

TIAGO SILVA OLIVEIRA

**“EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DO ÁCIDO SALICÍLICO
EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ‘*CANDIDATUS*
LIBERIBACTER SPP.’, AGENTE DO *HUANGLONGBING*
DOS CITROS”**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TIAGO SILVA OLIVEIRA



**“EXPRESSÃO DE GENES DA VIA DO ÁCIDO SALICÍLICO EM
RESPOSTA À INFECÇÃO POR ‘CANDIDATUS LIBERIBACTER
SPP.’, AGENTE DO HUANGLONGBING DOS CITROS”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
TIAGO SILVA OLIVEIRA
M. Machado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Dr. Marcos Antonio Machado

CAMPINAS,

2013

i

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

OL4e Oliveira, Tiago Silva, 1987-
Expressão de genes da via do ácido salicílico em resposta à infecção por "*Candidatus Liberibacter spp.*", agente do huanglongbing dos citros / Tiago Silva Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcos Antonio Machado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cítricos. 2. Huanglongbing. 3. Relação planta-patógeno. 4. Ácido salicílico. 5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Machado, Marcos Antonio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expression of genes of salicylic acid pathway in response to "*Candidatus Liberibacter spp.*", causal agent of citrus huanglongbing

Palavras-chave em inglês:

Citrus

Huanglongbing

Plant-pathogen relationships

Salicylic acid

Real-time polymerase chain reaction

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcos Antonio Machado [Orientador]

Michel Georges Albert Vincentz

Fábio Tebaldi Silveira Nogueira

Data de defesa: 13-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 13 de junho de 2013

BANCA EXAMINADORA

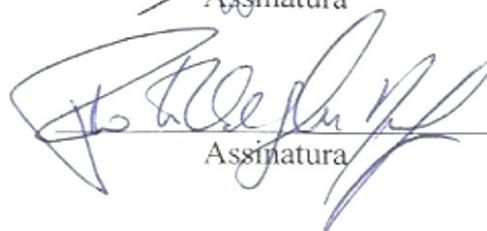
Dr. Marcos Antonio Machado (orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Tebaldi Silveira Nogueira


Assinatura

Dra. Camila Caldana

Assinatura

Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Universidade Estadual de Campinas pelo acolhimento, oportunidades, aprendizado e vivência; ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira (Instituto Agrônômico de Campinas), pela possibilidade de realizar estudos junto a grupos de pesquisa de excelência em citros; a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e ao INCT citros, pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço ao Dr. Marcos Antonio Machado, pela sua orientação durante o processo de desenvolvimento deste projeto, pelo acolhimento e apoio.

Agradeço a Dra. Juliana Freitas-Astúa pela co-orientação, por todo apoio e ensinamentos que foram importantes para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à banca examinadora, aos Professores Michel Georges Albert Vincentz e ao professor Fábio Tebaldi Silveira Nogueira pelas considerações e sugestões.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Biologia e do Centro de Citricultura Sylvio Moreira.

A todos os meus colegas de laboratório, pela relação de carinho e respeito, bem como as sugestões e discussão de trabalho: Leonardo Boava, Valéria Mafra, Silvia Dorta, Cíntia Sagawa, Inaiara Souza, Laís Granato, Diogo Maciel, Simone Picchi, Rosângela Inui, Willian Eduardo, Guilherme Fachini, Marcus Silva, Carolina Sardinha, Carolina Munari, Raquel Caserta, Andréia Nunes, Gabriela Arena, Marcela Bergamini, Meire Sommer, Reinaldo; em especial a Luciane Coerini por toda ajuda e ao João Paulo Marques, pelo aprendizado com as análises de microscopia.

Agradeço a Karine, Fausto, Laura, Michèle e Diogo, pela companhia, carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos meus pais, Luís e Bernadete; aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho, compreensão e por todo apoio que me permitiram vencer barreiras.

“Expressão de genes da via do ácido salicílico em resposta à infecção por ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’, agente do *Huanglongbing* dos citros”

Huanglongbing dos citros (HLB), também conhecido como *greening*, é uma das doenças mais destrutivas na citricultura mundial. Três espécies de bactérias biotróficas limitadas ao floema estão associadas ao HLB. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (*CaLas*) e ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ (*CaLam*) são as duas espécies encontradas no Brasil. Os sintomas da doença se manifestam tardiamente e resultam na depreciação dos frutos e na morte da planta. Nenhuma fonte de resistência foi ainda encontrada, embora espécies tolerantes sejam conhecidas. A análise transcricional pode fornecer importante informação sobre genes candidatos visando à obtenção de variedades resistentes. O ácido salicílico (SA) é o hormônio que desempenha papel importante na defesa contra patógenos biotróficos. O objetivo deste estudo foi o de realizar uma análise transcricional em *time-course* de genes associados à via do SA em espécie tolerante [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] (trifoliata) e suscetível [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] (laranja doce) em resposta a infecção por ‘*CaLas*’ e ‘*CaLam*’ em experimentos independentes. Plantas foram inoculadas com borbulhas infectadas e plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. O RNA total foi isolado a partir de tecidos foliares, coletados sete e 30 dias após inoculação e no estágio de sintomas iniciais de HLB. A detecção de transcritos foi feita através de RT-qPCR, e as análises de expressão gênica calculada utilizando o programa GenEx. Avaliações de microscopia foram conduzidas para analisar a associação do acúmulo de calose à via do SA e à sintomatologia. Foi observado que o perfil de expressão genica foi similar, tanto nos genótipos suscetíveis quanto nos tolerantes. Genes associados à modificação/transporte do SA, como a metiltransferase *BSMT1*, apresentaram níveis significativos de expressão em laranja doce. Genes relacionados à biossíntese foram menos expressos e genes *downstream* da via de resposta, como *PR2*, foram induzidos significativamente. Os resultados sugerem que a bactéria desencadeia importantes alterações na via do SA reduzindo o acúmulo dos sinais de defesa *downstream* da via. Por outro lado, o acúmulo de calose parece atuar como uma resposta de defesa primária à infecção e que o colapso dos vasos do floema pode exercer maior impacto sobre o desenvolvimento dos sintomas associados ao bloqueio do fluxo de seiva.

“Expression of genes of salicylic acid pathway in response to ‘*Candidatus Liberibacter spp.*’, causal agent of citrus Huanglongbing”

Citrus *Huanglongbing* (HLB), formerly known as greening, is a highly destructive disease in many citrus growing areas. HLB is caused by three different phloem limited biotrophic bacteria. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (*CaLas*) and ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ (*CaLam*) are the two species found in Brazil. Plant symptoms are late exhibited, although it results from fruit depreciation to the plant death. No source of resistance has been reported yet, albeit some tolerant citrus species are known. Thus, gene transcriptional analysis could provide important information about candidate genes for HLB resistance. Salicylic acid (SA) pathway is the most prevalent plant hormone associated to plant defense against biotrophic pathogens. The objective of this study was a transcriptional time-course analysis of SA pathway using tolerant (*Poncirus trifoliata*) (*trifoliata*) and susceptible (*Citrus sinensis*) (sweet orange) plants in response to ‘*CaLas*’ and ‘*CaLam*’ infection in different experiments. Plants were inoculated through grafting with infected budwoods. Non inoculated plants were used as healthy control. Total RNA was isolated from leaf tissues, collected seven and thirty days after inoculation (dai), and in symptoms stage. Transcript detection was done through RT-qPCR, and the gene expression analysis was calculated with GenEx software. Microscopy analysis was done to evaluate the association of callose deposition to the plant SA pathway and symptomatology. It was observed that the overall expression profile of tolerant and susceptible plants was similar. Genes associated to SA modification/transport, such as SA methyltransferase, had significant expression level through time-course. Biosynthesis related genes were gradually less expressed, and the downstream genes, as *PR2*, had significant level of expression. Results suggest that the bacteria trigger important alteration in salicylic acid pathway that reduces the defense signal accumulation downstream the hormone pathway. In the other hand, callose deposition seems to be a primary defense response to *Liberibacter* infection, and phloem cells collapse could be more important in HLB symptomatology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Huanglongbing (ex-Greening)</i>	13
2.1.2 Caracterização do patógeno.....	14
2.1.3 Transmissão do HLB	16
2.1.4 Sintomas do HLB.....	17
2.1.5 Detecção do patógeno	18
2.1.6 Manejo do HLB	19
2.2 Interação planta-patógeno.....	20
2.2.1 Sistema imune vegetal.....	20
2.2.2 Fitormônios e resistência sistêmica adquirida (SAR)	23
2.2.3 Calose na defesa contra patógenos	28
3 JUSTIFICATIVA.....	30
4 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral	30
4.2 Objetivos específicos	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material biológico e condições experimentais	32
4.2 Extração de RNA	33
4.3 Síntese de cDNA.....	34
4.4 Desenho e validação de <i>primers</i>	34
4.5 Seleção de genes de referência	35
4.6 Forma de análise dos dados.....	41
4.7 Análises de microscopia.....	41
6 RESULTADOS	43
6.1 Experimento de desafio com HLB	43

6.2 Seleção de genes de referência	45
6.3 Análises de expressão gênica	46
6.4 Análises de microscopia.....	53
7 DISCUSSÃO	57
7.1 Regulação da via do ácido salicílico e SAR.....	60
7.2 Sinalização <i>upstream</i> da via do ácido salicílico	60
7.3 Biossíntese do ácido salicílico	62
7.4 Metabolismo do ácido salicílico	64
7.5 Reguladores <i>downstream</i> da via do ácido salicílico	68
7.5.1 Reguladores NPR	68
7.5.2 Proteínas PR.....	68
7.5.3 Fatores de transcrição WRKY	69
7.6 Respostas associadas.....	69
8 CONSIDERAÇÕES.....	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

Apesar de estar presente no Brasil desde períodos coloniais, o cultivo de citros só começou a ganhar notoriedade no início do século XX, impulsionada pela crise da economia cafeeira. A princípio se sobressaíam os estados de São Paulo e Rio de Janeiro na produção da fruta, embora outros estados também contribuíssem para produção e comercialização em menor escala (DONADIO *et al.*, 2005; HASSE, 1987).

A citricultura paulista e carioca desde o início se destacaram na produção do citros para suprir as demandas do mercado externo. Com a participação dos Estados no cenário mundial da citricultura, o país se tornou, durante a década de 1920, o quinto maior produtor mundial da fruta, superado apenas pelos Estados Unidos (EUA), Espanha, Japão e Itália (BOTEON; NEVES, 2005).

Em decorrência da segunda guerra mundial, o país enfrentou uma crise de preços no setor, além do surgimento de doenças, como a tristeza e cancro, que favoreceram a redução dos tratos culturais e redução da área cultivada. A virose da tristeza só veio a ser controlada com a utilização de porta-enxertos tolerantes a doença. No caso do cancro, um controle efetivo só veio a ser alcançado a partir da década de 1970, com a criação do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) (HASSE, 1987).

A citricultura carioca não conseguiu superar a crise pós-guerra. Por outro lado, a citricultura paulista desde a década de 1960 apresentou contínuo aumento de produtividade, agora com foco comercial de fruta fresca para a produção de matéria-prima voltada à indústria, consolidando o estado, na década de 1980 até os dias atuais, como maior polo citrícola nacional e mundial. Entre as décadas de 1980 e 90, houve excedentes de oferta da *commodity*, entretanto, a demanda desproporcional ao volume produzido gerou quedas significantes das cotações internacionais do produto e dos preços recebidos pelos citricultores paulistas (HASSE, 1987; BOTEON; NEVES, 2005).

Nas últimas décadas, a citricultura paulista e brasileira veem enfrentando altos e baixos, em decorrência, dentre outros fatores, da falta de tratos culturais, substituição dos pomares por outras culturas e relação comercial entre o produtor e a indústria. A fim de

contornar estes problemas, o aumento da produtividade e a busca por novos mercados têm sido fatores importantes para manter a liderança da citricultura paulista no cenário mundial. Grande parte do mercado do citros brasileiro é destinada às indústrias produtoras de suco. Desta forma, a cadeia citrícola que tem como eixo o produtor, a indústria e o consumidor, é responsável pela geração de empregos e movimento da economia das zonas produtoras (BOTEON; NEVES, 2005).

Uma das maiores barreiras que afeta a produção e exportação da *commodity* é a incidência de doenças nos pomares. O surgimento de novas doenças (cancro cítrico, leprose, huanglongbing, dentre outras) nas últimas décadas constitui um risco econômico ao setor citrícola e potencial comprometedor do status de produtividade do país.

O *huanglongbing* (HLB) ex. *greening* é uma das doenças mais severas dos citros embora tenha sido detectada no Brasil em 2004, no município de Araraquara (São Paulo). Alertas tinham sido feitos sobre os riscos para a cultura, caso a doença fosse introduzida no país:

Existe outra doença dos citros, felizmente não presente no Brasil, mas cuja introdução poderia acarretar prejuízos de tal monta que, em associação com as doenças já existente no país, tornaria a produção dos citros antieconômica em nosso meio com o passar dos anos (MULLER *et al.* 1986).

De ocorrência mundial, o HLB é atualmente conhecido como uma das doenças mais severa do citros. O HLB tem importantes consequências sobre a produção de laranja e preço do suco no mercado internacional, e aumento dos custos de produção em decorrência utilização de defensivos (BOVÉ, 2006).

No Brasil, o HLB está presente nos Estados de São Paulo, sul do Estado de Minas Gerais e norte do Estado do Paraná (BASSANEZI *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2010). Tendo em vista medidas de controle da doença nos pomares e também regionalmente, o

Ministério da Agricultura estabeleceu algumas regras de manejo através de instruções normativas (IN53/2008).

O HLB é uma doença de provável origem na China, cujos primeiros relatos foram feitos no início do século XX. Durante muito tempo a natureza do patógeno permaneceu desconhecida, tendo sido considerado como vírus ou micoplasma devido aos seus sintomas. Apenas na década de 1980 confirmou-se a agente etiológico como sendo uma bactéria Gram negativa. Três espécies de bactérias fastidiosas, restritas ao floema, estão associadas à doença: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, *CaLas* (Ásia e Américas), ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’, *CaLaf* (África) e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, *CaLam* (Brasil). A primeira é responsável pela forma mais severa da doença, com sintomas que evoluem lentamente, mas que, em estágios avançados resultam no definhamento e morte da planta. Todas desenvolvem uma relação biotrófica com as plantas hospedeiras.

Esforços têm sido feito a fim de estabelecer metodologias de cultivo da bactéria em laboratório, entretanto, até o momento pouco sucesso tem sido obtido, e os poucos procedimentos já divulgados são de difícil reprodutibilidade. Este é um dos empecilhos que dificultam o estudo dos mecanismos de patogenicidade da bactéria.

Dentre as espécies dos citros, grande parte se apresenta suscetível ao patógeno, sendo poucas consideradas tolerantes, e nenhuma resistência identificada (FOLIMONOVA *et al.*, 2009). *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. é uma das espécies consideradas tolerantes a doença, cujos sintomas se expressam de forma indefinida, além disso, em estágios tardios de infecção, comparado a outros hospedeiros, apresentam baixas concentrações da bactéria.

Geralmente utilizado como porta-enxerto, o trifoliata apresenta resistência a muitos agentes patogênicos, como gomose de *Phytophthora*, o nematoide *Tylenchulus semipenetrans* Cobb., tolerância à xiloporose, e imunidade à tristeza, além de outras condições abióticas (POMPEU JUNIOR, 2005).

A laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) está entre as plantas mais suscetíveis ao HLB (FOLIMONOVA *et al.*, 2009). Devido ao seu cultivo em larga escala e importância para indústria, a doença exerce grande impacto no mercado produtor da fruta.

Atualmente diferentes estudos têm sido feitos com abordagens em transcriptômica, proteômica e metabolômica de citros, durante estágios de infecção com HLB. Entretanto, nenhum modelo de interação foi proposto que explicasse a evolução da doença na planta.

O ácido salicílico (SA) é um hormônio que desempenha um papel importante na imunidade desencadeada por PAMP (PTI) e por efector (ETI). Em resposta a infecção, os níveis do hormônio se elevam, resultando na ativação das vias de defesa dependente de SA. Além disso, o hormônio é requerido para o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR). Os trabalhos de transcriptoma de HLB revelam que as plantas exercem resposta ativa contra a infecção, embora suas defesas não sejam efetivas para resistência ao patógeno. Ademais, as vias hormonais são profundamente alteradas na condição de doença, entretanto poucos estudos abordam as vias hormonais e suas implicações na tolerância e suscetibilidade ao HLB.

Considerando a natureza das bactérias do HLB, e o envolvimento do ácido salicílico como hormônio de participação ativa na defesa contra patógenos biotróficos. Com este trabalho tivemos o objetivo de analisar a expressão de genes da via do ácido salicílico em resposta a infecção por '*Candidatus Liberibacter spp.*', agente do *Huanglongbing* dos citros, visando contribuir para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria e identificar genes com possíveis aplicações para o desenvolvimento de eventos de transformação para resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 *Huanglongbing* (ex-*Greening*)

Huanglongbing (HLB), também conhecido como '*Greening*', é um dos principais problemas fitossanitários em zonas citrícolas de muitos países produtores de laranja (COLLETA FILHO *et al.*, 2005). Esta doença foi descrita pela primeira vez na China em 1919, sendo denominada *Huanglongbing*, *ad lit.* 'amarelecimento dos ramos' ou 'doença do dragão amarelo'. Atualmente, o HLB já foi relatado em mais de 40 países, sendo responsável por elevadas perdas na cultura (BOVÉ, 2006).

As primeiras descrições da doença levaram a conclusões preliminares de que se tratava de uma virose (CHEN, 1943; MCCLEAN, 1950; MCCLEAN, 1965). Neste caso, hipóteses foram levantadas de que um vírus associado à tristeza do citros fosse o agente causal do HLB (MCCLEAN, 1950). Porém, em 1970 Laflèche e Bové identificaram organismos semelhantes à micoplasma no floema de tecidos sintomáticos. Micoplasmas (Mollicutes) são microrganismos sem parede celular de tamanho reduzido (0,3-0,5 µm) e genoma que varia de 600 a 2.200 Kb. Devido suas características simples e sintomas similares aos causados por vírus, geralmente são estudados por virologistas (HOGENHOUT *et al.*, 2008). Tais organismos geralmente estão associados a sintomas semelhantes aos observados no HLB. Desta forma, este foi considerado como provável agente etiológico da doença (CHEN *et al.*, 1973).

Estudos comparativos da estrutura bacteriana em microscopia eletrônica (ME) puseram em questão a natureza do patógeno (BOVÉ; GARNIER, 1984; GARNIER *et al.*, 1984). Nestes estudos, foi observada a presença de envelope citoplasmático de 25 nm delimitando a célula, enquanto que micoplasmas geralmente apresentam uma membrana com espessura entre 7 nm e 10 nm. A partir destas observações foi postulado que o organismo associado ao HLB possuísse uma parede celular. Garnier *et al.* (1984) verificaram a presença de duas camadas na parede celular, sugerindo que o patógeno fosse

uma bactéria Gram negativa. Além disso, evidências previamente obtidas pelo estudo do efeito de penicilina sobre plantas infectadas com HLB davam suporte a esta hipótese (BOVÉ *et al.*, 1980). Neste âmbito, sabe-se que a penicilina inibe a organização da camada de peptidoglicano em bactérias Gram negativas (MADIGAN *et al.*, 2009). Tratamentos com este antibiótico causaram a remissão dos sintomas em plantas infectadas (AUBERT; BOVÉ, 1980; BOVÉ *et al.*, 1980).

2.1.2 Caracterização do Patógeno

Até o presente momento pouco sucesso foi alcançado no isolamento da bactéria do HLB em meio de cultura, sendo este o principal fator impeditivo para os avanços na caracterização deste organismo. Desta forma, praticamente todos os estudos realizados com esta bactéria têm sido feitos a partir da inoculação de borbulhas (gemas laterais) obtidas de plantas infectadas (DA GRAÇA, 2008). Os únicos experimentos onde se obtiveram êxito no isolamento da bactéria do HLB foram relatados por Davis *et al.* (2008) e Sechler *et al.* (2009). Porém tais métodos de cultivo são de difícil reprodutibilidade.

De acordo com os postulados de Koch, para validar e diferenciar a patogenicidade e virulência de um microrganismo, este deve ser isolado e multiplicado em meio de cultura (KING, 1952). Neste sentido, a bactéria do HLB não se ajusta completamente aos postulados de Koch. Porém, diante das evidências obtidas, a bactéria originalmente descrita por Laflèche e Bové (1970) é o agente causal do *Huanglongbing*.

A fim de determinar a posição filogenética da bactéria do HLB, Jagoueix *et al.* (1994) clonaram e sequenciaram o DNA ribossomal 16S de diferentes isolados da bactéria. As análises filogenéticas das sequências revelaram a bactéria como sendo membro da subdivisão ' α ' de Proteobacteria.

Organismos semelhantes à bactéria do HLB têm ocorrência em outras culturas, estando envolvidos em mais de 20 doenças de plantas (BOVÉ, 2006). A partir da análise da

distância evolutiva entre isolados da África e Ásia, Jagoueix *et al.* (1994) propuseram a denominação 'Liberobacter' (Latim *liber*: vaso; *bacter*: bactéria) a este grupo de bactérias, em referência ao seu hábito restrito aos vasos floemáticos da planta.

Entidades procarióticas cujas características estejam incompletamente descritas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactéria (ICNB) são estabelecidas dentro do grupo '*Candidatus*' (abreviação *Ca.*), como proposto em nota por Murray e Schleifer (1994). A partir destas propostas, Jagoueix *et al.* (1994) sugeriram a classificação '*Candidatus* Liberobacter asiaticum' e '*Candidatus* Liberobacter africanum', para isolados da bactéria do HLB da Ásia e África, respectivamente. De acordo com as normas do ICNB, '*bacter*', por ser do gênero masculino e a vogal 'i' como conectivo precedente a termos de origem latina, Garnier *et al.* (2000) revisaram a nomenclatura das duas espécies para '*Ca.* Liberibacter asiaticus' e '*Ca.* Liberibacter africanus'.

Os primeiros casos de HLB na América foram relatados no Estado de São Paulo (COLLETA FILHO *et al.*, 2004). Com a crescente incidência nas lavouras brasileiras, a doença se tornou um dos principais problemas fitossanitários para citricultura paulista (BOTEON; PAGLIUCA, 2010). Através dos estudos filogenéticos de isolados de '*Ca.* Liberibacter spp.' obtidos em diferentes regiões de São Paulo, foi identificada a ocorrência de uma nova espécie de bactéria associadas ao HLB. A esta espécie foi sugerida a denominação '*Candidatus* Liberibacter americanus' (*CaLam*) (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Recentemente, a sequência genômica de '*Ca.* Liberibacter asiaticus (indicada por Psy62) foi obtida através de amplificação por deslocamento múltiplo e pirosequenciamento 454 (DUAN *et al.*, 2009). Anotações preliminares do genoma de 1,23 Mb revelaram limitada habilidade aeróbica, ausência de sistemas de secreção do tipo III e IV, mas presença de genes associados ao sistema de secreção tipo I, um número aproximado de 1,136 genes codificantes de proteínas e um conteúdo de bases CG de 36,5%. A partir destas informações novas abordagens poderão ser tomadas para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria, bem como seu controle.

2.1.3 Transmissão do HLB

Os primeiros experimentos de transmissibilidade do HLB foram realizados por enxertia (MCCLEAN; OBERHOLZER, 1965), sugerindo a provável origem viral da doença (CHEN, 1943; MCCLEAN, 1950; MCCLEAN, 1965). Relatos também foram feitos sobre infecção de plantas jovens após contato com insetos previamente expostos a plantas sintomáticas (SCHWARZ, 1964). Estudos posteriores revelaram uma correlação positiva entre a presença das espécies de psíldeos *Trioza erytrae* (Del Guercio) (África) e *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Ásia) e a ocorrência do HLB (MCCLEAN; OBERHOLZER, 1965; SCHWARZ *et al.*, 1970).

