Pineapple sweet orange WT and transgenic leaves.

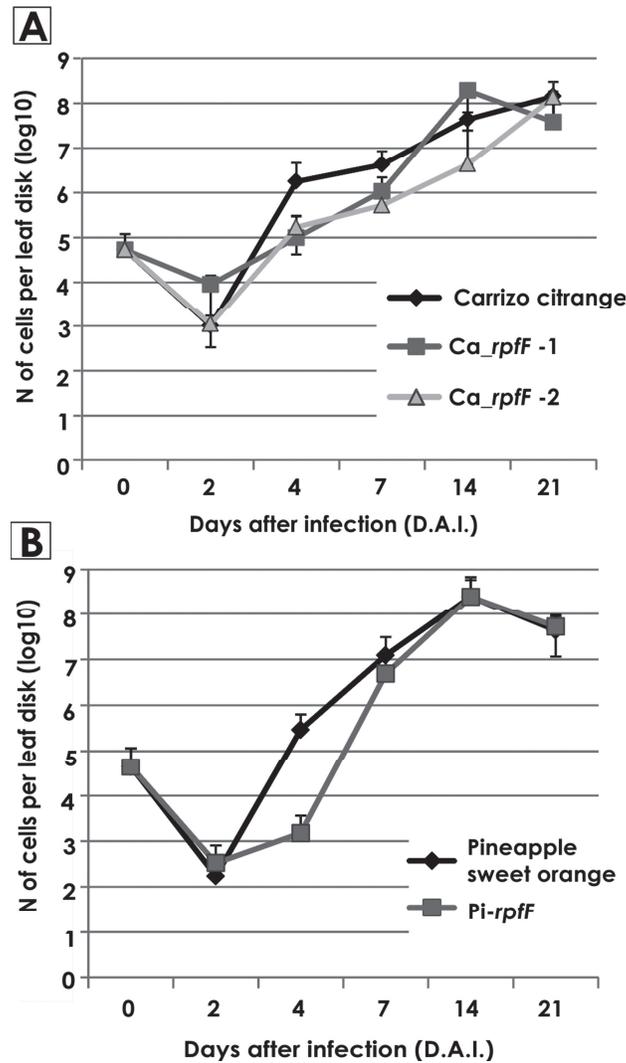


Fig. 7. *X. citri*_GFP growth curves in detached leaves. Leaves were infiltrated with 10^4 cells and growth was evaluated at 2, 4, 7, 14 and 21 days after inoculation. **A.** Growth curve of *X. citri*_GFP in Carrizo citrange WT and transgenic plants. **B.** Growth curve of *X. citri*_GFP in Pineapple sweet orange WT and transgenic plant. The standard deviation bar represents the mean of three repetitions. No statistically significant difference was observed.

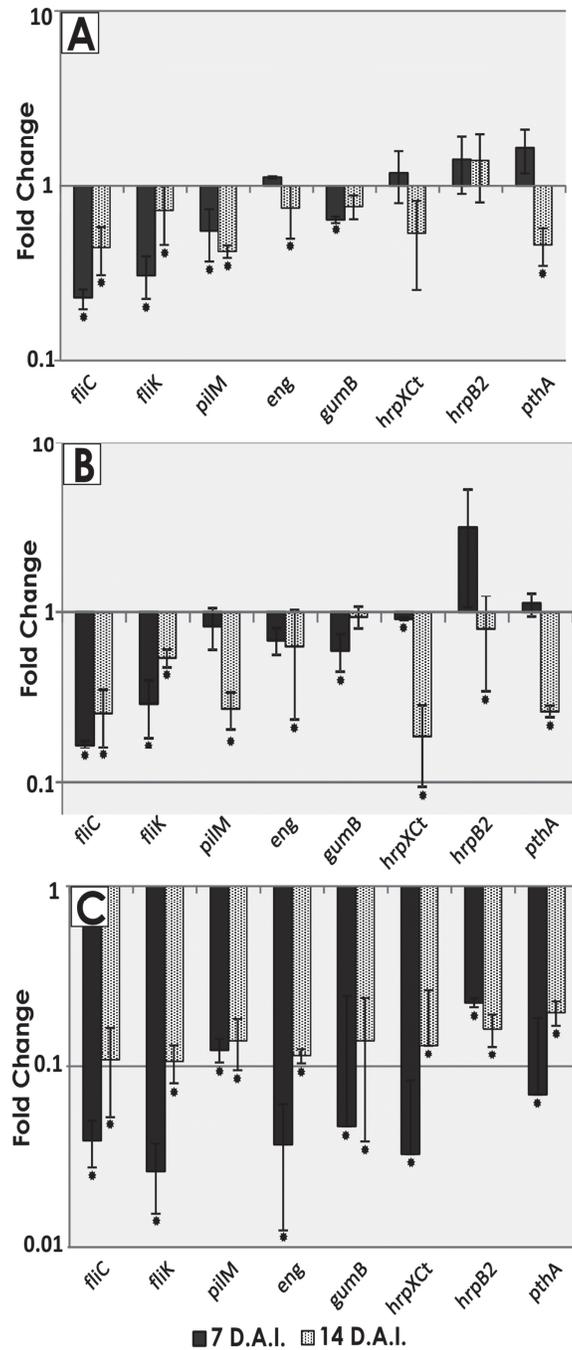


Fig. 8. Relative quantification of genes responsive to DSF in *X. citri*. Gene expression was evaluated for *Ca_rpfF-1* (A), *Ca_rpfF-2* (B) and *Pi_rpfF* (C) in relation to WT at 7 and 14 days after inoculation (D.A.I.). Results are means of three independent experiments. The bars indicate the standard deviation of the means. (*) indicates significant difference ($P < 0.05$) between the mean values obtained for each gene compared with the WT.

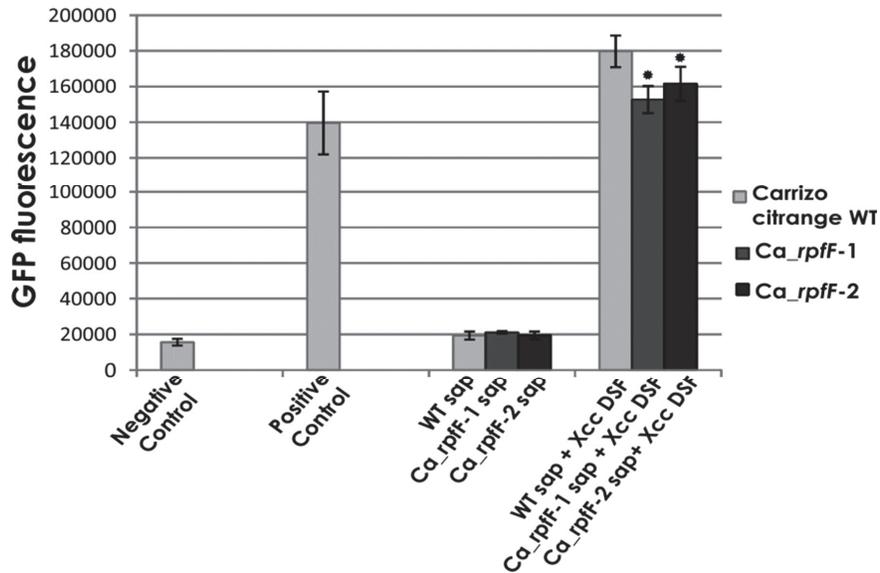


Fig. 9. GFP fluorescence triggered by *Xanthomonas campestris* biosensor cells. Negative control represents untreated cells. Positive control represents cells treated only with *Xcc*DSF. Treatments only with sap without DSF shows no GFP emission from the sensor while treatments with sap plus DSF from transgenic plants significantly decreased the emission of GFP. Results are means of three repetitions. The bars indicate the standard deviation of the means. (*) indicates significant difference ($P < 0.05$) between the mean values obtained for each gene compared with the WT.

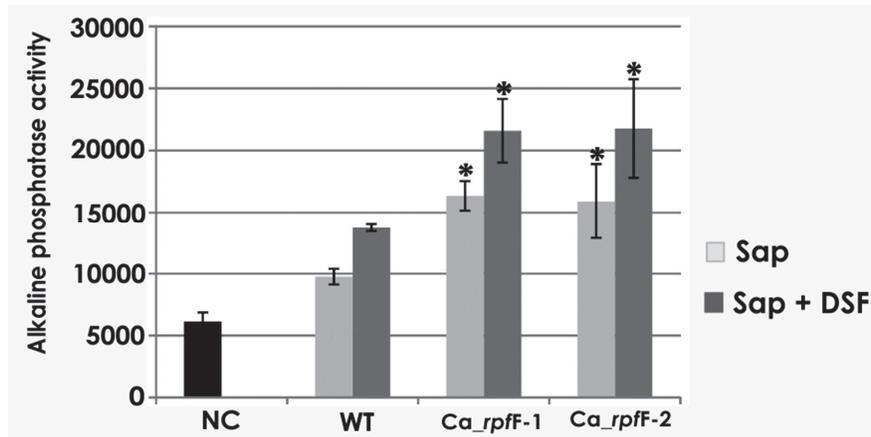


Fig. 10. Alkaline phosphatase (AP) activity exhibited by cells of a *X. fastidiosa* DSF biosensor. The sap from WT and transgenic plants were tested for induction of expression of the *phoA* gene under the control of the DSF-induced *hxfA* promoter, by measuring the AP activity. Sap alone (grey bars) or sap to which 3 μ M *Xf*DSF had been added (dark bars) were tested. Negative control (NC) corresponds to AP activity from cells cultured on PWG. The vertical bars indicate the standard deviation of the means. (*) indicates a significant difference ($P < 0.05$) between the mean values obtained for the transgenic plants compared with the WT.

Table 1: Relative expression of *X. citri* genes responsive to DSF measured

Locus tag	Gene name	<i>rpfC</i>	<i>rpfF</i>	<i>rpfG</i>	<i>Ca_rpf</i> <i>F-1</i> 7D.A.I.	<i>Ca_rpfF</i> - 1 14D.A.I.	<i>Ca_rpfF-2</i> 7D.A.I.	<i>Ca_rpfF-2</i> 14D.A.I.	<i>Pi_rpfF</i> 7D.A.I.	<i>Pi_rpfF</i> 14D.A.I.
XAC0612	<i>eng</i>	down	down	down	nr	down	nr	down	down	down
XAC1975	<i>fliC</i>	down	down	down	down	down	down	down	down	down
XAC1949	<i>fliK</i>	down	down	down	down	down	down	down	down	down
XAC2585	<i>gumB</i>	down	down	-	down	nr	down	nr	down	down
XAC0408	<i>hrpB2</i>	down	nr	down	nr	nr	nr	nr	down	down
XAC1266	<i>hrpXct</i>	down	down	nr	nr	nr	down	down	down	down
XACa022	<i>pthA</i>	-	-	-	nr	down	nr	down	down	down
XAC3385	<i>pilM</i>	down	down	nr	down	down	nr	down	down	down
Reference		14, 20, 21	14, 20, 21	14	This work	This work	This work	This work	This work	This work

Down: down regulated; Nr: non responsive; - : no information available

Table 2: Gene names and primer sequences used in this work

Gene number	Gene name	Primer sequence 5'-3'	Size of amplicon
UBIQ CAS-PT- 300961	<i>ubiquitin</i>	F - TTCGTCAGTTGACTAATCCT	100 bp
		R - GTTGCTGTGTTGACTGTG	
	35S	F – ACACTCTCGTCTACTCCAAG	
XF1115	<i>rpfF</i>	F _c - AGAGGTACCAATGTCCGCTGTACAT	900 bp
		R _c - AGCGGATCCTGCTCAGTTTTTTAGTG	
XF1115	<i>rpfF</i>	F _{qPCR} - TCGGCAGCAAATCACTCCGAACTA	100 bp
		R _{qPCR} - CAGCACAGCTTTGAGTGCTCAGTT	
XAC1975	<i>fliC</i>	F - TCAAGCAGCTGACCTCTGAAATC	100 bp
		R - GCGCCGACCTGGAACAG	
XAC1949	<i>fliK</i>	F - GGCTGCGCGAAATGCT	100 bp
		R - TGCCCGCCGAATTCTG	
XCC2454	<i>gumB</i>	F - CATGGTCAACGGGCAAAG	100 bp
		R - AGATCTCAGGATCCGGATTGG	
XAC0408	<i>hrpB2</i>	F - CCATCGCCGAGCATATCG	100 bp
		R - ATGGTCAGCTCGTGCATCAA	
XAC1266	<i>hrpXCt</i>	F - GACGTCGACGGTGTGCAA	100 bp
		R - CTCTGAAAGCCATCGAAAAAATC	
XAC0612	<i>engXCA</i>	F - CGTATTCCGAAGCGCAATG	100 bp
		R - TCGGCTCGTTCTTCAGAT	
XAC3385	<i>pilM</i>	F - GCGTGAAGGGCTTGCTCAACT	100 bp

		R- GGTAAGAGCCCCACGGTAACT	
XAC0022	<i>pthA-1</i>	F - CACCTCAGCGTCGAATTCG	100 bp
		R - TCCTATGATCGGCGAGTACGT	
	16S	F - CCGGATTGGAGTCTGCAACT	100 bp
		R - ACGTATTCACCGCAGCAAT	

F_c – forward primer designed to amplify *rpfF* for cloning

R_c - forward primer designed to amplify *rpfF* for cloning

F_{qPCR} – forward primer designed for *rpfF* detection by qPCR

R_{qPCR} - reverse primer designed for *rpfF* detection by qPCR

3. Conclusões gerais do patossistema *Xanthomonas citri*

- ✓ DSF produzido pela planta está atuando como antagonista com relação a *X. citri*.

- ✓ Redução de sintomas pode ser resultado da repressão de genes associados a movimento e virulência.

- ✓ Diminuição do crescimento do patógeno fora da área de lesão pode ser devido ao reconhecimento da bactéria pela planta uma vez que genes de virulência da bactéria foram reprimidos.

Apêndice I. Utilização de genes de *Citrus reticulata* para transformação genética visando resistência a *Xylella fastidiosa*

1. Introdução

C. reticulata é considerada uma espécie resistente a Clorose Variegada dos Citros (CVC), uma vez que, mesmo inoculada na planta a bactéria não é capaz de colonizar o hospedeiro, e após determinado tempo da inoculação não é possível detectar a bactéria. Além disso, existem graus de resistência contra *X. fastidiosa* entre híbridos com *C. reticulata*, e até mesmo em condições de campo onde há uma alta fonte de inóculo, tangerinas e alguns híbridos não apresentaram a doença (Laranjeira *et al.*, 1998). A resistência de *C. reticulata* a *X. fastidiosa* envolve fatores genéticos, uma vez que genes associados à diferentes vias de defesa são superexpressos após a infecção com a bactéria (De Souza *et al.*, 2007a; De Souza *et al.*, 2007b). Alguns genes relacionados ao estresse oxidativo e fotorrespiração foram encontrados ativados em *C. reticulata* após infecção por *X. fastidiosa*, sendo um deles foi o Serine-Glyoxilato Aminotransferase (De Souza *et al.*, 2007b).

Glyoxilato Aminotransferases presentes no peroxissomo têm um papel central na via fotorrespiratória, algumas reações dessa via são catalizadas por Serine-Glyoxilato Aminotransferase (SGAT), e sua atividade está relacionada também à modulação da quantidade de aminoácidos durante esse processo (Igarashi *et al.*, 2003; Liepman and Olsen, 2003; Igarashi *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis thaliana*, a superexpressão de uma glyoxilato aminotransferase induziu um aumento nos acúmulo de amonoácidos totais, inclusive aqueles ligados a fotorrespiração, além de um aumento na eficiência da assimilação de amônia (Igarashi *et al.*, 2006). Além disso *A. thaliana* mutante para o gene que codifica glioxilato aminotransferase apresentou coloração verde clara e sensibilidade à luz, além de não ser responsivo ao ácido abscísico nem ao estresse abiótico. Os autores desse trabalho atribuem tais fenótipos a um possível acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), já que a atividade de glioxilato aminotransferases também interfere na síntese de tais moléculas (Versules *et al.*, 2007). Glioxilato aminotransferases também estão envolvidas na síntese de oxalato. As funções do oxalato em plantas são bastante diversas, sendo envolvido na diminuição do estresse oxidativo durante o ataque de patógenos em plantas (Cessna *et al.*, 2000), na eliminação de fitotoxinas excretados de ervas daninhas (Weir *et al.*, 2006), e está envolvido também em morte celular

programada (Errakhi *et al.*, 2008). Em alfafas foi demonstrado que cristais de oxalato de cálcio são efetivos na defesa contra o ataque de insetos mastigadores (Korth *et al.*, 2006). Estudos utilizando *Oryza sativa* mutantes para SGAT (serine-glyoxylate aminotransferase) e GGAT (glutamate-glyoxylate aminotransferase) demonstraram que glioxilato é um importante precursor de oxalato, que sua produção não está totalmente dependente de fotorrespiração e sua atividade pode estar envolvida na defesa de plantas contra patógenos, por reduzir efeitos de estresse oxidativo nas plantas durante o ataque a patógenos (Yu *et al.*, 2010). O envolvimento de glioxilato aminotransferases no aumento de resistência de plantas já foi reportado em um trabalho envolvendo a superexpressão de dois genes *At1* e *At2* em melões. *At1* apresentou alta similaridade com uma serina – glioxilato aminotransferase de *Fritilaria agrestis* e *At2* com uma Alanina glioxilato aminotransferase de *A. thaliana*. Resultados demonstraram que a atividade de ambas as enzimas foi fortemente associada a resistência de melões contra a doença causada pelo oomiceto *Pseudoperonospora cubensis* (Taler *et al.*, 2004).

Outro gene superexpresso em *C. reticulata* após infecção por *X. fastidiosa*, e apresentou inibição em *C. sinensis* sob a mesma condição foi o que codifica para Miraculina (De Souza *et al.*, 2007b). Essa proteína foi isolada da fruta do milagre, originária da África, que tem esse nome porque quando se mastiga tais frutas juntamente com limão tem-se a impressão de um sabor doce como o da laranja (Kurihara, 1992; Masuda *et al.*, 1995). O ingrediente ativo das frutas do milagre é a proteína Miraculina, pertencente à família de inibidores de tripsina do tipo Kunitz, que pode chegar a mais de 10% do total de proteínas solúveis nessas frutas (Sun *et al.*, 2006). Aparentemente modificar o sabor de frutos não é a única função de proteínas da família das miraculinas, sendo que a função de defesa contra *Alternaria alternata* também foi atribuída a uma miraculina isolada de *Citrus jambhiri*. Nesse trabalho, os autores observaram a super expressão de duas proteínas similares a miraculinas RlemMLP1 e RlemMLP2, moduladas após infecção de *C. jambhiri* com *A. alternata* não patogênica. Essas proteínas foram expressas em folhas após inoculação com o patógeno e também foram responsivas ao tratameto com metil jasmonato (MeJA). Após a expressão dessas proteínas em sistema heterólogo, foi demonstrada a atividade inibitória de ambas sobre tripsina e RlemMLP2 apresentou atividade inibitória do crescimento das hifas da *A. alternata* (Tsukuda *et al.*, 2006). A supreexpressão de duas outras proteínas do tipo miraculinas também foi observada em condições de ataque de patógenos e tratamento com elicitores em Clementina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.). Nesse caso, Mir1 e

Mir3 apresentaram um aumento na expressão após infestação de folhas de Clementina por ácaros, entretanto apenas Mir1 foi responsiva ao tratamento por MeJA. Já Mir3, que não respondeu ao tratamento por MeJA, apresentou aumento na expressão após tratamento com ácido salicílico, indicando que proteínas do tipo miraculinas podem estar envolvidas em diferentes respostas das plantas (Podda *et al.*, 2014). Recentemente, um estudo demonstrou que diferentes proteínas da família das miraculinas podem ser agrupadas em 3 classes, de acordo com suas sequências de aminoácidos. Miraculinas do tipo I e II (MLP 1 e MLP2) apresentam três pontes dissulfeto no domínio Kunitz de inibição de tripsina, característico para proteínas dessa família. Entretanto, em todas elas o domínio se diferencia ligeiramente do domínio Kunitz clássico, oriundo de soja (STI). Possivelmente a função inibitória de tripsina tenha sido substituída em algumas dessas proteínas uma vez que alterações de aminoácidos não permitem uma alta especificidade para a ligação com tripsina. Além disso, a predição do dobramento de MLP2 demonstrou que sua função antifúngica não está ligada ao domínio thaumatina, como atribuído anteriormente. Proteínas que apresentam tal domínio tem ponto isoelétrico maior que 8 e, de acordo com a sequência de MLP2 o ponto isoelétrico dessas proteínas é menor que 5,5. Os aminoácidos distribuídos em sua superfície não formam as fendas características para a ligação com componentes da parede celular do fungo, como ocorre com proteínas que apresentam o domínio thaumatina, sugerindo que a ação antifúngica de MLP2 envolve mecanismos ainda não descritos. Interessantemente, MLP2 apresentam a inserção de 4 aminoácidos que vêm sendo positivamente selecionados pela evolução, ainda que sua função não tenha sido elucidada (Selvakumar *et al.*, 2011).

A sequência de aminoácidos da Miraculina selecionada para o presente trabalho foi alinhada com as sequências de algumas outras proteínas descritas no trabalho citado anteriormente e o resultado demonstrou similaridade com miraculinas do tipo II, apresentando características similares no domínio Kunitz, a presença dos 4 aminoácidos em posição conservada e similaridades nos sítios catalíticos. A **Figura 1** mostra o alinhamento de algumas miraculinas.

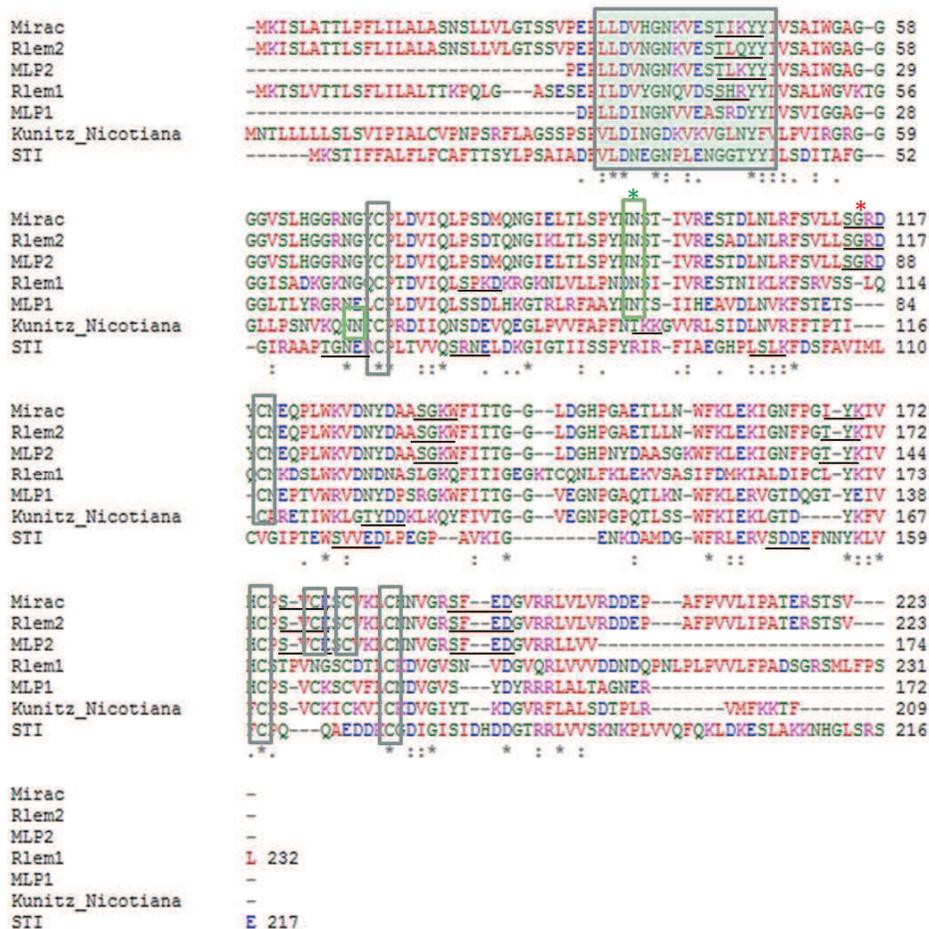


Figura 1: Alinhamento das sequencias de aminoácidos de algumas miraculinas. Domínio Kunitz está destacado na caixa sombreada, o sítio de glicosilação (N) está destacado na caixa verde com asterisco, os 4 resíduos conservados de aminoácidos SGRD estão grifados e destacados sob um asterisco vermelho. Os demais resíduos grifados são conservados entre nas proteínas e os demais sítios catalíticos estão destacados em caixas. Mirac – refere-se a proteína superexpressa de *C. reticulata* após infecção com *X. fastidiosa*, Rlem2 e MLP2 são miraculinas do tipo II, Rlem1 e MLP1 são miraculinas do tipo I, Kunitz_Nicotiana é uma proteína de tabaco que apresenta o domínio Kunitz e STI é o domínio classico de inibidores de tripsina de soja.

Devido a evidências do envolvimento de Serina-glioxilato aminotransferase e Miraculina na defesa de plantas contra patógenos, e a superexpressão desses genes em *C. reticulata* após infecção por *X. fastidiosa*, esses genes foram escolhidos para trabalhos com transformação de *C. sinensis*, objetivando obter algum nível de resistência contra a bactéria causadora de CVC.

2. Hipótese

Genes associados a defesa de *Citrus reticulata* contra *X. fastidiosa* quando superexpressos em hospedeiro suscetível podem conferir resistência/tolerância ao patógeno.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Obter plantas de *Nicotiana tabacum* e *C. sinensis* e superexpressando genes de *C. reticulata* associados à resistência a *X. fastidiosa* e possivelmente envolvidos nas diferentes vias associadas a resposta de defesa do hospedeiro

3.2. Objetivos específicos

- Montar cassetes de expressão através da clonagem dos genes Serine-Glyoxylate Aminotransferase, S-Adenosil-L-Metionine: Salicilic Acid Methyl Transferase e Miraculian de *Citrus reticulata* sob o promotor constitutivo 35S e cauda poliA
- Obter vetores binários pCambia2301 contendo os cassetes de expressão
- Transformar plantas de *N. tabacum* e *C. sinensis* com as construções através de infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e validar as plantas positivas através PCR e RT-qPCR
- Desafiar as plantas positivas com *X. fastidiosa* e avaliar o grau de tolerância através da colonização da bactéria *in planta* por sintomatologia e qPCR.

4. Materiais e métodos

4.1. Clonagem dos genes alvo

Para a amplificação dos genes alvo foram utilizados clones contendo as sequências dos genes de interesse, gerados em trabalhos anteriores de ESTs no Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CitEst - Expressed Citrus Genome, De Souza *et al.*, 2007b) . Para cada gene de interesse foram escolhidos pelo menos dois clones: S-Adenosil-L-Metionine: Salicilic Acid Methyl Transferase (SAMT) - CR05C1102042F12 e CR05C1102034E06, Serine-Glyoxylate Aminotransferase (Aminotransferase) - CR05C1103008D03 e CR05C1103066D10, e Miraculina CR05C3700063A01 e CR05C3700073G10. Primers foram desenhados para a amplificação dos genes, utilizando o programa PrimerSelect da suíte Lasergene99 (DNASTAR, Inc.). Em todos os primers diretos inseriu-se o sítio da enzima *KpnI* anteriormente ao ATG de início da transcrição, e após seus codons de terminação foi inserido o sítio de restrição da enzima *BamHI*. Dessa maneira a clonagem foi direcional, posicionando os genes alvo sob o domínio de um promotor 35S e uma cauda poliA. A Tabela 1 demonstra as sequências dos primers desenhados.

Tabela 1: Sequências dos primers desenhados para os genes alvo e o tamanho esperado dos fragmentos por eles gerados.

Nome do primer	Seqüência (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)
Miraculina_ <i>KpnI</i>	F - TTTGAAAACGGTACCATGAAGATT	750
Miraculina_ <i>BamHI</i>	R - ATTACACGGATCCTGATCTTTC	750
SAMT_ <i>KpnI</i>	F - TGGTACCGATGGAGGTGGTTCAAGT	1100
SAMT_ <i>BamHI</i>	R - TATCGGATCCATCATCCAATTTTCGTC	1100
Aminotransferase_ <i>KpnI</i>	F - CAAACTTTAAGGTACCCGTGACATTCC	800
Aminotransferase_ <i>BamHI</i>	R - GACCGTGCCTTTGGATCCCATTTC	800

F- primer direto R – primer reverso

A amplificação dos genes alvo foi realizada utilizando a enzima *Taq Platinun High Fidelity* (Invitrogen). Os amplicons obtidos foram clonados em pGEM-T (Promega) e transformados em *Escherichia coli* por choque térmico, como descrito no Capítulo 2. Após seleção em meio contendo 100µg/mL de ampicilina e PCR para a certificação de colônias

positivas, foi realizado o sequenciamento dos plasmídeos obtidos, de acordo com as instruções da ABI para o “DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction”, v 3.0 utilizando o ABI 3730 – Applied Biosystems. As seqüências geradas foram analisadas por Phred Phrap e Consed e os clones que apresentaram seqüência totalmente similar à do banco de dados após realização de BlastN foram digeridos com *KpnI* e *BamHI* (New England Biolabs), separados em gel de agarose 1% e purificados com o kit ‘GFX PCR and Gel Band Purification’ (Ge Healthcare).

O vetor de construção pRT101 (**Figura 2**) foi digerido com *KpnI* e *BamHI*, purificado e ligado ao gene *rpfF* utilizando T4 DNA Ligase (Invitrogen). O vetor foi inserido em *E. coli*, e após seleção em meio de cultura e PCR de colônia, foi realizada mini prep para posterior digestão do cassete de interesse com *HindIII* (New England Biolabs).

O vetor binário pCambia 2301 foi previamente digerido com *HindIII* ou *PstI*, dependendo do cassete de expressão que ia receber. A fim de minimizar a autoligação do vetor, este foi defosforilado segundo especificações para a enzima CIAP (Invitrogen) e purificado como descrito anteriormente. A ligação com os cassetes contendo os genes alvo foi procedida imediatamente após a purificação do vetor defosforilado, e para a ligação a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) foi novamente utilizada. Os vetores obtidos foram inseridos no choque térmico na linhagem DH5 α de *E. coli* e as colônias foram selecionadas em meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina. PCR de colônia foi realizada para a avaliação da presença dos genes de interesse e as colônias positivas foram submetidas a mini prep, utilizando o mesmo kit descrito anteriormente. Os plasmídeos obtidos foram analisados por PCR utilizando o conjunto de primers que amplificavam o gene alvo (Tabela 1) e a combinação do primer direto desenhado para o promotor 35S (F- ACACTCTCGTCTACTCCAAG) e o reverso do gene alvo, e também foram analisados por digestão teste, realizada com a mesma enzima utilizada na clonagem do cassete de interesse para avaliar sua presença. Após a digestão teste, os fragmentos foram separados em gel de agarose 1% para verificação da correspondência entre o tamanho do fragmento liberado após a digestão, e seu tamanho predito através da soma dos tamanhos dos fragmentos no vetor de construção. A **Figura 2** ilustra a estratégia de obtenção dos vetores de transformação em planta, similar aquela explicada no item 4.1 do Capítulo 2.