No caso de *D. citri*, o patógeno pode ser adquirido em um período mínimo de 15-30 minutos, com um período latente de 8 a 12 dias. Enquanto *T. erytrae* requer 1 hora ou mais para adquirir a bactéria, podendo transmiti-la após 7 dias (DA GRAÇA, 1991). As espécies asiática e americana da bactéria são transmitidas pelo *D. citri*, enquanto a africana pelo *T. erytrae*, havendo diferença em relação à sensibilidade à temperatura pelo patógeno. Neste caso, *T. erytrae* e '*Ca. Liberibacter africanus*' são sensíveis a temperaturas superiores a 25°C (VAN DEN BERG, 1990). A transmissão da bactéria ocorre de forma circulativa, de modo que, uma vez adquirido pelo inseto, este pode veicular a bactéria por toda sua vida (BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2009).

Uma vez que '*Ca. Liberibacter spp.*' está restrita ao floema da planta, outra forma de transmissão ocorre pela inoculação mecânica de borbulhas (gemas laterais) infectadas em plantas saudáveis, sendo este um método geralmente utilizado para estudos da interação planta-patógeno (DA GRAÇA, 2008).

2.1.4 Sintomas do HLB

Os sintomas do HLB, por não serem inerentemente característicos da doença, podem ser confundidos com outras condições da planta. Desta forma, é difícil o diagnóstico da doença considerando apenas este aspecto (COLLETA FILHO; CARLOS, 2010).

Dentre os sintomas, a planta infectada se destaca pelo amarelecimento dos ramos, daí a denominação original '*Huanglongbing*' ou 'Yellow shoot'. '*Ca. Liberibacter spp.*' possui um sistema de transporte de zinco que aparentemente pode contribuir para deficiência local deste micronutriente. Portanto, mimetizando os sintomas do HLB a deficiência de zinco. As folhas geralmente apresentam um padrão mosqueado irregular, com manchas verdes-claros, que tendem ao amarelecimento completo com o tempo (BOVÉ, 2006). Estas são as primeiras características da doença a serem manifestadas, indicando também os locais onde há maior titulação da bactéria na planta. Além disso, as folhas podem se tornar espessas, coriáceas, com nervuras proeminentes, amareladas e de tamanho reduzido (MCCLEAN; SCHWARZ, 1970).

Frutos com HLB são pequenos, assimétrico, com manchas esverdeadas e eixo central (columela) arqueado. Em corte perpendicular à columela, podem ser visíveis sementes abortadas, com coloração marrom e necrose amarelo-escuro no albedo (BOVÉ, 2006). Na África do Sul, a coloração esverdeada da região estilar dos frutos sintomáticos resultou na denominação da doença como *Greening* (BOVÉ, 2006). Atualmente a denominação oficial da doença é o *Huanglongbing* (HLB). O HLB provoca, portanto, a depreciação do fruto de forma a reduzir a produtividade. De acordo com o tempo de infecção, as plantas se tornam debilitadas, improdutivas até a morte dos ramos (*dieback*) (BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2009).

O período de latência do patógeno depende dentre outros fatores, da temperatura, idade, espécie e variedade da planta e titulação da bactéria nos ramos. Considerando tais fatores, o período de incubação pode variar geralmente de seis a doze meses, com sintomas podendo ser manifestados tardiamente (COLLETA FILHO; CARLOS, 2010).

2.1.5 Detecção do patógeno

Dos três patógenos associados ao HLB, '*Ca. Liberibacter asiaticus*', '*Ca. Liberibacter africanus*' e '*Ca. Liberibacter americanus*', a forma asiática é responsável pelo quadro mais severo da doença. A distinção entre as diferentes formas é difícil de ser feita através da sintomatologia. Outro fato que também dificulta a caracterização visual é a similaridade a outras doenças (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Portanto, as metodologias moleculares são mais eficientes para o diagnóstico do HLB (COLLETA FILHO; CARLOS, 2010).

A primeira técnica laboratorial utilizada para confirmação do HLB foi feita pela identificação da bactéria por microscopia eletrônica (VARMA *et al.*, 1993). Neste método, várias secções são feitas preferencialmente no tecido vascular de folhas com sintomas fortes de mosqueamento, entretanto, nenhuma diferença morfológica entre as formas das bactérias pode ser evidenciada (GARNIER *et al.*, 1991; VARMA *et al.*, 1993).

Villechanoux *et al.* (1993) clonaram e sequenciaram três fragmentos de DNA genômico da bactéria do HLB (isolado Poona/Índia): um fragmento de 2,6 Kpb correspondente a parte do gene nusG e do operon rplKAJL-rpoBC; um fragmento de 1,0 Kpb codificante de um tipo de DNA polimerase bacteriana; e um fragmento de 0,6 Kpb não foi identificado. A partir deste trabalho, métodos baseados em PCR, *Southern blot* e *dot-blot* passaram a ser desenvolvidos e utilizados na detecção e identificação do patógeno (HOCQUELLET *et al.*, 1997).

Os primeiros procedimentos de PCR aplicados na detecção de *Liberibacter* foram realizados por Jagoueix *et al.* (1996), a partir do desenvolvimento de *primers* que amplificam parte do gene codificante do rRNA 16S das espécies africana e asiática da bactéria. Hocquellet *et al.* (1999) também desenvolveram um método de detecção via PCR, baseado na sequência do operon rplKAJL-rpoBC. Posteriormente, Colleta Filho *et al.* (2005) e Teixeira *et al.* (2005) identificaram a espécie '*Ca. Liberibacter americanus*' após análises de sequências do gene 16S rRNA amplificado por PCR.

Devido à baixa titulação de *Liberibacter* em citros, dentre outros fatores, muitas vezes a PCR convencional não permite a detecção da bactéria na planta. A fim de aumentar a eficiência do método, geralmente têm-se realizado a técnica de Nested-PCR. Esta apresenta maior especificidade e sensibilidade, possibilitando a detecção de quantidades reduzidas da bactéria (COLLETA FILHO; CARLOS, 2010). Outro método recentemente aplicado baseia-se no PCR quantitativo (qPCR), que além da detecção, permite estimar a titulação das bactérias na planta (LI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2006; TRIVEDI *et al.*, 2009).

2.1.6 Manejo do HLB

Por não ter tratamento curativo, o principal método de manejo da doença é feito através do controle da população do inseto vetor nas plantações, pela aplicação de produtos químicos. Aliado ao uso de defensivos, a espécie de *Tamarixia radiata* tem sido utilizada com eficiência no controle biológico de *Diaphorina citri*. Tentativas de controle pela aplicação de antibióticos foram realizadas, porém sem resultados promissores (BOVÉ *et al.*, 1980).

Para prevenção eficiente da doença, medidas de controle devem ser tomadas em conjunto. De acordo com Bové (2006), uma vez detectada a incidência do patógeno no pomar, a medida mais adequada a ser seguida é a eliminação das plantas infectadas e não infectadas nas proximidades (*roguing*). Sabendo-se que plantas de murta (*Murraya paniculata*) são hospedeiros secundários de '*Ca. Liberibacter spp.*', a eliminação desta espécie nas proximidades dos pomares também é recomendada. Considerando a rápida disseminação do HLB na cultura e a ausência de métodos curativos, o *roguing* é uma medida importante no manejo da doença. No Brasil, a instrução normativa [Instrução Normativa nº 53/2008 (IN53)] regulamenta estas práticas (BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2009).

2.2 Interação planta-patógeno

2.2.1 Sistema imune vegetal

A planta fornece um ambiente favorável ao desenvolvimento de organismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas complexos. Porém, ao longo da coevolução com o patógeno, a planta desenvolveu uma variedade de barreiras estruturais e bioquímicas que atuam como defesa contra a invasão de tais organismos (CHISHOLM *et al.*, 2006). De modo geral, estas respostas de defesas podem ser distinguidas entre imunidade basal inata e resistência baseada na interação gene-a-gene (DYAKOV, 2007).

Quando uma planta é infectada por um patógeno, o resultado desta interação depende primariamente se o hospedeiro é capaz de impedir o desenvolvimento e multiplicação do patógeno. Plantas que são incapazes de evitar a invasão do patógeno são ditas suscetíveis. Isto se deve a incapacidade da planta em reconhecer o patógeno ou orquestrar uma resposta de defesa efetiva (CHISHOLM *et al.*, 2006).

Muitos processos de defesa estão associados a respostas ativa como, fortalecimento da parede celular, através da deposição de glicoproteínas, calose e outros compostos fenólicos. Aumento da atividade de peroxidases, necessária para o processo de lignificação. Adicionalmente, fitoalexinas e enzimas da via de fenilpropanóides são rapidamente induzidas. Todas estas respostas ocorrem rapidamente após a infecção. Outras respostas de defesa são induzidas tardiamente após a infecção, como indução de enzimas hidrolíticas (beta-glucanases e quitinases) e inibidores de proteinases.

De acordo com o modo de obtenção de nutrientes, os patógenos podem ser classificados em biotróficos (subsistem das atividades metabólicas das células vivas do hospedeiro), necrotróficos (nutrem-se de células e tecidos mortos) ou hemibiotróficos (intermediários entre as outras formas) (PLOTNIKOVA; AUSUBEL, 2007). É certo que, o estilo de vida do patógeno não pode ser classificado como sendo estritamente biotrófico ou

necrotrofico, de modo que, a patogenicidade é dada pela interação conjunta dos mecanismos metabólicos na interação planta-patógeno (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

A defesa basal atua de modo quase instantâneo na interação planta-patógeno (BORRÁS-HIDALGO, 2004). Durante o início da infecção, o patógeno apresenta à célula vegetal um 'padrão molecular associado ao patógeno/microrganismo' (PAMP ou MAMP), representado, dentre outras moléculas, por flagelinas, fatores de alongação Tu (EF-Tu), ou lipopolissacarídeos (GOMÉZ-GOMÉZ; BOLLER, 2002). Os PAMPs possuem elementos conservados que podem ser reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão da planta (PRR) (NÜRNBERGER *et al.*, 2004). Através da interação PAMP-PRR, cascatas de reações químicas são ativadas de modo a elicitar mecanismos de defesa da planta contra o patógeno (CHISHOLM *et al.*, 2006). Esta reação também é conhecida como imunidade desencadeada por PAMP (PTI), representa a defesa primária da planta em resposta a invasão pelo patógeno, não sendo um mecanismo de resistência patógeno-específico (JONES; DANGL, 2006).

Defesas das plantas desencadeadas por genes de resistência tipicamente ocorre de modo mais lento do que aquele observado na imunidade basal (COOK, 1998; CRUTE, 1994). O conceito de resistência gene-a-gene foi originalmente descrito por Flor em 1971. Neste modelo, para cada gene de resistência na planta há um gene de avirulência (*Avr*) cognato no patógeno que condiciona a patogenicidade. Desta forma, o gene de resistência é efetivo apenas se um gene *Avr* correspondente é expresso pelo patógeno.

Muitos genes de resistência (gene R) se dispõem em *clusters* no genoma da planta, e estão associados a famílias gênicas cujas proteínas apresentam motivos conservados (DANGL; JONES, 2001; LEHMANN, 2002). Tal conservação indica que a resistência a diferentes patógenos é ativada por mecanismos similares (ELLIS *et al.*, 2000).

A maioria das proteínas de resistência possui domínio de ligação de nucleotídeo (NBS) e repetições ricas em leucina (LRR) nas extremidades amino- e carboxi-terminal da cadeia proteica, respectivamente (BENT, 1996). Estes domínios são separados por uma região conservada conhecida como ARC (Apaf-1, Plant **R** e Ced-4), o qual pode ser dividido em unidades funcionais (ARC1, ARC2, ARC3 etc.). Os domínios LRR possuem

um consenso LxxLxxLxxLxLxx(N/C/T)x(x)LxxIPxx e atuam como sítios de ligação extracelular denominado '*receptor-like protein*' (RLP) (JONES; JONES, 1997). Além destes, domínios citoplasmáticos de quinase, denominados '*receptor-like kinase*' (RLK) estão envolvidos na ativação de cascatas de reações ligadas ao mecanismo de defesa após o reconhecimento do patógeno pelos RLPs (DANGL; JONES, 2001; GABRIËLS *et al.*, 2007).

Proteínas NB-LRR podem ser subdivididas de acordo com os motivos associados à extremidade N-terminal, podendo ser do tipo TIR-NB-LRR (*Toll and Interleukin 1 Receptor*), CC-NB-LRR (*Coiled Coil Domain*). Entretanto, as plantas também produzem proteínas sem domínios LRR com conformações CC-NB, TIR ou TIR-NB (DANGL; JONES, 2001).

A diversidade alélica de um gene R confere especificidade para o reconhecimento de patógenos distintos. Porém há eventos nos quais um simples alelo pode conferir defesa a diferentes patógenos, como ocorre na resistência da planta a vírus de um mesmo gênero (BAKKER *et al.*, 2003; GRUBE *et al.*, 2000; INES, 1995).

Os patógenos desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos complexos de proteínas envolvidas na modulação das vias metabólicas da planta durante a evolução da doença (FORCAT *et al.*, 2008). Estas proteínas, denominadas efetores ou fatores de avirulência, são codificadas direta ou indiretamente pelos genes *Avr*, e constituem uma das estratégias pelas quais microrganismos promovem a patogenicidade (FLOR, 1971).

Durante a infecção, os efetores produzidos pelo patógeno são reconhecidos pelas proteínas R, desencadeando a imunidade induzida por efector (ETI), induzindo mecanismos de defesa qualitativa da planta (SACCO; MOFFETT, 2009). Neste caso, a resistência gene-a-gene geralmente é acompanhada por respostas de hipersensibilidade, durante a qual, a planta induz a morte celular programada localizada, impedindo a dispersão do patógeno (HEAT, 2000).

Patógenos podem contornar o ETI através de mutações em genes *Avr*. Uma vez que o repertório de efetores citoplasmáticos (CE) é redundante, qualquer efector individual pode

ser dispensado de modo a garantir a eficiência desta estratégia. Desta forma, a principal atividade dos CE é de supressão dos mecanismos de defesa da planta, tanto a nível basal quanto na resistência por interação gene-a-gene (SCHNEIDER; COLLMER, 2010).

A falta de evidências de interações diretas entre proteína R e fator *avr* deu origem ao 'modelo de identificação indireto' ou 'hipótese guarda', segundo o qual, o reconhecimento é mediado por proteínas secundárias que interagem com o complexo NB-LRR, ao invés do próprio efetor (VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008). Neste modelo, o NB-LRR monitora os efeitos da atividade do fator *avr* sobre a proteína cognata no hospedeiro (guarda). Uma evidência direta que suporta esta hipótese são as proteínas RIN4 de *Arabidopsis thaliana* que atuam como cofatores de reconhecimento. A interação do RIN4 com fatores de avirulência ativa a resistência dependente dos genes cognatos RPM1 ou RPS2 (MACKEY *et al.*, 2002).

2.2.2 Fitormônios e resistência sistêmica adquirida (SAR)

Plantas não possuem células especializadas em defesa imunológica. Porém, alterações causadas por patógenos e sua percepção desencadeia eventos bioquímicos que reprograma a célula a centralizar suas atividades na defesa contra o patógeno. Neste caso, a planta ativa seus sinais de defesa de acordo como tipo de patógeno envolvido (LÓPEZ *et al.*, 2008).

Os fitormônios desempenham um papel importante na regulação de redes sinalizadoras de respostas da planta a fatores bióticos e abióticos. Além disso, são conhecidos pela participação no desenvolvimento, crescimento e manutenção das atividades vitais da planta (BARI; JONES, 2009). Portanto, o envolvimento destes reguladores em diferentes atividades sugere que suas vias sinalizadoras estejam interconectadas em uma rede metabólica complexa (SPOEL; DONG, 2008).

Geralmente as concentrações dos fitormônios são baixas, porém alterações nesses níveis podem ocorrer sob condições de estresse (FORCAT *et al.*, 2008). No caso de ataque por um patógeno, a quantidade e composição dos hormônios produzidos dependem do modo de vida e estratégia de infecção do organismo patogênico. Para contornar o sistema imune da planta, os patógenos também desenvolveram um mecanismo de defesa no qual eles podem manipular as vias de sinalização dependente de fitormônio (ROBERT-SEILANIANTZ *et al.*, 2007).

Os ácidos abscísico (ABA), salicílico (SA) e jasmônico (JA) são os principais hormônios envolvidos nos eventos de defesa contra patógenos biotróficos e necrotróficos (BARI; JONES, 2009). Estes hormônios podem agir sinergisticamente na amplificação das respostas de defesa (PIETERSE *et al.*, 2009).

A resistência em largo espectro, também referida como 'resistência sistêmica adquirida' (SAR), é caracterizada pela ativação coordenada de um conjunto específico de genes associados à defesa contra patógenos (PR), muitos dos quais codificam proteínas com atividade antimicrobiana (PIETERSE *et al.*, 2009). O início do SAR é ativado pelo PTI ou ETI e está associado ao aumento dos níveis de ácido salicílico localmente e também sistematicamente em tecidos distantes do sítio de infecção (CHATURVEDI; SHAH, 2007). Dada a importância do SA nos mecanismos de defesa da planta. A aplicação do SA e seus análogos funcionais têm sido demonstrado induzir a expressão de genes PR em plantas (PARK *et al.*, 2007).

Pouco ainda se sabe sobre os componentes da interação entre a planta e o patógeno, requeridos para desencadear o SAR. Esforços para elucidar a base bioquímica da resistência têm permitido a identificação de uma variedade de proteínas que são induzidas após o ataque pelo patógeno.

A habilidade de a planta desenvolver o SAR após uma infecção localizada indica a atuação de um sinalizador sistêmico, muitos dos quais são representados por moléculas hormonais (SA, ET, JA, sisteminas).

O primeiro relato do envolvimento do SA na indução do SAR foi feito por White (1979). White observou que folhas de tabaco tratadas com SA e ácido acetilsalicílico exibiram resistência a infecção por TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) e acúmulo de proteínas PR. Posteriormente, foi demonstrado que o tratamento de tabaco com SA induz o mesmo conjunto de genes ativados durante o desenvolvimento do SAR após infecção com TMV. Correlacionando com a indução de resistência pelo tratamento com SA, pesquisadores observaram que plantas com níveis naturais elevados de SA foram altamente resistentes ao ataque de patógenos.

Pelo menos duas vias de sinalização de defesa gene-específico são reconhecidas e requerem uma proteína funcional EDS1 ou NDR1. Resposta mediada por gene R que exibe forte dependência do gene *EDS1* geralmente apresenta fraca ou nenhuma dependência do gene *NDR1* (AARTS *et al.*, 1998). *EDS1* codifica uma proteína semelhante à lipase que opera *upstream* da via de defesa do ácido salicílico. Enquanto o *NDR1* codifica uma proteína que possui dois domínios de ligação à membrana (RUSTÉRUCCI *et al.*, 2001). *EDS1* controla a ativação de defesa e morte celular programada condicionada por receptores intracelulares que reconhecem efetores específicos do patógeno. Além disso, também é necessário para resistência basal contra patógenos invasivos pela restrição do progresso da doença.

A proteína NPR1 é um importante transdutor do sinal de SA em arábido. Homólogos ao gene *NPR1* estão presentes em outras espécies. Sobre a indução do SA, o *NPR1* atua como cofator de transcrição para expressão de genes PR, sendo necessário em outras vias metabólicas não dependentes de SA (FITZGERALD *et al.*, 2004). Portanto, o *NPR1* constitui um importante conector entre os diferentes mecanismos de defesa.

Associada a expressão de genes PR, a planta geralmente manifesta reações de hipersensibilidade (HR), caracterizado pela morte celular programada no local de infecção do patógeno (BAGIROVA, 2007). Este mecanismo é resultado da geração de espécies ativas de oxigênio (explosão oxidativa) como H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), O₂⁻ (radical superóxido) e OH⁻ (radical hidroxila), os quais atuam na defesa da planta (CHEN *et al.*, 1993). O peróxido de hidrogênio estimula a síntese de SA, além de estar envolvido

diretamente na reação contra o patógeno (LÉON *et al.*, 1995). Por sua vez, o SA tem sido observado como modulador da reação de hipersensibilidade, de modo que, os eventos de SA-HR parecem estar coordenados em *feedback* (HOLUIGUE *et al.*, 2007).

Os eventos de expressão de genes PR, explosão oxidativa, resposta de hipersensibilidade e deposição de calose, estimulados pelo metabolismo de SA são conhecidos com *priming* e representam a defesa sistêmica induzida após contatos prévios com o patógeno (CHATURVEDI; SHAH, 2007). SA desempenha um papel crucial no estabelecimento da imunidade da planta contra patógenos biotróficos (BARI; JONES, 2009).

Em contraste com o SA, os jasmonatos estão envolvidos nas respostas de defesa contra patógenos necrotróficos e insetos herbívoros (GLAZEBROOK, 2005). Estudos têm revelado o aumento da concentração de JA localmente em resposta a infecção por patógenos. Os três principais componentes sinalizadores de JA incluem o '*coronatine insensitive1*' (*COI1*), '*jasmonate resistant1*' (*JAR1*) e o '*jasmonate insensitive 1/MYC2*' (*JIN1/MYC2*) (CREELMAN; MULLET, 1997).

No caso da resistência sistêmica induzida (ISR), o ácido salicílico não é requerido para sua ativação, porém são necessários o ácido jasmônico e o etileno (PIETERSE *et al.*, 2009). A proteína NPR1 atua no núcleo e no citoplasma durante a ativação do SAR e ISR, respectivamente. Diante deste fato, a NPR1 parece ser um componente chave na regulação do tipo *crosstalk* entre o SAR (regulado por SA) e o ISR (regulado por ácido jasmônico/etileno) (POZO *et al.*, 2005; ROBERT-SEILANANTZ *et al.*, 2011). Estes hormônios atuam antagonicamente em muitas vias metabólicas, de modo que a aplicação de SA, por exemplo, inibe a expressão de genes induzidos por JA (KAZAN; MANNERS, 2008). Tem sido demonstrado que o gene *WRKY70* produz fatores de transcrição envolvidos na modulação do *crosstalk* entre SA e JA (PIETERSE *et al.*, 2009; SPOEL; DONG, 2008).

Dois modelos conceituais são propostos para percepção local do ácido salicílico e eventos de sinalização seguido ao transporte do SA e seus intermediários (**Figura 1**). No primeiro uma resposta a baixos níveis de ácido salicílico resulta na sobrevivência e ativação

dos mecanismos através da cascata de sinalização mediada pela NPR1. O segundo mecanismo envolve a explosão oxidativa e ativação de canais de íons associado ao acúmulo de SA, que resulta em morte celular programada. Portanto, o tipo de resposta da planta a infecção pelo patógeno e depende da concentração de SA nas células (KAWANO *et al.*, 2013).