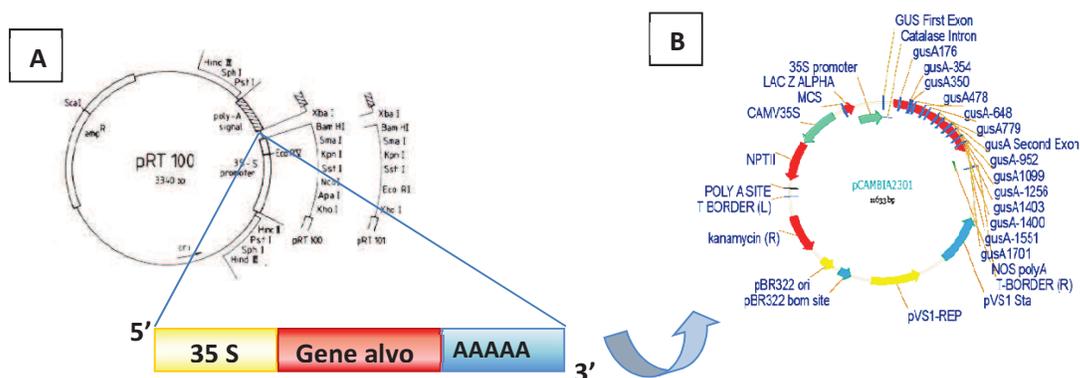


Figura 2: Estratégia de obtenção do vetor binário contendo os genes alvo. **A.** Vetor pRT101, onde os genes alvo foram inseridos entre um promotor 35S e uma cauda poliA. Os cassetes após digeridos foram inseridos no vetor binário. **B.** Vetor binário pCambia2301, utilizado para a transformação das plantas neste trabalho.

4.2. Introdução da construção em *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor pCambia2301 contendo os cassetes com os genes alvo foi introduzido na estirpe EHA105 de *A. tumefaciens*, por choque térmico como descrito mais detalhadamente no item 4.2 do Capítulo 2. Os transformantes foram selecionados em meio YEP sólido contendo 300µg/µL de rifampicina e 100µg/µL de canamicina. A verificação das colônias transformadas foi feita por PCR utilizando primers específicos para os genes alvo.

4.3. Transformação das plantas alvo e seleção de transformantes

Para transformação de tabaco, seguiram-se as etapas descritas no item 4.3.1 do Capítulo 2.

Para a transformação de *C. sinensis* foram utilizados 2 tipos de explantes e por isso os protocolos de transformação utilizados foram adequados para cada um deles. As variedades utilizadas para a transformação foram Pêra, Hamlin e Pineapple.

Para a transformação utilizando epicótilos de citros, o procedimento foi realizado como descrito no item 4.3.2 do Capítulo 2.

Além da transformação de epicótilos, a tentativa de obtenção de brotos foi feita também através da transformação de hipocótilos de citros. Essa técnica foi realizada como uma alternativa à baixa eficiência de obtenção de brotos transgênicos que ocorria nos experimentos com epicótilos.

Para a transformação de hipocótilos, 20 sementes de Pineapple e Hamlin foram germinadas em magentas contendo meio de cultura MS/2, como descrito acima. A germinação foi monitorada até o aparecimento das radículas, que ocorreu em aproximadamente 10 dias. O cotilédone das sementes foi cortado transversalmente pela metade e descartado, e o restante foi cortado longitudinalmente, de maneira a separá-lo em duas porções. O embrião da semente e a radícula foram retirados (**Figura 3**). A porção contendo o metade do cotilédone junto ao hipocótilo foi utilizada como explante, sendo processada como descrito anteriormente a partir da imersão em solução contendo agrobactéria. O período de co-cultivo e a manutenção dos explantes até o aparecimento dos brotos foram realizados seguindo a metodologia descrita acima. A **Figura 3** mostra a obtenção dos explantes contendo hipocótilos.

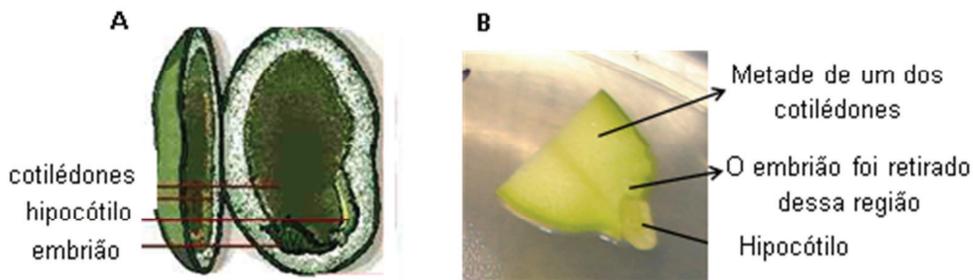


Figura 3 : Obtenção do explante referente ao hipocótilo da semente. **A.** Esquema do corte longitudinal da semente para a exposição do embrião, hipocótilo e radícula. **B.** Explante pronto para imersão com a cultura de agrobactéria.

As brotações que se desenvolveram de epicótilos e de hipocótilos transformados foram testadas para a presença da atividade do gene *gusA*, repórter do vetor pCambia2301, utilizado para as transformações nesse trabalho. As análises iniciais dos brotos regenerados foi feita por teste GUS, e os tecidos utilizados foram transferidos para uma solução 1:1 (v/v) de ácido acético

e etanol para que descorassem após o teste, tornando mais evidente alguma coloração azul que possivelmente aparecesse.

Os brotos cujas folhas apresentaram alguma coloração azul foram microenxertados e aclimatados até que suas folhas se desenvolvessem para que fossem testadas por PCR a fim de avaliar a presença do transgene. A PCR teste foi realizada de acordo com instruções do kit REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR (Sigma – Aldrich), que consiste em uma rápida extração de DNA e posterior PCR. Essa PCR foi realizada utilizando os primers descritos na Tabela 1 e a combinação do primer direto desenhado para o promotor 35S (F-ACACTCTCGTCTACTCCAAG) e o reverso do gene alvo.

5. Resultados e discussão

5.1. Clonagem dos genes de interesse e transformação de *A. tumefaciens*

Os genes alvo para a construção dos vetores binários foram obtidos a partir da amplificação das sequências contidas no banco de ESTs do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Os tamanhos preditos dos fragmentos gerados após a amplificação foram condizentes com o com o tamanho do gene predito em análises *in silico* (**Figura 4**). A amplificação do gene Miraculina gerou um fragmento de 750pb, a amplificação do SAMT gerou um fragmento de 1100pb e a amplificação da Aminotransferase gerou um fragmento de 800pb. Esses fragmentos foram purificados e clonados em pGEMT (Promega) para certificação da qualidade de sua sequência. Após o sequenciamento, análises revelaram que a totalidade dos clones obtidos teve 100% de similaridade com a sequência do banco de dados do Centro de Citricultura. Os resultados das etapas de amplificação e purificação dos genes alvo estão demonstrados na **Figura 4**.

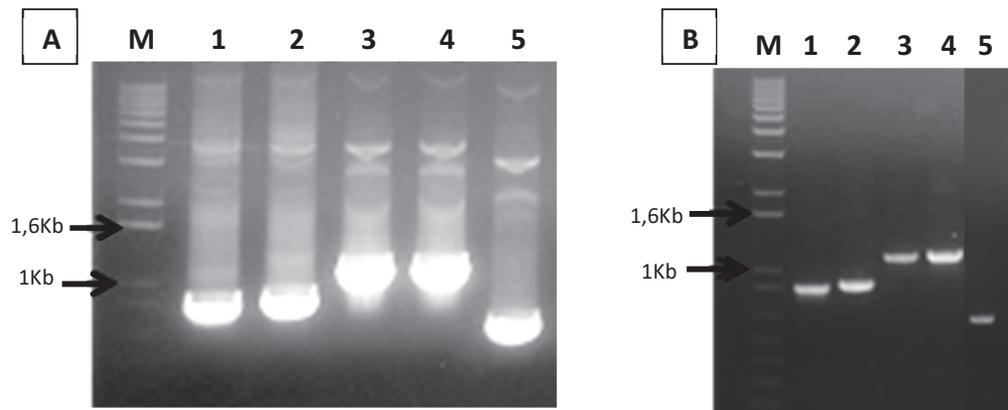


Figura 4: Amplificação e obtenção dos genes alvo. **A.** Gel de agarose 1% demonstrando o resultado da amplificação dos genes alvo com a enzima Taq Platinum (Invitrogen). **M.** Marcador Molecular 1Kb Plus (Invitrogen), **1 e 2.** Amplificação de aminotransferase a partir de dois clones do banco de ESTs, com tamanho esperado de 800pb; **3 e 4.** Amplificação do SAMT a partir de dois clones do banco de ESTs, com tamanho esperado de 1100pb; **5 e 6.** Amplificação de miraculina a partir de dois clones do banco de ESTs, com tamanho esperado de 750pb; **B.** Gel de agarose 1% demonstrando os genes alvo purificados. **M.** Marcador Molecular 1Kb Plus (Invitrogen), **1 e 2.** Purificação de aminotransferase (800pb); **3 e 4.** Purificação de SAMT

(1100pb); **5.** Purificação de miraculina (750pb). As setas indicam bandas de 1,6Kb e 1Kb, respectivamente.

Após a certificação da sequência, foi realizada a subclonagem para montagem do cassete de expressão submetendo o gene ao domínio do promotor 35S em vetor pRT101. Para isso genes alvo e vetor foram digeridos com *KpnI* e *BamHI* e a ligação dos genes no vetor foi feita utilizando T4 Ligase. Embora a amplificação e purificação de SAMT foi possível, sua clonagem no vetor de construção não foi obtida. Problemas com a digestão impediram as clonagens. Para resolver tais problemas outras metodologias foram feitas para clonagem e transformação com esse gene, como serão demonstradas no apêndice II. O vetor pRT101 contendo os genes alvo foi inserido em *E. coli* e PCR de colônia foi realizada para avaliar a presença dos genes alvo. Os resultados da PCR de colônia estão apresentados na **Figura 5**.

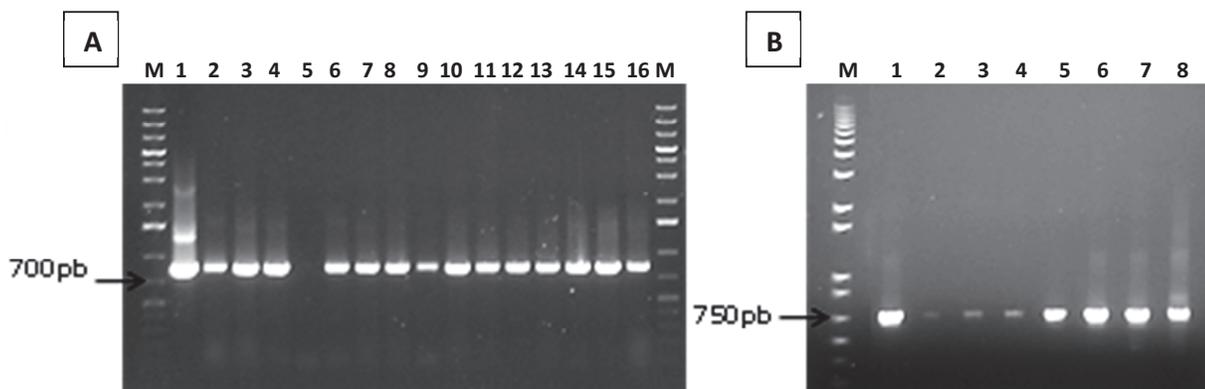


Figura 5: PCR de colônias contendo o vetor pRT101 ligado com os genes alvo **A.** PCR para aminotransferase, verificado com os primers teste que geram bandas de 800pb. **M.** Marcador O'Gene Ruler 1Kb Plus (Fermentas); **1 a 16.** Colônias transformadas; **B.** PCR para miraculina, que apresenta tamanho esperado de 750pb. **M.** Marcador 1Kb Plus (Invitroge); **1 a 8.** Colônias transformadas.

Depois de verificadas, as colônias positivas contendo os vetores de construção, foram submetidas a mini prep e os plasmídeos obtidos foram digeridos para que os cassetes construídos pudessem ser recuperados. Essas digestões foram realizadas com a enzima *PstI*, de acordo com

análise de restrição para os genes alvo. O tamanho esperado das bandas corresponde ao gene alvo somado às regiões 35S e poliA. A **Figura 6** mostra a digestão dos cassetes contendo miraculina (tamanho da construção igual a 1460pb) e aminotransferase (tamanho da construção igual a 2000pb).

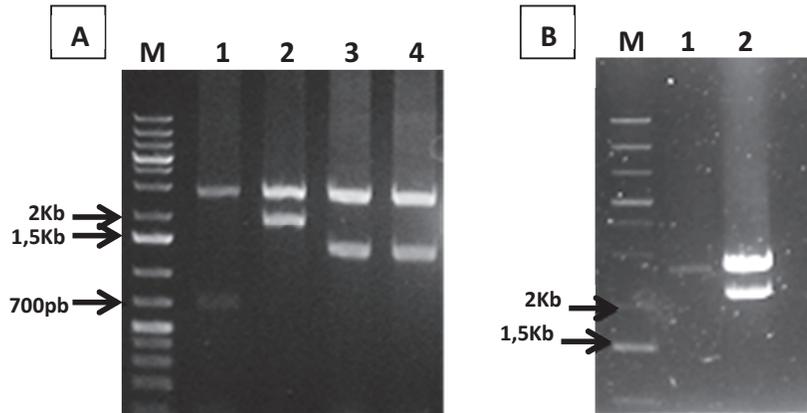


Figura 6: Géis de agarose 1% demonstrando os cassetes obtidos após digestão. **A.** Digestão do cassete contendo o gene miraculina. **M.** Marcador Gene Ruler 1Kb plus (Fermentas); **1.** Vetor pRT101 digerido com *HindIII*; **2.** Vetor pRT101 fechado; **3** e **4.** Clones contendo miraculina ligado a pRT101 e digeridos com *PstI*, o tamanho do fragmento esperado após a digestão era de 1460pb. **B.** Digestão do cassete contendo o gene aminotransferase. **M.** Marcador Gene Ruler 1Kb plus (Fermentas); **1.** Vetor pRT101 digerido com *PstI*; **2.** Clone contendo aminotransferase ligado a pRT101 e digerido com *PstI*, o tamanho do fragmento esperado após a digestão era de 2000pb.

Após obtidos, os cassetes foram purificados e ligados a pCambia 2301, previamente digerido com as mesmas enzimas usadas na digestão dos cassetes e defosforilado. Para a confirmação da presença dos genes de interesse nos vetores pCambia 2301 foram realizados quatro testes: PCR das colônias transformadas, PCR dos plasmídeos obtidos dessas colônias, utilizando como *primer* direto um que acora em uma região do promotor 35S e como *primer* reverso aquele desenhado para o gene e digestão do plasmídeos com a enzima *PstI*. No caso das construções obtidas, todos os testes realizados confirmaram a presença do gene alvo. A **Figura 7** mostra os resultados de alguns testes.

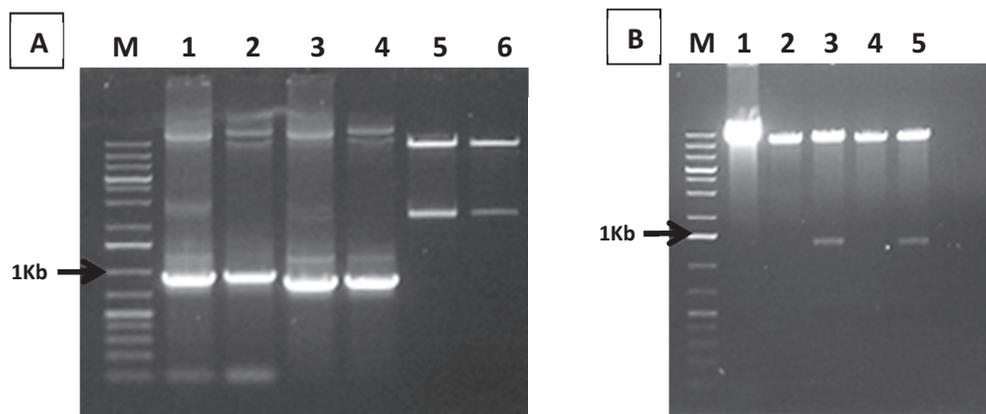


Figura 7: Testes realizados com pCambia 2301 contendo os genes alvo. **A.** Vetor pCambia 2301 contendo o gene aminotransferase. **M.** Marcador Gene Ruler 1Kb Plus (Fermentas); **1 e 2.** Clones 7 e 9 amplificados com *primer* direto para o 35S e reverso para o gene; **3 e 4.** Os mesmos clones amplificados com os primers teste desenhados para aminotransferase (tamanho esperado da banda 800pb); **5 e 6.** Digestão dos clones com *Pst*I para avaliar a presença do cassete (tamanho esperado 2000pb). **B.** Vetor pCambia 2301 contendo o gene miraculina. **M.** Marcador Gene Ruler 1Kb Plus (Fermentas); **1.** Vetor pCambia 2301 digerido com *Pst*I; **2 a 5.** Clones 3, 4, 5 e 6 contendo miraculina digeridos com *Hind*III (tamanho esperado da banda 1460pb).

Os vetores pCambia 2301 contendo miraculina e aminotransferase foram introduzidos em *A. tumefaciens* e após crescimento em meio de cultura, realizou-se PCR utilizando os primers para os genes alvo. Os resultados de PCR de colônia estão demonstrados na **Figura 8**.

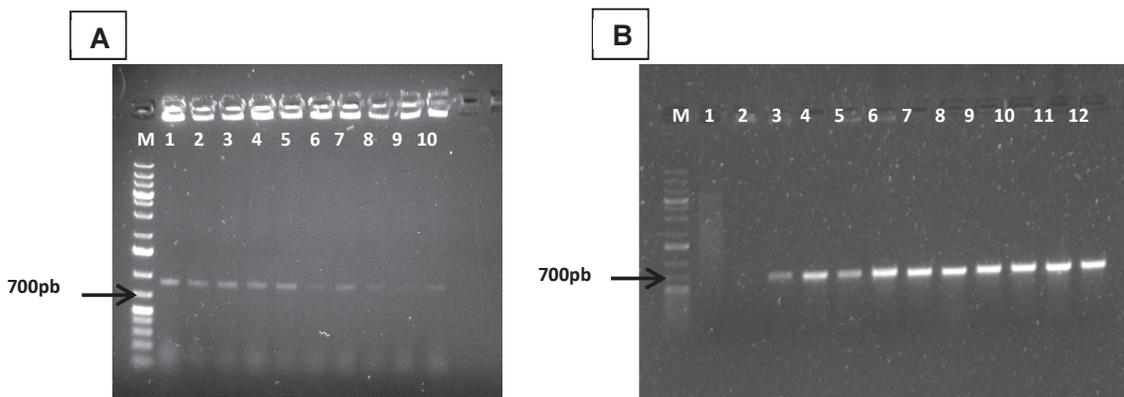


Figura 8: PCR de colônia para transformantes de *A. tumefaciens* com os vetores pCambia 2301 contendo os genes alvo. **A.** Transformantes contendo aminotransferase. **M.** Marcador Molecular Gene Ruler 1Kb Plus (Fermentas); **1 a 10.** Colônias testadas com os primers teste para

aminotransferase (800pb). **B.** Transformantes contendo miraculina. **M.** Marcador Molecular Gene Ruler 1Kb Plus (Fermantas); **1 a 12.** Colônias testadas com os primers para miraculina (750pb).

5.2. Transformação das plantas alvo

Para transformação de tabaco, discos foliares foram utilizados como explantes, de acordo com a metodologia descrita no capítulo 2. Para transformação de citros, segmentos de epicótilo e hipocótilo de diferentes variedades de citros foram utilizados como explantes. As Tabelas 2 e 3 demonstram os resultados das transformações de tabaco e citros, respectivamente.

Tabela 2: Eventos de transformação com os vetores pCambia2301 contendo os genes alvo realizados em tabaco e resultados obtidos

Construção utilizada	N de explantes infectados	Brotos regenerados	GUS positivos	Brotos PCR positivos
pCambia2301_Miraculina	179	48	1	0
pCambia2301_Aminotransferase	202	45	0	0

De acordo com os resultados apresentados nas Tabela 2 foi possível observar que nas transformações de tabaco apenas 1 broto transformado com o vetor contendo miraculina foi positivo para o teste GUS, entretanto esse broto foi negativo para a PCR de detecção do gene alvo. Embora 26,81% dos brotos infectados com a bactéria contendo pCambia2301_miraculina foram regenerados, não obtivemos plantas transformadas. O mesmo ocorreu para os explantes infectados com pCambia2301_aminotransferase, que apresentou regeneração de 22,27%, mas nenhuma planta transformada. De acordo com os resultados apresentados para as transformações de tabaco foi possível observar que no caso dos genes vindo de *C. reticulata* a transformação foi mais difícil quando comparada aquela realizada com o vetor contendo o gene da bactéria, demonstrada no Capítulo 2.

Tabela 3: Eventos de transformação com os vetores pCambia2301 contendo os genes alvo realizados em citros e resultados obtidos

Construção utilizada	Variedade de citros	Tipo de explante	N de explantes	Brotos testados	Brotos GUS positivos	Brotos positivos - PCR de DNA
pCambia2301_ Miraculina	Hamlin	Hipocótilo	23	214	15	0
		Epicótilo	1314			
	Pineapple	Hipocótilo	22	187	10	0
		Epicótilo	1008			
	Pêra	Epicótilo	433	60	0	0
	pCambia2301_ Aminotransferase	Hamlin	Epicótilo	175	0	0
Pineapple		Hipocótilo	26	0	0	0
		Epicótilo	900			
Pêra		Epicótilo	96	0	0	0

Resultados similares aos de tabaco também foram observados para transformação de citros, uma vez que nenhuma planta transgênica foi obtida após os eventos de transformação. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, a regeneração dos três cultivares de citros foi possível após a transformação com pCambia2301_miraculina, sendo que 16% dos explantes de Hamlin, 18,55% dos explantes de Pineapple e 13,85% dos explantes de Pêra infectados foram regenerados. Nenhum tecido dos explantes regenerados após transformação com miraculina apresentou coloração azul forte após testes GUS. A coloração presente era sempre azul muito fraca (dados não mostrados), bastante diferente daquela vista em transformantes infectados com pCambia2301_rpfF, demonstradas no Capítulo 2. No caso das transformações da variedade Hamlin, 7% dos brotos regenerados apresentaram tal coloração azul, sendo que para Pineapple essa porcentagem foi mais baixa, 5,34%. Apesar de satisfatória, as brotações dos explantes de Pêra foram todas negativas. O vetor pCambia contendo miraculina apresentou, na sua construção final 3 promotores 35S, sendo: um que regula a atividade do gene *nptII*, responsável pela resistência a antibiótico, outro que regula a atividade do gene reporter *gusA*, e um terceiro, que foi inserido após a construção com o gene miraculina. Esse excesso de promotores iguais pode ter interferido na atividade regulatória do gene repórter, impedindo sua correta transcrição e

resultando em uma coloração mais fraca após o teste. A alta similaridade (97%) entre os genes miraculina da planta alvo e o gene obtido de *C. reticulata* também pode ter dificultado a transformação.

No caso dos eventos de transformação com o vetor pCambia2301_aminotransferase, não foi observada a regeneração dos explantes infectados de nenhum cultivar. Esse resultado pode ter sido reflexo de um desbalanço regulatório da célula transformada, uma vez que o gene alvo foi clonado sob o domínio de um promotor 35S e é envolvido em diferentes mecanismos de regulação da célula, envolvendo a síntese de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, como esse gene foi transformado com sucesso em melão, onde foi associado ao aumento de resistência contra um fungo (Taler *et al.*, 2004), não se pode descartar a hipótese que os problemas obtidos no presente trabalho sejam devido a dificuldade de transformação usando gene de planta com alto nível de similaridade (Hamilton e Baulcombe 1999).

Todos os genes alvo foram clonados sob o domínio do promotor forte 35S, o que pode ter atrapalhado a transformação, já que a expressão de muitas cópias do transgene pode ocasionar silenciamento pós transcricional (Hamilton e Baulcombe 1999). Outro fator que pode interferir na expressão de transgenes é a similaridade entre o transgene e genes da planta alvo (Hamilton e Baulcombe 1999). Análises da sequência de nucleotídeos, através da ferramenta de bioinformática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), entre os transgenes e genes da planta alvo demonstraram que nos três casos a similaridade foi maior que 95% (**Figura 9**).

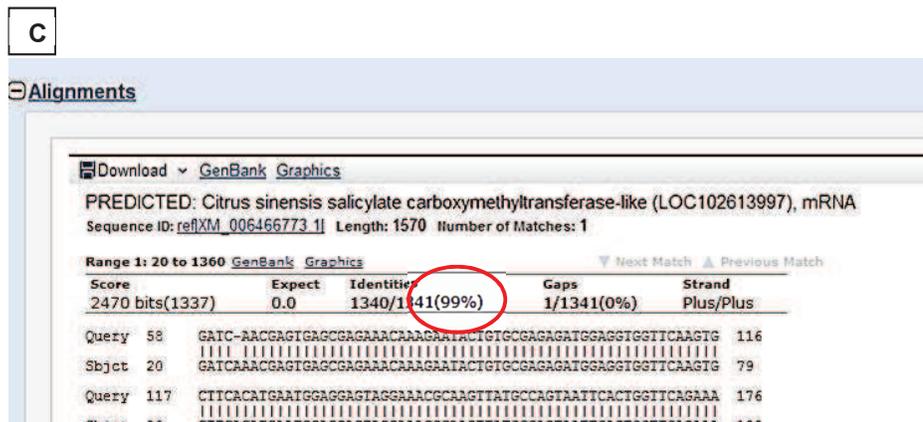
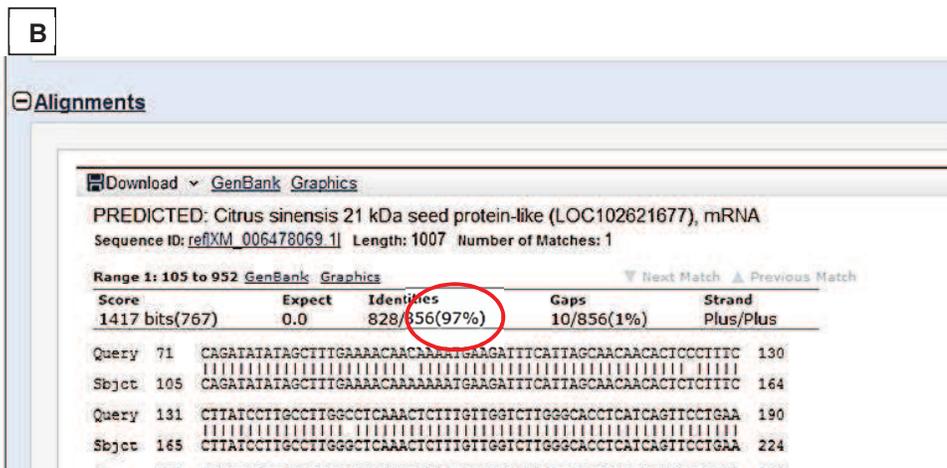
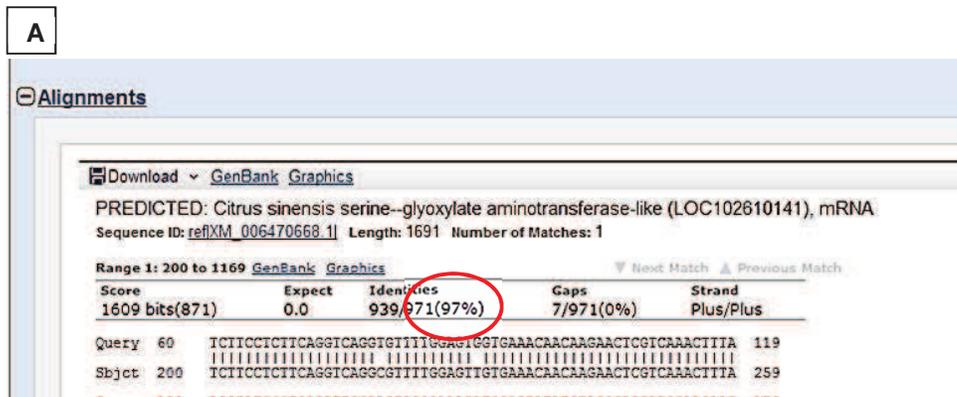


Figura 9: Análises comparativas entre a sequência de nucleotídeos dos transgenes, obtidos de *C. reticulata*, e dos genes endógenos da planta alvo, *C. sinensis*. **A.** Comparação entre as sequências de nucleotídeos de serine- glyoxilato – aminotransferase. **B.** Comparação entre as sequências de nucleotídeos de miraculina. **C.** Comparação entre as sequências de nucleotídeos de SAMT. A porcentagem de similaridade entre as sequências está destacada por círculos vermelhos nas três figuras.

6. Considerações finais

Embora diversos trabalhos reportem resultados de sucesso na transformação de plantas com genes de outras espécies vegetais, alguns alertam para problemas encontrados em alguns casos. Hamilton e Baulcombe (1999) discutem a possibilidade de silenciamento pós transcricional de transgenes em casos onde a similaridade entre o transgene e genes endógenos da planta alvo é alta, ou ainda em casos onde o transgene é altamente expresso. Em ambos os casos, RNAs dupla fita poderiam ser formados e ser reconhecido pela planta como um RNA viral (Hamilton e Baulcombe, 1999).

Embora diferentes tentativas tenham sido feitas utilizando os vetores contendo genes isolados de *C. reticulata* não foi possível obter nenhuma planta transformada, sendo que no caso de uma das construções não foi possível obter regeneração de brotos.

Bibliografia consultada

Cessna S. G., Sears V. E., Dickman M. B. e Low P. S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell* 12: 2191–2199.

CitEst - Expressed Citrus Genome. *Genetics and Molecular Biology*. Cordeirópolis: Sociedade Brasileira de Genética, v. 30, n. 3, 2007.

De Souza A. A., Takita M. A., Coletta-Filho H. D., Campos M. A., Teixeira J. E. C., Targon M. L. P. N., Carlos E. F., Ferraz J. R., Fischer C. N. e Machado M. A. 2007b. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 965-971.

De Souza A. A., Takita M. A., Coletta-Filho H. D., Targon M. L. P. N., Carlos E. F., Locali-Fabris E. C., Amaral A. M., Astua J. F., Pinhati A. C. O. S., Boscariol-Camargo R. L., Berger I. J., Rodrigues C. M., Reis M. S. e Machado M. A. 2007a. Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 957-964.

Errakhi R., Meimoun P., Lehner A., Vidal G., Briand J., Corbineau F., Rona J. P. e Bouteau F. 2008. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *Journal of Experimental Botany* 59: 3121–3129.

Hamilton, A. J. e Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.

Igarashi D., Miwa T., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. e Ohsumi C. 2003. Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 975–987.