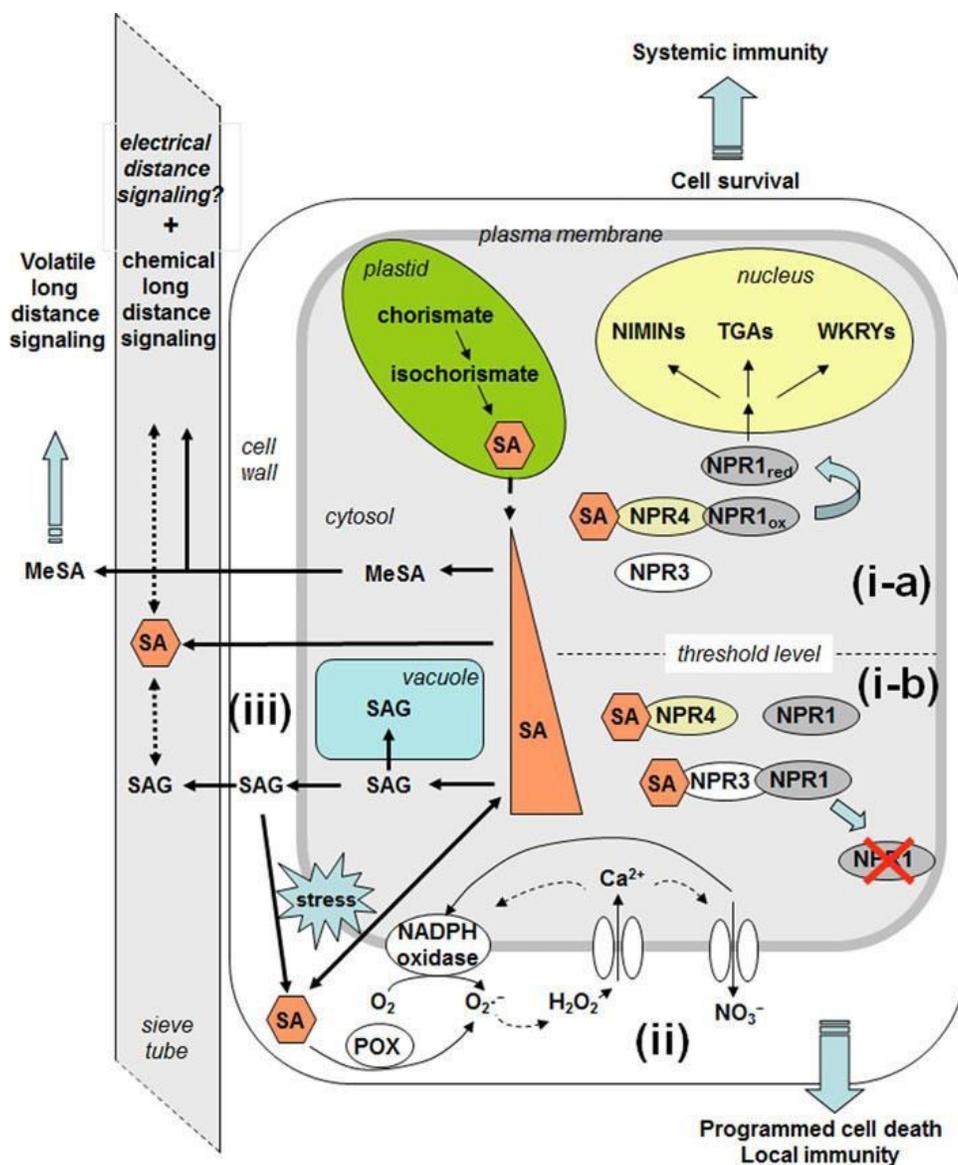


Figura 1: Modelos da sinalização dos mecanismos de defesa de plantas mediados pelo ácido salicílico, em resposta a infecção por patógenos biotróficos.

Apesar das evidências de antagonismo, o SA e JA podem atuar sinergicamente. Estudos recentes revelam que o fenótipo patológico da doença pode ser influenciado pela intensidade e instante em que os sinais dos hormônios são dados (CREELMAN; MULLET, 1997; FEY; PARKER, 2000). Desta forma, é importante a mensuração dos níveis de tais hormônios em diferentes estágios da infecção para o entendimento de suas vias metabólicas na interação planta-patógeno. Dentre os métodos convencionais para mensuração dos níveis destes hormônios têm-se imunoensaio (ELISA), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de gasosa e espectrometria de massa (MS) (FORCAT *et al.*, 2008). Além destes métodos, a aplicação de técnicas refinadas, como reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR) além de *chips* de microarranjos e RNAseq têm sido utilizadas para avaliação de genes expressos em vias metabólicas (JINYUAN *et al.*, 2001; WAN *et al.*, 2002).

2.2.3 Calose na defesa contra patógenos

Calose é um polissacarídeo amorfo na forma de β -(1,3)-glucano de elevado peso molecular, ligado a algumas ramificações β -1,6, amplamente distribuído em plantas superiores, que atua como componente estrutural em vários processos de desenvolvimento e resposta a estresse biótico e abiótico (AIST, 1976; LUNA *et al.*, 2011). O polissacarídeo é depositado na placa crivada, durante a citocinese, no plasmodesma, onde regula o movimento de substâncias célula-a-célula e está envolvido nos estágios de desenvolvimento do pólen, crescimento e diferenciação celular (CHEN; KIM, 2009).

A biossíntese da calose é regulada pela família gênica da enzima calose sintase, utiliza a UDP-glicose como substrato e é degradado por enzimas β -1,3-Glucanases (codificada pelo gene PR2) (LEVY *et al.*, 2007). Outros componentes incluem UDP-glicose transferase (UGT1) e sacarose sintase (SuSy), o qual fornece UDP-glicose para síntese de calose. O complexo da calose sintase contém uma proteína chamada anexina cuja regulação da síntese de calose e celulose é dependente dos níveis de Ca^{2+} (VERMA;

HONG, 2001). Os íons de Ca^{2+} atuam como componentes importantes da produção de calose. Entretanto, o aumento na concentração não seja o único fator suficiente para calogênese (KAUSS, 1985).

Arabidopsis possui doze genes codificantes de putativas calose sintase. Tais genes são referenciados na literatura por duas nomenclaturas: *CalS* (*Callose synthase*) *AtCalS1-AtCalS12* (VERMA; HONG, 2001) ou *GSL* (*Glucan synthase-Like*) *AtGSL1-AtGSL12* (RICHMOND; SOMERVILLE, 2000), sendo este último comumente citado em publicações. Os genes *GSL* podem ser organizados em três famílias, com efeito parcialmente redundante, mas com diferentes funções (CHEN; KIM, 2009). O gene *GSL5* (*CalS12*) é responsável pela síntese de calose induzida por patógeno ou por lesões causadas por insetos herbívoros e desempenha um papel importante na formação do pólen (ENNS *et al.*, 2005; JACOBS *et al.*, 2003).

Os mecanismos de acúmulo de calose são controlados por vias distintas de sinalização, dependendo das condições ambientais e dos padrões moleculares associados ao patógeno (LUNA *et al.*, 2011). O tempo e intensidade de deposição de calose podem ser influenciados por sinais ambientais, além de compostos relacionados à defesa como ácido salicílico e glicosinolatos (CLAY *et al.*, 2009).

Durante a infecção por fitoplasmas, o influxo do cálcio para os vasos do floema estimula a deposição de calose de modo a causar oclusão das placas crivadas e afetando o deslocamento do patógeno e distribuição da seiva (MUSSETTI *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm discutido o envolvimento da calose e celulose na regulação negativa da via do ácido salicílico. Mutantes da calose são capazes de desencadear a via do SA de maneira pouco compreendida (NISHIMURA *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns trabalhos sugerem o envolvimento do SA na produção de calose (DONG *et al.*, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

A infecção por '*Ca. Liberibacter spp.*' em laranja doce leva a processo ativo de resposta da planta, porém insuficiente para resposta de resistência. Genes da via do ácido salicílico (SA), assim como genes *upstream* e *downstream* de vias de resposta de interação, podem estar envolvidos, sem que não haja clara resposta de hipersensibilidade (HR).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar, através da quantificação de transcritos, a expressão de genes associados à via do ácido salicílico, assim como outros genes de resposta de interação, em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* var. Hamlin), altamente suscetível, e de *Poncirus trifoliata* (tolerante), infectados com “*Ca. Liberibacter spp.*”

4.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a ocorrência e comparar as sequências dos genes da via do ácido salicílico, envolvendo sinalização *upstream*, biossíntese, metabolismo do hormônio, sinalização *downstream* da via e outros genes de resposta de interação;
- II. Comparar o perfil de expressão desses genes em laranja doce e no trifoliata infectados com “*Ca. Liberibacter asiaticus*” e “*Ca. Liberibacter americanus*”, em experimentos independentes;

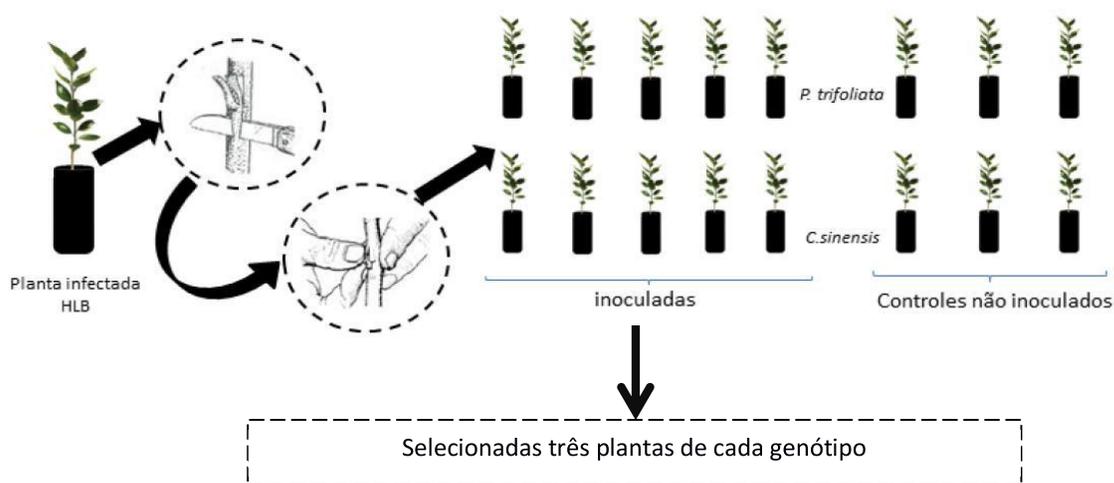
III. Avaliar o envolvimento da formação de calose na resposta a infecção por “*Ca. Liberibacter asiaticus*”.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material biológico e condições experimentais

Para compor este experimento foram utilizadas plantas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., como representante tolerante e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, como representante suscetível, mantidos em condições controladas de casa de vegetação do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP. A inoculação da bactéria foi feita por enxertia de borbulhas (ramos laterais) infectadas em cinco indivíduos de cada representante, e três plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. Para cada espécie bacteriana, ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Ca. Liberibacter americanus*’, foi conduzido um experimento isolado (**Esquema 1**).

Para condução dos ensaios moleculares, foram selecionados três indivíduos de cada representante que primeiro expressaram os sintomas característicos da infecção pela bactéria. As análises de expressão gênica do material coletado foram feitas em três períodos: sete dias após inoculação (dai), 30 dai e após o aparecimento dos primeiros sintomas. No caso de *P. trifoliata*, por não apresentar sintoma bem definidos da doença, as coletas foram realizadas no mesmo tempo que o correspondente em *C. sinensis*.



Esquema 1: Esquema experimental de trabalho. Procedimento para obtenção de plantas infectadas com ‘*Ca. Liberibacter americanus*’ e ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’, conduzido em experimentos isolados.

5.2 Extração de RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado individualmente a partir de tecido foliar usando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), com modificações. Uma etapa de tratamento com DNase (Qiagen) foi incorporada a extração do RNA, para completa remoção de DNA da amostra, de acordo com as orientações do fabricante. A concentração do RNA foi determinada através da absorbância a 260 nm (A_{260}) em espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

A pureza do RNA foi avaliada através da razão da leitura em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}), que permite estimar a presença de contaminantes, tais como proteínas. Foram consideradas puras, as amostras que obtiveram a razão A_{260}/A_{280} entre 1.9-2.1.

A integridade e distribuição de tamanho do RNA purificado foram avaliadas em gel desnaturante de agarose 1,2%. O gel foi preparado em 10% de solução tampão de formaldeído 10X (200 mM MOPS, 50 mM Acetato de sódio, 10 mM EDTA, pH 7,0), adicionado de 1,8% de formaldeído 37% (12,3 mM), e corado com brometo de etídio (1,5 μ L/1,2 g de agarose). Previamente a eletroforese, o gel foi imerso em tampão de formaldeído 1X [10% de tampão formaldeído 10X, 2% de formaldeído 37% (12,3 mM)] por 30 minutos. Foi aplicado uma solução contendo 1 μ L de tampão de carregamento azul de bromofenol e 4 μ L de amostra de RNA após desnaturação a 65°C por 5 minutos.

5.3 Síntese de cDNA

O RNA foi preparado para síntese de cDNA em uma reação contendo: 4 μ M de primer Oligo(dT)₁₈ e 1 μ g de RNA em um volume total de 12 μ L, seguido desnaturação a 65°C por 5 minutos e choque térmico à 4°C. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas), em uma reação contendo: 1 mM dNTP, 5X tampão, 20 U de Ribolock RNA inibitor, 200 U de M-MuLV *Reverse Transcriptase*. As seguintes condições de reação foram utilizadas: 42°C por 60 minutos, seguido de incubação a 70°C por 5 minutos. Depois de sintetizado, as amostras foram armazenadas a temperatura de -20°C.

5.4 Desenho e validação de *primers*

O desenho dos *primers* foi baseado em genes de *Arabidopsis thaliana*, envolvidos na via de sinalização do ácido salicílico, obtidos na base de dados *The Arabidopsis thaliana Information Resource* - TAIR (The Arabidopsis Initiative, 2000), e utilizados como molde para busca de sequências ortólogas em citros através da ferramenta BlastTX contra *unigenes* presentes na base de dados Phytozome (GOODSTEIN *et al.*, 2012).

Os *primers* foram projetados e suas penalidades analisada utilizando a ferramentas Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2012), seguindo os seguintes critérios: tamanho do amplicon de 70 pares de base (pb) a 200 pb, tamanho do *primer* entre 18-24 nucleotídeos (nt), temperatura de anelamento de 60 °C ($\pm 2^\circ$ C) e conteúdo de GC entre 45-60% (**Quadro 1**).

A estabilidade e ocorrência de pareamentos indesejáveis, como formação de alças (*hairpin*), dímeros (*primer dimer* e *cross dimer*) foram avaliados utilizando o programa online NetPrimer (Premier Biosoft).

Os *primers* para genes pertencentes a famílias gênicas foram projetados após alinhamento das sequências codificantes (CDS) entre os genes membros, utilizando a ferramenta online ClustalW2 (GOUJON *et al.*, 2010; LARKIN *et al.*, 2007), sendo selecionado regiões do transcrito de interesse de menor similaridade com os outros membros. A especificidade dos *primers* foi checada *in silico* com o banco de dados do Phytozome, avaliados por PCR convencional e os *amplicons* sequenciados para confirmação de sua identidade.

5.5 Seleção de genes de referência

Inicialmente foram definidos quais seriam os melhores genes endógenos de referência para as condições do experimento a serem usados na etapa de normalização dos valores de expressão de cada gene de interesse. Foram testados oito genes de referência endógenos: *SAND Family protein* (SAND), *F-box Family protein* (FBOX), *Polypyrimidine tract-binding protein 1* (PTB1), *Ubiquitin-protein ligase 7* (UPL7), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2* (GAPC2-GAPDH), considerados superiores, de acordo com Mafra *et al.* (2012), além dos genes TIP41-like protein (TIP41) e 18S rRNA (18S) (ALBRECHT; BOWMAN, 2008).

O programa geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) foi utilizado para as análises dos dados. O geNorm possui um algoritmo baseado em estratégia de comparação aos pares, que determina os melhores genes de referência a partir de um conjunto de genes candidatos. Dois parâmetros são utilizados, o valor médio da estabilidade de expressão (valor M), e variação par-a-par ($V_{n/n-1}$). O primeiro estima a estabilidade de expressão, de modo que genes com menor ‘valor M’ apresentem maior estabilidade. Desta forma, os genes são ranqueados, sendo eliminado aquele de maior valor M, então um novo cálculo é feito com os demais genes remanescentes. Após isso, dois ou mais genes superiores são dados. O segundo parâmetro determina o número mínimo de genes requeridos para uma normalização acurada.

Quadro 1. Genes de citros associados à via de ácido salicílico e de interação, seus acessos nos bancos *TAIR* e *Phytozome* e seqüências de *primers* utilizadas para avaliação de resposta por RT-qPCR. NA (não se aplica).

36

<i>Gene</i>	<i>Gene name/Description</i>	<i>TAIR</i>	<i>Phytozome</i>	<i>Seqüência dos primers (5'→3')</i>	<i>Amplicon (pb)</i>
<i>EDS1</i>	<i>Enhanced Disease Susceptibility1</i>	at3g48090.1	orange1.1g007278m	Fw-TTTACAGGGCATTTCCTCAGCTGGT	114
				Rv-TATAGGTGGCATTCTGCTGGTGCT	
<i>PAD4</i>	<i>Phytoalexin Deficient4</i>	at3g52430.1	orange1.1g007061m	Fw-GCTTGGCAAATTCTGGGATGGTGT	128
				Rv-ACCTCCTTGGTCTTCCATGCTTCA	
<i>HSP90</i>	<i>Suppressor of G2 allele of skp1</i>	at4g11260.1	orange1.1g017264m	Fw-GCAAGCCATTGAGATTAGCC	198
				Rv-GCCACCTTAGCCGTTTCATA	
<i>SGT1B</i>	<i>Heat Shock Protein90</i>	at5g52640.1	orange1.1g005321m	Fw-CACATGGGAGAAACCGAGAC	180
				Rv-AGCATCGAGCTTGCTCTTGT	
<i>RAR1</i>	<i>Required for MLA12 resistance1</i>	at5g51700.1	orange1.1g027086m	Fw-GCTCCTGCTCCTTCAACAAC	127
				Rv-CTGGGGCATAATTGGTCTGT	

Gene	Gene name/Description	TAIR	Phytozome	Sequência dos primers (5'→3')	Amplicon (pb)
<i>SARD1</i>	<i>SAR Deficient1</i>	at1g73805.1	orange1.1g011961m	Fw-GCCGAAGGAGTTTTGAATGA	192
				Rv-AATTTGCCAATCGTTGCTTC	
<i>ICS1</i>	<i>Isochorismate Synthase1</i>	at1g74710.1	orange1.1g008131m	Fw-TGCTCGATTGGCGGGCAGAC	108
				Rv-AGGCGTGCCTCTTCAGTCGGA	
<i>ICS2</i>	<i>Isochorismate Synthase2</i>	at1g18870.1	orange1.1g008131m	Fw-CCAGCAGGCACTCCCTCAA	109
				Rv-GGCAGCCGAGGGTCTCCTTT	
<i>EIN3</i>	<i>Ethylene Insensitive3</i>	at3g20770.1	orange1.1g007186m	Fw-CGAAATCAGCAGCCAGAGCAGC	86
				Rv-CCCCCTTCATAACACCTACGCCT	
<i>EDS5</i>	<i>Enhanced Disease Susceptibility5</i>	at4g39030.1	orange1.1g008932m	Fw-GCTGCATTAGTCCTGGGAAA	136
				Rv-TTCTCCAATCCTCCCCTCTT	

Gene	Gene name/Description	TAIR	Phytozome	Sequência dos primers (5'→3')	Amplicon (pb)
PAL2	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase2</i>	at3g53260	orange1.1g005031m	Fw-GGCTGCCATTGCCACGTCCT	174
				Rv-AGAGCACCGCCGTTCTTGGT	
PAL3	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase3</i>	at5g04230	orange1.1g004955m	Fw-AACTGGACCGTGGCAGCGGA	104
				Rv-GACTCGCCGCCGAGCTTCAC	
PAL4	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase4</i>	at3g10340	orange1.1g037382m	Fw-TCACCGCCGGCCCAATTCT	118
				Rv-GCGAGACCCTCCTTAGGCTGC	
PAL5	<i>Phenylalanine Ammonia Lyase5</i>	não se aplica	orange1.1g016039m	Fw-CTGACGATGGGGTCAATGGGA	112
				Rv-CGCTGCAGGGATCATCAGCGTA	
SAGT1	<i>Salicylic Acid Glucosyltransferase1</i>	at2g43820.1	orange1.1g012194m	Fw-CCAAGCGCCTAGATCACAA	92
				Rv-GGACGAGGATGACGAATCTC	
BSMT1	<i>Benzoid acid/SA carboxyl Methyltransferase1</i>	at3g11480.1	orange1.1g017514m	Fw-GTTTAAACGAGGCCGTTGATG	200
				Rv-TCGTCAAGGAAACTGTCACG	

Gene	Gene name/Description	TAIR	Phytozome	Sequência dos primers (5'→3')	Amplicon (pb)
<i>GH3.5</i>	<i>Gretchen Hagen3.5</i>	at4g27260.1	orange1.1g006862m	Fw-TCAGTCCCAAATGTCCCAAG	70
				Rv-GTAGTGGCCTTGTTGTTGTTGC	
<i>NPR1</i>	<i>Non-expressor of Pathogenesis Related gene1</i>	at1g64280.1	orange1.1g007923m	Fw-AAGGGAGCTCGGCCATCAGA	171
				Rv-TGCAGCCTTAGTGAGCCGCT	
<i>NPR3</i>	<i>Non-expressor of Pathogenesis Related gene3</i>	at5g45110.1	orange1.1g007849m	Fw-TCTGGAGGGAGAAATGAGG	70
				Rv-TGTGGGAGGTGATAAAGGC	
<i>WRKY46</i>	<i>WRKY46 transcription fator</i>	at2g46400.1	orange1.1g017895m	Fw-AGGTCGACGATGGATAGGG	110
				Rv-GCGAGTTTCTGGAGAGGAAG	
<i>WRKY62</i>	<i>WRKY62 transcription fator</i>	at5g01900.1	orange1.1g020291m	Fw-GTCAGGCCACGTCTTCATCT	149
				Rv-CATCGCTTTTGACCCTTCTC	
<i>WRKY70</i>	<i>WRKY70 transcription fator</i>	at3g56400.1	orange1.1g021598m	Fw-CAGCAGCAGCAGGCGAATTCTT	100
				Rv-GTCCTTCGCCGCCGGTCTCT	

Gene	Gene name/Description	TAIR	Phytozome	Sequência dos primers (5'→3')	Amplicon (pb)
<i>PR2</i>	<i>Pathogenesis Related Protein 2</i>	at3g57260.1	orange1.1g019260m	Fw-CGGTCGTTTCCGACGGATCGTT	132
				Rv-CCGTCGGCCACCCACTCTCT	
<i>CAL5</i>	<i>Calose Synthase5</i>	at4g03550.1	orange1.1g000259m	Fw-CCCAAGTATTCCGGCCCTTT	107
				Rv-CACGGGGGTCAAGACAATCA	
<i>CAL7</i>	<i>Calose Synthase1</i>	at4g04970.1	orange1.1g000258m	Fw-CAGGTGTATGGGCAGCAGAA	121
				Rv-CATCCCTCCCCAAGTGAACC	

5.6 Forma de análise dos dados

As análises e normalização da expressão dos genes foram realizadas com o software GenEx (MultiD Analysis AB, Göteborg, Sweden), com base na eficiência e CT gerado pelo algoritmo Miner (ZHAO; FERNALD, 2005). Os níveis de expressão foram estimados pela normalização com dois genes de referência, em escala de $\text{Log}_2 \textit{fold change}$, comparando com plantas sadias não infectadas, e expressão relativa considerando a fórmula $N_{\text{rel}}=2^{(C_{\text{qmin}}-C_{\text{q}})}$.

Para identificar os genes diferencialmente expressos foi feita análise estatística por Teste-t. De acordo com os valores de significância, a diferença no nível de expressão dos genes foi classificada como significativas (p-valor $\leq 0,05$), considerando o ponto de corte de $\text{Log}_2 \textit{fold change}$ de ± 1 .

5.7 Análises de microscopia

Para detecção de calose, amostras de pecíolo de plantas não infectadas e infectadas com a bactéria '*Ca. Liberibacter asiaticus*' foram coletadas (16 meses após inoculação) e rapidamente fixadas em solução de FAA. Após incubação *overnight*, as amostras fixadas foram seccionadas a 10 μm de espessura em micrótomo de deslize (Leica), as secções coradas com 1% azul de anilina diluído em álcool 70% e visualizadas sob luz UV.

Para análises anatômicas gerais, amostras de pecíolo foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Durante a fixação, as amostras foram colocadas numa bomba à vácuo para a retirada do ar. Após desidratação em série etílica, as amostras foram infiltradas em hidróxi-etil-metacrilato (Leica Histo-resin), conforme instrução do fabricante. Os blocos foram seccionados a 5 - 7 μm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. As secções foram coradas com o azul de toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais e o cloreto de zinco iodado para a detecção de amido (JENSEN, 1962).

As secções também foram analisadas sob luz polarizada para visualização dos cristais de oxalato de cálcio.

6 RESULTADOS

6.1 Experimento de desafio com HLB

Plantas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sinensis* foram inoculadas com cada bactéria em experimentos independentes. Tecidos foliares foram coletados em *time course* de sete e trinta dias após inoculação (dai) e em estágio de sintoma, sendo este observado 9 meses após inoculação (mai), em infecção com a bactéria *CaLas*, e 29 mai para *CaLam*. No caso do trifoliata, que apresenta sintomas indefinidos da doença, coletas do estágio de sintoma foram feitas no mesmo tempo que o correspondente em *C. sinensis*.

Sintomas típicos da doença em plantas de *C. sinensis*, incluindo mosaico mosqueado das folhas, com tendência a clorose, amarelecimento dos ramos, folhas coriáceas, com nervuras amareladas e proeminentes (*vein corking*). As plantas do trifoliata não manifestaram um fenótipo definido da doença (**Figura 2**).

O RNA total foi isolado dos tecidos foliares utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen). A integridade e distribuição do RNA foram verificadas através de eletroforese em gel desnaturante de agarose (**Figura 3**). A quantificação do RNA foi feita pela leitura de absorbância a 260 nm no Nanodrop ND8000.

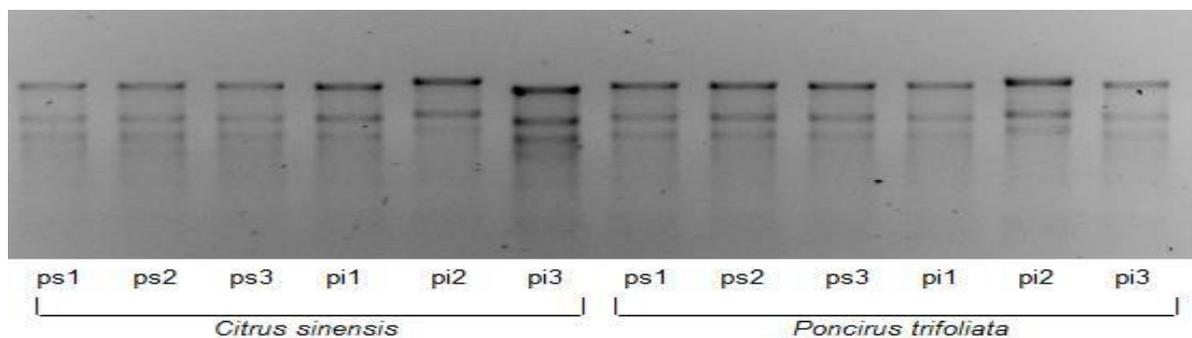


Figura 2: Padrão eletroforético de RNA total em gel desnaturante de agarose, plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata*, sete dias após infecção, experimento com “*Ca. Liberibacter americanus*”.



Figura 3: Plantas de *Citrus sinensis* (A-E) e *Poncirus trifoliata* (F e G) infectadas com *CaLas* (A, D, E e F) e *CaLam* (B, C e G) em estágio de sintoma. A. Ramos com padrões de mosqueados irregulares. D e E. Detalhe de folhas com sintomas típicos de *vein corking* e setores cloróticos. B. Ramos cloróticos, com amarelecimento das nervuras, detalhe em C. F. Ramos sem manifestação de sintomas definidos, com detalhe em G.

6.2 Seleção de genes de referência

A acurácia da expressão gênica depende da seleção de genes de referência ou normalizadores adequados para normalização dos dados (PFAFFL *et al.*, 2004). Para isso, foi avaliada a estabilidade de sete genes de referência codificantes: SAND, FBOX, PTB1, UPL7, GAPC2, considerados superiores de acordo com Mafra *et al.* (2012), além do TIP41 e 18S (ALBRECHT & BOWMAN, 2008). Usando o algoritmo geNorm (VANDERSOMPELE *et al.*, 2002), TIP41 e SAND foram identificados como o par de genes mais estável dentre as comparações par-a-par.

Os genes UPL7 e 18S foram retirados da análise devido à baixa eficiência de amplificação (**Tabela 1**). Uma vez identificado os melhores genes de referência, procedeu-se com os ensaios de RT-qPCR com os genes selecionados.

Tabela 1: M-value dos genes de referência obtidos pelo geNorm.

Gene	M-value (<i>anti Log₂</i>)
TIP41	0,327
SAND	0,327
GAPDH	0,372
PTB1	0,404
FBOX	0,509

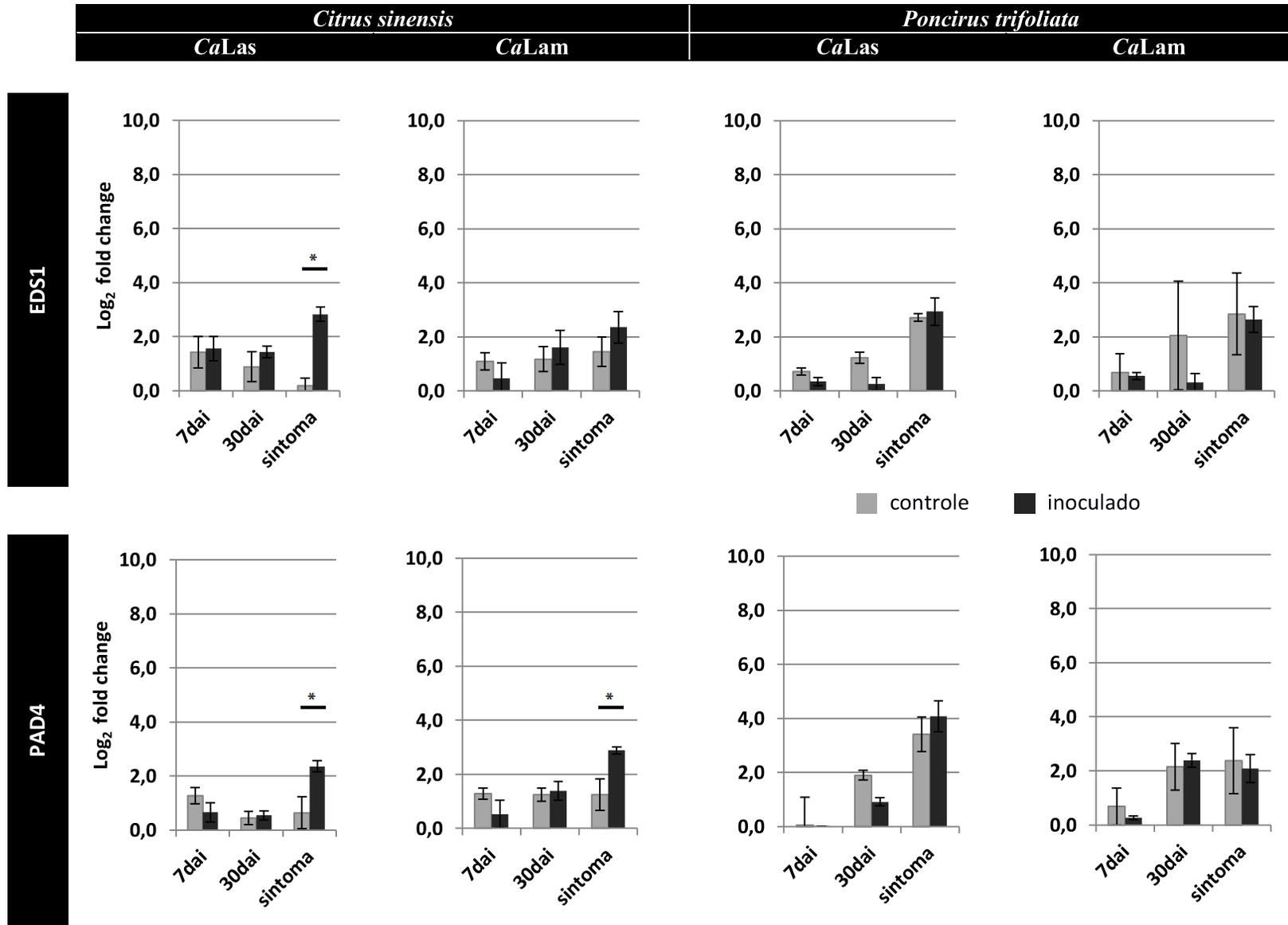
6.3 Análises de expressão gênica

As análises de expressão gênica foram realizadas com o software GenEx (MultiD Analysis AB, Göteborg, Sweden), com base na eficiência e CT gerado pelo programa Miner. Os níveis de expressão foram estimados pela normalização com dois genes de referência, em escala de $\text{Log}_2 \text{fold change}$, comparando com plantas saudias não infectadas (**Tabela 2**).

Os genes *upstream* da via apresentaram níveis significantes de indução, com destaque para o *EDS1*, *PAD4* e *NDR1*, entre os diferentes tratamentos ao longo do *time-course*. Por outro lado, o gene de HSP90 foi reprimido nos estágios tardios de infecção em *C. sinensis*. Porém, não apresentou alterações significantes no trifoliata. Os genes associados a biossíntese do ácido salicílico por intermédio da via da fenilalanina amônia liase (*PAL*) foram menos expressos no estágio tardio de infecção, principalmente para as plantas de *C. sinensis*. Associado ao metabolismo do ácido salicílico, os genes *BSMT1*, *SAGT1* e *GH3.5* foram regulados positivamente em laranja, enquanto no trifoliata observaram-se modestas alterações (**Gráfico 1**).

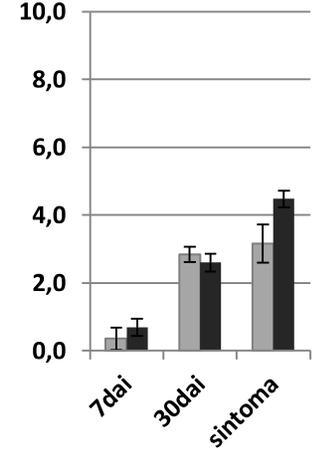
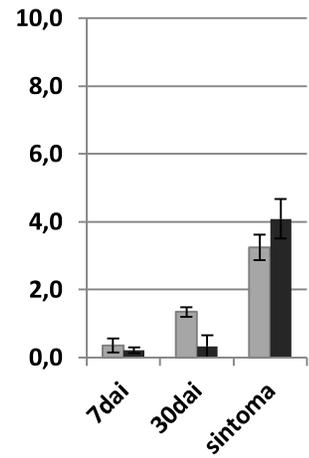
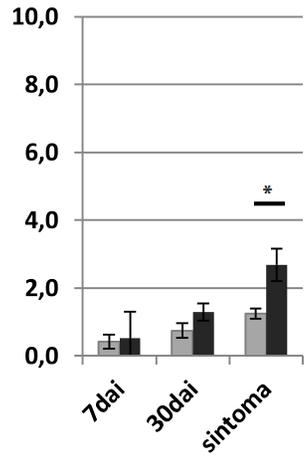
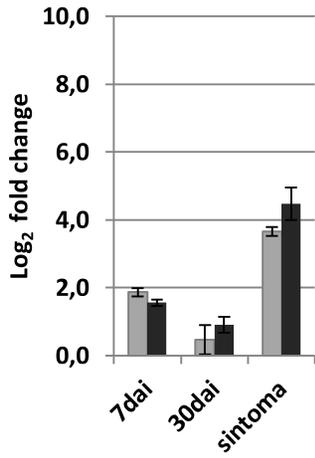
Considerando que os genes *upstream* da via do ácido salicílico foram regulados positivamente entre os tratamentos, poderia se esperar que os genes *downstream* da via apresentassem o mesmo comportamento, entretanto, não foi observado alterações significantes em tal grupo de genes. A regulação fina das concentrações do hormônio na planta, por intermédio de enzimas modificadoras, possivelmente, pode atuar como um mecanismo que impede a ativação dos genes *downstream*.

Gráfico 1: Níveis de expressão dos genes com valores significantes. Representação das plantas controle e inoculadas normalizadas com os genes endógenos *TIP41* e *SAND*. Asterisco indica variação significativa entre tratamentos.



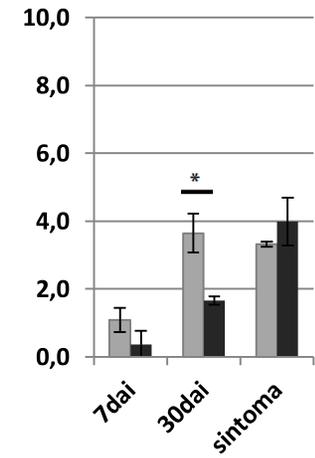
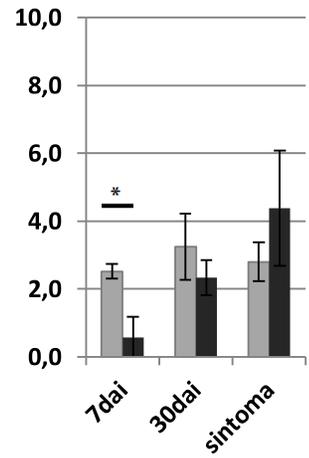
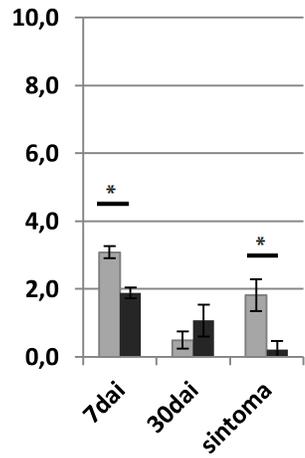
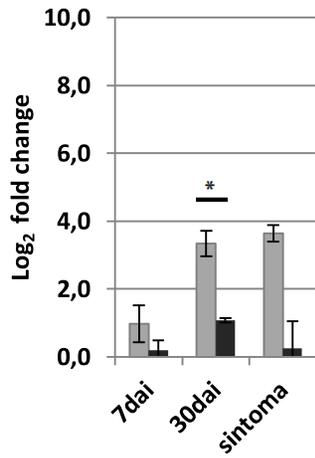
<i>Citrus sinensis</i>		<i>Poncirus trifoliata</i>	
<i>CaLas</i>	<i>CaLam</i>	<i>CaLas</i>	<i>CaLam</i>

NDRI1



■ controle ■ inoculado

HSP90



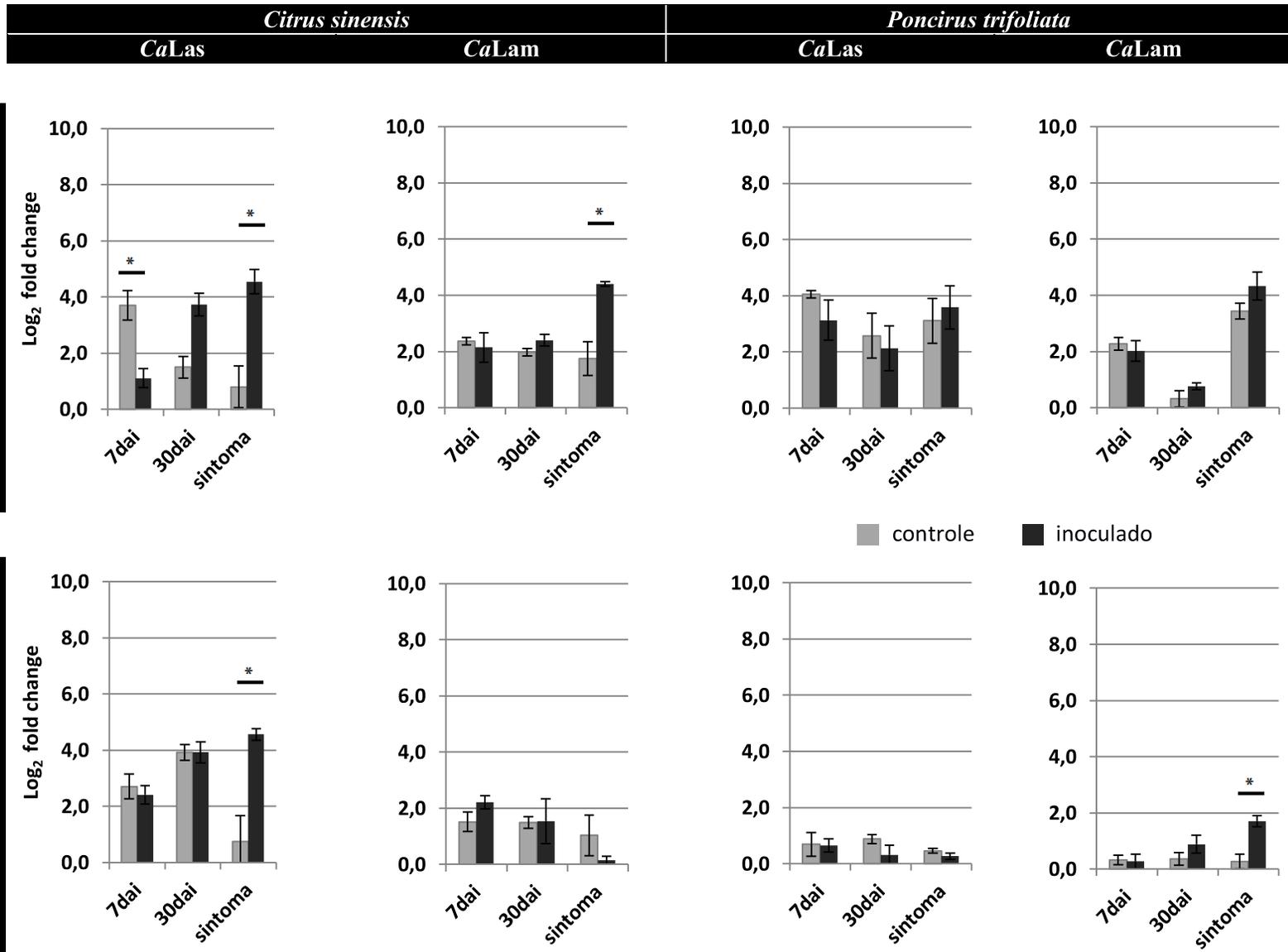


Tabela 2: Valores de expressão gênica relativa (RE) obtidos por RT-qPCR de plantas infectadas em ralação ao controle normalizados com os genes endógenos *TIP41* e *SAND*. Valores em destaque foram considerados significativos ($p \leq 0,05$).

		<i>Citrus sinensis</i> CaLas			<i>Citrus sinensis</i> CaLam			<i>Poncirus trifoliata</i> CaLas			<i>Poncirus trifoliata</i> CaLam		
		p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV
<i>EDSI</i>	07 dai	0,796	0,13	0,77	5,1E-02	-0,63	0,26	4,5E-02	-0,37	0,14	8,3E-01	-0,11	0,84
	30 dai	0,106	0,55	0,34	4,9E-01	0,43	0,88	3,9E-02	-0,97	0,34	8,7E-01	-0,04	0,34
	sintoma	0,006	2,64	0,35	2,0E-01	0,90	0,83	5,4E-01	0,22	0,53	8,7E-01	-0,20	1,88
<i>PAD4</i>	07 dai	0,038	-0,61	0,21	1,0E-01	-0,75	0,44	9,5E-04	0,98	0,05	4,2E-01	-0,42	0,73
	30 dai	0,612	0,09	0,26	6,8E-01	0,15	0,54	3,4E-03	-0,99	0,10	7,0E-01	0,23	0,90
	sintoma	0,042	1,72	0,63	3,4E-02	1,65	0,54	2,7E-01	0,66	0,77	7,6E-01	-0,29	1,45
<i>NDR1</i>	07 dai	0,005	-0,31	0,04	7,8E-01	0,11	0,59	4,6E-01	-0,14	0,28	2,7E-01	0,33	0,37
	30 dai	0,062	0,44	0,20	1,3E-02	0,56	0,11	6,4E-02	-1,01	0,46	3,1E-01	-0,24	0,31
	sintoma	0,120	0,83	0,55	2,5E-02	1,44	0,40	2,0E-01	0,84	0,78	9,6E-02	1,31	0,76
<i>SGT1B</i>	07 dai	0,584	-0,03	0,07	2,3E-01	0,29	0,30	3,5E-01	-0,64	0,91	2,0E-01	0,56	0,51
	30 dai	0,756	-0,03	0,15	5,1E-01	0,18	0,40	2,9E-01	-0,50	0,62	1,6E-01	-0,69	0,54
	sintoma	0,095	1,08	0,62	8,0E-01	0,14	0,82	2,0E-01	1,03	0,94	6,3E-01	0,17	0,54
<i>HSP90</i>	07 dai	0,251	-0,78	0,84	2,5E-02	-1,20	0,34	2,5E-02	-1,95	0,55	2,3E-01	-0,73	0,74
	30 dai	0,010	-2,26	0,39	2,4E-01	0,58	0,61	2,0E-01	-0,91	0,83	2,4E-02	-2,00	0,54
	sintoma	0,33	0,18	0,24	4,9E-02	-1,60	0,64	2,5E-01	1,59	1,69	2,1E-01	0,67	0,64
<i>RARI</i>	07 dai	0,050	-1,10	0,45	2,3E-01	0,10	0,10	2,6E-02	0,36	0,10	1,9E-01	0,30	0,27
	30 dai	0,021	-0,89	0,22	6,7E-01	-0,06	0,21	8,4E-01	-0,02	0,13	7,5E-03	-1,69	0,25
	sintoma	0,556	0,33	0,80	4,4E-01	-0,44	0,80	3,1E-01	0,44	0,57	1,6E-01	0,61	0,49
<i>SARD1</i>	07 dai	0,925	0,04	0,59	5,1E-01	0,17	0,36	4,3E-02	0,74	0,27	7,6E-02	1,03	0,52
	30 dai	0,123	0,76	0,51	2,4E-01	-0,39	0,41	5,4E-01	0,26	0,62	5,8E-02	0,32	0,14
	sintoma	0,334	-0,29	0,39	5,3E-01	0,62	1,41	1,5E-01	0,76	0,57	6,5E-04	1,70	0,08
<i>ICSI</i>	07 dai	0,976	-0,02	0,93	4,6E-02	1,24	0,48	6,1E-01	0,31	0,89	1,3E-01	-0,66	0,45
	30 dai	0,603	0,10	-0,12	2,4E-01	0,32	0,33	1,9E-01	-0,83	0,74	2,3E-02	-1,08	0,29
	sintoma	0,481	-0,33	0,67	6,4E-01	-0,13	0,41	2,6E-03	-4,88	0,43	5,3E-02	-2,07	0,86