Igarashi D., Tsuchida H., Miyao M. e Ohsumi C. 2006. Glutamate:Glyoxylate Aminotransferase Modulates Amino Acid Content during Photorespiration. *Plant Physiology* 142: 901–910.

Korth K. L., Doege S. J., Park S. H., Goggin F. L., Wang Q., Gomez S. K., Liu G., Jia L. e Nakata P. A. 2006. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiology* 141: 188–195.

Kurihara, Y. 1992. Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 231–252.

- Laranjeira F. F., Pompeu Jr. J., Harakava R., Figueiredo J. O., Carvalho S. A. e Coletta-Filho H. D. 1998. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 23, 147-154.
- Liepman A. H. e Olsen L. J. 2003. Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis. *Plant Physiol* 131: 215–227.
- Masuda, Y., Nirasawa, S., Nakaya, K. e Kurihara, Y. 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste modifying protein miraculin. *Gene* 161: 175–177.
- Podda A.; Simili M.; Del Carratoreb R.; Mouhayac W.; Morillonc R. e Maserti B. E. 2014. Expression profiling of two stress-inducible genes encoding for miraculin-like proteins in citrus plants under insect infestation or salinity stress. *Journal of Plant Physiology* 171: 45– 54.
- Selvakumar, P., Gahloth, D., Tomar, P. P. S., Sharma, N. e Sharma, A. K. 2011. Molecular Evolution of Miraculin-Like Proteins in Soybean Kunitz Super-Family. *J Mol Evol* 73:369–379.
- Sun H-J, Cui M., Ma B e Ezura H. 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett*; 580:620–6.
- Taler, D., Galperin, M., Benjamin, I., Cohen, Y. e Kenigsbuch D. 2004. Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell*. 16:172-84.
- Tsukuda S., Gomi K., Yamamoto H. e Akimitsu K. 2006. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. *Plant Molecular Biology* 60:125–136.
- Verslues P. E.; Kim Y. S. e Zhu J. K. 2007. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an Arabidopsis glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Mol Biol* 64:205–217.
- Weir T. L., Bais H. P., Stull V. J., Callaway R. M. e Thelen G. C., Ridenour W. M., Bhamidi S., Stermitz F. R., Vivanco J. M. 2006. Oxalate contributes to the resistance of *Gaillardia grandiflora* and *Lupinus sericeus* to a phytotoxin produced by *Centaurea maculosa*. *Planta* 223: 785–795.
- Yu, L.; Jiang, J.; Zhang, C.; Jiang, L.; Ye, N.; Lu, Y.; Yang, G.; Liu, E.; Peng, C.; He, Z. e Peng, X. 2010. Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. *Journal of Experimental Botany* 61:1625–1634.

Apêndice II. Utilização de genes de *C. reticulata* para obtenção de plantas de *C. sinensis* e *N. tabacum* resistentes a *X. fastidiosa* – doutorado sanduíche desenvolvido na Universidade da Flórida

1. Introdução

Um dos genes identificado como envolvido na resposta de defesa de *C. reticulata* contra *X. fastidiosa* está relacionado a sinalização mediada por ácido salicílico. O “S – adenosil – L – metionine: salicylic acid methyl transferase” foi superexpresso 30 dias após inoculação do patógeno em *C. reticulata*, sugerindo que a resistência dessa espécie envolve sinalização mediada por ácido salicílico (SA) (de Souza *et al.*, 2007b). O ácido salicílico está envolvido em diferentes mecanismos de sinalização em plantas, não somente àqueles relacionados a defesa, mas participa de processos como germinação, crescimento celular, regulação da expressão gênica no processo de senescência, resposta a estresse abiótico, entre outros processos (Rate *et al.*, 1999, Rajou *et al.*, 2006, Clarke *et al.*, 2004, Morris *et al.*, 2000). O efeito do SA nesses processos não é necessariamente de maneira direta, uma vez que esse hormônio vegetal pode alterar a síntese de outros hormônios, como ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). SA é um hormônio tão importante para a sinalização em plantas que pode ser produzido por duas vias diferentes a partir de um composto denominado corismato. Corismato pode ser convertido em SA via intermediários de benzoato ou via atividade de enzimas denominadas isocorismato sintases (Strawn *et al.*, 2007). Entretanto, mutantes de *Arabidopsis thaliana* para genes que codificam corismato sintases ainda apresentaram SA residual, indicando que a síntese de SA não é exclusivamente dependente da atividade dessas enzimas (Garcion *et al.*, 2008).

SA está diretamente ligado a um mecanismo de resistência de plantas denominado Resistência Sistêmica Adquirida, ou SAR, que é desencadeado por um ataque local de patógenos e resulta em uma imunização da planta como um todo, inclusive em partes distantes do local do ataque (Ross, 1966). Em tabacos resistentes ao vírus do mosaico do tabaco os níveis de SA aumentaram em mais de 20 vezes no local da infecção e mais de 5 vezes em folhas distais. Tanto em folhas inoculadas quanto nas distais, esse aumento ocorreu paralelamente ou precedeu a expressão de proteínas de defesa, conhecidas como PR (Malamy *et al.*, 1990). Essa imunização

ocorre porque o SA é transportado via floema na forma de um metil éster, MeSA, do tecido infectado até tecidos mais distais, onde é metabolizado e convertido para o sinal biológico ativo, o SA (Mirjana *et al.*, 1998). MeSA é produzido nas plantas através da atividade de uma enzima codificada pelo gene SAMT - “S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid methyltransferase” (Dudareva *et al.*, 1998). Estudos em tabaco demonstraram que plantas que não eram capazes de metabolizar MeSA tiveram SAR reduzida, apresentando lesões maiores após infecção com o vírus do mosaico do tabaco (TMV). Os autores também encontraram altos níveis de MeSA em exudatos de tabaco após a infecção com o vírus, e demonstraram que níveis reduzidos de MeSA conferiram maior suscetibilidade ao TMV. Experimentos de enxertia onde *NtSAMT1* foi silenciado demonstraram que esse gene é requerido para a ativação local de SAR, mas não para a ativação sistêmica. Nesse caso, foi necessária a atividade da enzima MeSA-esterase, que converte MeSA em SA (Park *et al.*, 2007). O envolvimento de MeSA em resposta de SAR também já foi demonstrado para batata onde foi relatado um aumento de níveis de MeSA em folhas de batatas tratadas com ácido aracnóideo e folhas distais não tratadas. Além disso, o bloqueio do acúmulo de MeSA em plantas com o gene *methylesterase1* (*StMES1*) silenciado comprometeu a indução de SAR nesses mutantes (Manosalva *et al.*, 2010).

Além de bactérias e fungos, defesa da planta via ácido salicílico também já foi reportada no caso de nematóides. O nematóide do cisto, *Heterodera glycines* Ichinohe, ataca variedades de soja e dentre elas algumas são resistentes. Já foram identificados alguns loci relacionados a resistência nessas variedades, e em estudos envolvendo expressão diferencial de genes entre variedades resistentes e suscetíveis foi demonstrada a ativação de genes relacionados a via do ácido salicílico nas variedades resistentes. Um desses genes foi o *GmSAMT1*, isolado pelos autores para estudos em variedades de soja suscetíveis. Esse gene foi utilizado para superexpressão em duas variedades suscetíveis de soja ‘Williams 82’ e TN02-275. Depois de obtidas, as raízes dessas plantas transgênicas foram desafiadas com ovos do nematóide do cisto e o desenvolvimento das larvas foi acompanhado. O estágio de desenvolvimento das larvas foi utilizado para avaliação do nível de resistência das raízes e os resultados demonstraram que em ambos os eventos transgênicos foram mais resistentes ao nematóide (Lin *et al.*, 2013).

Portanto, não está claro se o aumento nos níveis de MeSA aumenta SAR, pois essa relação não parece ser tão direta nos diferentes hospedeiros. Alguns estudos demonstraram que nem sempre o acúmulo de MeSA leva ao aumento de SAR, como ocorreu em *A. thaliana*

superexpressando o gene OsBSMT1- “salicylic acid/benzoic acid carboxyl methyltransferase de *Oryza sativa* (Koo *et al.*, 2007). As plantas superexpressando OsBSMT1 quando inoculadas com a bactéria *Pseudomonas syringae* ou com o fungo *Golovinomyces orontii* foram mais suscetíveis que plantas do tipo selvagem, mesmo sendo capazes de acumular altos níveis de MeSA. Quando mutantes superexpressando OsBSMT1 foram colocadas próximas a plantas do tipo selvagem, estas foram capazes de ativar proteínas PR-1. Já nos mutantes superexpressando OsBSMT1 foi relatado um aumento dos níveis de ácido jasmônico, paralelamente a redução dos níveis de SA (Koo *et al.*, 2007). Esses resultados indicam que MeSA além de ser um sinal volátil capaz de ativar SAR em plantas vizinhas, pode ser uma molécula intermediadora do cross-talk entre as vias de SA e JA (Koo *et al.*, 2007). O acúmulo de MeSA e sua posterior perda para a atmosfera também já foi relatado por Attaran *et al.*, 2009. Nesse trabalho os autores demonstraram que MeSA aumenta em folhas inoculadas com a bactéria *P. syringae*, entretanto grande quantidade de MeSA é emitido para a atmosfera e pouco é retido pela folha. Foi demonstrado ainda que em diversos mutantes para genes de defesa, a produção de MeSA e o desenvolvimento de SAR não é coincidente. Em algumas linhagens onde o T-DNA interrompeu a produção de MeSA foi possível avaliar o acúmulo de SA e o desenvolvimento de SAR. Os autores demonstraram que a produção de MeSA induzida por *P. syringae* dependeu da via do ácido jasmônico, e em interações compatíveis a produção de MeSA depende de um fator de virulência de *P. syringae* denominado coronatina, e que o patógeno utiliza a volatilização de MeSA mediada por tal fator para atenuar a via de defesa mediada por SA (Attaran *et al.*, 2009).

Durante a infecção por *X. fastidiosa*, genes relacionados tanto com a via de ácido salicílico como jasmonato foram superexpressos em *C. reticulata* sugerindo que o processo de defesa parece não recrutar apenas uma via. A superexpressão de SAMT nesse conjunto pode ter relação com o cross-talk entre as vias responsáveis pela defesa de *C. reticulata* e por isso foi um gene escolhido para transformação da variedade suscetível, *C. sinensis*.

2. Objetivos específicos

Como demonstrado no Apêndice I, encontramos diversas dificuldades com com as transformações utilizando os vetores pCambia construídos no Brasil. Como uma alternativa encontrada para sobrepor tais dificuldades foi feito um treinamento na Universidade da Florida para o aprendizado de novas estratégias de transformação de citros. O laboratório da Profa. Dra. Gloria Moore, na Universidade da Flórida, tem tradição com metodologias de transformação de citros e por isso foi escolhido para a realização desse treinamento. Durante o período de permanência nesse laboratório os objetivos foram:

- encontrar uma opção diferente de promotor para construção do cassete contendo o gene alvo, como uma alternativa ao uso do 35S
- o aprendizado de uma nova técnica de transformação de citros, que utilizava cotilédones como explantes
- obter plantas de tabaco transformadas com os genes de interesse

3. Materiais e métodos

3.1 Construção dos vetores para transformação

Os genes selecionados para a clonagem sob o domínio de um novo promotor foram S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid methyltransferase (SAMT) e miraculina. A proposta de trabalho com miraculina novamente foi devido a problemas encontrados em ensaios de GUS de brotos regenerados, como demonstrado no Apêndice I.

Para obtenção das novas construções foi utilizado o vetor pUC118FMV/ Poly 2, desenvolvido pelo Dr. Vicente J. Febres, que apresenta o promotor do vírus Mosaico do Figo (FMV) e um terminador do gene 35S. Esse vetor foi interessante na medida em que a clonagem do gene foi feita sob o domínio do promotor FMV, uma alternativa ao uso do promotor 35S que, em alguns casos, pode atrapalhar a superexpressão do gene alvo depois de clonado em vetores da série pCambia. Esse vetor também apresenta enzimas diferentes daquelas presentes no vetor de construção pRT101, sendo outra alternativa para auxiliar na clonagem do gene SAMT, que apresentou problemas na digestão. O mapa do vetor utilizado está demonstrado na **Figura 1**.

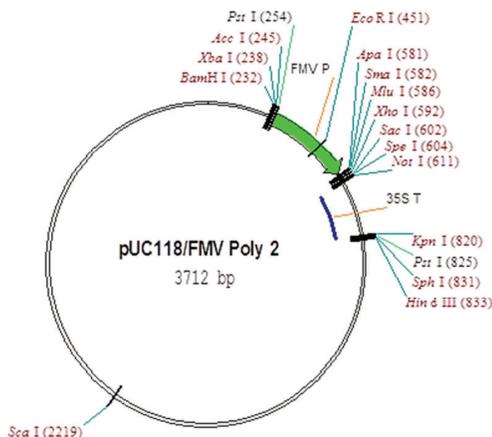


Figura 1: Mapa do vetor pUC118/FMV Poly 2 utilizado para as novas construções dos genes alvo

Os genes de interesse foram amplificados seguindo instruções do kit da enzima de alta fidelidade Advantage2 Polymerase Mix (Clontech). Depois de amplificados os genes foram

separados em gel de agarose 1% e, após excisados do gel, purificados seguindo-se as instruções do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). A fim de se obter uma clonagem direcional, primers foram sintetizados contendo sítios de *ApaI* na posição 5' e *NotI* na posição 3'. A sequência dos primers utilizados e os tamanhos esperados dos fragmentos estão na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para amplificação dos genes alvo e o tamanho esperado dos fragmentos.

Primer	Seqüência (5'- 3')	Tamanho esperado
SAMT-F	TTT TTT GGG CCC ATG GAG GTG GTT CAA GTG CTT CAC	1,1Kb
SAMT-R	TTT TTT GCG GCC GCT CAT CCA ATT TTC GTC AAG GAA	
Tang_Miraculin_F	AAA AAA GGG CCC ATG AAG ATT TCA TTA GCA ACA ACA CT	750pb
Tang_Miraculin_R	AAA AAA GCG GCC GCG ATT ACA CAG ACGTTG ATC TTT CT	
F – primer direto	R – primer reverso	

Após a purificação das sequencias obtidas, foram realizadas as digestões e nova purificação dos fragmentos. Os fragmentos digeridos e purificados foram ligados, utilizando a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) no vetor pUC118/FMV Poly 2 igualmente digerido com *ApaI* e *NotI* e purificado. As novas construções foram transformadas em *E. coli* pelo método de choque térmico (ESPECIFICAÇÕES AQUI). As células foram recuperadas em 1mL 2XYT (16g/L de Bacto Triptone, 10 g/L de Bacto Yeast extract, 5g/L de NaCl, pH7) e crescidas a 37⁰C sob agitação de 250rpm por 1 hora. Os transformantes foram selecionados em placas de meio 2XYT (2XYT com 15g/L de Agar) contendo 100µg/µL de ampicilina e a presença do gene de interesse foi verificada por PCR de colônia utilizando os *primers* específicos desenhados para a amplificação dos genes alvo (Tabela 1). As colônias obtidas foram submetidas a mini prep e os vetores recuperados foram sequenciados para análises de orientação e qualidade das sequências, que foram realizadas utilizando o programa Vector NTI[®] (Life Technologies), para o sequenciamento foram utilizados *primers* universais (F-20 e R-24) e também os *primers* específicos.