		<i>Citrus sinensis</i> CaLas			<i>Citrus sinensis</i> CaLam			<i>Poncirus trifoliata</i> CaLas			<i>Poncirus trifoliata</i> CaLam		
		p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV
<i>PAL2</i>	07 dai	0,908	-0,09	1,25	4,2E-01	-0,42	0,74	6,4E-01	0,17	0,55	2,0E-01	-0,12	0,11
	30 dai	0,947	-0,04	1,04	<u>1,0E-02</u>	<u>-1,99</u>	<u>0,35</u>	9,3E-01	0,03	0,57	<u>5,0E-03</u>	<u>4,03</u>	<u>0,53</u>
	sintoma	<u>0,004</u>	<u>-2,42</u>	<u>0,25</u>	<u>4,9E-02</u>	<u>-1,76</u>	<u>0,70</u>	<u>4,8E-02</u>	<u>2,02</u>	<u>0,79</u>	<u>5,0E-03</u>	<u>-2,20</u>	<u>0,27</u>
<i>PAL3</i>	07 dai	0,547	-0,55	1,34	9,5E-02	-1,88	1,08	3,2E-01	0,38	0,50	<u>5,8E-03</u>	<u>2,44</u>	<u>0,32</u>
	30 dai	0,093	-1,10	0,63	<u>8,4E-03</u>	<u>-3,98</u>	<u>0,64</u>	9,7E-01	0,02	0,93	2,9E-01	0,23	0,28
	sintoma	0,075	-2,56	1,29	2,7E-02	0,83	0,24	2,8E-01	1,64	1,93	<u>1,6E-02</u>	<u>-2,55</u>	<u>0,57</u>
<i>PAL4</i>	07 dai	0,895	0,14	1,60	5,0E-01	0,42	0,88	1,1E-01	0,16	0,10	5,8E-01	0,03	0,08
	30 dai	0,656	-0,25	0,85	6,3E-01	0,11	0,34	6,4E-01	-0,15	0,47	<u>3,0E-04</u>	<u>5,97</u>	<u>0,18</u>
	sintoma	<u>0,019</u>	<u>-2,69</u>	<u>0,65</u>	<u>1,2E-02</u>	<u>-1,97</u>	<u>0,38</u>	<u>3,0E-02</u>	<u>2,54</u>	<u>0,78</u>	2,1E-01	-0,94	0,89
<i>PAL5</i>	07 dai	0,585	0,48	1,28	<u>2,8E-03</u>	<u>3,44</u>	<u>0,32</u>	<u>3,8E-02</u>	<u>1,07</u>	<u>0,37</u>	<u>1,2E-02</u>	<u>1,81</u>	<u>0,34</u>
	30 dai	0,212	-1,05	1,00	<u>6,7E-03</u>	<u>-5,47</u>	<u>0,78</u>	8,2E-01	0,10	0,65	<u>3,8E-02</u>	<u>1,45</u>	<u>0,50</u>
	sintoma	<u>0,020</u>	<u>-5,62</u>	<u>1,42</u>	<u>1,1E-02</u>	<u>-2,22</u>	<u>0,41</u>	<u>1,1E-02</u>	<u>3,14</u>	<u>0,57</u>	<u>3,5E-02</u>	<u>-1,51</u>	<u>0,50</u>
<i>EDS5</i>	07 dai	1,23	-0,39	0,15	3,9E-01	0,30	0,49	1,9E-01	-1,22	1,09	1,3E-01	-0,28	0,19
	30 dai	0,05	1,75	0,20	9,8E-01	-0,01	0,41	4,3E-01	-0,75	1,30	8,5E-02	0,44	0,24
	sintoma	1,99	1,82	0,83	0,11828	0,31	0,20	5,2E-01	0,54	1,22	5,6E-02	1,24	0,53
<i>BSMT1</i>	07 dai	<u>0,032</u>	<u>-2,62</u>	<u>0,83</u>	6,0E-01	-0,22	0,62	1,8E-01	-0,93	0,80	5,1E-01	-0,261	0,566
	30 dai	0,0097	-0,77	0,13	3,7E-02	0,43	0,15	8,9E-01	-0,46	4,82	1,9E-01	0,451	0,400
	sintoma	<u>0,0094</u>	<u>3,71</u>	<u>0,63</u>	<u>1,9E-02</u>	<u>2,65</u>	<u>0,64</u>	7,6E-01	0,48	2,42	1,4E-01	0,895	0,652
<i>SAGT1</i>	07 dai	0,230	-0,33	0,34	1,2E-02	-0,56	0,11	4,6E-02	-0,32	0,12	5,3E-03	-0,95	0,12
	30 dai	0,514	0,07	0,16	<u>1,6E-02</u>	<u>1,58</u>	<u>0,34</u>	1,2E-01	-0,56	0,37	<u>7,4E-02</u>	<u>-1,25</u>	<u>0,62</u>
	sintoma	<u>0,025</u>	<u>1,30</u>	<u>0,36</u>	<u>4,1E-02</u>	<u>1,90</u>	<u>0,69</u>	3,7E-01	0,87	1,30	3,3E-01	0,47	0,64
<i>GH3.5</i>	07 dai	<u>0,006</u>	<u>-1,71</u>	<u>0,23</u>	8,9E-01	-0,05	0,62	3,2E-01	0,14	0,19	7,5E-03	-0,53	0,08
	30 dai	0,074	0,28	0,14	3,4E-01	0,29	0,41	5,3E-02	0,99	0,41	1,4E-02	0,75	0,15
	sintoma	<u>0,032</u>	<u>1,75</u>	<u>0,56</u>	<u>8,7E-03</u>	<u>4,10</u>	<u>0,67</u>	<u>3,1E-02</u>	<u>1,98</u>	<u>0,62</u>	1,4E-01	1,40	1,01
<i>NPR1</i>	07 dai	0,697	0,08	0,32	5,9E-01	-0,15	0,42	9,7E-01	-0,23	0,63	6,6E-01	0,08	0,26
	30 dai	0,680	0,04	0,15	3,4E-01	-0,13	0,18	<u>2,3E-03</u>	<u>-2,76</u>	<u>0,23</u>	1,6E-01	-0,49	0,40
	sintoma	0,872	-0,03	0,31	8,2E-01	0,09	0,58	<u>7,4E-03</u>	<u>-4,74</u>	<u>0,71</u>	1,8E-02	-0,33	0,08

		<i>Citrus sinensis</i> CaLas			<i>Citrus sinensis</i> CaLam			<i>Poncirus trifoliata</i> CaLas			<i>Poncirus trifoliata</i> CaLam		
		p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV	p-valor	RE	STDV
NPR3	07 dai	0,164	-0,27	0,22	6,7E-02	0,16	0,08	4,2E-02	0,26	0,10	<u>6,1E-03</u>	<u>2,86</u>	<u>0,39</u>
	30 dai	0,436	-0,15	0,27	<u>5,6E-03</u>	<u>1,04</u>	<u>0,14</u>	4,7E-01	-0,20	0,40	<u>2,7E-03</u>	<u>1,21</u>	<u>0,11</u>
	sintoma	0,973	0,00	0,12	1,3E-01	0,92	0,63	8,3E-01	0,08	0,53	4,2E-01	-0,50	0,86
PR2	07 dai	0,529	-0,28	0,66	1,6E-01	0,70	0,56	8,2E-01	-0,04	0,28	7,8E-01	-0,06	0,32
	30 dai	0,980	0,01	0,31	9,6E-01	0,05	1,57	1,3E-01	-0,55	0,39	2,3E-01	0,52	0,54
	sintoma	<u>0,013</u>	<u>3,81</u>	<u>0,76</u>	2,0E-01	-0,89	0,81	6,4E-02	-0,19	0,09	<u>6,4E-03</u>	<u>1,44</u>	<u>0,20</u>
WRKY46	07 dai	0,499	-0,25	0,53	2,8E-01	-0,04	0,05	7,4E-01	-0,09	0,42	6,2E-01	0,09	0,26
	30 dai	0,921	0,03	0,42	6,1E-01	-0,09	0,25	3,4E-01	0,21	0,29	8,6E-02	0,23	0,13
	sintoma	0,963	0,01	0,39	5,0E-02	1,28	0,52	1,5E-01	0,85	0,64	3,1E-01	0,44	0,57
WRKY62	07 dai	0,137	-1,32	0,95	1,4E-02	-0,39	0,08	2,0E-04	-0,57	0,01	2,7E-01	0,25	0,28
	30 dai	0,105	-0,71	0,43	1,4E-03	0,82	0,05	8,2E-02	-1,26	0,67	5,7E-02	-0,62	0,27
	sintoma	0,964	0,03	0,99	1,8E-01	0,71	0,62	6,9E-02	1,74	0,84	5,1E-02	1,62	0,66
WRKY70	07 dai	0,450	-0,26	0,49	1,7E-02	0,55	0,13	8,6E-03	-0,31	0,05	4,9E-01	-0,44	0,91
	30 dai	0,225	-0,11	0,11	1,0E-01	0,86	0,51	5,9E-03	-0,76	0,10	9,8E-01	-0,01	0,48
	sintoma	0,319	0,10	0,13	4,5E-01	0,27	0,50	7,6E-02	1,64	0,83	2,9E-01	0,33	0,40
CAL5	07 dai	0,754	-0,26	1,26	<u>2,3E-02</u>	<u>1,78</u>	<u>0,48</u>	8,8E-01	0,03	0,27	<u>3,7E-02</u>	<u>-1,06</u>	<u>0,36</u>
	30 dai	0,049	0,12	0,05	1,5E-02	0,48	0,10	3,3E-01	-0,58	0,80	<u>1,3E-02</u>	<u>1,32</u>	<u>0,27</u>
	sintoma	0,468	0,37	0,72	<u>2,9E-02</u>	<u>-1,67</u>	<u>0,50</u>	6,2E-01	-0,10	0,29	2,8E-01	-0,47	0,54
CAL7	07 dai	0,773	-0,13	0,69	7,5E-02	1,16	0,58	<u>2,4E-02</u>	<u>-1,16</u>	<u>0,32</u>	7,3E-02	0,58	0,29
	30 dai	0,521	-0,21	0,47	9,7E-02	0,86	0,50	4,1E-01	0,17	0,28	5,3E-02	0,93	0,38
	sintoma	0,062	0,23	0,10	<u>2,9E-03</u>	<u>-1,93</u>	0,18	9,7E-01	0,02	0,63	7,3E-01	-0,07	0,29

6.4 Análises de microscopia

Calose é um polímero de açúcar amplamente distribuído entre as espécies botânicas e que atua em vários processos de desenvolvimento da planta. Diferentes condições de estresse, seja biótico ou abiótico, podem estimular a produção de calose. Estudos têm demonstrado que o ácido salicílico influencia positivamente a deposição de calose. Apesar de a calose desempenhar um papel importante na defesa contra patógenos, sua deposição não pode ser considerada um mecanismo de defesa universal em plantas. Ademais, Nishimura e colaboradores (2003) observaram que a síntese de calose pode de alguma forma, inibir as respostas de defesa mediadas pelo ácido salicílico.

Diferentes trabalhos têm reportado a deposição e acúmulo de calose em plantas infectadas com '*Ca. Liberibacter asiaticus*', sendo esta deposição considerada um dos elementos ligados aos sintomas. A fim de verificar se a calose poderia estar associada à manifestação dos sintomas em *C. sinensis* e no trifoliata, avaliações microscópicas foram feitas, utilizando o método de coloração específico para calose com azul de anilina (**Figura 4**).

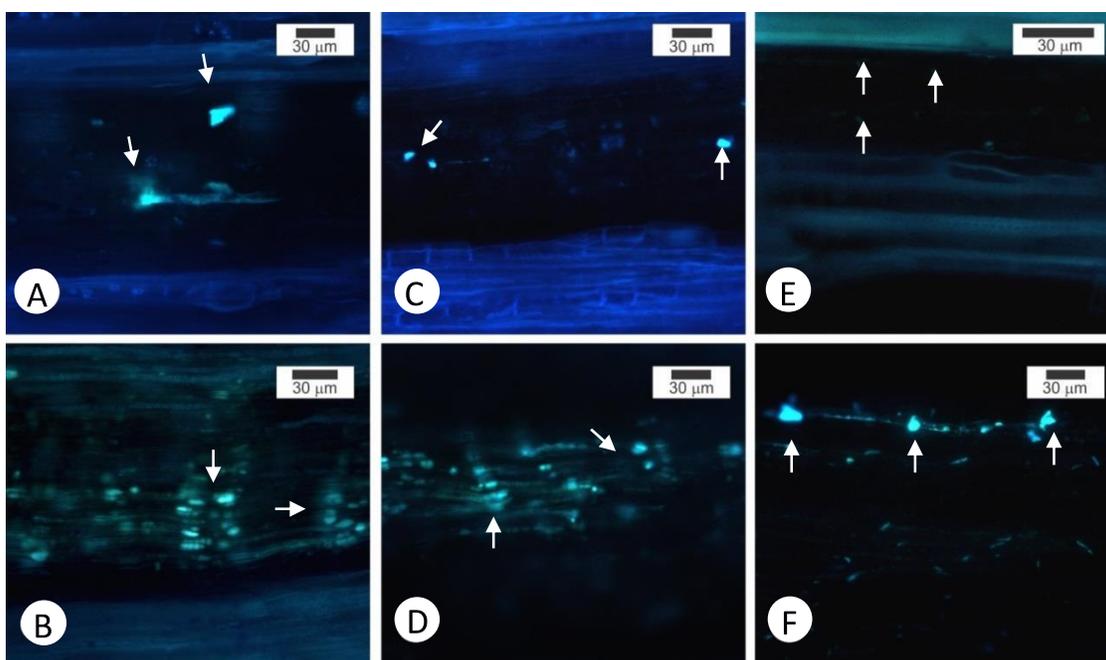


Figura 4: Padrão de deposição de calose em pecíolos de *Citrus sinensis* (A-D) e *Poncirus trifoliata* Raf. (E e F) em cortes longitudinais. Sadios (A, C, E) e infectados com “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (B, D, F).

Qualitativamente foram visualizadas diferenças significativas na deposição e acúmulo de calose entre plantas infectadas e não infectadas, tanto em *C. sinensis* quanto no trifoliata. Em *C. sinensis*, foi observado maior acúmulo de calose em várias camadas adjacentes de células. No trifoliata, observa-se depósito de calose de forma mais pontual, em placas de células adjacentes, que formam um tubo contínuo elementos de vasos.

Avaliações com outros métodos histológicos revelaram significativas alterações estruturais em plantas infectadas, como: colapso das células do floema, aumento da atividade do câmbio, associada à proliferação dos vasos floemáticos, maior acúmulo de cristais de oxalato de cálcio e acúmulo de amido em células parenquimáticas (**Figura 5**). Não foi observado alterações nos pecíolos do trifoliata (**Figura 6**).

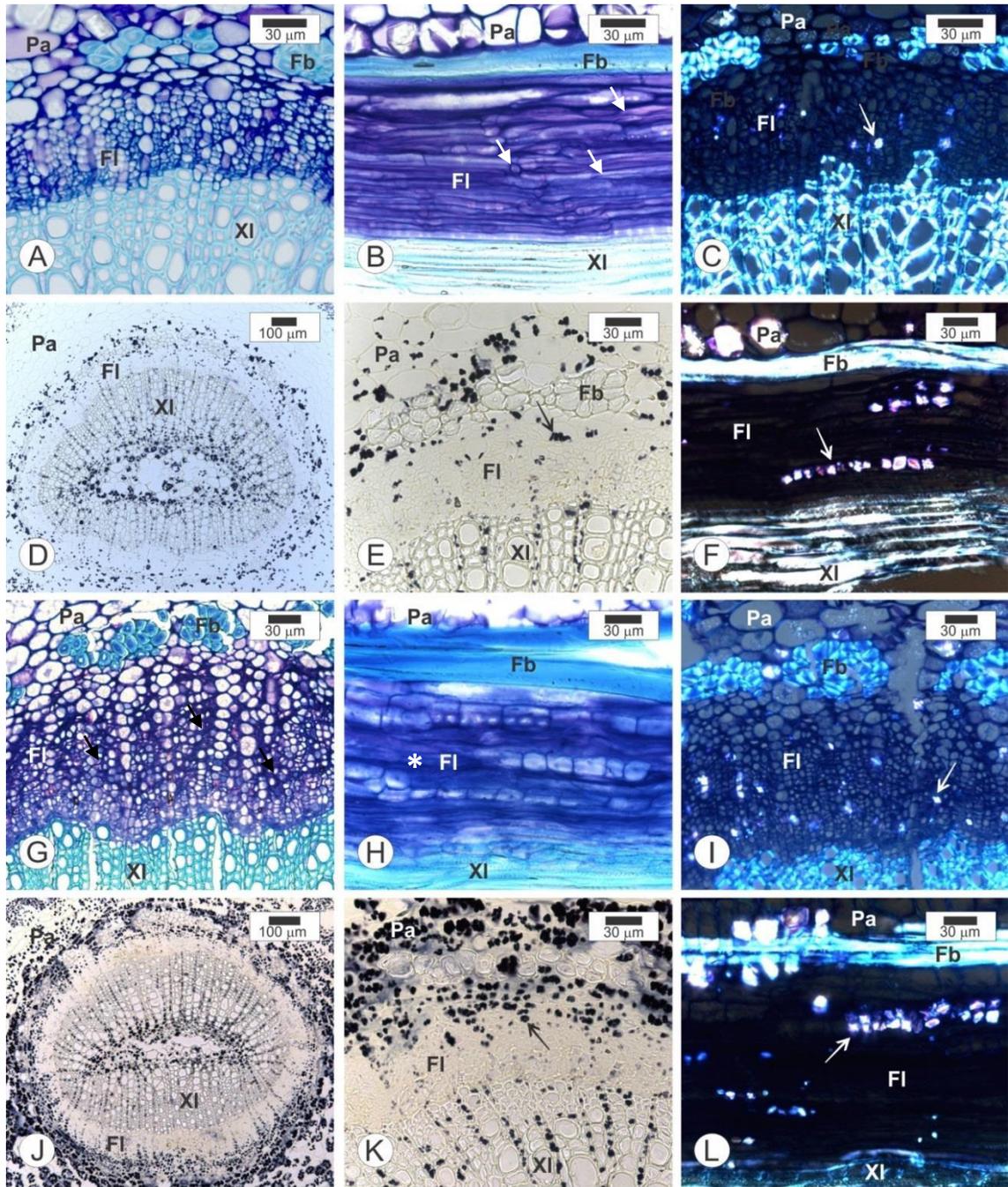


Figura 5: Anatomia dos pecíolos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Hamlin sadios (A-F) e infectados com “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (G-L). A, C, D-E, G-H, J-K. Secções transversais. B, F, I, L. Secções longitudinais. A. Visão geral do floema. B. Detalhe dos elementos de tubo crivado e das placas crivadas (setas). C. Análise do floema sob luz polarizada. Notar os cristais (seta). D-E. Reação positiva com cloreto de zinco iodado indicando as regiões com amido. D. Visão geral do cilindro vascular. E. Detalhe do floema. F. Cristais em série nas células do floema (seta). G –H. Detalhe do floema alterado. Notar o colapso dos elementos de tubo crivado (seta em G e * em H). I e L. Acúmulo de cristais nos

tecidos infectados observados sob luz polarizada (setas). J-K. Acúmulo de amido nos tecidos. K. Detalhe do floema. FB – Fibra do floema; FL – Floema; Pa – Parênquima; XI – Xilema.

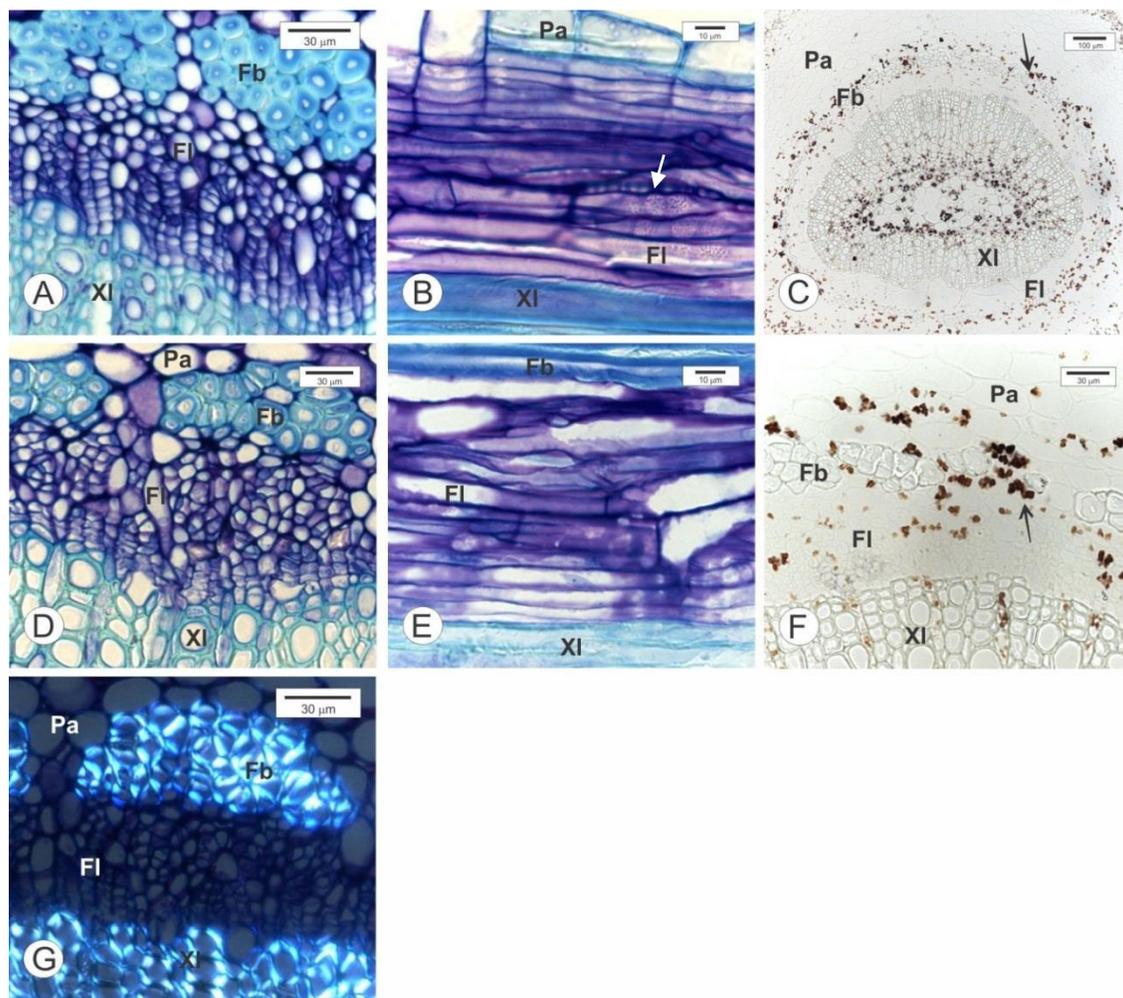


Figura 6: Anatomia dos pecíolos de *Poncirus trifoliata*. sadios (A-C, F e G) e infectados com “*Ca. Liberibacter asiaticus*” (D-E). A, C, D, F, G. Secções transversais. B, E. Secções longitudinais. A. Visão geral do floema. B. Detalhe dos elementos de tubo crivado e das placas crivadas compostas (setas). D-E. Visão do floema de amostras inoculadas. Notar ausência de alterações estruturais. G. Análise do floema sob luz polarizada. X-F. Reação positiva com cloreto de zinco iodado. FB – Fibra do floema; FL – Floema; Pa – Parênquima; XI – Xilema.

7 Discussão

Devido aos sérios danos causados às zonas citrícolas de ocorrência, o *Huanglongbing* dos citros tem mobilizado nas últimas décadas a atenção de grupos de pesquisas de diversas áreas do conhecimento. Isto, tendo em vista o desenvolvimento de ferramentas ou abordagens para o controle do inseto vetor, compreensão dos mecanismos de patogenicidade dos agentes etiológicos, estabelecimento de práticas culturais para remissão dos sintomas das plantas infectadas em campo, ou até o desenvolvimento de cultivares resistentes.

A fim de obter informações sobre as alterações globais na planta durante a infecção pela bactéria do HLB, muitos estudos têm sido realizados, com abordagens em transcritômica, proteômica, metabolômica, anatomia e da nutrição. Entretanto, os mecanismos biológicos sobre a evolução da doença durante a interação com o patógeno ainda são pouco compreendidos. Um dos maiores empecilhos para isto é a dificuldade de cultivo da bactéria em condições de laboratório, associado à complexidade genética e fisiológica das espécies dos citros.

Apesar dos postulados de Koch não terem sido preenchidos, a coexistência da bactéria e expressão da doença estabelecem as três espécies de '*Ca. Liberibacter spp.*' como os agentes etiológicos do HLB. Entretanto, a existência de outros fatores em associação com a doença não pode ser descartada.

O HLB afeta todas as espécies de citros e outras espécies próximas e desenvolve relação biotrófica com as mesmas. No trabalho realizado por Folimonova *et al.* (2009), foi observado uma larga amplitude de respostas entre trinta genótipos de citros durante infecção por '*Ca. Liberibacter asiaticus*'. De acordo com os níveis de sintomas expressos, os diferentes genótipos foram classificados em suscetíveis, moderadamente tolerantes ou tolerantes. Além disso, verificou-se que a bactéria se distribui de forma irregular nas plantas.

As variedades comerciais de *C. sinensis*, mandarins (*C. reticulata* Blanco) e tangelo (híbridos de *C. reticulata*) são os mais suscetíveis, enquanto a tolerância é observada em poucos genótipos, principalmente *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos. O trifoliata, apesar de ser infectado pelas espécies de *Liberibacter*, não apresenta sintomas bem definidos da doença (ALBRECHT; BOWMAN, 2012; ALBRECHT; BOWMAN, 2011; FOLIMONOVA *et al.*, 2009; MCCLEAN; SCHWARZ, 1970; MYIAKAWA, 1980).

Embora vários trabalhos tenham sido realizados, nenhum mecanismo molecular de interação planta-patógeno foi descrito que explicasse as diferenças de expressão de sintoma entre as diferentes espécies, híbridos, cultivares e variedades de citros. Por outro lado, em relação à interação planta-inseto vetor, estudos demonstram que o psilídeo *D. citri* sente menor atratividade pelo trifoliata, em relação aos seus híbridos com *Citrus* spp. (RICHARDSON; HALL, 2013).

Apesar de o floema ser rico em nutrientes, comparado a muitos outros produtos da planta, este pode impor algumas barreiras nutricionais para insetos que se alimentam estritamente da seiva (DOUGLAS, 2006; SANDSTRÖM; MORAN, 1999). Em muitas espécies vegetais, o conteúdo de nitrogênio e aminoácidos essenciais do floema constituem fatores limitantes para o desenvolvimento do inseto (WILKINSON *et al.*, 2001; WILKINSON; DOUGLAS, 2003). Por outro lado, a existência de bactérias simbiotas nas células do inseto permite contornar essa barreira, uma vez que tais microrganismos possuem genes associados a vias de produção de aminoácidos essenciais, que são dificilmente encontrados na seiva floemática (TAMAS *et al.*, 2002; VAN HAM *et al.*, 2003).

Estudos nesse âmbito de interação inseto-bactéria são bem conhecidos no caso de afídeos. Quanto aos psilídeos em citros, isto ainda é pouco explorado. Entretanto, sabe-se que no patossistema do HLB, a bactéria induz respostas na planta que inclui a liberação de voláteis atrativos ao inseto vetor. Contudo, Devido às alterações globais no conteúdo nutricional da planta doente, inclusive de nitrogênio, após algum tempo de permanência na planta infectada, os insetos acabam migrando para plantas sadias (GRAFTON-

CARDWELL *et al.*, 2013; MANN *et al.*, 2012). Ainda não se sabe se a bactéria pode trazer algum tipo vantagem para o inseto hospedeiro. Porém não se pode descartar a possibilidade de que a bactéria possa compensar as carências nutricionais do psilídeos que desenvolvem todo seu ciclo de vida em plantas infectadas.

Os eventos de resposta da planta à infecção por bactérias de floema são similares aos desencadeados por insetos sugadores de seiva do floema (CASTEEL *et al.*, 2012; KEMPEMA *et al.*, 2007). De alguma forma tais eventos evoluíram como uma defesa em largo espectro, sinalizando à planta – se há o patógeno, provavelmente há o inseto vetor, ou vice-versa.

A defesa das plantas contra patógenos biotróficos está associada principalmente a respostas reguladas por vias dependentes do ácido salicílico (GLAZEBROOK, 2005). Os níveis endógenos de SA aumentam no sítio de infecção e logo, em regiões distais a este, de modo a induzir respostas de defesa a nível sistêmico na planta e atuando como um processo de préimunização cuja duração se prolonga de semana a meses, chamado Resistência sistêmica adquirida (RSA) ou *systemic acquired resistance* (SAR), em inglês (FU; DONG, 2013; SHAH; ZEIER, 2013).

Trabalhos recentes têm demonstrado alterações globais dos níveis de hormônios em citros infectado com *Liberibacter*. Entretanto, pouco se sabe sobre as alterações em nível de interação gênica entre essas vias hormonais e suas implicações no patossistema do HLB dos citros (MARTINELLI *et al.*, 2012).

Sabendo-se que, as espécies de *Liberibacter* dos citros são patógenos biotrófico restritos ao floema, e que a via do ácido salicílico comumente é ativada na defesa contra esse tipo de patógeno. Este trabalho teve como objetivo, avaliar os níveis de expressão dos genes desta via e genes de interação em *Citrus sinensis*, como representante suscetível ao HLB e *Poncirus trifoliata*, como representante tolerante. Considerando as diferentes repostas dos citros às espécies de *Liberibacter* ocorrentes no Brasil, independentes experimentos de infecção foram feitos para ambas às bactérias.

7.1 Regulação da via do ácido salicílico e SAR

As plantas desenvolveram mecanismos finos de controle das vias de defesa mediadas por hormônios, para que a transdução de sinais da resposta imune ocorra apenas durante condições de desafio com patógenos e outros estados fisiológicos de estresse (BECKERS; SPOEL, 2006; KUPPUSAMY *et al.*, 2009). Este balanço pode ser alcançado através do *crosstalk* entre hormônios, uma vez que a planta não possui células especializadas de defesa, permitindo o desenvolvimento e crescimento ótimo da planta (ROBERT-SEILANANTZ *et al.*, 2011; ROBERT-SEILANANTZ *et al.*, 2007).

A resistência sistêmica adquirida é uma induzida resposta de defesa de plantas, envolvida na ativação da expressão de genes defesa e que confere resistência ou tolerância a um largo espectro de patógenos (FU; DONG, 2013). Devido a importância do SA na geração de sinais móveis que desencadeiam o SAR, esforços têm sido feitos a fim de identificar os componentes celulares da via de transdução do SA. Vários componentes já foram identificados. Entretanto, devido à diversidade e complexidade dos eventos que ocorrem durante interações planta-patógeno, poucos se sabe sobre a interação entre os componentes da via.

7.2 Sinalização *upstream* da via do ácido salicílico

De modo geral, os genes *upstream* da via EDS1, PAD4 e NDR1 foram induzidos gradativamente com a progressão da doença entre os tratamentos. Tais genes desempenham papel central entre o reconhecimento de moléculas associadas a patógenos e a ativação de vias de defesa *downstream* da via do SA, além de outros mecanismos de defesa. Fan *et al.* (2011) demonstraram que o gene *EDS1* foi induzido 2 e 6,5 vezes, em *C. sinensis* infectado com *CaLas*, em estágio inicial e tardio de infecção, respectivamente.

O gene *EDS1* (*Enhanced Disease Susceptibility1*) atua na regulação da resistência basal (AARTS *et al.*, 1998; WIERMER *et al.*, 2005) e imunidade desencadeada por efector associada a proteínas de resistência do tipo TIR-NB-LRR (BHATTACHARJEE *et al.*, 2011; HEIDRICH *et al.*, 2011). A proteína EDS1 pode interagir e formar um complexo ternário com as proteínas codificadas pelos genes *PAD4* (*Phytoalexin Deficient4*) e *SAG101* (*Senescence Associated Gene101*), cuja atividade combinada é essencial para sinalização de defesa (FEYS *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram que a interação EDS1-PAD4 é requerida para resistência basal, enquanto o EDS1 na forma não combinada atua no ETI. Possivelmente, o EDS1 atua como isca para efetores que se ligam ao PAD4 e SAG101 (VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008). O balanço dos *pools* de EDS1 citoplasmático e nuclear é necessário para completa ativação das respostas de defesa (GARCÍA *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2009). Por outro lado, *NDR1* é um gene que codifica uma proteína ancorada a glicosilfosfatidilinositol, cuja atividade está localizada entre os nós *EDS1/PAD4* e *SID2/EDS5* (AARTS *et al.*, 1998).

O complexo gênico formado pela *HSP90*, *SGT1b* e *RAR1*, que também atua *upstream* da via do SA, não apresentou alterações de expressão significativas, exceto o gene HSP90 que foi reprimido em *C. sinensis*, mas não no trifoliata.

Heat Shock Protein 90 é uma chaperona conservada entre os organismos envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo defesa contra patógenos, mediada por proteínas R (WEGELLE *et al.*, 2004). Assim como outras chaperonas, a HSP90 é altamente induzida durante condições de estresse em plantas (XU *et al.*, 2012). Estruturalmente ela pode se associar a um largo espectro de proteínas com atividades de co-chaperonas, de modo a formar um complexo com atividades moduladoras de diferentes processos metabólicos, de acordo com o seu ligante (LI *et al.*, 2012; SANGSTER; QUEITSCH, 2005). Vários trabalhos têm demonstrado a interação entre HSP90 e as proteínas produzidas pelos genes *SGT1* e *RAR1* (KADOTA; SHIRAZU, 2012; PRODOMOU, 2012; YAN *et al.*, 2012). Tais proteínas estão envolvidas em vias de defesa contra patógenos.

O fator de transcrição SARD1 apresentou indução significativa no estágio de sintoma em plantas de trifoliata para ambos experimentos com *CaLam* e *CaLas*. A proteína

codificada por este fator e seu homólogo CBP60g, ligante a calmodulina, se associam especificamente a sequência GAAATTTGG no promotor do gene *SID2 (ICS1)* e estão correlacionados produção de ácido salicílico em resposta ao reconhecimento de PAMPs (ZHANG *et al.*, 2010a). Diferentemente do CBP60g, o SARD1 não se liga a calmodulina (CaM). A habilidade de se ligar a CaM, sugere que CBP60g responda ao fluxo de Ca^{2+} , e promova o acúmulo de SA na célula. Embora ambos os genes pareçam ter função parcialmente redundante, CBP60g parece atuar mais rapidamente após o reconhecimento de PAMPs, enquanto *SARD1* desempenha um papel mais importante em estados mais posteriores no acúmulo de SA e limitação do desenvolvimento do patógeno. Isto ocorre porque em estágios iniciais de interação com o patógeno, os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos são elevados, resultando na ativação da sinalização da via do ácido salicílico pelo CBP60g, independentemente do EDS1. Quando a concentração de Ca^{2+} é estabilizada, o SARD1 assume o papel primário na ativação nas respostas de defesa. O nó de sinalização definido pelos genes CBP60g e SARD1 se localiza downstream do nó EDS1/PAD4 (WANG *et al.*, 2011).

7.3 Biossíntese do ácido salicílico

A biossíntese do SA ocorre tanto a nível local, durante a infecção pelo patógeno, quanto a nível sistêmico sob indução do SAR (MALAMY *et al.*, 1990; METRAUX *et al.*, 1990). Duas vias de biossíntese do hormônio têm sido propostas em plantas: a via da isocorismato sintase (ICS) e a via da fenilalanina amônia liase (PAL) (CHEN *et al.*, 2009a).

Neste trabalho, os níveis de expressão dos gene *ICS1* não apresentaram alterações significativas em relação a planta controle, embora menor expressão do gene tenha sido observado entre as plantas ao longo do experimento. Por outro lado, os genes da via da PAL são induzidos no início da infecção e reduzem sua expressão de modo gradativo para entre os tratamentos. Isto ocorre provavelmente devido ao lento processo de colonização da bactéria na planta.

Estudos de metaboloma de citros infectados por '*Ca. Liberibacter asiaticus*' revelaram acúmulo de fenilalanina nos tecidos do fruto em estágios sintomáticos (SLISZ *et al.*, 2012). Este acúmulo deve-se a inibição dos genes da via da PAL, e pode ser um dos mecanismos associada à patogenicidade da bactéria para suprimir as defesas da planta. Outros trabalhos com o fungo necrotrófico *Penicillium digitatum* dos citros, também reportaram a supressão da via da PAL na planta, tanto no sítio de infecção quanto em áreas distantes deste ponto (ISMAIL *et al.*, 1979; LISKER, *et al.*, 1983; MACARISIN *et al.*, 2007). Neste mesmo patossistema, Ballester e colaboradores (2006) relataram o aumento da atividade da PAL em zonas distantes do ponto de infecção, sugerindo, portanto, que esta indução ocorra em resposta a invasão pelo patógeno. Em diferentes patossistemas, genes dessa via são rapidamente induzidos durante infecção (TREMBLAY *et al.*, 2011).

A via do ICS é responsável pela síntese de maior parte (> 90%) do SA associado ao SAR (WILDERMUTH *et al.*, 2001). Nesta via, pela ação da isocorismato sintase, o corismato é convertido em isocorismato, que por sua vez é convertido em SA por uma isocorismato piruvato liase (IPL). *Arabidopsis* contém dois genes *ICS*: *ICS1* (*alias*. *SID2*, *EDS16*) e *ICS2*, cujas proteínas são transportadas até o cloroplasto, onde se processa a biossíntese do SA. A ausência do gene *ICS2* produz efeitos menos dramáticos para a planta do que mutantes nulos do *ICS1*, de modo que os dois genes representam um exemplo de redundância desigual (BRIGGS *et al.*, 2006).

Em condições normais, *ICS1* e *ICS2* apresentam baixos níveis de expressão. Uma vez que tais genes também estão envolvidos na síntese de filoquinona, a expressão constitutiva desses genes em condições não induzida está correlacionada com o requerimento da filoquinona como receptor de elétrons para o sistema fotossintético I (GROSS *et al.*, 2006).

Apesar da aparente menor contribuição do PAL para biossíntese do SA (< 10%), estudos têm sugerido que a alta atividade da PAL seja importante para síntese de AS induzida por patógenos, uma vez que a supressão dos genes envolvidos na via resulte no comprometimento do SAR (ELKIND *et al.*, 1990; PALLAS *et al.*, 1996). A atividade da PAL tem sido associada a respostas de defesa de plantas contra bactérias (PANINA *et al.*,

2005), fungos (MAUCH-MANI; SLUSARENKO, 1996; SULLIVAN, 2009), nematóides (VASYUKOVA *et al.*, 2007).

A fenilalanina amônia liase converte a L-fenilalanina em ácido cinâmico, precursor de vários compostos fenólicos, que incluem ligninas, ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóides, isoflavonóides e outros salicilatos que são essenciais para o desenvolvimento adaptativo, vascular, reprodutivo e de defesa das plantas (VOGT, 2009). A atividade do PAL pode ser induzida por diferentes condições de estresse como, frio, ataque por insetos, luz ultravioleta (UV), ozônio, invasão de patógenos, e aplicação exógena de hormônios, incluindo, jasmonatos, ácido salicílico, ácido abscísico e etileno (LEYVA *et al.*, 1995; LONGEMAN *et al.*, 2000; PASQUALINI *et al.*, 2012; RIOV *et al.*, 1969).

A PAL é codificada por uma família multigênica, cujo número de cópias varia de quatro (*PAL1-PAL4*) em arábido, a dezenas, em plantas superiores (CHANG *et al.*, 2008). Estes genes estão entre os mais estudados em plantas, principalmente em resposta a condições de estresse biótico e abiótico. As isoformas proteicas da PAL apresentam sensibilidade diferencial a metabólitos pertencentes a ramos particulares da via do fenilpropanóide (SARMA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2010).

7.4 Metabolismo do ácido salicílico

O gene BSMT1, que atua na conversão do ácido salicílico em metilsalicilato (MeSA), foi significativamente induzido no estágio de sintoma em plantas de *C. sinensis* para ambos os experimentos com *CaLas* e *CaLam*. Estudos recentes demonstram que citros infectados com '*Ca. Liberibacter asiaticus*' apresentam alterada composição de voláteis que afetam o comportamento de preferência do inseto vetor *D. citri* (MANN *et al.*, 2012). O inseto é inicialmente atraído pelo volátil MeSA, que é produzido em maior nível pelas plantas doentes, embora estas apresentem depleção de nutrientes essenciais a dieta dos

insetos, e que tornam a seiva menos gustativa. Desta forma, o vetor logo migra para plantas saudáveis, e apesar do pouco período se alimentando da seiva, o psílido pode estar apto a inocular a bactéria em outras plantas (GRAFTON-CARDWELL *et al.*, 2013; MANN *et al.*, 2012).

O MeSA é um constituinte natural de essências florais de várias espécies botânicas. Em condições fenotípicas de doença, a planta pode produzir maiores níveis do MeSA elicitado por patógenos (SHULAEV *et al.*, 1997), sendo considerado um sinalizador de defesa envolvido na comunicação planta-a-planta, além de estar envolvido na atração de insetos (ZHU; PARK, 2005).

Pesquisas tem discutido que o SA acumulado na planta após infecção por patógenos é convertido em MeSA, sendo este transportado através do floema, para regiões distais, onde é convertido na forma ativa do SA e desencadeia a resistência sistêmica (SAR) (LIU *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2007). Entretanto, trabalhos tem demonstrado que o papel do MeSA parece ser pouco participativo durante o desenvolvimento do SAR, uma vez que a conversão do SA em MeSA afeta negativamente os níveis do hormônio durante interações da planta com o patógeno (ATTARAN *et al.*, 2009; KOO *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2012).

A expressão do gene BSMT1 é regulada positivamente pelo jasmonato, e induzida durante infecção por patógenos e lesões causadas por insetos (CHEN *et al.*, 2003). Mutantes de *Arabidopsis* para os genes *pad4*, *npr1* e *ics1*, com baixo acúmulo de ácido salicílico, apresentam elevada expressão do BSMT1, assim como outros genes responsivos a jasmonatos (ATTARAN *et al.*, 2009). A formação do MeSA também pode influenciar a interação SA-JA, desencadeando um conjunto distinto de respostas de defesa que se comporta de maneira contra-ativa, sendo este um mecanismo de *crosstalk* negativo entre estes hormônios. Isto sugere que, por ação antagonista, a eliminação do ácido salicílico torna o efeito do jasmonato mais intenso (ZHENG *et al.*, 2012).

A superexpressão do gene BSMT1 em *Arabidopsis* resulta no aumento da produção de MeSA e expressão induzida dos genes responsivos a jasmonatos, como JAR2, LOX2 e

AOS. Os dois últimos codificam enzima-chave associadas a vias de biossíntese de jasmonatos (SONG *et al.*, 2008, SONG *et al.*, 2009). Por outro lado, mutantes *bsmt1* perdem completamente a capacidade de produzir MeSA induzido por patógenos, entretanto sem aparente efeito sobre a resistência adquirida (ATTARAN *et al.*, 2009). Portanto, é evidente que a biossíntese do MeSA é fortemente regulada pela via do jasmonato, porém sem aparente envolvimento direto desse hormônio no estabelecimento do SAR. Dado que, o MeSA produzido a partir do SA pela metiltransferase geralmente é perdido para atmosfera (KOO *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2012).

Dessa forma, a volatilização do MeSA mediada por produtos do patógeno resulta no decréscimo dos níveis de SA no sítio de infecção, e portanto, constitui um mecanismo de virulência que afeta negativamente as defesas da planta mediadas por SA (ZHENG *et al.*, 2012). Possivelmente, as bactérias causadoras do HLB usam esse mecanismo de volatilização do MeSA como estratégia para contornar a via de defesa mediada pelo ácido salicílico dos citros, assim como aumentar a atratividade das plantas infectadas sobre os insetos vetores.

A glicosiltransferase SAGT1 apresentou níveis significativos de indução na condição de sintoma em plantas de *C. sinensis*. Em arábido, duas glicosiltransferases estão envolvidas na modificação do ácido salicílico, codificadas pelos genes *AtSAGT1* e *AtSAGT2*, antes descritos como *UGT74F2* (LIM *et al.*, 2002) ou *AtSGT1* (SONG *et al.*, 2006) e *UGT74F1* (LIM *et al.*, 2002) ou *AtSGT2* (SONG *et al.*, 2006), respectivamente. A conjugação de glicose ao grupo hidroxila do SA forma SA 2-O- β -D-glicosídeo (SAG) e éster salicilato (SGE), como maior e menor conjugado, respectivamente (DEMPSEY, *et al.* 2011; SONG *et al.*, 2009).

A função exata dessas formas conjugadas ainda não foi bem caracterizada, embora hipóteses sugerem que a produção do SAG ocorra no citoplasma como reação detoxificante e forma de armazenamento vacuolar do ácido salicílico. O SAG pode retornar ao apoplasto onde é convertido novamente em SA por uma beta-glicosidase. Assim como o SAG, a função do SGE é pouco compreendida, entretanto este provavelmente não é transportado ao vacúolo (DEAN; DELANEY, 2008). Plantas saudáveis expressam o gene *SAGT1* de modo

constitutivo em baixos níveis. Entretanto, durante condições de patogênese, o nível de ácido salicílico sob a forma glicosilada é elevado de modo paralelo ao acúmulo do hormônio, sugerindo o envolvimento de glicosiltransferase, como SAGTs, na regulação fina dos mecanismos de defesa da planta (UMEMURA *et al.*, 2009). Transgênicos de *Arabidopsis* superexpressando o gene SAGT1 exibem respostas de defesa comprometida e níveis reduzidos de SA livre, durante infecção por *Pseudomonas syringae*. Entretanto, plantas cujo gene SAGT1 é silenciado não exibem fenótipo alterado durante infecção por patógenos (SONG *et al.*, 2008).

O gene *GH3.5* pertencente a família gênica GH3 (*Gretchen Hagen3*) que são responsivos a auxina. O *GH3.5* se apresentou indução significativa entre os tratamentos com a evolução da doença. Sua função está envolvida na adenilação do ácido indolacético e do ácido salicílico, atuando como modulador bifuncional das defesas mediadas pelo ácido salicílico e suscetibilidade mediada pela auxina durante interações planta-patógeno (STASWICK *et al.*, 2002). Estudos demonstram que o *GH3.5* regula positivamente a sinalização pelo ácido salicílico (ZHANG *et al.*, 2008).

No presente trabalho, os genes modificadores do ácido salicílico apresentaram níveis de expressão altamente significativos para *C. sinensis*. Aparentemente nesta condição, o SA se apresenta amplamente regulado por enzimas modificadoras. Entretanto, não é possível afirmar se tais modificações desempenham um papel positivo na sinalização da via de defesa, ou negativo, pela metabolização do hormônio em formas inativas.

7.5 Reguladores *downstream* da via do ácido salicílico

7.5.1 Reguladores NPR

O gene NPR1 e NPR3 atuam como reguladores chave da via de SAR mediada pelo ácido salicílico (PIETERSE; VAN LOON, 2004). Estes genes mantiveram seus níveis de expressão basal entre tratamentos.

Esforços têm sido feitos na tentativa de identificar os receptores do ácido salicílico. Usando diferentes métodos, dois grupos reportaram que as proteínas relacionadas à NPR1, NPR3 e NPR4 são os prováveis receptores do ácido salicílico em *arabidopsis* (FU *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012). De acordo com Fu e colaboradores, a proteína NPR1 não se liga diretamente ao ácido salicílico, mas através das NPR3 e NPR4. A concentração nuclear da NPR1 é controlada pelo ácido salicílico através dos receptores NPR3/NPR4. Concentrações elevadas do SA no sítio de infecção promovem a interação NPR1-NPR3, degradação da NPR1 e morte celular programada. Por outro lado, em postos distais, níveis menores de SA impedem a ligação NPR1-NPR4, resultando no acúmulo do NPR1 e promovendo os eventos do SAR. Desta forma, a NPR3 controla os níveis da NPR1 após indução pelo SA, enquanto a NPR4 parece atuar de modo constitutivo (FU *et al.*, 2012).

7.5.2 Proteínas PR

A proteína PR2 foi significativamente induzida no estágio de sintoma em plantas de *C. sinensis* infectada com *CaLas* e trifoliata infectado com *CaLam*.

Normalmente, as proteínas PR acumulam tanto no sítio de infecção, quanto de modo sistêmico, associado ao acúmulo de ácido salicílico. Tais proteínas podem ser agrupadas em 14 famílias, cujas funções já são conhecidas exceto para PR1. A PR1 é um

dos principais marcadores do SAR (BUSCHEL *et al.*, 1999), e assim como as PR2 e PR5 têm sido detectados em plantas após infecção por patógenos biotróficos, bem como após aplicação de ácido salicílico exógeno (DATTA *et al.*, 1999; LEUBNER-METZGER; MEINS, 1999).