Após análise de sequencia dos plasmídeos obtidos, os cassetes de expressão foram digeridos utilizando as enzimas *Xba*I e *Kpn*I. Os fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose 1% e excisados para purificação, que foi realizada como descrito acima. O vetor pCambia 2201 também foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Kpn*I, defosforilado segundo instruções do kit da enzima Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Promega) e purificado. A ligação dos cassetes de expressão e do vetor pCambia também foi realizada com T4 DNA ligase e os vetores foram novamente transformados em *E. coli*, segundo descrito anteriormente. Os transformantes foram selecionados em placas de meio 2XYT contendo 50µg/µL de cloranfenicol e PCR de colônia foi realizada para verificar a presença dos genes alvo. As colônias obtidas foram submetidas a mini prep e os plasmídeos recuperados foram sequenciados utilizando os primers que geraram os genes alvo (Tabela 1) e, no caso de SAMT, o primer interno SAMT_Int_5'CTT ATA GTC TCC AAT GGCTAT CTC 3', para que a qualidade do sequenciamento fosse maior. Os plasmídeos que apresentaram alta qualidade de sequencia foram transformados na linhagem Agl-1 de *A. tumefaciens*, por choque térmico como descrito anteriormente.

As colônias de *A. tumefaciens* transformadas foram selecionadas em placas de meio YEP contendo 300µg/µL de rifampicina, 50µg/µL de cloranfenicol e 50µg/µL de carbenicilina. PCR de colônia foi realizada para avaliar a presença do gene alvo e as colônias positivas foram utilizadas para transformação de *N. tabacum* e *C. sinensis*.

3.2 Transformação de *N. tabacum* e *C. sinensis*

Para a transformação de *N. tabacum*, foi seguido o procedimento descrito no Capítulo 2. A avaliação dos brotos regenerados também foi feita através do teste GUS, uma vez que o vetor pCambia2201 apresenta como repórter o gene *gusA*, que indica a presença de tecido transformado pela coloração azul, e a avaliação da presença do transgene nas plantas transformadas foi feita por PCR utilizando DNA e cDNA como molde, de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 2.

Já a transformação de *C. sinensis* foi realizada utilizando cotilédones como explantes. Essa metodologia começa com o preparo das sementes, que devem ser coletadas diretamente dos

frutos e após tratadas estocadas a 4⁰C. O tratamento das sementes foi realizado com pectinase (SIHA® Pectinase W Liquid) por 1 hora sob agitação, seguido por lavagem com água destilada, lavagem com hipoclorito de sódio 10% por 3 minutos, nova lavagem com água destilada autoclavada, lavagem com etanol 70% por 5 minutos, e após 3 lavagens com água destilada autoclavada, as sementes foram secas em fluxo laminar. Para a transformação, os tegumentos das sementes e os embriões foram retirados com auxílio de pinça e bisturi no fluxo laminar. Os cotilédones, já separados, foram imersos em meio MS líquido para manutenção de sua viabilidade. A cultura de *A. tumefaciens* transformada foi preparada como descrito anteriormente no Capítulo 2, com uma etapa de pré- cultivo durante 16 horas e o cultivo em novo meio de cultura até que a densidade óptica (OD₆₀₀) estivesse entre 0,3 e 06. As células foram recuperadas por centrifugação e a população corrigida para 10⁸ células. Essa cultura foi utilizada para a infecção dos cotilédones, que ocorreu com o auxílio de vácuo durante 15 minutos. Após a infecção, os cotilédones foram secos em papel filtro e colocados no meio de co – cultivo para cotilédones (4,13g/L MS, 100mg/L de Mio-inositol, 0,4mg/L de glicina, 1mg/L de ácido nicotínico, 2mg/L de piridoxina, 2mg/L de tiamina, 1mg/L de naftalenacético (ANA), 1mg/L de cinetina, 2mg/L 6-benzilaminopurina (BAP), 30g/L de sacarose e 8g/L de Agar, pH 5,7). O período de co-cultivo foi realizado por três dias no escuro a 24⁰C, e após isso, os cotilédones foram transferidos para meio de seleção (Meio de co-cultivo contendo 300µg/µL de canamicina e 50µg/µL de claforan). As placas contendo os cotilédones transformados e os controles (aqueles que não foram infectados pela bactéria, mas passaram igualmente pelo procedimento de vácuo) foram transferidas para câmaras de crescimento sob foto período de 18 horas de luz. Algumas etapas do procedimento de transformação por cotilédones estão representadas na **Figura 2**.

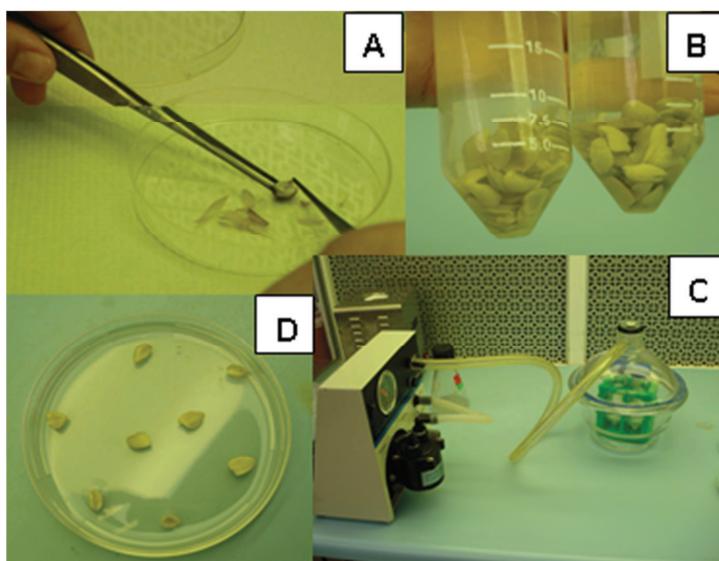


Figura 2: Representação das etapas do protocolo de transformação de citros utilizando cotilédones. **A.** Após esterilização, o embrião e o tegumento das sementes foram retirados e os cotilédones separados. **B.** Infecção dos cotilédones com a cultura de agrobactéria. **C.** Utilização de vácuo por 15 minutos durante o processo de infecção dos cotilédones. **D.** Cotilédones depois de secos organizados meio de co cultivo.

A medida em que os brotos foram se regenerando, eles foram excisados dos cotilédones e um corte transversal da base foi utilizado para o teste GUS. Utilizar esse corte transversal ao invés de pedaços foliares foi interessante porque fornecia informações sobre possíveis brotos quiméricos.

Os brotos que apresentavam alguma coloração azul após o teste foram transferidos para meio de cultura de enraizamento (4,13g/L MS, 100mg/L de Mio-inositol, 0,4mg/L de glicina, 1mg/L de ácido nicotínico, 2mg/L de piridoxina, 2mg/L de tiamina, 0,5mg/L de naftalenacético (*ANA*), 30g/L de sacarose e 8g/L de Agar, pH 5,7), e após o desenvolvimento das raízes foram transferidos para potes contendo substrato. Para os brotos maiores, cujas folhas estavam mais desenvolvidas, foi feita extração de DNA de alguns pedaços de folhas utilizando-se o kit DNAeasy Plant mini (Qiagen), e pequenos pedaços de folhas dos brotos menores foram testados utilizando utilizando REDEExtract – N – Amp Tissue PCR (Sigma), que consiste em uma rápida extração de DNA e posterior PCR. Para a detecção do transgene foi desenhado um novo

conjunto de primers a fim de excluir possíveis ampliações do gene SAMT endógeno presente em Pineapple. As seqüências dos primers sintetizados foram: FMV_SAMT F-GTGGGGACCAGACAAAAAAGGAATG e SAMT_Ter R-CGAAACCCTATAAGAACCCTAATTCCC, que apresenta como resultado a amplificação da montagem completa do gene, contendo o promotor FMV e o terminador, gerando um fragmento de aproximadamente 1800pb. Plântulas positivas foram deixadas no laboratório da professora Gloria Moore, mas posteriormente serão trazidas para o Brasil.

4. Resultados e discussão

4.1 Obtenção dos vetores pCambia contendo os genes alvo

Os genes alvo foram amplificados utilizando-se enzima de alta fidelidade, purificados para posterior digestão com as enzimas *ApaI* e *NotI*. Essas enzimas foram escolhidas para clonagem direcional no vetor pUC118FMV/ Poly 2, que após obtido de *E. coli* por mini prep, também foi digerido com as mesmas enzimas e purificado. Após a amplificação e purificação, os genes alvo apresentaram tamanho de acordo com o predito, como demonstrado na **Figura 3**.

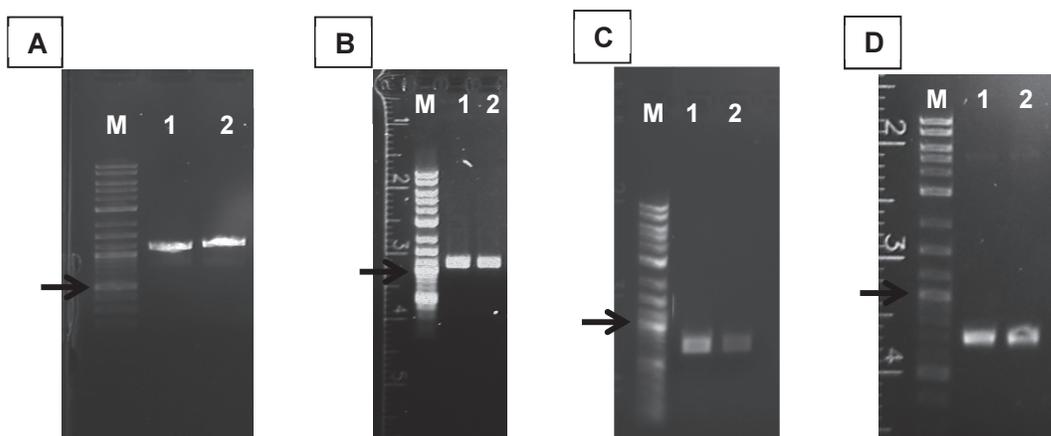


Figura 3: Amplificação e purificação dos genes alvo. **A.** Amplificação de SAMT com a enzima Advantage 2 (Clontech), 1 e 2. Bandas referentes ao gene SAMT, de tamanho esperado 1,1Kb. **B.** Bandas referentes ao gene SAMT após a purificação da digestão com *ApaI* e *NotI*. **C.** Amplificação de Miraculina com a enzima Advantage 2 (Clontech), 1 e 2. Bandas referentes a miraculina, de tamanho esperado 750bp. **D.** Bandas referentes ao gene miraculina após a purificação da digestão com *ApaI* e *NotI*. Em todas as figuras, M refere-se ao marcador 2 Log Ladder (New England Biolabs). As setas indicam bandas de 1Kb.

Após a purificação, os fragmentos correspondentes aos genes alvo foram ligados ao vetor pUC118FMV/ Poly 2 e transformados em *E. coli*. As colônias foram testadas por PCR para avaliação da presença dos genes alvo. A **Figura 4** demonstra os resultados das PCRs de colônia transformadas com SAMT e miraculina.

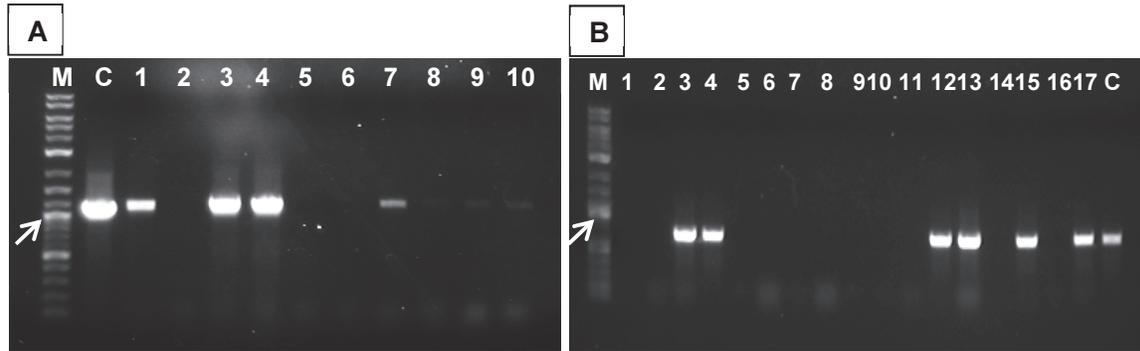
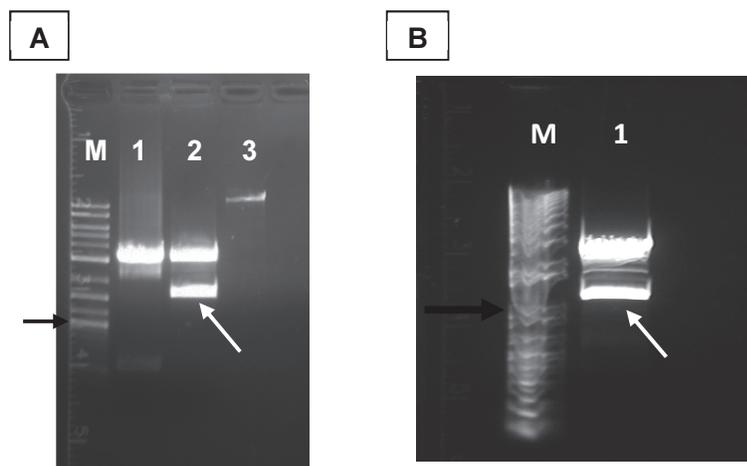


Figura 4: PCR de colônias transformadas com pUC118FMV/ Poly 2 ligado aos genes alvo. **A.** PCR teste para colônias contendo o vetor ligado a SAMT, **M** – Marcador 2 Log Ladder (New England Biolabs), **C** – Controle positivo, **1 a 10** – Colônias transformadas com pUC118FMV_SAMT. **B.** PCR teste para colônias contendo vetor ligado a miraculina, **M** – Marcador 2 Log Ladder (New England Biolabs), **1 a 17** – Colônias transformadas com pUC118FMV_miraculina, **C** – Controle positivo. As setas indicam bandas de 1Kb em ambas as figuras.

Depois da obtenção das colônias transformadas, o vetor construído foi recuperado por mini prep e sequenciado. As análises da qualidade da sequência foram realizadas utilizando o programa Vector NTI (Life Technologies) e após certificação das sequências, os cassetes foram digeridos com *Xba*I e *Kpn*I. Os fragmentos digeridos foram separados do vetor por gel de agarose 1% e após a excisão, foram purificados. A **Figura 5** demonstra os resultados obtidos, bem como o mapa da região do vetor construída utilizando os genes alvo.



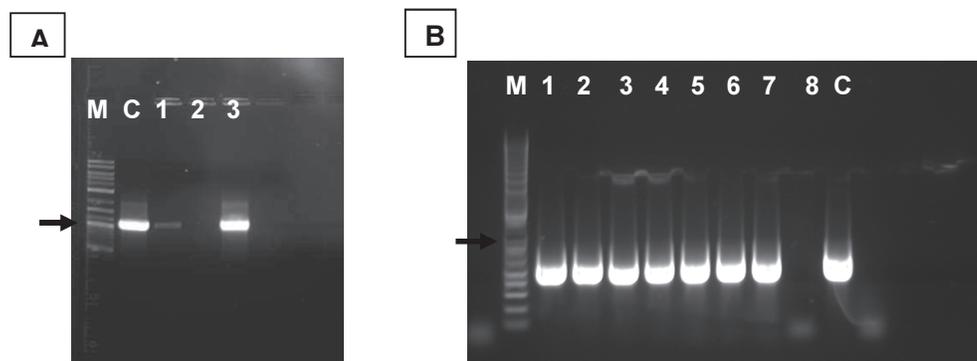


Figura 6: PCR de vetores pCAMBIA2201 transformados com SAMT e miraculina recuperados de *E. coli*. **A.** PCR teste de vetores recuperados de colônias transformadas com pCAMBIA_SAMT; M – Marcador 2 Log Ladder (New England Biolabs); C – Controle positivo; 1 a 3 – vetores pCAMBIA2201 ligados a SAMT. **B.** PCR teste de vetores recuperados de colônias transformadas com pCAMBIA_miraculina; M – Marcador Ladder 1Kb Plus (Invitrogen); 1 a 8 – vetores pCAMBIA ligado a miraculina; C – Controle positivo. As setas indicam bandas de 1Kb em ambas as figuras.