PR2 são β -1,3-glucanases capazes de catalisar a clivagem de ligações 1,3- β -D-glucosídica de β -1,3-glucanos. Glucanases são enzimas altamente reguladas e amplamente distribuídas em plantas, e estão implicadas em vários processos fisiológicos incluindo, divisão celular, microsporogênese, germinação de pólen, fertilização, embriogênese (LEUBNER-METZGER; MEINS, 1999). Entretanto, tem sido destacada sua atividade em resposta a patógenos (CÔTÉ *et al.*, 1991). Trabalhos sugerem a atuação da PR2 na defesa contra fungos (LAWRENCE *et al.*, 1996).

7.5.3 Fatores de transcrição WRKY

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão dos fatores de transcrição WRKY.

7.6 Respostas associadas

As plantas se protegem contra patógenos usando uma variedade de mecanismos de defesa química e física (KEEN, 2000). A deposição de calose tem sido associada à imunidade desencadeada por PAMPS e tem emergido como um sistema para quantificar a atividade do sistema imune de plantas contra diferentes patógenos (LUNA *et al.*, 2011). Alguns estudos apontam que a deposição de calose nos plasmodesmas pode resultar na obstrução dos vasos e consequente interrupção do transporte de nutrientes até as células da raiz, causando portanto, a diminuição do seu crescimento (SIVAGURU *et al.*, 2000).

Pesquisas têm relatado a deposição de calose em tecidos infectados com *CaLas* (FAN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2009; KOH *et al.*, 2012). Em nosso estudo foi visualizado nítido acúmulo de calose tanto em *C. sinensis*, quanto no trifoliata infectados com *CaLas*. As avaliações microscópicas do floema de pecíolo de plantas infectadas revelaram alterações anatômicas que corroboram o estado sintomatológico das plantas. Foi observada nítida desorganização do floema, com hiperplasia das células do parênquima floemático. Os vasos do floema se apresentaram colapsados, aparentemente, em função da atividade anormal do câmbio na contínua reposição de novas camadas de células. Associado a isto, a deficiência de nutrientes de importância estrutural como zinco, pode contribuir para o enfraquecimento da parede celular, sendo comprimida com maior facilidade pelas células vizinhas. Não foi possível afirmar a ocorrência de necrose dos vasos, embora outros trabalhos a tenham relatado. Portanto, nota-se que o colapso do floema exerce maior impacto sobre a distribuição da seiva da folha para outras partes da planta. É possível que a calose atue como uma resposta primária ao reconhecimento do patógeno, causando bloqueio das placas crivadas. Logo, novos vasos são repostos pelo câmbio, para contornar estas obstruções.

As alterações na atividade do câmbio podem estar relacionadas ao desequilíbrio entre as vias hormonais (SEHR *et al.*, 2010). Estudos de transcrito de *C. sinensis* infectado com HLB relatam a indução de genes associados a estas vias (MARTINELLI *et al.*, 2012). Desta forma, é provável que tais distúrbios hormonais associados, a presença da bactéria podem ser responsáveis pela desorganização estrutural do floema em plantas sintomáticas. Além disso, alguns patógenos biotróficos restritos ao floema podem produzir moléculas efetoras associadas a multiplicação das células do tecido infectado na planta hospedeira.

Através da reação com cloreto de zinco iodado foi observado o acúmulo de amido em todas as células parenquimáticas do pecíolo. Outros trabalhos também fazem relato deste acúmulo. Esta é uma das mais notáveis alterações do metabolismo de carboidratos em plantas infectadas (ETXEBERRIA *et al.*, 2009).

O cálcio (Ca) é um nutriente importante para a ativação de algumas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na síntese de membranas, ativação de proteínas-quinases dependentes Ca^{2+} e α -amilases (a qual medeia a degradação de amido nos cloroplastos) e participação no desenvolvimento da parede celular (RAHMAN; PUNJA, 2007). Mudanças na concentração do íon de cálcio no citoplasma $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tem sido reportadas como importantes eventos de sinalização mediada pelo SA (KHOKON *et al.*, 2011). Estudos recentes tem demonstrado que sinais de PAMPs são rapidamente transmitidos para o cloroplasto e evocam específicas assinaturas de cálcio no estroma (MANZoor *et al.*, 2012). Além disso, a proteína CAS (*Calcium-sensing receptor*) está envolvida no Ca^{2+} transitório do estroma e está associada à resistência induzida por PAMPs e resposta de hipersensibilidade mediada por gene de resistência (NOMURA *et al.*, 2012).

O SA também está envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio, bem como na indução do influxo de Ca^{2+} para o citoplasma (KAWANO *et al.*, 1998). O $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ desempenha um papel importante como um mensageiro secundário de mecanismos de defesa em plantas, participando ativamente na regulação fina da via do ácido salicílico (LECOURIEUX *et al.*, 2006; TUTEJA; MAHAJAN, 2007).

Observações dos cortes histológicos sob luz polarizada revelaram o acúmulo de cristais de oxalato de cálcio em plantas infectadas. Plantas saudias também apresentaram tais estruturas, embora em menor quantidade, comparado às plantas doentes. Cristais de oxalato de cálcio aparecem como estruturas minerais insolúveis, distribuído entre diversas famílias vegetais. Diferentes funções são atribuídas a estas estruturas, com balanço iônico, suporte dos tecidos, detoxificação, dentre outros, entretanto, sem evidências que suportem estas teorias.

Apesar do estado de deficiência de cálcio geralmente observado em plantas com HLB, é possível que no âmbito celular, as respostas de defesa da planta promovam o fluxo de Ca^{2+} para o interior do citoplasma, sendo este por sua vez sequestrado e insolubilizado sob a forma de cristais de oxalato de cálcio. Considerando que a atividade de várias proteínas é dependente da associação com íons Ca^{2+} , a menor disponibilidade do nutriente pode comprometer a ativação de determinados vias metabólicas (e.g. metabolismo do

amido), bem como a transdução de sinais de cascatas de reações, principalmente em tecidos juvenis infectados. De acordo com estudos previamente realizados com patossistema do HLB, verifica-se semelhança nas respostas de defesa com aquelas observadas em plantas sob ataque de insetos com hábitos alimentares restritos ao floema. Desta forma, o floema induz vias de defesa associadas comuns tanto a patógenos quanto ao ataque por insetos.

8. CONSIDERAÇÕES

Foi observado que "*Ca. Liberibacter spp.*" induz alterações nos níveis de expressão dos genes relacionados à via do ácido salicílico, tanto em *C. sinensis* quanto no trifoliata. Genes *upstream* da via são progressivamente induzidos com o desenvolvimento da doença. Tais genes atuam na ativação de diferentes vias de defesa em plantas, além daquela mediada pelo ácido salicílico. Desta forma, no caso do HLB, plantas infectadas reagem com processos de defesa ativos contra o patógeno, embora aparentemente, insuficientes para conter a doença de forma efetiva.

Genes da via dos fenilpropanóides, associados à biossíntese do SA, se apresentaram menos expressos no estágio de sintoma. A desregulação da via da PAL pode desempenhar um papel importante na expressão dos sintomas, uma vez que estão envolvidas a vários processos do desenvolvimento da planta.

Os genes *SAGT1*, *BSMT1* e *GH3.5*, que participam do metabolismo do SA, foram positivamente regulados ao longo do *time-course*. O SA se apresenta altamente regulado por enzimas modificadoras. Entretanto, não é possível afirmar se tais modificações desempenham um papel positivo na sinalização da via de defesa, ou negativo, pela metabolização do hormônio em formas inativas. O gene *BSMT1* parece desempenhar papel importante na fisiologia do HLB. Estudos têm revelado elevada taxa de produção de MeSA em plantas infectadas. Possivelmente a bactéria induz alterações que previnem o acúmulo do SA na planta, pela volatilização do MeSA, de modo que as respostas de defesa mediada por genes *downstream* da via não sejam ativadas.

De modo geral, os genes *downstream* da via do ácido salicílico não apresentaram níveis expressivamente significativos para os diferentes tratamentos. Outros trabalhos de transcriptoma, tanto em microarranjo, como em RNAseq, não demonstram expressão significativa de tais genes, exceto para alguns fatores de transcrição da família WRKY.

Aparentemente as espécies de *Liberibacter* dispõem de efetores capazes de contornar as defesas basais da planta. Além disso, alguns estudos de genoma indicam que a bactéria *CaLas* pode produzir uma provável enzima degradadora do ácido salicílico. Sendo este, um provável mecanismo de virulência do patógeno.

No caso das avaliações da deposição de calose, observa-se maior acúmulo em plantas infectadas, tanto de *C. sinensis*, quanto do trifoliata. Entretanto, grandes alterações estruturais foram visualizadas em *C. sinensis*, mas não no trifoliata, como o colapso e desestruturação dos vasos do floema em pecíolo. Provavelmente, essas alterações desempenham um papel mais importante no bloqueio do fluxo de seiva nos vasos do que a deposição de calose. Além disso, o desequilíbrio no metabolismo de açúcares associado ao acúmulo de amido no cloroplasto pode ter alguma consequência sobre a biossíntese de alguns hormônios cuja biossíntese está associada a esta organela.

A via de defesa do ácido salicílico, assim como outras vias hormonais, se encontra aparentemente ‘desviada’ pela metabolização do hormônio. O conjunto de alterações a nível global na planta, não apenas uma única via é responsável pelo fenótipo da doença. As alterações observadas no acúmulo dos sinais de defesa no estágio de sintoma provavelmente ampliam o mecanismo de virulência do patógeno. A dificuldade de cultivo da bactéria dificulta a identificação de quais os eventos pontuais que estão acima da cascata de alterações globais na planta. O presente trabalho apresenta uma contribuição ao entendimento das respostas de defesa dos citros a infecção pelas bactérias “*Candidatus Liberibacter spp.*”.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTS, N.; METZ, M.; HOLUB, E.; STASKAWICZ, B. J.; DANIELS, M. J.; PARKER, J. E. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in arabdopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 17, p. 10306-10311, aug. 1998.

ABRAMOVITCH, R. B.; ANDERSON, J. C.; MARTIN, G. B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Molecular Cell Biology**, London, v. 7, n. 8, p. 601-611, aug. 2006.

AIST, J. R. Papillae and related wound plugs of plant cells. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, p. 145-163, sep. 1976

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". **Plant Science**, v. 185-186, p. 117-130, apr. 2012.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to *Huanglongbing*. **HortScience**, v. 46, n. 1, p. 16-22, jan. 2011.

ATTARAN, E.; ZEIER, T. E.; GRIEBEL, T.; ZEIER, J. Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, n. 3, p.954-971, mar. 2009.

AUBERT, B.; BOVÉ, J. M. Effects of penicillin or tetracycline injections of citrus trees affected by greening disease under field conditions in Reunion Island. **Proceedings of 8th Conference IOCV**. p. 103-108, 1980.

BAGIROVA, S. F. Hypersensibility. In: DYAKOV, Y. T.; DZHAVAHIYA, V. G.; KORPELA, T. (Org.). **Comprehensive and molecular phytopathology**. Elsevier, 2007, p. 247-264.

BAKKER, E.; BUTTERBACH, P.; VAN DER VOORT, J. R.; VAN DER VOOSSEN, E.; VAN VLIET, J.; BAKKER, J. GOVERSE, A. Genetic and physical mapping of homologues of the virus resistance gene *Rx1* and the cyst nematode resistance gene *Gpa2* in potato. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 8, p. 1524-1531, may. 2003.

BALLESTER, A. R.; LAFUENTE, M. T.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit - *Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, n. 2, p. 115-124, feb. 2006.

BARI, R.; JONES, J. D. Role of plant hormones in plant defense responses. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 4, p. 473-488, mar. 2009.

BASSANESI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JUNIOR, J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T. MIRANDA, M. P. WULF, N. A. Epidemiologia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research and Technology**, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BECKERS, G. J.; SPOEL, S. H. Fine-tuning plant defense signaling: salicylate *versus* jasmonate. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 1, p. 1-10, jan. 2006.

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

BENT, A. F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10 p. 1757-1771, oct. 1996.

BHATTACHARJEE, S.; HALANE, M. K.; KIM, S.H.; GASSMANN, W. Pathogen effectors target arabidopsis *EDSI* and alter its interactions with immune regulators. **Science**, v. 334, n. 6061, p.1405-1408, dec. 2011.

BORRÁS-HIDALGO, O. Basic insight in plant-pathogen interaction. **Biotechnología Aplicada**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 2004.

BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU, JR., J. (Org.). **Citros**. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 19-36.

BOTEON, M.; PAGLIUCA, L. G.; Análise da sustentabilidade econômica da citricultura paulista. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p. 101-106, 2010.

BOVÉ, J. M. *Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.

BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Citrus greening and psylla vectors of the disease in Arabian Peninsula. **Proceedings of 9th Conference IOCV**, p. 109-114, 1984.

BOVÉ, J. M.; BONNET, P.; GARNIER, M.; AUBERT, B. Penicillin and tetracyclin treatment of greening disease-affected citrus plant glasshouse, and the bacterial nature of prokaryotes associated with greening. **Proceedings of 8th Conference IOCV**, p. 91-102, 1980.

BRIGGS, G. C.; OSMONT, K. S.; SHINDO, C.; SOBOUT, R.; HARDTKE, C. S. Unequal genetic redundancies in arabidopsis - a neglect phenomenon? **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 10, p. 492-498, oct. 2006.

BUSCHEL, A. S.; LINTHOST, H. J. M. PR1: a group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Org.). **Pathogenesis-related proteins in plants**. CRC Press, 1999.

CASTEEL, C. L.; HANSEN, A. K.; WALLING, L. L. PAINE, T. D. Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericerca cockerelli* and its associated endosymbiont 'Candidatus Liberibacter psyllaurous'. **PLoS One**, v. 7, n. 4, e35191, apr. 2012.

CASTRO, M. E. A.; BEZERRA, A. R.; LEITE, W. A. MUNDIN FILHO, W.; NOGUEIRA, N. D. Situação e ações do estado de Minas Gerais frente ao *Huanglongbing*. **Citrus Research and Technology**, v. 31, n. 2, p. 163-168, 2010.

CHANG, A.; LIM, M. H.; LEE, S. W.; ROBB, E. J.; NAZAR, R. N. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 48, p.33591-33601, nov. 2008.

CHATURVEDI, R.; SHAH, J. Salicylic acid in plant resistance. In: HAYAT, S.; AHMAD, A. (Org.). **Salicylic acid: a plant hormone**. Springer, 2007, p. 335-370.

CHEN, F.; D'AURIA, J. C.; THOLL, D.; ROSS, J. R.; GERSHENZON, J.; NOEL, J. P.; PICHERSKY, E. An *Arabidopsis thaliana* gene for methyl salicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. **The Plant Journal**, v. 36, n. 5, p. 557-588, dec. 2003.

CHEN, X.-Y.; KIM, J.-Y. Callose synthesis in higher plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 6, p.489-492, jun. 2009.

CHEN, H.; XUE, L.; CHINTAMANANI, S.; GERMAIN, H.; LIN, H.; CUI, H.; CAI, R.; ZUO, J.; TANG, X.; LI, X.; GUO, H.; ZHOU, J. M. E. *ETHYLENE INSENSITIVE3* and *ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1* repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, n. 8, p. 2527-2540, aug. 2009b.

CHEN, Z.; ZHENG, Z.; HUANG, J.; LAI, Z.; FAN, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 6, p.493-496, jun. 2009a.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D. F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, v. 262, n. 5141, p. 1883-1886, dec. 1993.

CHEN, M.-H.; MIYAKAWA, T.; MATSUI, C. Citrus likubin pathogen in salivary glands of *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, v. 63, n. 1, p. 194-195, 1973.

CHEN, Q. A report of a study on yellow shoot of citrus in Chaoshan. **New Agriculture Quality Bulletin**, v. 3, p. 142-175, 1943

CHENG, Y. T.; GERMAIN, H.; WIERMER, M.; BI, D.; XU, F.; GARCÍA, A. V.; WIRTHMUELLER, L.; DESPRÉS, C.; PARKER, J. E.; ZHANG, Y.; LI, X. Nuclear pore complex component MOS7/NUP88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, n. 8, p. 2503-2516, aug. 2009.

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Massachusetts, v. 124, n. 4, p. 803-814, feb. 2006.

CLAY, N. K.; ADIO, A. M.; DENOUX, C.; JANDER, G.; AUSUBEL, F. M.
Glucosinolate metabolites required for an arabidopsis innate immune response. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 95-101, jan. 2009.

COLLETA FILHO, H. D.; CARLOS, E. F. Ferramentas para diagnóstico de *huanglongbing* e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research and Technology**, v. 31, n. 3, p. 129-143, 2010.

COLLETA FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A.
Analysis of 16S rDNA sequences from citrus *Huanglongbing* bacteria reveal a different “*Ca. Liberibacter*” Strain Associated with citrus disease in São Paulo. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 848-852, 2005.

COLLETA FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D. ; POMPEU JÚNIOR, J.; MACHADO, M. A. First report of the causal agent of *huanglongbing* ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1,382.3-1,382.3, dec. 2004.

COOK, R. J. The molecular mechanism responsible for resistance in plant-pathogen interactions of gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. **PNAS**, Washington, v. 95, n. 17, p. 9711-9712, aug. 1998.

CÔTÉ, F.; EL OUAQFAOUI, S.; ASSELIN, A. Detection of beta-glucosidase activity on various beta-1,3 and beta-1,4-glucans after native and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 12, n. 1, p. 69-74, jan. 1991.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, jun. 1997.

CRUTE, I. R. Gene-for-gene recognition in plant-pathogen interactions. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, London, v. 346, n. 1317, p. 345-349, nov. 1994.

DA GRAÇA, J. V. **Biology, history, and world status of *Huanglongbing***. 2008. Disponível em: <<http://www.concivter.com/huanglongbingYPSilidoAsiatico/Memor%C3%ADa-1%20Graca.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2011.

DA GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 109-136, 1991.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, jun. 2001.

DATTA, S. K.; VELAZHAHAN, R. MUTHUKRISHNAM, S. The PR-5 Family. In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Org.). Pathogenesis-related proteins in plants. **CRC Press**, 1999.

DAVIS, M. J.; MONDAL, S. N.; CHEN, H., ROGERS, M. E.; BRLANSY, R. H. Co-cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' with Actinobacteria from citrus *Huanglongbing*. **Plant Disease**, v. 92, n. 11, p. 1547-1550, nov. 2008.

DEAN, J. V.; DELANEY, S. P. Metabolism of salicylic acid in wild-type *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 4, p. 417-425, apr. 2008.

DEMPSEY, D. A.; VLOT, A. C.; WILDERMITH, M. C.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. **Arabidopsis Book**, v. 9, e0156, dec. 2011.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centro de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU, JR., J. (Org.). **Citros**. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 1-18.

DONG, X.; HONG, Z.; CHATTERJEE, J.; KIM, S.; VERMA, D. P. Expression of callose synthase genes and its connection with *NPR1* signaling pathway during pathogen infection. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 87-98, dec. 2008.

DOUGLAS, A. E. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 4, p. 747-754, mar. 2006.

DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D. G.; WENBIN, L.; DODDAPANENI, H.; LI, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. W.; WILLIAMS, K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete genome sequence of citrus *Huanglongbing* bacterium, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 22, n. 8, p. 1011-1020, aug. 2009.

DYAKOV, Y. T. Introduction to molecular phytopathology: phenomenology of plant-parasite relations. In: DYAKOV, Y. T.; DZHAVAHIYA, V. G.; KORPELA, T. (Org.). **Comprehensive and Molecular Phytopathology**. Elsevier, 2007, p.117-136.

ELLIS, J.; DODDS, P. PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 278-284, aug. 2000.

ELKIND, Y.; EDWARDS, R.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S. A.; RIBAK, O.; DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **PNAS**, v. 87, n. 22, p. 9057-9061, nov. 1990.

ENNS, L. C.; KANAOKA, M. M.; TORII, K. U.; COMAI, L.; OKADA, K.; CLELAND, R. E. Two callose synthases, *GSL1* and *GSL5*, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. **Plant Molecular Biology**, v. 58, n. 3, p. 333-349, jun. 2005.

ETXE BERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high level of starch in HLB-affected valencia orange trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p. 76-83, jan. 2009.

FAN, J.; CHEN, C.; YU, Q.; KHALAF, A.; ACHOR, D. S.; BRLANSKY, R. H.; MOORE, G. A.; LI, Z. G.; GMITTER JR., F. G. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 11, p. 1396-1407, nov. 2012.

FAN, J.; CHEN, C.; YU, Q.; BRLANSKY, R. H.; LI, Z. G.; GMITTER JR., F. G. Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analysis of sweet orange infected by '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Physiologia Plantarum**, v. 143, n. 3, p. 235-245, nov. 2011.

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 10, p. 449-455, oct. 2000.

FITZGERALD, H. A.; CHERN, M.-S.; NAVARRE, R.; RONALD, P. C. Overexpression of (At)*NPR1* in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, n. 2, p. 140-151, feb. 2004.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p. 275-296, sep. 1971.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to *Huanglongbing* (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, n. 12, p. 1346-1354, dec. 2009.

FORCAT, S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W.; GRANT, M. R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA, and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4, n. 16, jun. 2008.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 64, p. 7.1-7.25, apr. 2013.

GABRIËLS, S. H. E. J.; VOSSSEN, J. H.; EKENGREN, S. K.; VAN OOIJEN, G.; ABD-EL-HALIEM, A.; VAN DEN BERG, G. C. M.; RAINEY, D. Y.; MARTIN, G. B.; TAKKEN, F. L. W.; DE WIT, P. J. G. M.; JOOSTEN, M. H. A. J. An NB-LRR protein required for HR signaling mediated by both extra- and intracellular resistance. **The Plant Journal**, v. 50, n. 1, p. 14-58, apr. 2007.

GARCÍA, A. V.; BLANVILLAIN-BAUFUMÉ, S.; HUIBERS, R. P.; WIERMER, M.; LI, G.; GOBBATO, E.; RIETZ, S.; PARKER, J. E. Balanced nuclear and cytoplasmic activities of EDS1 are required for a complete plant innate immune response. **PLoS Pathogens**, v. 6, e1000970, jul. 2010.

GARNIER, M.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; LE ROUX, H. F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa: proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *Capensis*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 2119-2125, nov. 2000.

GARNIER, M.; GAO, S. J.; HWE, Y. E.; VILLECHANOUX, S.; GANDAR, J.; BOVÉ, J. M. Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies: serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO. **Proceedings of 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists**. p. 428-435, University of California, Riverside, 1991.

GARNIER, M., DANIEL, N., BOVÉ, J. M. The greening organism is a Gram negative bacterium. **Proceedings of 9th Conference IOCV**, p.115-124, 1984.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 43, p. 205-227, 2005.

GOMÉZ-GOMÉZ, L.; BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 6, jun. 2002.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKES, W.; HELLSTEN, U. PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S.; Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acid Research**. Database issue D1178-86, jan. 2012.

GOUJON, M.; McWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, C.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tool framework at Embl-EBI. **Nucleic Acid Research**, 38 (Web Server Issue): W695-9. Jul. 2010.

GRAFTON-CARDWELL, E. E.; STELINSKI, L. L.; STANSLY, P. A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the Huanglongbing pathogens. **Annual Reviews of Entomology**, v. 58, p. 413-432, 2013.

GROSS, J.; CHO, W. K.; LEZHNEVA, L.; FALK, J.; KRUPINSKA, K.; SHINOZAKI, K.; HERRMANN, R. G. MEUER, J. A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. **The Journal of Biological Science**, v. 281, n. 25, p. 17189-17196, jun. 2006.

GRUBE, R. C.; RADWANSKY, E. R. JAHN, M. Comparative genetics of diseased resistance within the solanaceae. **Genetics**, Baltimore, v. 155, n. 2, p. 873-887, jun. 2000.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo: Edição de Drupat, lobe propaganda, 1987. 296p.

HEAT, M. C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 321-334, oct. 2000.

HEIDRICH, K.; WIRTHMUELLER, L.; TASSET, C.; POUZET, C.; DESLANDES, L.; PARKER, J. E. arabidopsis EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. **Science**, v.334, n.6061, p.1401-1404, dec. 2011.

HOCQUELLET, A.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Production and evaluation of non-radioactive probes for the detection of the two ‘*Candidatus Liberobacter*’ species associated with citrus *Huanglongbing* (greening). **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 11, n. 6, p. 433-438, dec. 1997.

HOCQUELLET, A.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Isolation of DNA from the uncultured ‘*Candidatus Liberobacter*’ species associated with citrus *Huanglongbing* by RAPD. **Current Microbiology**, New York, v. 38, n. 3, p. 176-182, mar. 1999.

HOGENHOUT, S. A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.-D.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H. N.; NAMBA, S. Phytoplasma: bacteria that manipulate plants and insects. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 403-423, jul. 2008.

HOLUIGUE, L.; SALINAS, P.; BLANCO, F.; GARRETÓN, V. Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. In: HAYAT, S.; AHMAD, A. (Org.). **Salicylic acid: a plant hormone**. Springer, 2007, p. 247-276.

HUANG, J.; GU, M.; LAI, Z.; FAN, B.; SHI, K.; ZHOU, Y. H.; YU, J. Q.; CHEN, Z. Functional analysis of the arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. **Plant Physiology**, v. 153, n. 4, p.1526-1538, aug. 2010.

INNES, R. W. Plant-parasite interactions: has the gene-for-gene model become outdated. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 3, n. 12, p. 483-485, dec. 1995.

ISMAIL, M. A.; BROWN, G. E. Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured ‘Valencia’ orange flavedo. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 104, n.1, p. 126-129, jan. 1979.

JACOBS, A. K.; LIPKA, V.; BURTON, R. A.; PANSTRUGA, R.; STRIZHOV, N.; SCHULZE-LEFERT, P.; FINCHER, G. B. An arabidopsis callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. **The Plant Cell**, v. 15, n. 11, p. 2503-2513, nov. 2003.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. PCR detection of the two '*Candidatus*' liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 1, p. 43-50, feb. 1996.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus, is a member of the α subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 379-386, jul. 1994.

JINYUAN, L.; OURA, C.; ASPURIA, E. T.; OONO, Y.; UCHIMIYA, H. Application of real-time RT-PCR quantification to evaluate differential expression of arabidopsis Aux/IAA genes. **Chinese Science Bulletin**, v. 46, n. 19, p. 1642-1645, 2001.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 16, 2006.

JONES, D. A.; JONES, J. D. G. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. **Advances in Botanical Research**, v. 24, p. 89-167, 1997.

KADOTA, Y.; SHIRASU, K. The HSP90 complex of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n.3, p.689-697, mar. 2012.

KARNOVSKY, M. J..A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KAUSS, H. Callose biosynthesis as a Ca^{2+} -regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. **Journal of Cell Science**, v. 2, p. 89-103, 1985.

KAWANO, T.; BOUTEAU, F. Crosstalk between intracellular and extracellular salicylic acid signaling events leading to long-distance spread of signals. **Plant Cell Reports**, In press, may. 2013.

KAWANO, T.; SAHASHI, N.; TAKAHASHI, K.; UOZUMI, N.; MUTO, S. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. **Plant Cell Physiology**, v. 39, n. 7, p.721-730, 1998.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, v. 146, n. 4, p. 1459-1468, apr. 2008.

KEEN, N.; STASKAWICZ, B.; MEKALANOS, J.; AUSUBEL, F.; COOK, R. J. Pathogens and host: the dance is the same, the couples are different. **PNAS**. v. 197, n. 16, p. 8752-8753, aug. 2000.

KEMPEMA, L. A.; CUI, X.; HOLZER, F. M.; WALLING, L. L. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs, similarities and distinctions in responses to aphids. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 849-865, feb. 2007.

KHOKON, M. D. A. R.; OKUMA, E.; HOSSAIN, M. A.; MINEMASA, S.; URAJI, M.; NAKAMURA, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in arabidopsis. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 3, p.434-443, 2011

KIM, H. S.; DELANEY, T. P. Over-expression of *TGA5*, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. **The Plant Journal**, v. 32, n.2, p. 151-163, oct. 2002.

KIM, J. S.; SAGARAM, U. S.; BURNS, J. K.; LI, J. L.; WANG, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 50-57, jan. 2009.

KING, L. S. Dr.' Koch postulates. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 350-361, 1952.

KOH, E. J.; ZHOU, L.; WILLIAMS, D. S.; PARK, J.; DING, N.; DUAN, Y. P.; KANG, B. H. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 687-697, jul. 2012.

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.; CHOI, Y. D. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 64, n. 1-2, p. 1-15, may. 2007.

KUPPUSAMY, K. T.; WALCHER, C. L.; NEMHAUSER, J. L. Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 4, p. 375-381, mar. 2009.

LAFLÈCHE, D.; BOVÉ, J. M. Structures de type mycoplasma dans la maladie du 'greening'. **Comptes Rendus d'la Académie des Sciences**, Paris, v. 270, p. 1915-1917, 1970.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTINGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.; ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAWRENCE, C. B.; JOOSTEN, M. H. A. J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, p.361-377, 1996.

LECOURIEUX, D.; RAJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. **The New Phytologist**, v. 171, n. 2, p. 249-269, 2006.

LEHMANN, P. Structure and evolution of plant disease resistance genes. **Journal of Applied Genetics**, v. 43, n. 5, p. 403-414, 2002.

LÉON, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1673-1678, aug. 1995.

LEUBNER-METZGER, G.; MEINS, F. Functions and regulation of plant beta 1,3-glucanase (PR-2). In: DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Org.). Pathogenesis-related proteins in plants. **CRC Press**, 1999.

LEVY, A.; GUENOUNE-GELBART, D.; EPEL, B. L. β -1,3-glucanases. **Plant Signaling and Behavior**, v. 2, n. 5, p. 404-407, sep.-oct. 2007.

LEYVA, A.; JARILLO, J. A.; SALINAS, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. **Plant Physiology**, v. 108, n. 1, p. 39-46, may. 1995.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 3, p. 624-635, mar. 2012.

LI, W.; LEVY, L. **Citrus Huanglongbing diagnosis based on molecular detection of associated Liberibacter species**. Disponível em: <<http://www.calcitrusquality.org/wpcontent/uploads/2009/05/manuscript.pdf>>. Acesso em 31 de Julho de 2011.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species associated with *Huanglongbing*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 104-115, jul. 2006.

LIM, E. K.; DOUCET, C. J.; LI, Y.; ELIAS, L.; WORRAL, O.; SPENCER, S. P.; ROSS, J.; BOWLES, D. J. The activity of arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 586-592, jan. 2002.

LISKER, N.; COHEN, L.; CHALUTZ, E.; FUCHS, Y. Fungal infections suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruits. **Physiological Plant Pathology**, v. 22, n. 3, p. 331-338, may. 1983.

LIU, P. P.; VON DAHL, C. C.; KLESSIG, D. F. The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after infection. **Plant Physiology**, v. 157, n. 4, p. 2216-2226, dec. 2011.

LONGEMANN, E.; TAVERNARO, A.; SCHULZ, W.; SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. **PNAS**, v. 97, n. 4, p. 1903-1907, feb. 2000.

LÓPEZ, M. A.; BANNENBERG, G.; CASTRESANA, C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 4, p. 420-427, aug. 2008.

LUNA, E.; PASTOR, V.; ROBERT, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B.; TON, J. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 183-193, 2011.

MACARISIN, D.; COHEN, L.; EICK, A.; RAFAEL, G.; BELAUSOV, E.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. **Phytopathology**, v. 97, n. 11, p. 1491-1500, nov. 2007.

MACKEY, D.; HOLT, B. F. 3rd; DANGL, J. L. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v. 108, n. 6, p. 743-754, mar. 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, J. M.; CLARK, D. P. Bacteria: Gram-positive and other bacteria. In: _____ (Org.). **Brock: Biology of microorganisms**. 12th edition. Pearson Education, 2009.

MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, v. 250, n. 4983, p. 1002-1004, nov. 1990.

MANN, R. S.; ALI, J. G.; HEMANN, S. L.; TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K. S.; ALBORN, H. T.; STELINSKI, L. L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, e1002610, mar. 2012.

MANZOOR, J.; CHILTZ, A.; MADANI, S.; VATSA, P.; SCHOEFS, B.; PUGIN, A.; GARCIA-BRUGGER, A. Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. **Cell Calcium**, v. 51, n. 6, p. 434-444, jun. 2012.

MARTINELLI, F.; URATSU, S. L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R. L.; PHU, M. L.; BRITON, M. BUFFALO, V.; FASS, J.; LEICHT, E.; ZHAO, W.; LIN, D.; D'SOUZA, R.; DAVIS, C. E.; BOWMAN, K. D.; DANDEKAR, A. M. Transcriptome profiling of citrus fruit response to *huanglongbing* disease. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e38039, may. 2012.

MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of arabidopsis to *Perenospora parasitica*. **The Plant Cell**, v. 8, n. 2, p.203-212, feb. 1996.

McCLEAN, A. P. D. Greening disease of sweet orange: its transmission in propagative parts and distribution in partially diseased trees. **Phytophylactica**, v. 2, p. 263-268, 1965.

McCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 297-298, 1965.

McCLEAN, A. P. D.; SCHWARZ, R. E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytopathologica**, Pretroria, v. 2, p. 177-194, 1970.

McCLEAN, A. P. D. Virus infection of citrus in Africa, III: stem-pitting disease of grape fruit. **Farming in South Africa**, v. 25, n. 294, p. 289-296, 1950.

MÉTRAUX, J. P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID, E.; BLUM, W.; INVERARDI, B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v. 250, n. 4983, p. 1004-1006, nov. 1990.

MIYAKAWA, T. Experimentally-induced symptoms and host range to citrus likubin (greening disease). **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 46, n. 2, p. 224-230, 1980.

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H.; Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 44, n. 1, p. 174-176, jan. 1994.

MUSETTI, R.; BUXA, S. V.; DE MARCO, F.; LOSCHI, A.; POLIZZOTTO, R.; KOGEL, K.-H.; VAN BEL, A. J. E. Phytoplasma-triggered Ca²⁺ influx is involved in sieve-tube blockage. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 4, p. 379-386, apr. 2013

NISHIMURA, M. T.; STEIN, M.; HOU, B. H.; VOGEL, J. P.; EDWARDS, H.; SOMERVILLE, S. C. Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. **Science**, v. 301, n. 5635, p.969-972, aug. 2003.

NOMURA, H.; KOMORI, T.; UEMURA, S.; KANDA, Y.; SHIMOTANI, K.; NAKAI, K.; FURUICHI, T.; TAKEBAYASHI, K.; SUGIMOTO, T.; SANO, S.; SUWASTIKA, I. N.; FUKUSAKI, E.; YOSHIOKA, H.; NAKAHIRA, Y.; SHIINA, T. Chloroplast-mediated activation of plant immune signaling in arabidopsis. **Nature Communications**, v. 3, n. 926, jun. 2012.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, apr. 2004.

PALLAS, J. A.; PAIVA, N. L.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. **The Plant Journal**, v. 10, n. 2, p. 281-293, aug. 1996.

PANINA, Y. S.; GERASIMOVA, N. G.; CHALENKO, G. I.; VASYUKOVA, N. I.; OZERETSKOVSKAYA, O. L. Salicylic acid and phenylalanine ammonia-lyase in potato plants infected with the causal agent of late blight. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, n. 4, p. 511-515, jul. 2005.

PARK, S. W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 113-116, oct. 2007.

PASQUALINI, S.; REALE, L.; CALDERINI, O.; PAGIOTTI, R.; EDERLI, L. Involvement of protein kinases and calcium in the NO-signaling cascade for defence-gene induction in ozonated tobacco plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 12, p.4485-4496, jul. 2012.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, mar. 2004.

PIETERSE, C. M. J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M. Network by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308-316, may. 2009.

PIETERSE, C. M.; VAN LOON, L. C. *NPRI*: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 456-464, aug. 2004.

PLOTNIKOVA, J.; AUSUBEL, F. M. Introduction to molecular phytopathology: structural basis of plant-pathogen interactions. In: DYAKOV, Y. T.; DZHAVAHIYA, V. G.; KORPELA, T. (Org.). **Comprehensive and Molecular Phytopathology**, Netherlands: Elsevier, 2007, p. 49-74.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU, JR., J. (Org.). **Citros**. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, p. 61-104.

POZO, M. J.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonates – signals in plant-microbe interactions. **Journal of Plant Growth Regulations**, v. 23, n. 3, p. 211-222, 2005.

PROMODOU, C. The 'active life' of HSP90 complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n.3, p.614-623, mar. 2012.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Calcium and plant disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. (Org.). **Mineral Nutrition and Plant Disease**. APS Press, 2007. p. 79-93.

RICHARDSON, M. L.; HALL, D. G. Resistance of Poncirus and Citrus x Poncirus germplasm to the Asian citrus psyllid. **Crop Science**, v. 53, n. 1, p. 183-188, jan. 2013.

RICHMOND, T. A.; SOMERVILLE, C. R. The cellulose synthase superfamily. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 495-498, oct. 2000.

RIOV, J.; MONSELISE, S. P.; KAHAN, R. S. Ethylene-controlled induction of phenylalanine ammonia-lyase in citrus fruit peel. **Plant Physiology**, v. 44, n. 5, p. 631-635, may. 1969.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 49, p. 317-343, 2011.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J. D. Pathological hormone imbalance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 372-379, aug. 2007.

RUSTÉRUCCI, C.; AVIV, D. H.; HOLT, III, B. F.; DANGL, J. L.; PARKER, J. E. The disease resistance signaling components *EDS1* and *PAD4* are essential regulators of cell death pathway controlled by *LDS1* in arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 13, n. 10, p. 2211-2224, oct. 2001.

SACCO, M.; MOFFETT, P. Disease resistance genes: form and function. In: BOUARAB, K.; BRISSON, N.; DAAYF, F. (Org.). **Molecular Plant-Microbe Interactions**. CABI International, 2009. p. 94-141.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, p. 247-249, 1973.

SANDSTRÖM, J.; MORAN, N. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 91, n. 1, p. 203-210, apr. 1999.

SANGSTER, T. A.; QUEITSCH, C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 86-92, feb. 2005.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, dec. 1998.

SCHNEIDER, D. J.; COLLMER, A. Studying plant-pathogen interactions in the genomics era: beyond molecular Koch's postulates to systems biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 8, p. 457-479, sep. 2010.

SCHWARZ, R. E. Comparative indexing of the annual and seasonal incidence of greening in sweet orange fruits by external symptoms and by the albedo fluorescence test. **Phytophylactica**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 1970.

SCHWARZ, R. E. An insect-transmissible virus, trapped in sweet orange seedlings in orchards where greening disease is common. **South African Journal of Agricultural Science**, v. 7, p. 885-889.

SECHLER, A., SCHUENZEL, E. L., COOKE, P., DONNUA, P., THAVEECHAI, N., POSTINIKOVA, E. Cultivation of '*Candidatus* L. africanus' and '*Candidatus* L. americanus' associated with *Huanglongbing*. **Phytopathology**, v. 99, n. 5, p. 480-486, may. 2009.

SEHR, E. M.; AGUSTI, J.; LEHNER, R.; FARMER, E. E.; SCHWARZ, M.; GREB, T. Analysis of secondary growth in the arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signaling in cambium formation. **The Plant Journal**, v. 63, n. 5, p. 811-822, sep. 2010.

SHAH, J.; ZEIER, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 30, p. 1-16, feb. 2013.

SHIRASU, K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 60, p. 139-164, 2009.

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, v. 385, p. 718-721, feb. 1997.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J. BALUSKA, F. YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced 1→3-β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 991-1006, nov. 2000.

SLISZ, A. M.; BREKSA III, A. P.; MISHCHUNK, D. O.; McCOLLUM, G.; SLUPSKY, C. M. Metabolomic analysis of citrus infection by '*Candidatus* Liberibacter' reveals insights into pathogenicity. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 4223-4230, aug. 2012.

SONG, J. T. Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, *AtSGT1*, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. **Molecules and Cells**, v. 22, n.2, p. 233-238, oct. 2006.

SONG, J. T.; KOO, Y. J.; SEO, H. S.; KIM, M. C.; CHOI, Y. D.; KIM, J. H. Overexpression of *AtSGTI*, an arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1128-1134, mar. 2008.

SONG, J. T.; KOO, Y. J.; PARK, J. B.; SEO, Y. J.; CHO, Y. J.; SEO, H. S.; CHOI, Y. D. The expression patterns of *AtBSMT1* and *AtSAGT1* encoding a salicylic acid (SA) methyltransferase and a SA glucosyltransferase, respectively, in arabidopsis plants with altered defense responses. **Molecules and Cells**, v. 28, n. 2, p. 105-109, aug. 2009.

SPOEL, S. H.; DONG, X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 348-351, jun. 2008.

STASWICK, P. E.; TIRYAKI, I.; ROWE, M. L. Jasmonate response locus *JAR1* and several related arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. **The Plant Cell**, v. 14, n. 6, p. 1405-1415, jun. 2002.

SULLIVAN, M. L. Phenylalanine ammonia lyase genes in red clover: expression in whole plants and in response to yeast fungal elicitor. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 2, p. 301-306, jun. 2009.

TAMAS, I.; KLASSON, L.; CANDÄCK, B.; NÄSLUND, A. K.; ERIKSSON, A.-S.; WERNEGREEN, J. J.; SANDSTÖM, J. P.; MORAN, N. A.; ANDERSSON, S. G. E. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. **Science**, v. 296, n. 5577, p. 2376-2379, jun. 2002.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JUNIOR, J.; BOSSANEZI, R. B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, v. 31, n. 2, p. 115-128, 2010.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus *Huanglongbing* (greening disease) in São Paulo state, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1857-1862, sep. 2005.

The Arabidopsis Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796-815, dec. 2000.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Gene expression in leaves of susceptible *Glycine max* during infection with *Phakopsora pachyrhizi* using next generation sequencing. **Sequencing**, v. 2011, p. 1-14, nov. 2011.

TRIVEDI, P.; SAGARAM, U. S.; KIM, J. -S.; BRLANSKY, R. H.; ROGERS, M. E.; STELINSKI, L. L.; OSWALT, C.; WANG, N. Quantification of viable "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in host using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. 4, p. 553-563, 2009.

TUTEJA, N.; MAHAJAN, S. Calcium signaling network in plants: an overview. **Plant Signaling and Behavior**, v. 2, n. 2. P. 79-85, mar. 2007.

UMEMURA, K.; SATOU, J.; IWATA, M.; UOZUMI, N.; KAWANO, T.; KOSHIBA, T.; ANZAI, H.; MITOMI, M. Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, *OsSGT1*, to chemically induced disease resistance in rice plants. **The Plant Journal**, v. 57, n. 3, p. 463-472, feb. 2009.

UNTERGASSER, A.; CUTCAHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G.; Primer3 – new capabilities and interfaces. **Nucleic Acid Research**, v.40, n. 15, e115, aug. 2012.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, p.1-11, jun. 2002.

VAN DEN BERG, M. A. The citrus psylla, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (hemiptera: Triozidae): a review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 30, n. 3-4, p. 171-194, apr. 1990.

VAN DER HOORN, R. A.; KAMOUN, S. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. **The Plant Cell**, v. 20, n. 8, p. 2009-2017, aug. 2008.

VAN HAM, R. C. H. J.; KAMERBEEK, J.; PALACIOS, C.; RAUSSEL, C.; ABASCAL, F.; BASTOLLA, U.; FERNÁNDEZ, J. M.; JIMÉNEZ, L.; POSTIGO, M.; SILVA, F. J.; TAMAMES, J.; VIGUERA, E.; LATORRE, A.; VALENCIA, A.; MORÁN, F.; MOYA, A. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. **PNAS**, v. 100, n. 2, p. 581-586, jan. 2003.

VARMA, A.; AHLAWAT, Y. S.; CHAKRABORTY, N. K.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. Detection of greening BLO by electron microscopy DNA hybridization in citrus leaves with and without mottle from various regions of India. **Proceedings of 12th Conference IOCV**, p. 280-285, 1993.

VASYUKOVA, N. I.; PRIDVOROVA, S. M.; GERASIMOVA, N. G.; CHALENKO, G. I.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; UDALOVA, Z. V.; ZINOV'EVA, S. V. The involvement of phenylalanine ammonia-lyase and salicylic acid in the induction of resistance of tomato plants infested with gall nematode *Meloidogyne incognita*. **Doklady Biological Sciences**, v. 417, p. 382-385, sep.-oct. 2007.

VERMA, D. P.; HONG, Z. Plant callose synthase complexes. **Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 6, p. 693-701, dec. 2001.

VILLECHANOUX, S.; GARNIER, M.; LAIGRET, F.; RENAUDIN, J.; BOVÉ, J. M. The genome of non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the nusG-rplKJL-rpoBC gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. **Current Microbiology**, New York, v. 26, n. 3, p. 161-166, mar. 1993.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, dec. 2009.

WAN, J.; DUNNING, F. M.; BENT, A. F. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 2, n. 6, p. 259-273, nov. 2002.

WANG, L.; TSUDA, K.; TRUMAN, W.; SATO, M.; NGUYEN, LE. V.; KATAGIRI, F.; GLAZEBROOK, J. *CBP60g* and *SARD1* play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. **The Plant Journal**, v. 67, n. 6, p. 1029-1041, sep. 2011.

WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER, J. HSP70 and HSP90 - a relay team for protein folding. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 151, p. 1-44, jan. 2004.

WHITE, R. F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, v. 99, n. 2, p. 410-412, dec. 1979.

WIERMER, M.; FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Plant immunity: the *EDS1* regulatory node. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 383-389, aug. 2005.

WILDERMUTH, M. C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 562-565, nov. 2001.

WILKINSON, T. L.; ADAMS, D.; MINTO, L. B.; DOUGLAS, A. E. The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, Pt. 17, p. 3027-3038, sep. 2001.

WILKINSON, T. L.; DOUGLAS, A. E. Phloem amino acids and the host plant range of the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 106, n. 2, p. 103-113, feb. 2003.

WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J. Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I. D.; DE LUCA, V.; DESPRÉS, C. The arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the defense hormone salicylic acid. **Cell Reports**, v. 1, n. 6, p. 639-647, jun. 2012.

XU, Z. S.; LI, Z. Y.; CHEN, Y.; CHEN, M.; LI, L. C.; MA, Y. Z. Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 15706-15723, nov. 2012.

YAN, J. J.; ZHANG, Y. B.; DING, Y. Binding mechanism between HSP90 and SGT1 explored by homology modeling and molecular dynamics simulations in rice. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 10, p. 4665-4673, oct. 2012.

ZAVALIEV, R.; UEKI, S.; EPEL, B. L. CITOVSKEY. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. **Protoplasma**, v. 248, n. 1, p. 117-130, jan. 2011.

ZHANG, Z.; WANG, M.; LI, Z.; LI, Q.; HE, Z. Arabidopsis *GH3.5* regulates salicylic acid-dependent and both NPR1-dependent and independent defense responses. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, n. 8, p. 537-542, aug. 2008.

ZHANG, Y.; XU, S.; DING, P.; WANG, D.; CHENG, Y. T.; HE, J.; GAO, M.; XU, F.; LI, Y.; ZHU, Z.; LI, X.; ZHANG, Y. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcriptional factors. **PNAS**, v. 107, n. 42, p. 18220-18225, oct. 2010a.

ZHENG, X. Y.; SPIVEY, N. W.; ZHENG, W.; LIU, P. P.; FU, Z. Q.; KLESSIG, D. F.; HE, S. Y.; DONG, X. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. **Cell Host and Microbe**, v. 11, n. 6, p. 587-596, jun. 2012.

ZHU, J.; PARK, K. C. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 8, p. 1733-1746, aug. 2005.

ZHU, S.; JEONG, R. D.; VENUGOPAL, S. C.; LAPCHYK, L. NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against turnip crinkle virus. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, e1002318, nov. 2011.