Depois de confirmadas as sequências corretas das construções clonadas em pCAMBIA2201 os vetores foram transformados na linhagem Agl-1 de *A. tumefaciens*. Os transformantes foram selecionados em meio YEP e PCR de colônia para verificação da presença dos genes alvo foi realizada utilizando primers específicos. A **Figura 7** mostra os resultados.

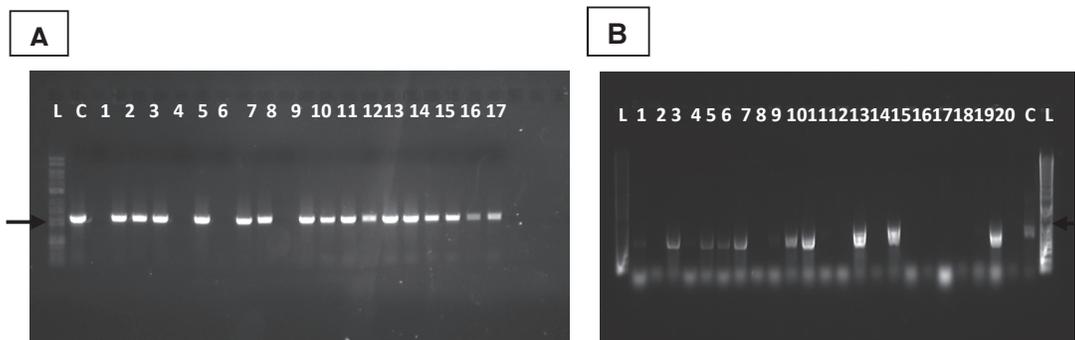


Figura 7: PCR de colônias de agrobactérias transformadas com as construções em pCAMBIA2201. **A.** PCR teste para colônias contendo pCAMBIA_MeSA; L – Ladder 2 log (New England Biolabs); C – Controle positivo; 1 a 20 – colônias Agl1 transformadas com pCAMBIA_MeSA. **B.** PCR teste para colônias contendo pCAMBIA_Miraculina; L – Ladder

1Kb Plus (Invitrogen); **1 a 10** – pCAMBIA_Miraculina; **C** – Controle positivo. As setas indicam bandas de 1Kb em ambas as figuras.

4.2 Transformação das plantas

4.2.1 Plantas de tabaco obtidas

Durante o período na Universidade da Flórida foi realizada a transformação de tabaco, para ensaios futuros. A linhagem RP-1 de *Nicotiana tabaccum* foi selecionada para transformação e para essa etapa as duas construções obtidas foram utilizadas. A transformação de tabaco foi feita segundo o protocolo citado no Capítulo 2. A Tabela 2 abaixo mostra os eventos de transformação em tabaco.

Tabela 2 - Eventos de transformação em tabaco utilizando as duas construções obtidas

Evento	Data	N ^o de explantos infectados	Brotos testados	GUS positivos	GUS positivos enraizados	GUS positivos no solo	DNA positivos
SAMT	11/10/2011	98	90	27	27	8	2
SAMT	17/10/2011	66	93	17	17	6	1
SAMT	18/01/2012	101	101	23	23	12	1
miraculina	05/06/2012	187	-	-	-	-	-

De acordo com os resultados da Tabela 2 foi possível observar que ao final do período na Universidade da Flórida foram obtidos 4 eventos de tabaco transformados com o gene SAMT, embora a construção contendo miraculina também tenha sido utilizada. A eficiência de transformação de tabacos com o vetor contendo SAMT foi de 1,4%, já que dos 284 brotos regenerados 4 foram PCR positivos. Algumas etapas da obtenção das plantas de tabaco estão demonstradas na Figura 8.

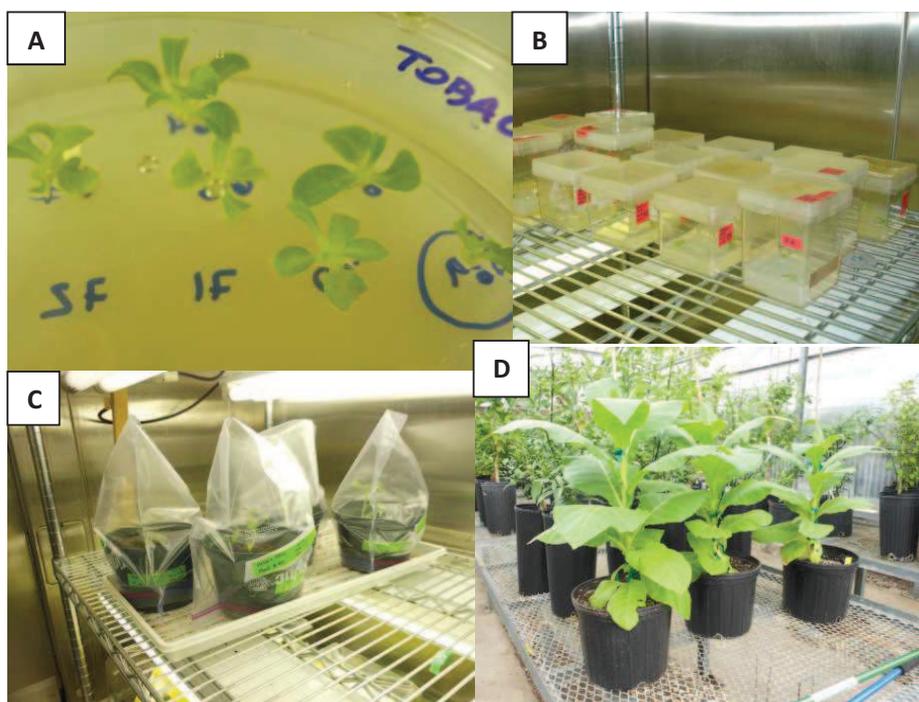


Figura 8: Representação das etapas de obtenção das plantas de tabaco na Universidade da Flórida. **A.** Brotação separada dos explantes para o teste GUS. **B.** Brotos GUS positivos enraizados em meio de cultura até atingirem um tamanho ideal de raiz e parte aérea. **C.** Brotos GUS positivos em vasos para um maior desenvolvimento foliar para os testes de validação da presença do gene alvo. **D.** Plantas que apresentaram a banda referente ao gene alvo em casa de vegetação.

Para a validação da presença do gene alvo nas plantas GUS positivas foi realizada a extração de DNA e posterior PCR para detecção do gene alvo. Aquelas que apresentaram banda referente ao gene alvo foram submetidas a extração de RNA e síntese de cDNA. Para as PCRs de tabaco, foram utilizados os primers específicos para o gene SAMT, como controle negativo DNA e cDNA de uma planta negativa após o teste GUS e como controles positivos, diluições dos vetores usados para a transformação. A Figura 9 mostra os resultados obtidos.

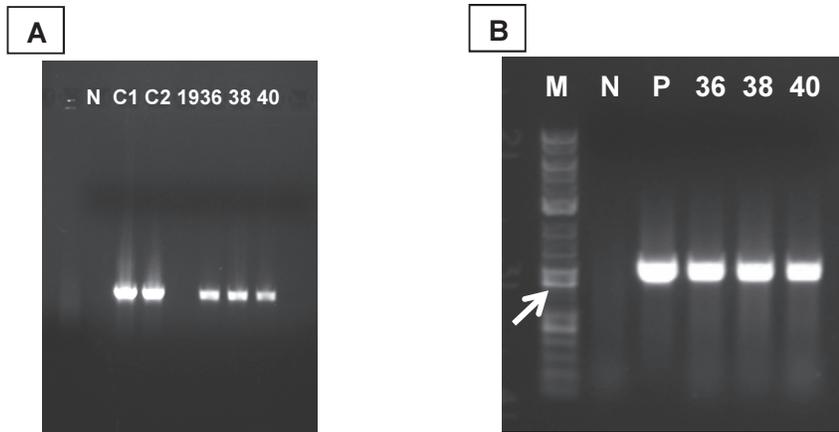


Figura 9: Resultado da PCR utilizando DNA e cDNA de plantas de tabaco enraizadas e transformados com a construção contendo o gene SAMT. **A.** PCR utilizando DNA de tabacos transformados; N, C1 e C2 – controles negativos, positivo 1 e positivo 2, respectivamente; 19, 36, 38 e 40 – plantas testadas. **B.** PCR de cDNA das plantas positivas para o teste anterior. M – Marcador 2-Log Ladder (New England Biolabs); N e P – controles negativo e positivo, respectivamente; 36, 38 e 40 - plantas positivas do primeiro teste. A seta indica banda de 1Kb.

As sementes das quatro plantas positivas de tabaco foram coletadas e trazidas ao Brasil para a continuidade dos experimentos, que envolverão o desafio dessas plantas contra *X. fastidiosa* e análises da expressão de genes da via de SA e JA possivelmente ativados devido a superexpressão do SAMT.

4.2.2 Plantas de citros obtidas

O novo protocolo aprendido baseava-se na utilização de cotilédones de citros como explantes para transformação. O processo de transformação por cotilédones é mais rápido, uma vez que as etapas de germinação de sementes e período de luz não são realizadas. Isso acelera o procedimento de transformação em aproximadamente 30 dias. Os eventos de transformação e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Eventos de transformação de citros e resultados obtidos.

Evento	Data	Nº de explantes infectados	Brotos testados	GUS positivos	GUS positivos enraizados	GUS positivos no solo	DNA positivos
SAMT	28/09/2011	36	27	3	3	0	0
SAMT	05/10/2011	55	53	7	7	1	0
SAMT	18/10/2011	108	15	3	7	0	0
SAMT	29/11/2011	86	19	4	4	4	0
SAMT	30/11/2011	80	31	3	3	1	0
SAMT	02/12/2011	61	34	5	5	4	0
SAMT	15/03/2012	91	16	9	9	8	0
SAMT	23/03/2012	63	4	0	0	0	0
SAMT	28/03/2012	64	5	2	2	2	1

De acordo com os dados da tabela, a eficiência da transformação de citros utilizando cotilédones foi de 0,49%, sendo que de 204 brotos regenerados apenas 1 foi positivo.

A brotação regenerada a partir de cotilédones é bastante vigorosa, apresentando na maioria das vezes mais de um broto por cotilédone. Outra diferença com relação ao protocolo de transformação por epicótilos diz respeito ao enraizamento dos brotos oriundos dos cotilédones. Esse brotos não foram microenxertados, mas sim enraizados em meio de cultura e posteriormente transferidos para o solo. A Figura 10 representa algumas das etapas de obtenção dos brotos de citros.

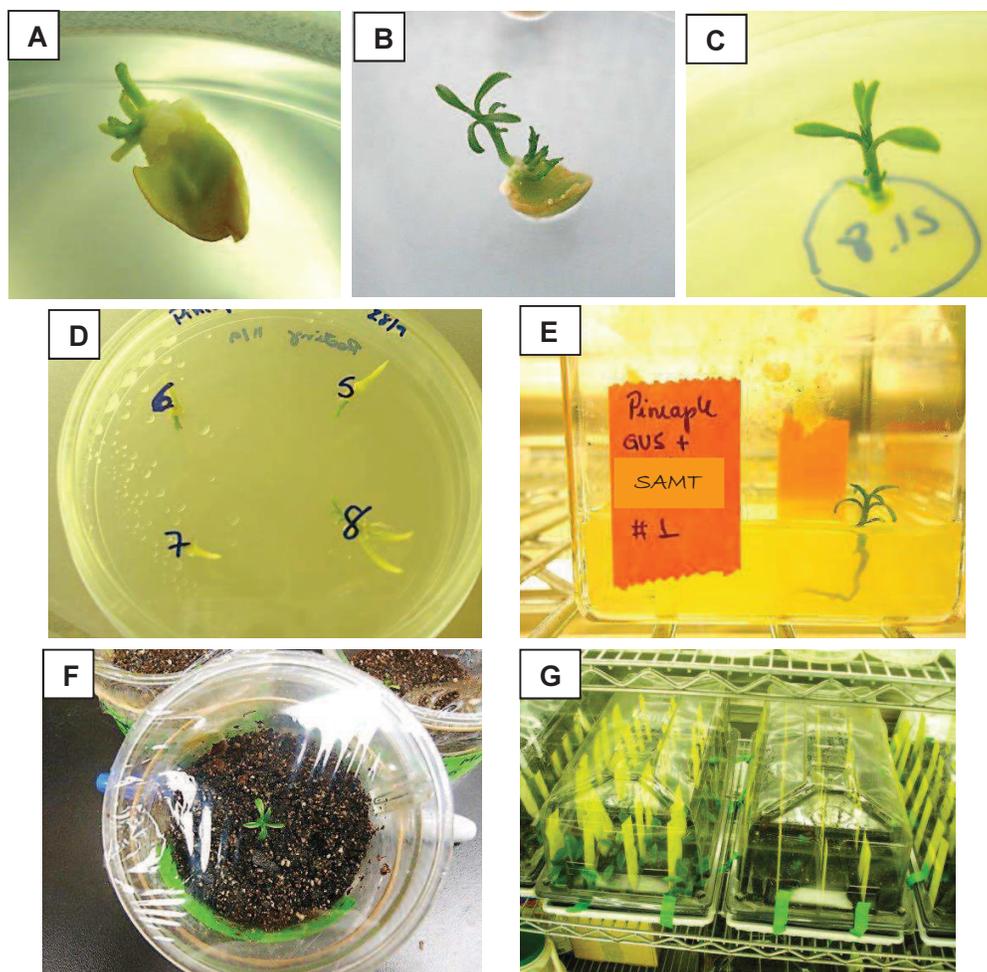


Figura 10: Representação das etapas de obtenção dos brotos de citros. **A e B.** Brotação regenerada após infecção com agrobactéria. **C.** Os brotos foram separados dos cotilédones para teste da presença do gene GUS e colocados em meio de enraizamento. **D e E.** Brotos GUS positivos em meio de enraizamento até o desenvolvimento de raiz. **F e G.** Brotos com raízes desenvolvidas foram passados para substrato e após desenvolvimento foliar foram testados para validação da presença do gene alvo.

Os brotos enraizados e transferidos para o solo foram testados para presença do gene alvo. Extrações de DNA foram realizadas de diferentes métodos de acordo com o tamanho das folhas a serem testadas. Para a detecção do transgene foi utilizado o novo conjunto de primers que amplificava a montagem completa do gene, contendo o promotor FMV e o terminador, gerando um fragmento de 1800pb. A Figura 11 mostra o resultado da PCR dos brotos pequenos.

Como controle positivos foi utilizado DNA validado de tabaco transformado com a mesma construção.

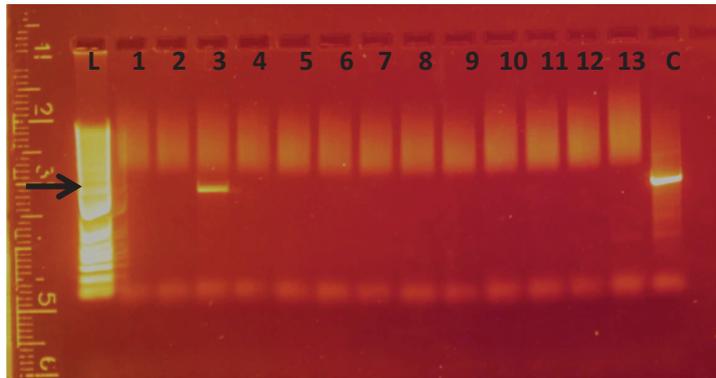


Figura 11: Resultado da PCR de brotos transformados com o gene SAMT. L – Ladder 1Kb plus (Invitrogen), 1 e 2 – controles negativos. 3 a 13 - brotos GUS positivos testados para a presença do gene alvo. C – controle positivo. A seta indica banda de 2Kb.

De acordo com a Figura 11 foi possível obter banda referente ao cassete de expressão no poço 3, correspondente a um dos brotos transformados e positivos para o teste GUS.

Atualmente, essa planta está mais desenvolvida e após esses testes, a equipe do laboratório da Prof. Gloria certificou, pelo método de southern blot, mais uma planta transgênica. A figura 12 demonstra o aspecto atual das plantas.



Figura 12: Aspecto atual das plantas transformadas com o gene SAMT.

5. Considerações finais

- A alteração utilização do promotor FMV para clonagem dos genes alvo permitiu a transformação de tabaco e de citros
- Mesmo sob o domínio desse novo promotor, não foi possível obter transformantes com o gene miraculina
- O protocolo de transformação por cotilédones é mais rápido, uma vez que as etapas de brotação e fotoperíodo, anteriores à transformação não são realizados
- A brotação regenerada de cotilédones é mais vigorosa sendo mais fácil para etapas de microenxertia
- O processo de enraizamento dos brotos é muito lento, não favorecendo a obtenção de plantas mais desenvolvidas em menor tempo
- As sementes de tabacos transgênicos trazidas para o Brasil serão germinadas e desafiadas contra *X. fastidiosa*.
- Para transformações futuras utilizando genes da própria planta seria melhor a utilização de promotores alternativos ao 35S, principalmente se o vetor binário utilizado for algum daqueles pertencentes à série Cambia, que já apresentam genes sob o domínio desse promotor.
- Foi mais fácil transformar as plantas alvo com o gene isolado da bactéria, uma vez que a transformação com genes isolados de *C. reticulata* apresentaram menor eficiência.

Bibliografia consultada

- Attaran E., Zeier T. E., Griebel T. e Zeier J. 2009. Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling Are Not Essential for Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 954–971
- Clarke S. M., Mur L. A. J., Wood J. E. e Scott I. M. 2004. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38:432–47
- Dudareva N., Raguso R. A., Wang J., Ross J. R. e Pichersky E. 1998. Floral Scent Production in *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* 116: 599-604.
- Garcion C., Lohman A., Lamodièrre E., Catinot J., Buchala A., *et al.* 2008. Characterization and biological function of the *ISOCHORISMATE SYNTHASE 2* gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 147:1279–87
- Koo Y. J., Kim M. A., Kim E. H., Song J. T., Jung C., Moon J. K., Kim J. H., Seo H. S., Song S. I., Kim J. K., Lee J. S., Cheong J. J. e Choi Y. D. 2007. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 64:1-15.
- Lin, J., Mazarei, M., Zhao, N., Zhu, J. J., Zhuang, X., Liu, W., Pantalone, V. R., Arelli, P. R., Stewart Jr C. N. e Chen F. 2013. Overexpression of a soybean salicylic acid methyltransferase gene confers resistance to soybean cyst nematode. *Plant Biotechnology Journal* 11: 1135–1145.
- Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F. e Raskin I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002–4
- Manosalva P. M., Park S.W., Forouhar, F., Tong, L., Fry, W. E., e Klessig, D. F. 2010. *Methyl Esterase 1 (StMES1)* is required for systemic acquired resistance in potato. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 23: 1151–1163.
- Mirjana S., Shulaev V. e Raskin I. 1998. Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants. *Plant Physiol.* 116: 387–392.
- Morris K., Mackerness S. A. H., Page T., John C. F., Murphy A. M., *et al.* 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23:677–85.
- Park S. W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S. e Klessig D. F. 2007. Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance *Science* 318: 113-116.
- Rajou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., *et al.* 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* 141:910–23

Rate D. N., Cuenca J. V., Bowman G. R., Guttman D. S. e Greenberg J. T. 1999. The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11:1695–708

Ross, A. F. 1966. “Systemic effects of local lesion formation,” in *Viruses of Plants*

Strawn M. A., Marr S. K., Inoue K., Inada N., Zubieta C., *et al.* 2007. *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J. Biol. Chem.* 282:5919–33

Anexo I: Curva de crescimento de *X. citri* isoladas de folhas não destacadas de plantas transgênicas e do tipo selvagem inoculadas.

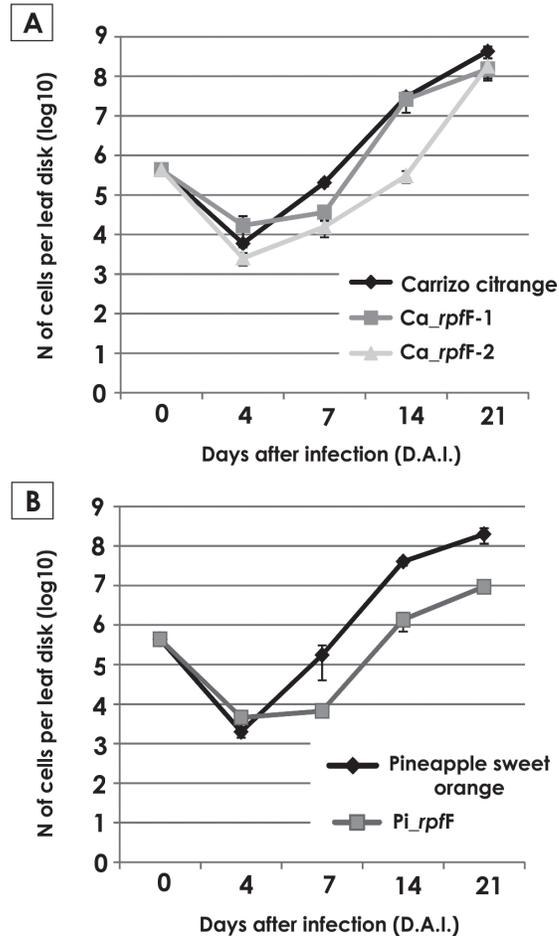


Figure 1: *X. citri*_GFP growth curves after isolation from infiltrated bacteria in undetached leaves. Leaves were infiltrated in planta with 10^4 cells and evaluated at 4, 7, 14 and 21 days after inoculation. A. Growth curve of *X. citri*_GFP in Carrizo citrange WT and transgenic plants. B. Growth curve of *X. citri*_GFP in Pineapple sweet orange WT and transgenic plant. The standard deviation bar represents the mean of three repetitions.

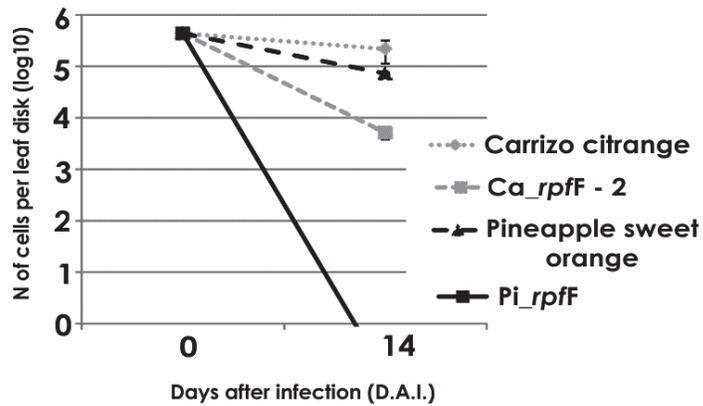


Figure 2: Bacterial population analysis of *X. citri*_GFP isolated from infiltration in undetached leaves. Sample disks for isolation were collected at 14 days after infiltration away of lesion area. Serial dilution of isolations was made from Carrizo citrange and Pineapple sweet orange WT and transgenic plants. Results are means of three repetitions. The bars indicate the standard deviation of the means.

Anexo II: Sintomatologia de cancro cítrico desenvolvida em folhas não destacadas de plantas transgênicas e do tipo selvagem inoculadas com *X. citri*.

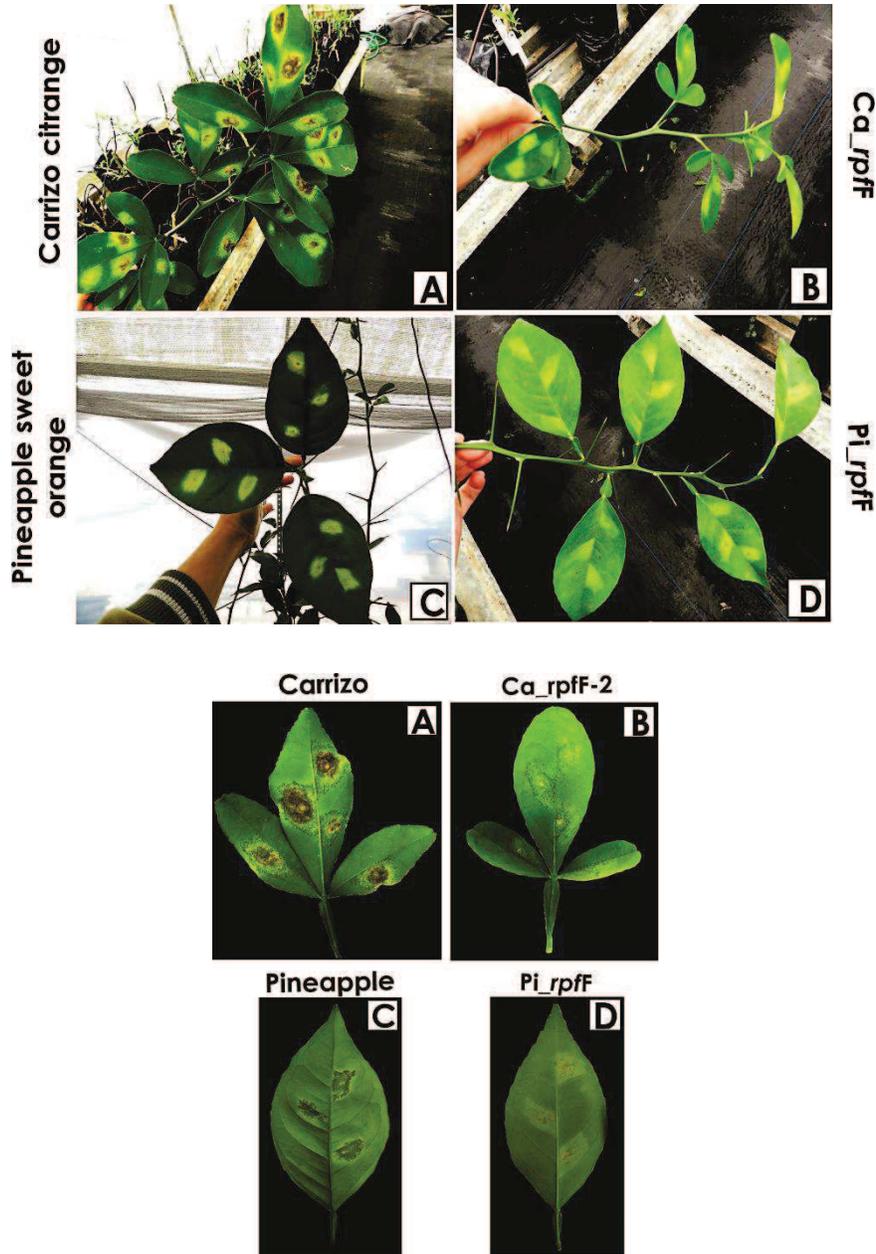


Figure 1: Citrus canker symptoms in plant leaves. *X. citri* *GFP* was infiltrated in WT and transgenic leaves from whole plants. Leaves were collected for photography records at 21 days after inoculation (D.A.I.). Carrizo citrange and Pineapple sweet orange WT and transgenic leaves are indicated in the picture.

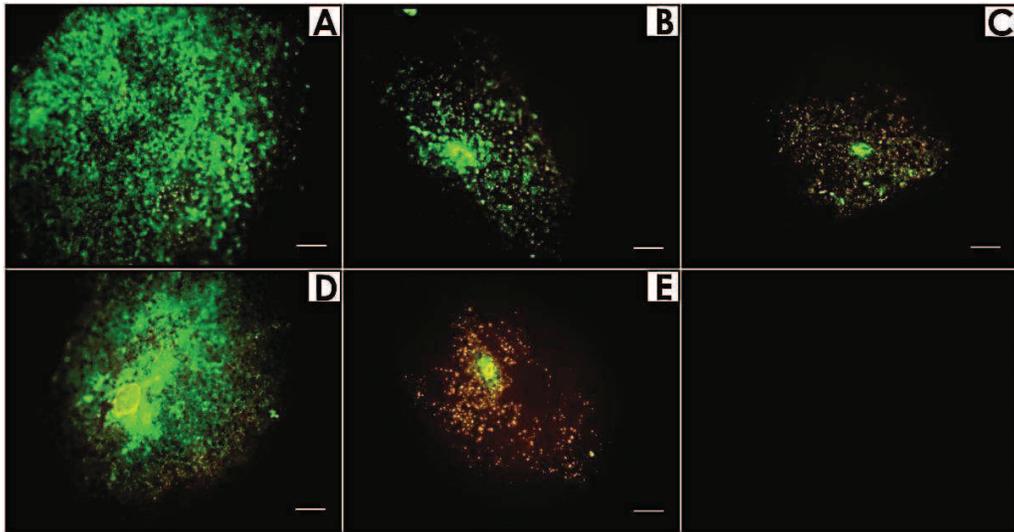


Figure 2: Microscopy analysis of citrus canker lesions after infiltration of *X. citri*_GFP into undetached leaves. *X. citri*_GFP was infiltrated in leaves of WT and transgenic plants and evaluated at 21 days after inoculation (D.A.I.) under fluorescence microscopy. Panel **A** represents Carrizo citrange wild type, **B** and **C** represents *Ca_rpfF*-1 and *Ca_rpfF* -2, respectively. Panel **D** represents Pineapple sweet orange wild type and panel **E** represents *Pi_rpfF*. Green labeling refers to *X. citri* GFP.

Conclusões gerais

- ✓ Transgenia utilizando genes candidatos isolados de *C. reticulata* foi mais difícil, resultando em duas plantas do cultivar Pineapple de laranja doce transformadas, e de 4 plantas do acesso RP-1 de *N. tabacum*. Por outro lado, o gene *rpfF* isolado de *X. fastidiosa* foi inserido com sucesso em diferentes cultivares de citros e no acesso RP-1 de *N. tabacum*, resultando na obtenção de várias matrizes transgênicas.
- ✓ *N. tabacum* foi um bom modelo para avaliação de respostas conferidas por genes candidatos contra *X. fastidiosa*, e no caso de plantas transformadas com *rpfF*, os resultados obtidos em tabaco foram corroborados em citros.
- ✓ DSF produzido pelas plantas transgênicas se demonstrou uma molécula plástica, atuando como antagonista ou agonista dependendo do patógeno.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Genes Derivados da Planta e do Patógeno: Diferentes Abordagens em Transgenia Visando Resistência à *Xylella fastidiosa* em *Citrus sinensis*".

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

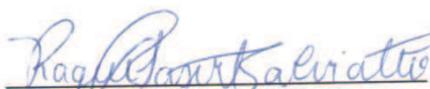
Tem autorização da seguinte Comissão:

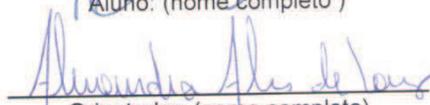
(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança. O trabalho de doutorado acima mencionado foi originado do projeto intitulado: " Estudo funcional de genes de *Citrus reticulata* associados a resistência a clorose variegada dos citros através da superexpressão em *Citrus sinensis* e *Arabidopsis thaliana*", desenvolvimento no Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.


Aluno: (nome completo)


Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dra. HELIANA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA
Presidente
CIBioIB-UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido