

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



THIAGO SENA SIMÕES

**“RESPOSTA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE LARANJA
DOCE (*Citrus sinensis* L. Osb.) À INFECÇÃO POR *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri* E *Candidatus Liberibacter asiaticus*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>THIAGO SENA SIMÕES</u> <u>M. Machado</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Dr. MARCOS ANTONIO MACHADO

Co-Orientadora: Dra. RAQUEL LUCIANA BOSCARIOL-CAMARGO

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

SI51r	Simões, Thiago Sena Resposta de plantas transgênicas de laranja doce (<i>Citrus sinensis</i> L. Osb.) à infecção por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> e <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus / Thiago Sena Simões. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientadores: Marcos Antonio Machado, Raquel Luciana Boscariol-Camargo. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>. 2. <i>Candidatus</i> Liberibacter. 3. Transformação genética. 4. Citros. I. Machado, Marcos Antonio. II. Boscariol-Camargo, Raquel Luciana. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (pbg/ib)
-------	--

Título em Inglês: Response of sweet orange transgenic plants to infection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Candidatus* Liberibacter asiaticus.

Palavras-chave em Inglês: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.; *Candidatus* Liberibacter; Genetic transformation; Citrus.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Títuloção: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Marcos Antonio Machado, Celso Eduardo Benedetti, Francisco de Assis Alves Mourão Filho.

Data da defesa: 24/11/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 24 de novembro de 2008.

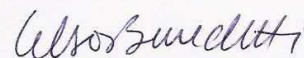
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado (Orientador)



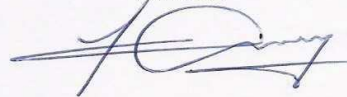
Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti



Assinatura

Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Morais do Amaral

Assinatura

Dedico

*Aos meus pais, José e Lilian,
por todo o apoio, incentivo e lições que sempre estiveram presentes na minha vida.*

*À minha namorada Lilian,
por todo o amor e carinho, e por me fazer tão feliz.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos Antonio Machado, pela oportunidade de aprendizado e orientação no Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’.

À Dra. Raquel Luciana Boscariol-Camargo, por todo o apoio e ensinamentos passados desde a iniciação científica.

Aos professores Dra. Beatriz M. J. Mendes, do CENA/USP, e Dr. Francisco A. A. Mourão Filho, da ESALQ/USP, por ceder plantas geneticamente modificadas para a realização deste trabalho.

Ao Leonardo Lotto por toda a ajuda na avaliação de sintomas de HLB.

Aos membros do exame de qualificação e da pré-banca, pelas sugestões que auxiliaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia, pelas informações e ajudas que tanto contribuíram para o meu trabalho.

Aos amigos do Centro APTA Citros, pelo convívio e companhia ao longo destes anos.

Aos meus pais, José e Lilian, e ao meu irmão Luís Eduardo, pelo apoio e incentivo irrestritos em todos os momentos.

À minha namorada, Lilian, por todo o amor, carinho, paciência e incentivo.

Aos amigos de república, Fernando, Eduardo e Marco.

À FAPESP pelo apoio financeiro que auxiliou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Citros.....	3
2.2. Desafios ao melhoramento genético de citros.....	4
2.3. Doenças.....	4
2.3.1. Cancro cítrico.....	5
2.3.2. Huanglongbing.....	7
2.4. Transformação genética de citros.....	10
2.5. Genes de resistência.....	12
2.5.1. <i>Npr1</i>	12
2.5.2. <i>atacina A</i>	14
2.5.3. <i>Xa21</i>	15
3. METODOLOGIA.....	16
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Análises das plantas de laranja doce com o gene <i>AtNpr1</i>	17
3.2.1. Southern blot.....	18
3.2.2. Extração de RNA.....	18
3.2.3. Northern blot.....	18
3.2.4. Síntese de cDNA.....	19

3.2.5. Avaliação da expressão dos genes <i>AtNpr1</i> , <i>PR1</i> , <i>PR2</i> e <i>PR5</i>	19
3.3. Avaliação de resistência a <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> em plantas transformadas com <i>AtNpr1</i>	20
3.4. Avaliação da resposta de laranjas transgênicas a inoculação de <i>Candidatus Liberibacter</i>	21
3.4.1. Inoculação de <i>Ca. Liberibacter</i> spp.	21
3.4.2. Avaliação visual dos sintomas.....	22
3.4.3. Detecção da bactéria por PCR quantitativo (qPCR).....	22
3.5. Verificação da transcrição e estabilidade dos transgenes.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Análises da integração e transcrição do gene <i>AtNpr1</i> em plantas de laranja doce geneticamente transformadas.....	25
4.2. Análises da expressão do transgene <i>AtNpr1</i> e ativação de proteínas PR.....	26
4.3. Avaliação da resposta a <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	27
4.4. Análises de ativação de PRs após inoculação de <i>Xac</i>	31
4.5. Inoculação da bactéria <i>Ca. Liberibacter</i>	32
4.6. Avaliação de sintomas de HLB.....	33
4.7. PCR quantitativo (qPCR).....	34
4.8. RT-PCR dos transgenes.....	44
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

RESUMO

Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening* é uma das mais importantes doenças dos citros no mundo e é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. Esta doença é originária da China e da África, onde estão presentes as variantes *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus*, respectivamente. Em 2004, a doença foi encontrada no Brasil onde foi identificada a forma asiática e também uma nova variante denominada *Ca. L. americanus*. A bactéria *Ca. Liberibacter* vive e se desenvolve no floema da planta hospedeira, causando amarelecimento do ramo infectado, deformação e queda do fruto. Até o momento não foi possível o cultivo em meio de cultura de *Ca. Liberibacter* e muito pouco é conhecido sobre sua biologia. Outra doença importante para a cultura, o cancro cítrico, também é originária do continente asiático, e causa grandes perdas de produção devido à desfolha da planta e a queda precoce de frutos. Seu agente causal, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* provoca lesões necróticas em folhas, ramos e frutos. Não existem variedades resistentes ao HLB ou ao cancro cítrico, o que torna necessários estudos buscando fontes alternativas de resistência às doenças. Uma das possibilidades para se obter resistência é o uso de plantas geneticamente modificadas com genes que expressam peptídeos antimicrobianos ou que atuem no mecanismo de ativação da resposta das plantas às doenças. Os genes *atacinaA* e *Xa21* já foram empregados em construções genéticas para variedades de laranjas doces, sendo que ambos apresentaram resistência a patógenos bacterianos em outras culturas, e diminuição no número de lesões causadas pelo patógeno *X. axonopodis* em plantas transgênicas de laranja doce. Outro gene interessante, o *Npr1*, é um regulador que atua na indução de respostas de defesa da planta contra patógenos. Em outras culturas, a superexpressão de *Npr1* culturas promoveu aumento da resistência a fungos e bactérias. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de plantas de laranjas geneticamente modificadas com estes três genes, quando infectadas com *Ca. Liberibacter*, e a resposta das plantas contendo o gene *AtNpr1* quando inoculadas com *X. axonopodis*. O monitoramento da resposta à inoculação com *Ca. Liberibacter* foi realizado através da avaliação da presença de sintomas de HLB, e pela quantificação da bactéria nos tecidos do floema por meio de qPCR, utilizando-se a região ribossomal 16S bacteriana, previamente caracterizada. Já as plantas inoculadas com a bactéria causadora do cancro cítrico foram analisadas através da expressão de PR-proteínas, da

quantificação do desenvolvimento da população bacteriana por meio de curva de crescimento, e pela análise visual de sintomas. A bactéria *Ca. Liberibacter* foi capaz de se multiplicar em todos os eventos de transformação analisados, porém quatro deles (transformados com o gene *AtNpr1*) não manifestaram sintoma da doença. Duas plantas desta construção também apresentaram redução no número e tamanho das lesões causadas por *X. axonopodis*, indicando uma possível tolerância desta planta à bactéria.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), also known as *greening*, is the world most important citrus disease and it is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter* spp. This disease was originated from China and Africa, where were discovered the variants *Ca. L. asiaticus* and *Ca. L. africanus*, respectively. In 2004, the disease was detected in Brazil, where the variants *asiaticus* and a new one called *americanus* were identified. The *Ca. Liberibacter* bacteria inhabit phloem vessels of host plants, causing yellowing of infected branches, and fruits abscission. At the moment, it was not possible to cultivate *Ca. Liberibacter*, and very little is known about its biology. Another important disease of citrus, the citrus canker, is also originated from Asian continent and causes huge damages to citrus production because of leaf drop and prematurely fall of fruits. Its causal agent, the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causes necrotic lesions in leaves, branches and fruits. There is no varietal resistance to HLB or citrus canker, and it is necessary to develop studies in order to achieve alternative resistance sources to these diseases. One possibility to obtain resistance is the use of genetically modified plants expressing antimicrobial peptides genes, or expressing genes that act in the plant defense response machinery. The genes *attacinA* and *Xa21* were used in genetic constructions for sweet orange varieties, and both showed resistance to bacterial pathogens in other crops, with small number of lesions caused by *X. axonopodis* in transgenic sweet orange plants. Another interesting gene, the *Npr1*, is a regulator that acts in the induction of plant defense response against pathogens. In other crops, the *Npr1* super-expression caused high level of resistance to bacterial and fungal pathogens. The goal of the present study was to evaluate the response of genetically modified sweet orange plants with these three genes, after infection of *Ca. Liberibacter*, and the response of plants containing the *AtNpr1* gene, after *X. axonopodis* inoculation. The response to *Ca. Liberibacter* infection was analyzed by the evaluation of HLB symptoms and by the quantification of phloem-associated bacteria by qPCR based on a previously characterized *Ca. Liberibacter* 16S ribosomal region. Plants inoculated with the causal agent of citrus canker were analyzed by RT-PCR to detect the expression of PR-proteins. The quantification of bacterial population was developed using a growth curve and by visual analysis of symptoms. The bacterium *Ca. Liberibacter* grown in all the transformation events analyzed, however four of them (transformed with the *AtNpr1* gene)

did not develop disease symptoms. Also, two plants of this construction showed reduction in the number and size of lesions caused by *X. axonopodis*, indicating a possible induction of plant tolerance to citrus canker.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, com uma área de plantio de mais de 800 mil hectares, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor nacional. Esta cultura se estabeleceu como uma importante fonte de divisas para o país, movimentando mais de US\$ 3 bilhões (FAO, 2008).

Apesar da grande produção e da importância econômica dos citros, a cultura é afetada por diversas doenças, causando grandes perdas. Na década de 40 a tristeza dos citros dizimou a maioria dos pomares. O cancro cítrico também está presente no país há muitos anos, mas sua disseminação tornou-se muito preocupante a partir da introdução do minador dos citros no parque citrícola. Nas últimas décadas, importantes doenças foram encontradas no país, como a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a morte súbita dos citros (MSC), e mais recentemente o *Huanglongbing* (*ex-greening*).

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e recebe atenção especial dos produtores por causar grandes perdas no mundo inteiro (Brunings e Gabriel, 2003). A doença causa lesões necróticas em folhas, frutos e ramos, causando a desfolha de ramos e a queda prematura de frutos. A transmissão ocorre por chuvas com ventos ou por ferramentas e implementos agrícolas contaminados. A partir da introdução do minador dos citros no país em 1996, o número de casos da doença aumentou pronunciadamente (Graham et al., 2004). Apesar de não existirem evidências de que o inseto seja um vetor, ele facilita a entrada da bactéria através de injúrias e galerias que causa em folhas. Atualmente o controle se dá por meio da erradicação de plantas doentes e das demais adjacentes a esta.

O *Huanglongbing* (HLB) é uma das doenças mais severas de citros causando inúmeras perdas nas regiões onde está presente. A doença é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. que não foi isolada até o momento (Bové, 2006). Relatos recentes sugerem que a doença também pode ser causada por um fitoplasma (Teixeira et al., 2008). Os sintomas de HLB são a presença de ramos amarelos, mosqueamento irregular das folhas, má formação de frutos e sementes, evoluindo para a desfolha, seca e morte de ramos. O vetor da bactéria é o psilídeo *Diaphorina citri* que está presente nos pomares paulistas (Fundecitrus, 2007). No combate a doença, os produtores efetuam diversas pulverizações de inseticidas para controlar a população

do vetor, e realizam inspeções nos pomares para identificação de plantas doentes, que são erradicadas para diminuir a fonte de inóculo existente nos pomares.

Todas as variedades de citros são suscetíveis ao cancro cítrico e ao *Huanglongbing*, por este motivo o uso de transformação genética de cultivares de citros se torna uma estratégia interessante na tentativa de combate a estas doenças. Dentro dos programas de melhoramento genético existem diferentes abordagens para obtenção de resistência a patógenos. Uma delas é a introdução de genes R de resistência, como o gene *Xa21* que confere resistência contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song et al., 1995). Outra possibilidade é o uso de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, como o gene *atacina A*. Uma abordagem que tem apresentado resultados interessantes é a superexpressão do gene *Npr1* de *Arabidopsis thaliana*, que está envolvido na sinalização de mecanismos de defesa vegetal (Cao et al., 1994).

Considerando estes exemplos e a necessidade de obter variedades resistentes a estas duas doenças de citros, o presente trabalho teve como objetivos analisar plantas geneticamente modificadas com o gene *Npr1*, para a confirmação da integração e transcrição do transgene, verificação da influência do transgene na expressão de PR-proteínas, assim como avaliar a resposta destas à *X. axonopodis* pv. *citri*, além de quantificar a presença de *Ca. Liberibacter asiaticus* em plantas transgênicas contendo os genes *atacina A*, *Xa21* ou *Npr1*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citros

Os citros são um dos principais produtos agrícolas cultivados no mundo. Eles são produzidos em mais de 120 países, sendo o Brasil responsável por 19% da produção total mundial e 29% da produção de laranja, movimentando anualmente mais de US\$ 3 bilhões (FAO, 2008) constituindo-se é um dos principais agronegócios brasileiros. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, responsável por cerca de 80% da produção, possuindo mais de 200 milhões de plantas em produção.

O gênero *Citrus* é originário do sudeste asiático e pertencem à família Rutaceae. As laranjas doces tiveram origem no sul da China e Indochina, e foram introduzidas no Brasil pela colonização portuguesa por volta de 1530 (Donadio et al., 2005).

As principais variedades de laranja doce cultivadas são a Pêra (37,8%), Natal, Valência (23,9% cada) e Hamlin (6%). A predominância da variedade Pêra se deve a excelente qualidade dos frutos produzidos, com grande aceitação nos mercados interno e externo, e pela indústria de suco. Os frutos da laranja ‘Natal’ possuem boa qualidade e são destinados ao consumo de frutas frescas e à industrialização. A variedade ‘Valência’ apresenta boa produtividade, sendo cultivada em diversas áreas produtoras de citros no mundo como nos Estados Unidos da América. Os frutos de ‘Hamlin’ são destinados principalmente ao mercado externo e ao processamento para obtenção de suco, sendo que esta variedade tem como vantagens uma grande produtividade e maturação precoce, diferentemente das variedades citadas acima (Boteon e Neves, 2005).

Na citricultura o uso de porta-enxerto é amplamente difundido, pois diversas vantagens são obtidas por este sistema. A enxertia possibilita a produção de plantas uniformes e idênticas à planta mãe, indução de precocidade no início da produção, aumento de produtividade e qualidade dos frutos, resistência a estresses bióticos e abióticos (Pompeu Junior, 1991). Entretanto, pode ocorrer incompatibilidade entre a variedade copa e o porta-enxerto, resultando em uma depressão na região da enxertia e formação de goma internamente, este quadro pode evoluir até a morte da planta (Pompeu Junior, 1991).

Apesar da qualidade dos frutos e predominância no mercado, as variedades plantadas no Estado apresentam baixa variabilidade genética entre elas e têm como principal porta-enxerto o limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osb.), ampliando a suscetibilidade à outras pragas e/ou doenças. Na década de 40 a citricultura brasileira foi significativamente reduzida em função da ocorrência da tristeza, revelando a baixa variabilidade genética do material em uso. Naquela época a citricultura baseava-se no uso da laranjeira azeda como porta-enxerto, e com o aparecimento da tristeza dos citros mais de 10 milhões de plantas foram eliminadas (Moreira e Moreira, 1991). Somente as plantas enxertadas em laranjeira ‘Caipira’ (*C. sinensis* L. Osb.), limoeiro ‘Cravo’ e ou de pé franco sobreviveram. Após este período o limoeiro ‘Cravo’ obteve a preferência dos produtores no replantio dos pomares. Mais recentemente, a morte súbita dos citros (MSC) foi relatada na citricultura e com grande potencial de destruição, porém dessa vez afetando o limoeiro Cravo que responde por mais de 80% do parque citrícola do país (CATI, 2008; Gimenès-Fernandes e Bassanezi, 2001). Assim, a diversificação do plantio tanto de copa, como porta-enxertos, com a oferta de novos materiais mais resistentes a doenças é de fundamental importância.

2.2. Desafios ao melhoramento genético de citros

Os citros apresentam apomixia e poliembrionia, características que dificultam o processo de melhoramento genético clássico, já que é necessário identificar o embrião zigótico (que será utilizado no programa de melhoramento) entre os diversos embriões nucelares (Machado et al., 2005). Além disso, também pode ocorrer a transferência de características indesejáveis dos parentais para os embriões. Por estes motivos, a transformação genética é muito interessante para a cultura já que uma dada característica pode ser incorporada, sem a alteração dos caracteres importantes já existentes no genótipo.

2.3 Doenças

A cultura dos citros é afetada por diversas doenças, tanto do porta-enxerto quanto da copa. No Estado de São Paulo são encontradas a leprose, o cancro cítrico, o declínio, a clorose

variegada dos citros (CVC), a morte súbita, a mancha marrom de alternaria, a tristeza, pinta preta (Rossetti, 1991), e mais recentemente o *huanglongbing* (Coletta Filho et al, 2004;2005; Teixeira et al., 2005), entre outras. Laranjeira et al. (2005) destacam a importância de problemas fitossanitários na produtividade e competitividade da citricultura brasileira. A produção de variedades resistentes a estas doenças é um dos grandes desafios dos programas de melhoramento de citros (Moreira e Pio, 1991). Indubitavelmente, o desenvolvimento de variedades resistentes é o método mais eficiente e viável para o combate de doenças (Coletta-Filho e Machado, 2002).

Atualmente, o *huanglongbing* e o cancro cítrico são duas das mais preocupantes doenças dos pomares paulistas, necessitando de controle intenso na inspeção e erradicação de plantas doentes.

2.3.1 Cancro Cítrico

O cancro cítrico é uma doença originária da Ásia, e foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos da América em 1915. A doença está presente no Brasil desde 1957, quando foi verificada sua presença no município de Presidente Prudente (Laranjeira et al., 2005). Ela é considerada como uma das mais importantes da citricultura mundial, causando grandes perdas na produção devido a queda precoce de frutos, e prejuízos no comércio de frutos lesionados.

O agente causal do cancro cítrico é a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, que penetra no tecido vegetal através da abertura dos estômatos ou de ferimentos existentes (Laranjeira et al., 2005). O sintoma inicial é a formação de pequenas lesões circulares, salientes e oleosas principalmente na face abaxial da folha (Brunings e Gabriel, 2003; Fundecitrus, 2006), onde existe um maior número de estômatos. Com o desenvolvimento da doença, as pústulas tornam-se pardas, circundadas por um halo amarelo e ocorre a necrose do tecido no centro da lesão. Os sintomas da doença podem ocorrer em toda a parte aérea da planta, mas ocorrem principalmente em folhas e frutos (Figura 1), causando a desfolha e queda dos frutos contaminados (Graham et al., 2004).

A bactéria está fortemente associada ao hospedeiro, não conseguindo sobreviver além de alguns dias no solo ou em ferramentas contaminadas, porém quando associadas com tecido vegetal dessecado, podem sobreviver por vários anos. As lesões são a principal fonte de inóculo

para a disseminação do patógeno pelo pomar durante as chuvas, além do manejo sem cuidados com a desinfestação das ferramentas utilizadas. O Estado de São Paulo adotou como forma de controle da doença a erradicação das plantas doentes e adjacentes em um raio de 30 metros, ou todo o talhão quando mais que 0,5% das plantas estiverem contaminadas (Fundecitrus, 2006).

A dispersão da doença no Estado de São Paulo teve um aumento importante a partir de 1996, devido à introdução do minador-dos-citros (*Phyllocnistis citrella*), passando de 25 focos nesse ano para 4180 em 1999 (Graham et al., 2004). A larva deste lepidóptero abre galerias nas folhas de citros, favorecendo desta forma a penetração da bactéria. Entretanto, não existem evidências que este inseto atue como vetor do patógeno (Amaral, 2003). A erradicação contínua das árvores contaminadas e o controle do minador-dos-citros se mostraram eficientes, pois o índice de contaminação do parque citrícola é de apenas 0,1% (Fundecitrus, 2006).

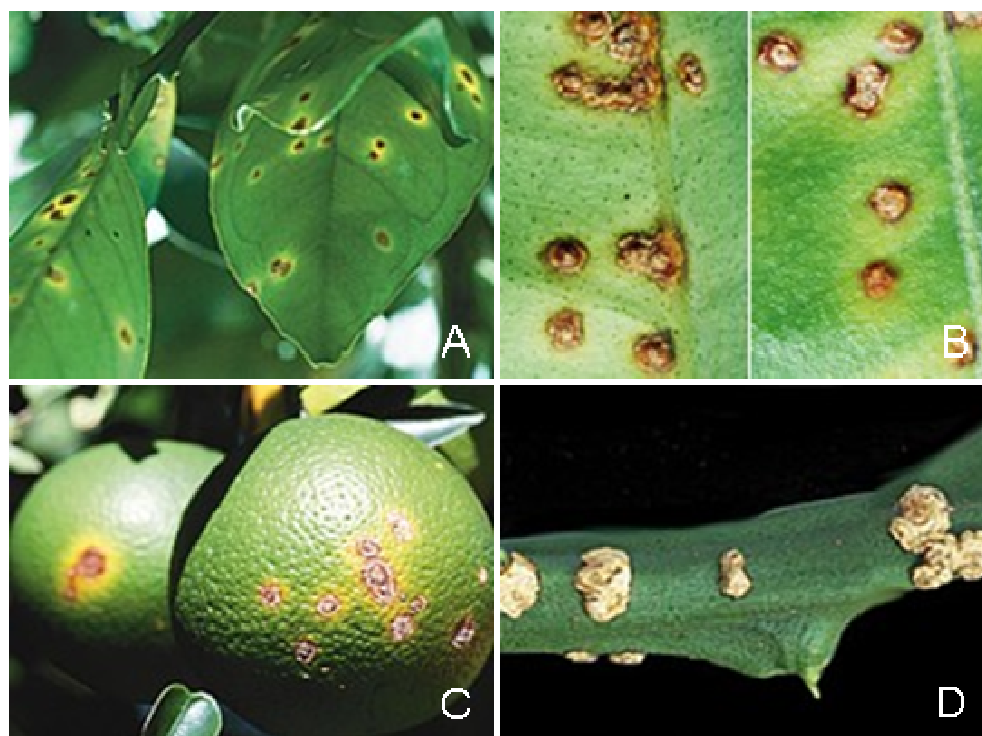


Figura 1 – Sintomas do cancro cítrico. **A**, lesões cloróticas em folhas; **B**, detalhe de lesões em folhas; **C**, Frutos contaminados; **D**, ramo afetado pela doença (Fotos: Fundecitrus).

Todas as espécies e cultivares de citros são suscetíveis ao cancro cítrico, existindo variação no nível de resistência entre elas (Namekata, 1991). A variação pode estar relacionada ao número de aberturas estomáticas existentes nos diferentes genótipos de citros (Brunings e Gabriel, 2003), ou a cutícula e ceras que alteram a infiltração da água no tecido foliar (Graham et al., 2004). As variedades ‘Pêra’ e ‘Valência’ são consideradas mais resistentes que ‘Natal’, e ‘Hamlin’ como a mais suscetível entre as quatro. A diferença entre elas não impede a infecção e a formação de lesões características da doença, por este motivo a busca por variedades com resistência total é de extrema importância, sendo que a utilização da metodologia de transformação genética pode auxiliar neste processo, já que permite alterações pontuais no genoma. Portanto, o uso do método de transformação genética para obtenção de cultivares com maior nível de resistência à doença é muito importante.

2.3.2 *Huanglongbing* (HLB)

Huanglongbing é uma das doenças mais destrutivas que ocorre em citros atualmente. Apesar de não existirem estudos detalhados sobre as perdas decorrentes desta doença, dados indicam que em algumas regiões as perdas foram de 30 a 100% (Da Graça, 1991). Os ramos afetados apresentam coloração amarela e má formação de frutos com sementes abortadas, e com o avanço da doença ocorre a desfolha dos ramos, a seca e morte de ponteiros (Figura 2). O HLB é causado pela bactéria Gram-negativa *Candidatus Liberibacter* spp. que habita exclusivamente o floema da planta infectada. Duas variantes desta bactéria foram originalmente identificadas na Ásia e na África, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter africanus*, respectivamente. Estas bactérias ainda não foram isoladas e totalmente caracterizadas e por este motivo recebem a designação *Candidatus*. A linhagem asiática foi recentemente cultivada em meio de cultura, porém ela cresceu associada a outra bactéria, e não foi possível isolá-la (Davis, et al., 2008). A forma asiática é transmitida pelo vetor *Diaphorina citri*, que também é encontrado no Brasil (Figura 2 D). A forma africana é transmitida pelo psilídeo *Trioza erytreae*, e é sensível a altas temperaturas (Halbert e Manjunath, 2004).

Em 2004 foram relatados casos de HLB na região de Araraquara, no Estado de São Paulo. Teixeira et al. (2005) determinaram a existência de uma terceira variante da bactéria que foi

chamada de *Ca. L. americanus* e estabeleceram uma metodologia para identificação. Coletta-Filho et al. (2005) analisaram seqüências de DNA ribossomal 16S de bactérias associadas aos casos de HLB do Estado de São Paulo, encontrando divergência entre a variante americana e a asiática. Houve também a confirmação da ocorrência da forma asiática, embora em menor quantidade em relação à americana naquela época (Coletta Filho et al., 2005; Teixeira et al., 2005). A partir do ano de 2006, esse panorama foi alterado, e o variante asiático foi associado a 80% dos casos de *huanglongbing* no início de 2008 (Fundecitrus, 2008a). O número de talhões afetados pelo HLB está aumentando desde a primeira confirmação da doença em 2004 (3,41% dos talhões infectados), e hoje está presente em mais de 18% dos talhões do parque citrícola paulista (Fundecitrus, 2008b).

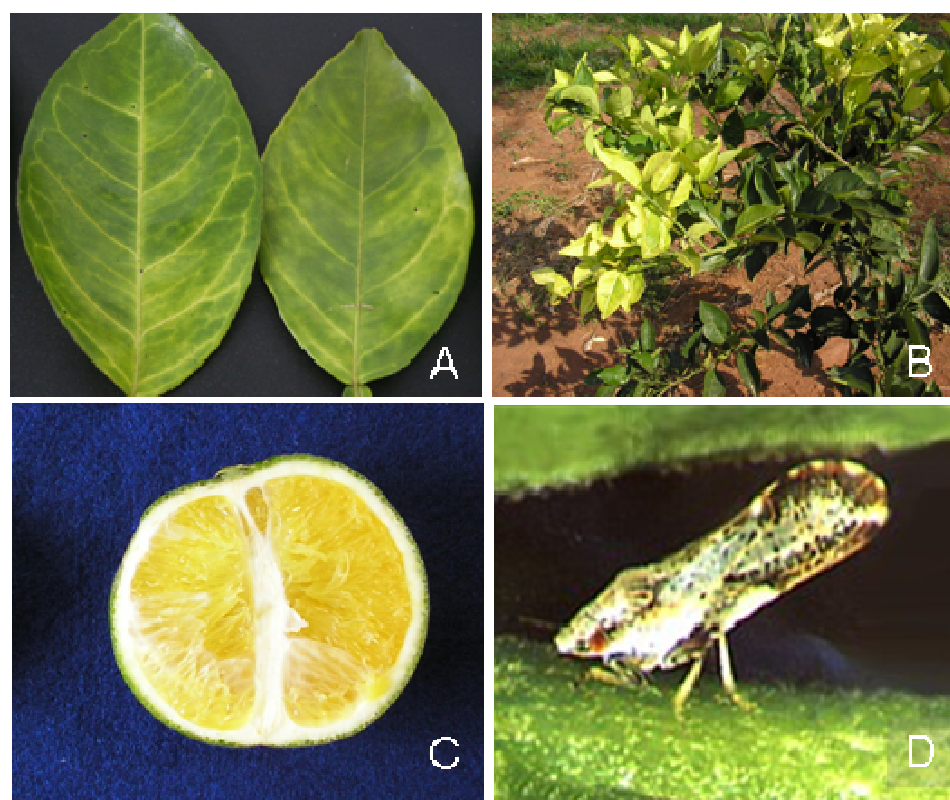


Figura 2 – Sintomas de HLB. **A**, mosqueamento irregular do tecido foliar; **B**, planta infectada apresentando ramos de cor amarela; **C**, fruto deformado e assimétrico; **D**, psilídeo *Diaphorina citri* (Fotos A, A. K. Nakatani; B e C, E. F. Carlos e D, Fundecitrus).

A confirmação de HLB em plantas sintomáticas é feita por PCR com *primers* específicos para a região 16S onde é possível distinguir os variantes da bactéria (Teixeira et al., 2005; Das, 2004). No entanto, a detecção da bactéria em tecidos não sintomáticos é prejudicada em função da limitação na sensibilidade da PCR convencional, muito provavelmente associado à baixa titulação da bactéria e sua distribuição irregular nos tecidos vegetais infectados (Tatineni et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Por isso a utilização de técnicas de detecção mais sensíveis, como o PCR quantitativo (qPCR), é fundamental. Carlos et al. (2006) desenvolveram uma metodologia eficiente para a detecção de *Ca. Liberibacter* utilizando PCR quantitativo em tempo real, que está em uso em diversos estudos do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’. A detecção é feita por sonda específica para a região do DNA ribossomal 16S da bactéria. O trabalho de Li et al. (2006), também relata o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a detecção de *Ca. Liberibacter* spp. através de qPCR. Esta técnica vem sendo utilizada com frequência nos trabalhos relacionados a detecção de *Ca. Liberibacter* nos tecidos da planta.

A transmissão de HLB pode ocorrer através de borbulhas contaminadas ou pelo inseto vetor (Bové, 2006; Lopes e Frare, 2008). O psílídeo *D. citri* está presente no Brasil há pelo menos 50 anos e é capaz de transmitir *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (Teixeira et al., 2005; Fundecitrus, 2007). Este inseto após adquirir a bactéria, mesmo durante a fase de ninfa, é capaz de transmitir o patógeno por todo o seu período de vida. Por este motivo o controle do inseto vetor é uma prática muito importante e foi adotada no combate ao HLB.

Em 2007, foi constatada no Estado de São Paulo a existência de outro microrganismo associado ao HLB, ele foi descoberto após testes de detecção de *Candidatus Liberibacter* apresentarem resultados negativos para plantas com sintomas da doença. Sequência de rDNA 16S mostraram que se trata de um fitoplasma (Teixeira et al., 2008).

Existem relatos de plantas de outras espécies, e de gêneros próximos ao *Citrus*, que não desenvolveram sintomas da doença quando inoculadas (Halbert e Manjunath, 2004). Entretanto, as pesquisas envolvendo resistência genética ao HLB são de extrema importância, pois não existem variedades comerciais de copa e porta-enxerto imunes à doença.

2.4 Transformação genética de citros

Os trabalhos com transformação genética de citros começaram no final da década de 80, e até o momento dezenas de trabalhos foram realizados com diversas variedades e espécies. O primeiro estudo envolvendo transformação genética de citros foi realizado por Kobayashi e Uchimiya (1989) por meio do uso de polietileno glicol (PEG).

A metodologia mais utilizada para a obtenção de citros transgênicos é a que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* (Azevedo, 2005; Boscariol, 2004; Ballester et al., 2007; Paoli et al., 2007; Pena et al., 1997; Zaneck et al., 2008). Estas bactérias são capazes de transferir naturalmente fragmentos de seu genoma para células vegetais, a fim de que estas produzam opinas que servem de fonte nutritiva (Andrade et al., 2003; Brasileiro e Lacorte, 1998). Após a identificação e esclarecimento deste processo, alterações genéticas destes organismos permitiram seu uso como vetores na transferência de fragmentos de DNA exógenos para diversas espécies vegetais (Andrade et al., 2003).

Os estudos envolvendo transformação genética de citros utilizam em sua maioria a metodologia baseada no uso de segmentos de epicótilos (Azevedo et al., 2006; Mendes et al., 2002; Molinari et al., 2004a; Paoli et al., 2007) ou segmentos nodais (Penã et al., 1995; Penã et al., 1997; Zaneck et al., 2008). A eficiência de transformação de citros varia entre os genótipos utilizados. Experimentos com citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* Raf.) apresentaram as maiores taxas de transformação genética, alcançando 41% de brotos transgênicos pelo número total de explantes utilizados (Ballester et al., 2007), resultado superior ao encontrado anteriormente por Penã et al. (1997) que foi de 20,6%. Entre as variedades de laranja doce os índices variam de 0,5% a 18,6% (Azevedo, 2005; Boscariol, 2004).

Normalmente, a seleção de transformantes é realizada através de genes de resistência a antibióticos, principalmente o *nptII*. Este gene promove a resistência à canamicina em brotações provenientes de células transformadas geneticamente, permitindo que estas se desenvolvam em meio contendo o antibiótico. Porém, esta estratégia tem sofrido resistência por parte de governos e consumidores, e diversos grupos de pesquisas têm buscado alternativas para a seleção de brotações transformantes (Ballester et al., 2007; Boscariol, 2004; Pereira, 2004). A utilização de açúcares não metabolizados normalmente pela planta, como manose e xilose, tem possibilitado a

recuperação de transformantes, sem utilização de antibióticos. (Ballester et al., 2008; Boscariol et al., 2003; Pereira, 2004).

Grande parte dos estudos realizados com citros transgênicos tem como finalidade a introdução de características de interesse agrônomo como resistência a doenças, tolerância a fatores abióticos, redução do período de juvenilidade, entre outros. Molinari et al. (2004b) e Carneiro et al. (2006) modificaram geneticamente plantas de citrange ‘Carrizo’ e citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* Macf. X *P. trifoliata* Raf.), respectivamente, com o gene *p5cs* isolado de *Vigna aconitifolia*. A enzima P5CS está envolvida na síntese do aminoácido prolina, que promove ajuste osmótico nas células e conseqüente aumento na tolerância a seca. A introdução do gene *flowering locus T* isolado de *Citrus* em *Poncirus trifoliata* induziu florescimento e frutificação precoces, sendo que algumas linhagens apresentaram florescimento doze semanas após a transferência para casa de vegetação (Endo et al., 2005). Plantas de citrange ‘Carrizo’ transformadas geneticamente com os genes *leafy* e *apetala1* de *Arabidopsis thaliana* apresentaram redução no período de juvenilidade (Peña et al., 2001).

Diversos trabalhos foram realizados visando obter resistência a doenças em citros. Recentemente, foram relatados estudos envolvendo resistência transgênica contra diferentes patógenos, entre eles os de Febres et al. (2008) e Zaneck et al. (2008), que desenvolveram plantas geneticamente modificadas de grapefruit e laranja doce com intuito de obter novas linhagens resistentes aos vírus da sorose e tristeza dos *Citrus*, respectivamente. Boscariol (2004) transformou geneticamente plantas de laranja doce com os genes *atacina A* e *Xa21*, e constatou a redução no tamanho das lesões causadas por *X. axonopodis* pv. *citri* em suas folhas. Azevedo (2005) introduziu o gene *cecropina* em laranja doce, encontrando um evento de transformação com diferença na formação da lesão do cancro cítrico quando comparado com um controle não transgênico. Neste mesmo trabalho o autor relatou a obtenção de um transformante de limão ‘Cravo’ com o gene *bacteriopsina* que apresentou redução na área de lesões causadas por *Phytophthora nicotianae*.

2.5 Genes de resistência

Dentro dos programas de melhoramento genético existem diferentes abordagens para obtenção de resistência a patógenos. Uma delas é a introdução de genes de resistência, também conhecidos como genes R, como o gene *Xa21*, originário de arroz, que confere resistência contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plantas de tabaco transformadas geneticamente com os genes de tomate *Pto* (Ronald et al., 1992) e *Cf9* tornaram-se resistentes a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Zhao et al. (2005) transferiu o gene *Rxo1* de milho para plantas de arroz e estas se tornaram resistentes à bactéria *X. oryzae*, comprovando que é possível a transferência de genes entre espécies não relacionadas.

Outra possibilidade é o uso de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (Bespalkov et al., 2001; Oard e Enright, 2006; Reynoird et al., 1999), como o gene *atacina A*. Uma abordagem que tem apresentado resultados interessantes é a superexpressão do gene *Npr1* de *Arabidopsis thaliana*, que está envolvido na sinalização de mecanismos de defesa vegetal (Chern et al., 2001; Lin et al., 2004; Malnoy et al., 2007). Além destas alternativas, o silenciamento gênico vem sendo utilizado contra doenças viróticas (Febres et al., 2008; Zaneck et al., 2008).

2.5.1 Npr1

O gene *Npr1* é um regulador importante na via de sinalização do ácido salicílico (SA), cuja função é a indução de respostas de defesa da planta contra patógenos, incluindo a resistência sistêmica adquirida (Delaney et al., 1995; Glazebrook et al., 1996; Shah et al., 1997). A resposta mediada pelo NPR1 ativa diversos mecanismos de defesa vegetal entre eles a ativação da expressão de PR-proteínas (Cao et al., 1998) e também de genes envolvidos na síntese de calose (Dong et al., 2008).

A proteína NPR1 torna-se ativa na presença de indutores da SAR, como o SA (Cao et al., 1998). A ativação ocorre através da redução de um complexo formado por moléculas de NPR1, para monômeros ativos, que são translocados para o núcleo celular (Johnson et al., 2003; Kinkema et al., 2000; Pieterse e Loon, 2004; Tada et al., 2008). No núcleo a proteína interage com fatores de transcrição da família TGA, que por sua vez se ligam aos promotores de genes de

PR-proteínas e ativam sua expressão (Johnson et al., 2003; Kinkema et al., 2000; Pieterse e Loon, 2004). A Figura 3 ilustra a hipótese de ação do NPR1 desenvolvida por Pieterse e Loon (2004).

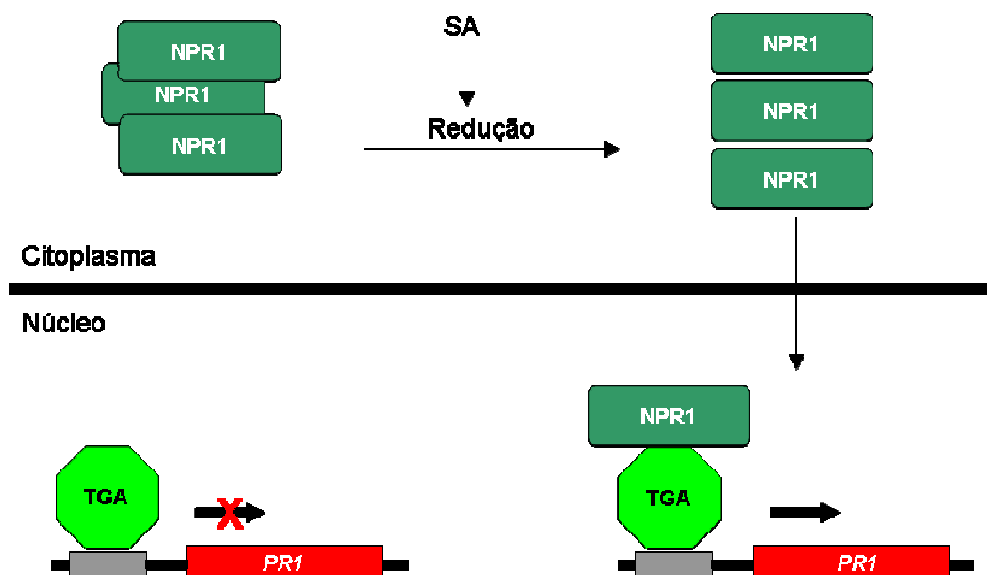


Figura 3- Hipótese do mecanismo de ação de NPR1 na ativação da expressão de PR-proteínas. (Baseado em Pieterse e Loon, 2004).

A super expressão do gene *Npr1* em plantas transgênicas promoveu aumento da resistência a diversos patógenos, tanto bacterianos quanto fúngicos (Cao et al., 1998; Chern et al., 2001; Lin et al., 2004; Malnoy et al., 2007). Cao et al. (1998) demonstraram que plantas de *Arabidopsis* com níveis altos de expressão de *Npr1* aumentaram a resistência a *Pseudomonas syringae* e a *Peronospora parasítica*, enquanto plantas com níveis baixos de expressão tiveram comportamento próximo ao de plantas selvagens, indicando uma relação entre o nível de expressão do transgene e a ativação de mecanismos de defesa. Linhagens de arroz transformadas geneticamente com o gene *Npr1* de *Arabidopsis* (*AtNpr1*) apresentaram redução no tamanho das lesões causadas por *X. oryzae* (Chern et al., 2001). Plantas transgênicas de tomate foram resistentes ao *Fusarium oxysporum* e a *Ralstonia solanacearum*, e moderadamente resistentes a *Stemphylium solani* e a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Lin et al., 2004). Os resultados obtidos em arroz e tomate mostram que o gene *AtNpr1* é funcional em outras espécies, sendo seu

produto capaz de ativar os mecanismos de defesa de grupos taxonômicos distantes. A super expressão de *MpNpr1* em maçã aumentou a resistência aos patógenos *Erwinia amylovora*, *Venturia inaequalis* e *Gymnosporangium juniperi-virginianae* (Malnoy et al., 2007). Estes autores também verificaram aumento na expressão de genes de proteínas PR como *PR-2*, *PR-5* e *PR-8*.

As proteínas PR são produzidas planta hospedeira em resposta a interações patogênicas ou outras situações de estresse. Estas proteínas são divididas em 17 famílias, de acordo com suas características serológicas, estruturais e atividade biológica (Van Loon e Van Strien, 1999; Van Loon et al., 2006). As famílias *PR-2* e *PR-5* possuem ação hidrolíticas sobre a parede celular em fungos (Van Loon et al., 2006), porém Cavalcanti et al. (2006) relataram aumento na proteção de tomates contra a infecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. A função da família *PR-1* ainda permanece desconhecida.

Estes resultados sugerem que a inserção do gene *Npr1* pode ser uma estratégia interessante para os programas de melhoramento genético visando resistência a doenças.

2.5.2 Atacina A

Outra abordagem para o melhoramento genético é a introdução de genes que codificam peptídeos antibacterianos. Existem diversos trabalhos de transformação genética de vegetais visando à produção desses peptídeos. Em plantas de fumo a expressão de cecropinas aumenta a resistência à *Ralstonia solanacearum* (Jaynes et al., 1993). Bessalov et al. (2001) transformaram laranja 'Pêra' com o gene do peptídeo sarcotoxina, e observaram maior tolerância à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, bactéria causadora do cancro cítrico. Oard e Enright (2006) mostraram que plantas de *Arabidopsis* transformadas geneticamente com genes de peptídeos antimicrobianos foram mais resistentes a bactérias e fungos patogênicos.

O peptídeo atacina também vem sendo utilizado visando resistência à diferentes bactérias. Plantas geneticamente modificadas de maçã (Ko et al., 2000; 2002), pêra (Reynold et al., 1999) e batata (Arce et al., 1999) apresentaram resistência à *Erwinia amylovora* e *E. carotovora* *atroseptica*, respectivamente. Plantas de laranja doce contendo o gene *atacina A* apresentaram

redução no tamanho das lesões causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Boscariol et al., 2006).

As atacinas foram isoladas a partir de insetos como *Hyalophora cecropia*, *Drosophila melanogaster* e *Trichoplusia ni*. Este peptídeo desestabiliza a membrana externa de bactérias Gram-negativas, ligando-se a lipopolissacarídeos da membrana a qual tem sua permeabilidade alterada (Carlsson et al., 1998). A produção de proteínas de membrana também é inibida após a associação do peptídeo aos lipopolissacarídeos.

2.5.3 Xa21

Outra abordagem para aquisição de resistência pode ser a utilização de genes “R” de resistência, como sugerido por Ronald et al. (1992). O gene *Xa21*, isolado da espécie selvagem de arroz *Oryza longistaminata*, é um exemplo desta classe. A proteína formada possui três domínios: uma região extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR), outra região transmembrana e um domínio intracelular serina-treonina quinase (Song et al., 1995). As regiões LRR e domínio quinase apresentam similaridade com os genes de resistência de tomate *Cf9* e *Pto*, respectivamente, e atuam provavelmente no reconhecimento do patógeno e na ativação de mecanismos de defesa (Ronald et al., 1996).

Linhagens de arroz transformadas geneticamente com o gene *Xa21* apresentaram aumento de resistência à *X. oryzae* pv. *oryzae* (Tu et al., 1998; Zhai et al., 2004). O nível de resistência adquirido com o transgene não foi influenciado pelo local de inserção, nem pelo número de cópias integradas, porém houve alteração entre as diversas variedades transformadas com o gene *Xa21* (Zhai et al., 2004). Boscariol (2004) construiu um vetor de expressão derivado do plasmídeo pCambia 2300 com marcador seletivo *nptII* e promotor constitutivo CaMV35S, onde foi inserido um fragmento de 3,1 kb, correspondente ao cDNA do gene *Xa21*. Esta construção gênica foi utilizada na transformação genética de laranja doce das variedades ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Hamlin’. Posteriormente, as linhagens de laranja transgênicas foram submetidas à inoculação de *X. axonopodis* pv. *citri*, apresentando redução de até 70% na severidade do cancro cítrico, fato que evidencia a funcionalidade deste gene em citros (Mendes et al., submetido à publicação).

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

Plantas geneticamente modificadas contendo os genes *atacinaA*, *Xa21* ou *AtNpr1* foram utilizadas nos experimentos de desafio com *Candidatus Liberibacter* spp. As três construções genéticas estão esquematizadas na Figura 1. A primeira construção envolve o gene *atacina A*, que codifica um peptídeo antibacteriano (Boscariol, 2004) e a segunda possui o gene *Xa21*, um gene R isolado de arroz (Boscariol, 2004). Plantas contendo as construções foram gentilmente cedidas pela Profª. Dra. Beatriz M. J. Mendes, do CENA/USP e pelo Prof. Dr. Francisco A. A. Mourão Filho, da ESALQ/USP.

Foram utilizados vinte e cinco eventos de transformação distintos de plantas contendo o gene *atacinaA*, sendo cinco das variedades de laranja ‘Natal’, cinco de ‘Valência’, onze de ‘Hamlin’ e quatro de ‘Pêra’. Com o gene *Xa21* foram utilizados dez eventos distintos de plantas de laranja ‘Valência’.

A terceira construção utilizada, contendo o gene *AtNpr1*, foi desenvolvida no laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’. Este gene está envolvido na ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas. As plantas obtidas após a transformação genética foram avaliadas por PCR, Southern e Northern blots, procedimentos que serão descritos a seguir. Quatro plantas transgênicas da variedade ‘Hamlin’ e uma de ‘Natal’ foram selecionadas para testes com os patógenos *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

As três construções gênicas utilizam como marcador seletivo o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina. Outra característica em comum é o uso do promotor constitutivo CaMV35S, proveniente do vírus do mosaico da couve-flor. O gene *atacinaA* utilizado possui um peptídeo sinal de 54 pares de bases, que direciona a proteína formada para o apoplasto.

Os transformantes das três construções gênicas foram obtidos pela técnica de transformação de células vegetais de citros, mediada co-cultura com *A. tumefaciens*, seguindo o protocolo de Mendes *et al.* (2002). Epicótilos com cerca de 10 a 15 cm de comprimento, provenientes de plântulas germinadas *in vitro*, foram utilizados como explantes após

segmentação (segmentos internodais de cerca de 1cm). Após co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* por 3 dias a 28°C, os explantes foram cultivados em meio seletivo contendo o antibiótico canamicina.

Cada evento de transformação genética com os genes *Atacina A* e *Xa21* foi propagado até a obtenção de seis plantas, e para os eventos de *AtNpr1* foram produzidas nove mudas de cada evento de transformação, sendo seis destinadas ao experimento de inoculação de *Ca. Liberibacter asiaticus*, e três para inoculação de *X. axonopodis* pv. *citri*. As borbulhas de cada planta transgênica foram enxertadas em limoeiros ‘Cravo’ plantados em sacos plásticos com substrato a base de casca de *Pinus*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura entre 16 e 30°C.

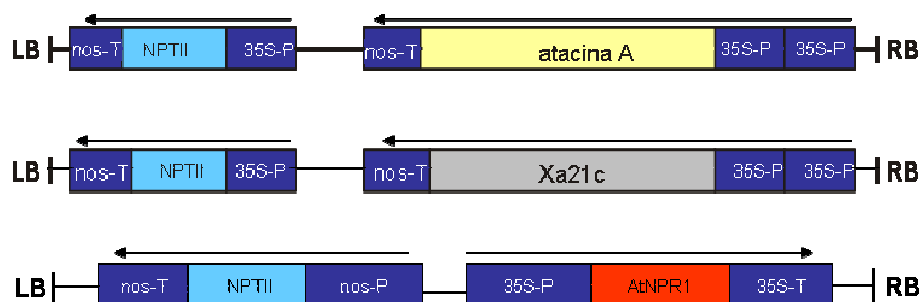


Figura 4 – Construções dos vetores para obtenção das plantas transgênicas utilizadas. De cima para baixo *atacina A*, *Xa21* e *AtNpr1*, respectivamente. *NPTII*: neomicina fosfotransferase II, gene de resistência ao antibiótico canamicina, 35S-P: promotor CaMV35S, 35S-T: terminador CaMV35S, nos-T: terminador nopalina sintase, LB: borda esquerda, RB: borda direita.

3.2 Análises das plantas de laranja com o gene *AtNpr1*

Cinquenta e dois brotos formados durante o processo de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, das variedades ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ foram confirmados por PCR e propagados através da enxertia sobre plântulas de porta-enxerto

germinadas *in vitro*. Tão logo o material apresentou suficiente número de folhas, as plantas foram avaliadas por Southern e Northern blots.

3.2.1 Southern Blot

O DNA das plantas transgênicas foi extraído a partir de folhas de acordo com o método de Doyle e Doyle (1990). Cerca de 10 µg do DNA foram digeridos com a enzima de restrição *Pst*I e transferidos para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences). A hibridização ocorreu a 60°C com sonda complementar ao gene *Npr1*, marcada com digoxigenina (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche), seguindo o protocolo do fabricante. A detecção foi realizada com Anti-DIG AP e CSPD, para posterior revelação em filme radiográfico.

3.2.2 Extração de RNA

Para isolamento do RNA total foi utilizado com 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) para cada 200 mg de limbo foliar, macerados em nitrogênio líquido. A seguir, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para novo tubo contendo clorofórmio. Após nova centrifugação, o RNA foi precipitado na presença de isopropanol e lavado com etanol 75%. As amostras foram tratadas com ‘DNaseI RNase free’ (Invitrogen) para eliminar contaminação por DNA. O RNA total foi quantificado em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro a 260 nm e armazenado a uma temperatura de -80 °C.

3.2.3 Northern blot

A transcrição do gene foi avaliada através de Northern blot utilizando-se a mesma sonda e condições de marcação descritas para a técnica de Southern blot. Para o preparo da membrana, cerca de 10 µg de RNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,2% de agarose, 0,925% de formaldeído, 20 mM de ácido morpholineopro panesulfonio, 5 mM de acetato de sódio e 2 mM de EDTA). Após a eletroforese, a transferência do RNA para a membrana de nylon foi feita usando-se SSC 20%. Após a transferência do RNA total para a

membrana de nylon, este foi hibridizado com sonda complementar marcada com digoxigenina e realizada a detecção sob as mesmas condições do Southern blot.

3.2.4. Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 120 ng do RNA total extraído e tratado com a enzima DNase I (Amplification Grade, Invitrogen), 1 µL de dNTP 2,5mM, 1 µL de *random primer* (Invitrogen) e 7 µL de H₂O DEPC por amostra. Após a adição destes reagentes, a amostra foi incubada a 70°C por 5 minutos, sendo então imediatamente colocadas no gelo. Em seguida foram acrescentados 4 µL de tampão 5X; 2 µL de dTT 2mM (Invitrogen); 1 µL da transcriptase reversa (M-MLV) e 0,5 µL do inibidor 'RNase OUT' (Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos, sendo posteriormente armazenada em *freezer* -20 °C.

3.2.5. Avaliação da expressão dos genes *AtNpr1*, *PR-1*, *PR-2* e *PR-5*

Os genes de PR-proteínas, *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* são induzidos na presença de patógenos e por NPR1 (Cao et al, 1998; Malnoy et al., 2007). Estes genes estão envolvidos nos mecanismos de defesa da planta contra patógenos. Para avaliarmos se o transgene *AtNpr1* é funcional em plantas de citros, a expressão destes três genes de PR-proteínas foi analisada em comparação a plantas não transgênicas. A quantificação relativa da transcrição dos genes *AtNpr1*, *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* foi realizada através do sistema SYBR Green no aparelho ABI 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Como controle endógeno da reação de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi utilizado o gene *β-tubulina*, que possui expressão constitutiva, visando normalizar possíveis diferenças de concentração das amostras de cDNA. As reações foram realizadas com um volume final de 25µL, e em cada reação foram utilizados 12,5µL de SYBR Green Master Mix 2X, 0,5 µL da solução de 10µM de cada *primer* e 250ng de cDNA. Após a reação de amplificação em tempo real foi realizada a curva de dissociação para a verificação da presença de fragmentos inespecíficos formados a partir de contaminantes. Na Tabela 1 estão as seqüências dos iniciadores utilizados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de comparação de médias pelo teste de Tukey (p<0,05%).

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas avaliações de RT-qPCR.

Gene	Seqüência (5' - 3')	Referência
<i>AtNpr1</i>	F ACCGGGTGTAAAGATAGCA R CGAGTTCCACGGTTTTAGA	Este estudo
<i>atacina A</i>	F GCT GTT CAG CTA GCC GTC C R TTT GGG AAG TCA GGC ATG TT	Boscariol, 2004
<i>Xa21</i>	F ATT GCC AGC TCT TAC GGT R CAA GTC TAA GCA GCC AAA CA	Boscariol, 2004
<i>PR1</i>	F GCAAGGTGTGTGGGCACTATAC R ACCCAATGCGAACCGAATT	Cernadas et al., 2008
<i>PR2</i>	F GAC GTC GTC GTA TCT CAT GG R GAG TTG GGC GTC AAA AAG G	Teixeira, 2005
<i>PR5</i>	F GTC CGT TGC ATT CCA AGC R GCG GCT TCT ATC TCC ATA GC	Teixeira, 2005
<i>β-tubulina</i>	F TTTGTGACATCCCTCCGACT R TCACCCTCCTGAACATTTCC	Malosso et al., 2007

3.3. Avaliação de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em plantas transformadas com *AtNpr1*

A avaliação de resistência a *X. axonopodis* foi realizada em plantas de cinco eventos de transformação genética distintos (quatro da variedade ‘Hamlin’ e um de ‘Natal’) e em plantas não transgênicas das variedades ‘Hamlin’ e ‘Natal’, utilizadas como controle dos experimentos de inoculação. Para cada transformante foram utilizadas três repetições biológicas, totalizando 15 mudas transgênicas e seis não transgênicas. Estes experimentos foram realizados em casa de vegetação, sob condições de contenção no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, Campinas-SP. O inóculo utilizado foi obtido de uma suspensão bacteriana da linhagem *Xac* 306. A bactéria foi plaqueada em meio nutritivo NBY (5g de peptona, 3g de extrato de carne, 2g de extrato de levedura, 2g de K₂HPO₄, 0,5g de KH₂PO₄ e 1,5g de Agar, quantidades referentes a um litro de meio nutritivo) com ampicilina (100µg/ml), e incubada a 28°C por 48 horas. As bactérias presentes nas placas foram raspadas com alça de platina e transferidas para tubo plástico estéril contendo 25 mL de água autoclavada. A suspensão obtida foi quantificada em espectrofotômetro e a concentração foi ajustada para 10⁴ UFC/mL (~OD=

0,3). A inoculação foi realizada em folhas através de dois métodos. O primeiro foi através da aplicação de solução contendo a bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* na face abaxial das folhas jovens (20 a 30 dias) utilizando-se de hastes de algodão para espalhar a solução, sem causar ferimentos na epiderme. O segundo consistiu na perfuração das folhas (com 40-50 dias) utilizando agulhas previamente imersas em solução bacteriana. Os experimentos de inoculação de *X. axonopodis*, através dos dois métodos descritos acima, foram realizados duas vezes para a confirmação dos resultados obtidos. O primeiro experimento ocorreu em novembro de 2007 e o segundo durante o mês de junho de 2008.

Durante os experimentos foram analisadas a formação de lesões nas folhas inoculadas e a população bacteriana através de curva de crescimento. A determinação da população bacteriana foi realizada em amostras de folhas nos períodos de 0, 6, 15 e 24 dias após a inoculação. Para cada evento de transformação analisado, três amostras de discos foliares de 1cm² contendo uma região inoculada foram transferidas para cadinho contendo 1mL de água estéril e maceradas. O extrato resultante foi transferido para microtubo, diluído com água destilada e esterilizada (1:10), e então plaqueado em meio nutritivo NBY com ampicilina (100µg/ml). As placas foram incubadas a 28°C por 2 a 3 dias. A contagem de colônias formadas foi considerada para 1 cm² de tecido vegetal e apresentada em gráfico.

3.4. Avaliação de resistência a *Candidatus Liberibacter* em plantas transgênicas de laranja doce

3.4.1. Inoculação de *Ca. Liberibacter* spp.

Para a inoculação de *Ca. Liberibacter* foram realizadas três coletas de borbulhas infectadas para uso como fonte de inóculo. As borbulhas foram retiradas de plantas que apresentavam sintomas da doença, e que foram positivas no PCR de diagnóstico para HLB. A primeira coleta foi efetuada em julho de 2006, quando foram retiradas cerca de 400 borbulhas, e a segunda no mês de outubro, quando foram coletadas cerca de 350 borbulhas. Ambas as coletas ocorreram em pomar comercial na região de Araraquara – SP, onde estavam presentes os variantes *Ca. Liberibacter americanus* e *Ca. L. asiaticus*. As borbulhas da primeira e da segunda

coleta foram utilizadas para desafiar as plantas transformadas com as construções *Atacina A* e *XA21*. A terceira coleta foi realizada no Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ no mês de maio de 2007, onde foram obtidas borbulhas contendo o variante asiático da bactéria. A inoculação das plantas contendo o gene *NPRI* foi realizada com borbulhas da última coleta. Para cada evento de transformação genética foram inoculadas cinco repetições biológicas, através da enxertia de três borbulhas infectadas em cada réplica. A sexta réplica foi utilizada como controle não inoculado. Plantas não transformadas das mesmas variedades foram inoculadas com borbulhas infectadas da mesma forma que as plantas transgênicas e utilizadas como testemunhas.

3.4.2. Avaliação visual dos sintomas

O monitoramento das plantas infectadas ocorreu através do acompanhamento de um dos sintomas típicos em laranja doce, a clorose assimétrica presente entre as nervuras secundárias das folhas maduras. As avaliações dos sintomas foram feitas aos três, seis, nove e doze meses após a enxertia com borbulhas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*.

3.4.3. Detecção da bactéria por PCR quantitativo (qPCR)

A quantificação de bactéria foi realizada a partir de amostras de DNA total das plantas infectadas com o patógeno. O método de extração de DNA utilizado foi baseado no trabalho de Murray e Thompson (1980). O material vegetal utilizado foi cerca de 250 mg de nervura central e o pecíolo de folhas, de preferência de ramos com sintomas, e macerados na presença de nitrogênio líquido. O DNA das amostras foi preparado utilizando o tampão de lise (100 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA; 0,7 M de NaCl; 1% de CTAB; 2% de PVP e 1% de Mercaptoetanol) a 65°C por 30 minutos. Após este período, proteínas, paredes celulares e outros polissacarídeos foram removidos com a adição de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa resultante recebeu igual volume de tampão [50 mM de Tris (pH 8,0), 10 mM de EDTA e 1% de CTAB] para precipitação do complexo DNA-CTAB, e tal solução foi incubada a temperatura ambiente, por 2 horas. O precipitado foi recuperado após centrifugação e então dissolvido em 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA e 1 M de NaCl. O DNA foi precipitado na

presença de etanol absoluto e lavado com etanol 70%. O DNA extraído foi dissolvido em TE e congelado a -20°C.

As análises de qPCR foram realizadas no ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem) através do sistema TaqMan. As sondas desenvolvidas são referentes a uma região conservada do DNA ribossomal 16S, capaz de diferenciar as formas americana e asiática de *Ca. Liberibacter* (Carlos et al., 2006). As seqüências das sondas utilizadas foram: 6-NED ACATCTAGGTAAAAACCMGBNFQ (var. asiaticus) e 6-FAM CCTATAAAGTTCCCA ACTTAMGBNFQ (var. americanus). A Figura 2 mostra a posição das sondas na região de rDNA 16S da bactéria.

Os iniciadores para *Ca. Liberibacter asiaticus* (Lsg1-AS-84F 5' TCACCGGCAGTC CCTATAAAGT 3' e Lsg1-AS-180R 5' GGGTTAAGTCCCGCAACGA), e para *Ca. Liberibacter americanus* (Lsg2-AM-67F 5' CACCTTCCTCCGGCTTATCA 3' e Lsg2-AM-144R 5' GCG CAACCCCTGCCTAT 3') foram usados separadamente nas reações de qPCR (Carlos *et al.*, 2006).

As reações de amplificação seguiram o protocolo convencional da Applied Biosystems, que consiste em uma pré-ativação a 50°C 2 min e 95°C 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C 15 s, 60°C 1 min, com um volume final de reação de 20µl. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e em cada placa também foram realizadas reações com o controle negativo (planta sadia), com o controle positivo (planta doente), com água estéril e com amostras contendo concentrações conhecidas do fragmento de rDNA 16S clonado (plasmídeo pGEM contendo um inserto de 1200 pb).

A quantificação das amostras foi realizada com base em uma curva-padrão obtida através de diluições em série na base 10 do plasmídeo contendo a região de rDNA 16S de *Ca. Liberibacter*. A amostra inicial do plasmídeo foi quantificada em espectrofotômetro e então utilizada para a formação de diluições seriais, sendo que 10µl foram transferidos para outro microtubo contendo 90µl de água, e assim sucessivamente até a obtenção da diluição 10⁻⁵. Foram obtidas diluições a partir de 10⁸ moléculas até 10⁴. A fórmula utilizada para calcular o número de cópias (CN), foi baseada no trabalho de Wang et al. (2006): $CN = (M \times N) / (L \times D)$, onde M= concentração mínima de ácido nucléico detectada (gml⁻¹); N= número de Avogrado (6,022x10²³ moléculas/mol); L= tamanho do ácido nucléico em kpb; e D= fator de conversão

de 1kpb de ácido nucléico para Daltons (dsDNA= $6,6 \times 10^{-5}$ g/mol kbp).

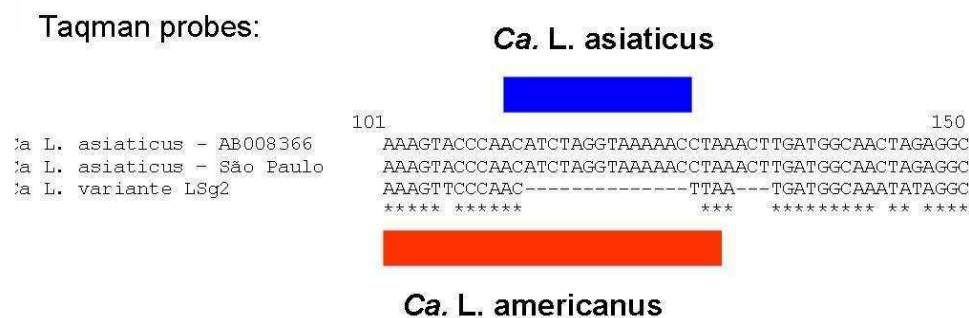


Figura 5 – Esquema indicando o fragmento alvo das sondas desenvolvidas para a detecção da região de rDNA 16S de *Ca. Liberibacter* SP, em relação às seqüências de DNA dos variantes asiático e americano.

3.5. Verificação da transcrição e estabilidade dos transgenes (*AtNpr1*, *Atacina A* e *Xa21*)

Após a realização dos experimentos de inoculação de *Ca. Liberibacter*, a transcrição dos transgenes estudados foi novamente avaliada através da técnica de RT-PCR, para verificar se a expressão do gene inserido não se alterou ao longo do tempo. O RNA total das plantas avaliadas foi isolado e utilizado como molde para a síntese de uma fita de cDNA, como descrito anteriormente. As fitas de cDNA geradas foram utilizadas na PCR com *primers* específicos para cada um dos transgenes testados, e submetidas a amplificações em termociclador. As condições da PCR das plantas das construções gênicas *atacina A* e *Xa21* foram baseadas no trabalho de Boscariol (2004). Após a reação de amplificação, os produtos gerados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises da integração e transcrição do gene *AtNpr1* em plantas de laranja doce geneticamente transformadas

Através da análise de Southern blot foi confirmada a presença de 1 a 2 inserções do gene nas plantas avaliadas (Figura 5a). Este número de inserções é normalmente relatado para transformação genética de citros via *Agrobacterium* (Azevedo et al., 2006; Boscariol et al., 2006; Febres et al., 2008; Paoli et al., 2007; Peña et al., 1997).

A integração do gene foi confirmada em 11 brotos de um total de 52 regenerados em meio seletivo. A transcrição do gene *AtNpr1* foi verificada por Northern blot (Figura 5b), utilizando a mesma sonda preparada para o Southern blot, de forma que apenas 5 foram positivos nesta avaliação, sendo 4 da variedade ‘Hamlin’ e 1 de ‘Natal’. Uma provável explicação para o silenciamento gênico observado é a ocorrência de metilação do DNA, ou a inserção de repetições invertidas do DNA, resultando na formação de fitas duplas de RNA, que atua no silenciamento pós-transcricional (Dominguez et al., 2002).

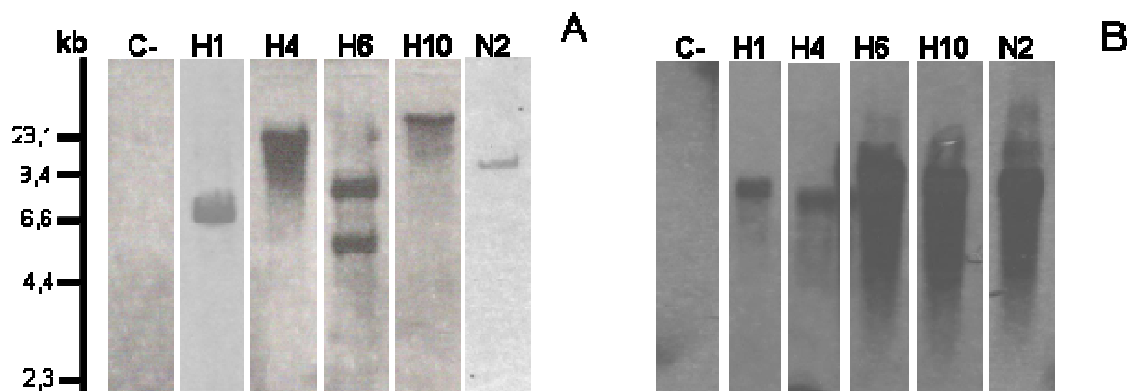


Figura 5 - Southern e Northern blots de *AtNpr1* (sonda marcada com digoxigenina). **A**, Southern blot; **B**, Northern blot. H1, H4, H6 e H10: plantas transformadas da variedade ‘Hamlin’, N2 da variedade ‘Natal’, C- : planta não transformada.

A eficiência dos experimentos de transformação genética com o gene *AtNpr1* variaram de 5% a 12%, dependendo da variedade utilizada. Estes índices estão de acordo com os valores encontrados em outros trabalhos de transformação genética de laranja doce (Ballester et al., 2007; Boscariol, 2004; Paoli et al., 2007; Zanek et al., 2008). O uso de sondas específicas para o gene marcadas com digoxigenina foi satisfatório, dispensando o uso de marcações radioativas.

4.2. Análises da expressão do transgene *AtNpr1* e ativação de proteínas PR

A análise de qPCR do transgene *AtNpr1* mostrou que a planta H1 (Hamlin) teve a menor expressão entre os cinco transformantes avaliados. Por este motivo, esta amostra foi utilizada como calibradora das demais amostras. A planta N2, da variedade ‘Natal’ foi a que apresentou a maior expressão do transgene, sendo 29 vezes maior que o calibrador, e cerca de seis vezes maior que as outras três plantas transgênicas (Figura 6).

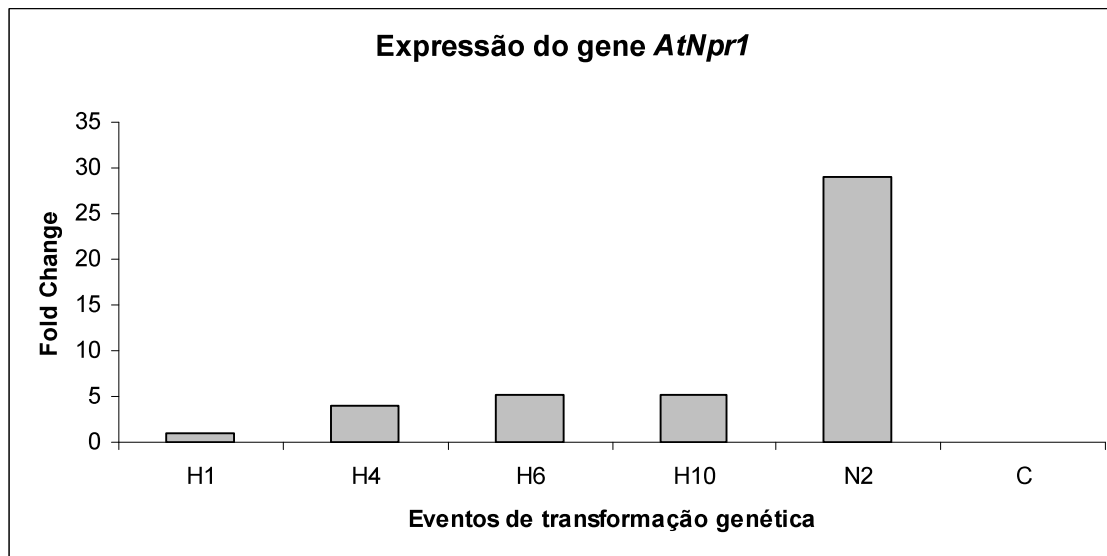


Figura 6 – Análise da transcrição do transgene *AtNpr1* através de PCR quantitativo. H1, H4, H6, H10, N2: plantas transgênicas, C: planta de laranja doce não transgênica.

A proteína NPR1 atua na via de sinalização da SAR, induzindo a expressão de PRs proteínas (Kinkema et al., 2000; Johnson et al., 2003; Pieterse e Loon, 2004). A ativação da expressão de PRs proteínas em plantas super expressando o gene *Npr1* já tinha sido comprovada por Malnoy et al. (2007) em macieira.

As análises de PCR quantitativo também indicaram que houve aumento na transcrição dos genes *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* nas demais plantas transgênicas com o gene *AtNpr1* (Figura 7). Contudo, as plantas H1 e H4 níveis inferiores de transcritos de *PR-1*. Isto pode ter ocorrido, devido à baixa expressão do transgene (*AtNpr1*) detectada nestas plantas, que pode ter influenciado a ativação das PRs nestas plantas. Os maiores níveis de transcrição dos três genes foram observados na planta N2, que possui o maior índice de expressão do transgene, indicando uma possível associação entre o nível de expressão de *Npr1* e o nível de transcrição dos genes de PR-proteínas, conforme evidências também obtidas por Cao et al. (1998) em *A. thaliana*. Entretanto, os resultados obtidos em maçã e tomate não indicaram correlação entre os níveis de expressão do transgene e de proteínas PR, exceto da PR-2 em macieiras (Lin et al., 2004; Malnoy et al., 2007).

4.3. Resposta a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em plantas transformadas com o gene *AtNpr1*

A resposta das plantas transgênicas à *X. axonopodis* pv. *citri* foi avaliada através da análise visual de sintomas nas folhas inoculadas pelos dois métodos descritos, e pela quantificação da população do patógeno na região da inoculação por meio de curva de crescimento. Os experimentos de inoculação da bactéria foram realizados por duas metodologias que se assemelham as condições encontradas nos pomares (Rigano et al., 2007), a primeira condição é a de folhas intactas que entram em contato com o patógeno, e a segunda situação se caracteriza pela presença de ferimentos causados pelo minador dos citros.

Os experimentos de inoculação foram realizados duas vezes, para a confirmação dos resultados obtidos. No primeiro experimento, nas inoculações realizadas com perfurações do tecido não foi possível observar diferenças quanto ao número de lesões ou tempo de aparecimento dos sintomas nas plantas transgênicas e as não transgênicas (Figura 8). Já na

inoculação sem perfuração, duas plantas apresentaram redução dos sintomas do cancro cítrico. As folhas da planta número 4 de ‘Hamlin’ apresentaram redução no número e tamanho das lesões formadas em comparação à planta controle, e no tecido foliar da planta Natal 2 não houve a formação de lesões (Figura 9).

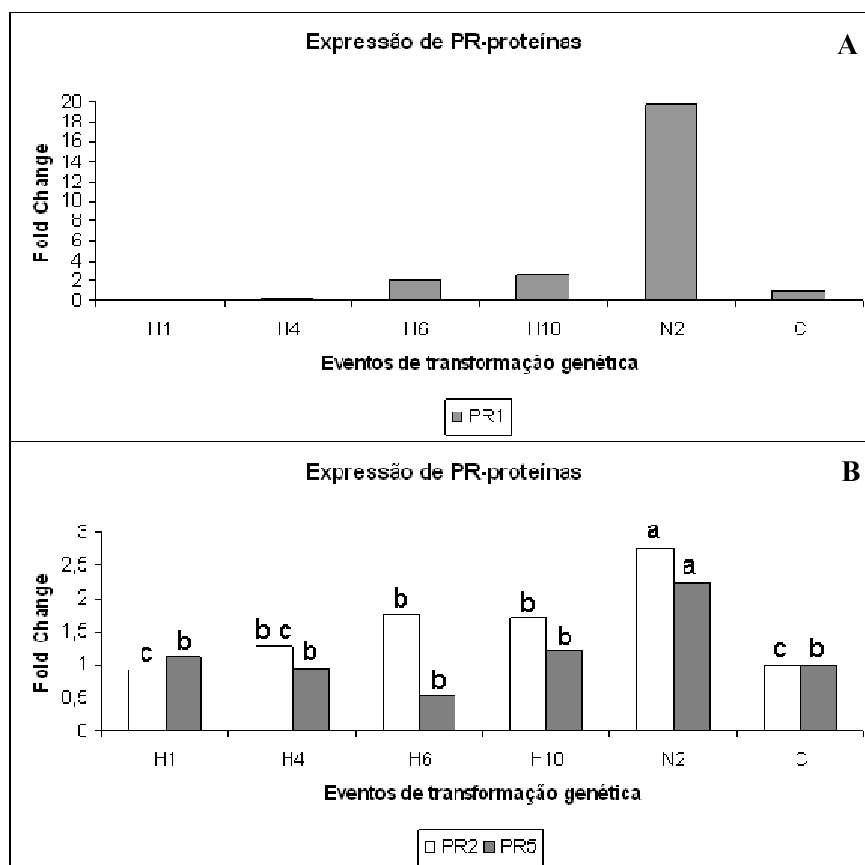


Figura 7 – Transcrição dos genes *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* em plantas super expressando o gene *AtNpr1*. **A**, análise da expressão de *PR-1*, as amostras de cada evento de transformação genética foram utilizadas na forma de *bulk*; **B**, análise da expressão dos genes *PR-2* e *PR-5*, letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. H1, H4, H6, H10, N2: plantas transgênicas; C: planta de laranja doce não transgênica.

No segundo experimento, a avaliação visual dos sintomas ocorreu concomitantemente à elaboração da curva de crescimento. Os resultados encontrados neste experimento estão de acordo com os do primeiro.

A diferença encontrada entre os métodos de inoculação da bactéria pode estar relacionada com uma maior suscetibilidade das folhas feridas em relação às intactas, como foi constatado por Christiano (2006) em laranjas doce. Este autor concluiu que a concentração da solução bacteriana necessária para causar a doença em folhas com injúrias é 100 vezes menor que para folhas sem ferimentos.

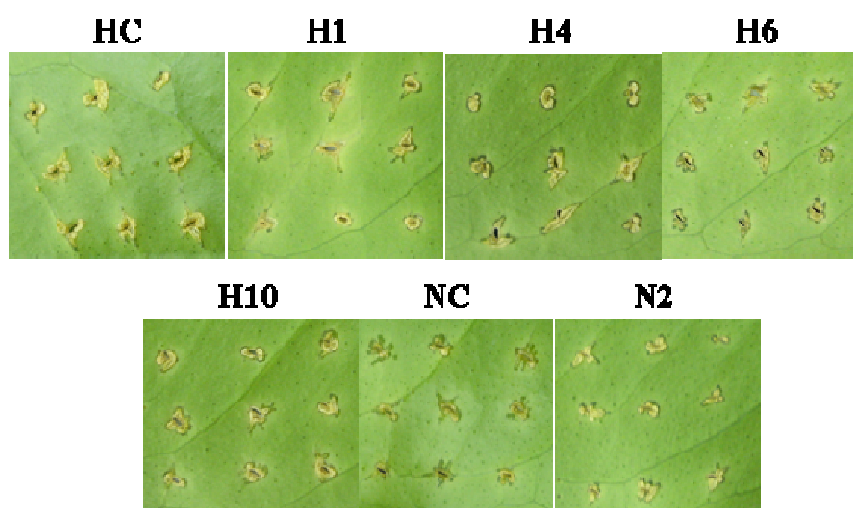


Figura 8 – Sintomas de cancro cítrico em folhas inoculadas com perfuração do tecido vegetal. HC= Hamlin controle, H1 a H10= plantas transgênicas da variedade Hamlin com o gene *AtNpr1*, NC= Natal controle, N2= planta transgênica da variedade Natal com o gene *AtNpr1*.

A capacidade do patógeno se desenvolver nos tecidos das plantas geneticamente modificadas foi avaliada por meio da construção de uma curva de crescimento da população bacteriana. A amostragem da população de *X. axonopodis* foi realizada nos dias 0, 6, 15, 24 e 35 após sua inoculação. A taxa de crescimento da bactéria nas plantas da variedade ‘Hamlin’ foi similar, quando comparada à da planta não transgênica (Figura 10a). O transformante Natal 2

apresentou redução do desenvolvimento da população bacteriana até o 24º dia em comparação ao controle da mesma variedade (Figura 10b).

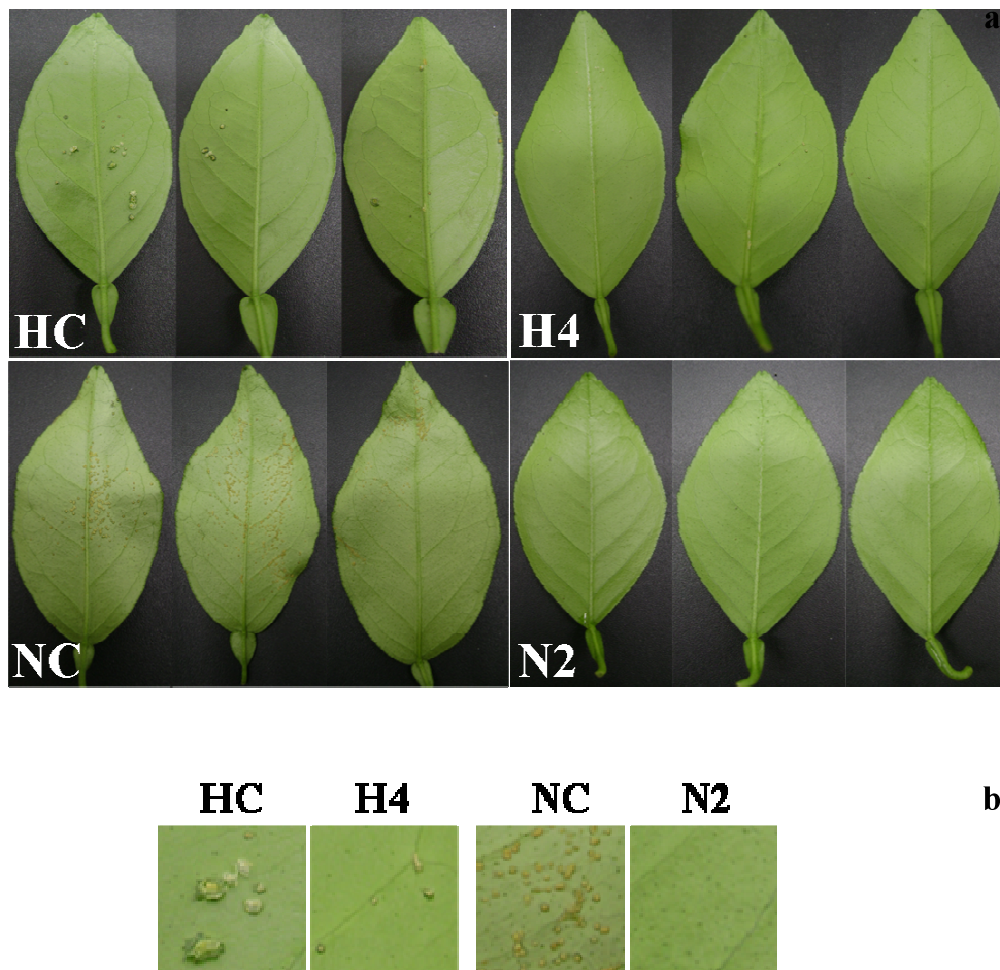


Figura 9 – Sintomas de cancro cítrico em folhas inoculadas sem perfuração do tecido vegetal. **a**, imagem de três repetições biológicas dos dois eventos de transformação com o gene *AtNpr1*, que obtiveram as melhores respostas ao patógeno (H4 e N2), e dos controles não transgênicos (HC e NC); **b**, detalhe das lesões causadas pela bactéria nestas plantas.

A redução no número e tamanho das lesões causadas por *X. axonopodis* pv. *citri* em laranjeiras transgênicas já foi relatada em estudos anteriores a este (Azevedo, 2005; Bessalok et

al., 2001; Boscariol et al., 2006; Mendes et al., submetido à publicação). Das três construções gênicas utilizadas, duas possuem genes codificadores de peptídeos antimicrobianos (*atacina A* e *sarcotoxina*) e uma o gene R (*Xa21*). Os resultados deste trabalho evidenciam que o uso do gene *Npr1* também é uma alternativa no combate a doenças da cultura de citros, entre elas o cancro cítrico, pois reduziu o número de lesões causadas pelo patógeno.

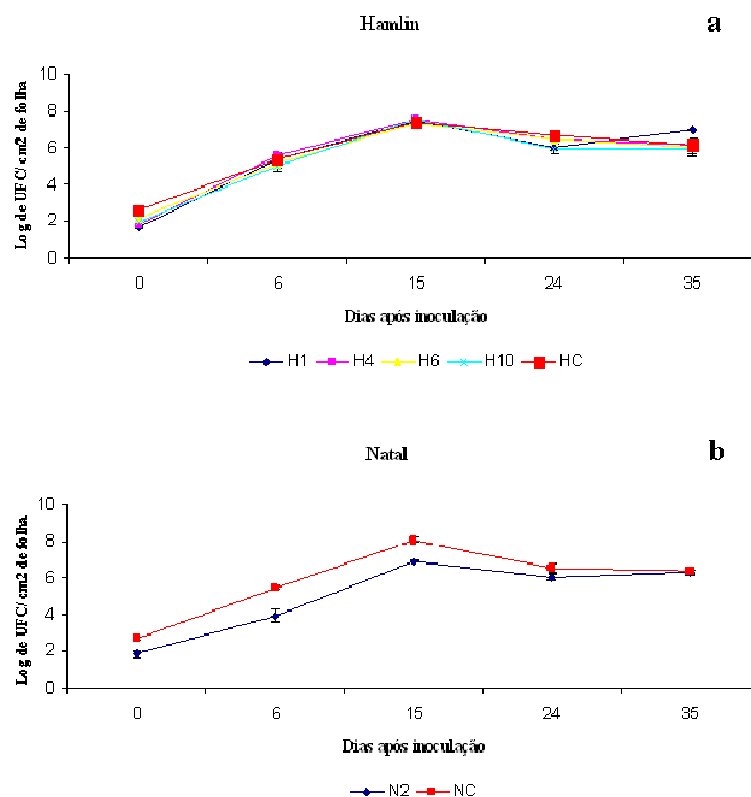


Figura 10 – Curva de crescimento de *X. axonopodis* pv. *citri* em tecido foliar de plantas geneticamente modificadas com o gene *AtNpr1*. **a**, plantas da variedade ‘Hamlin’; **b**, plantas da variedade ‘Natal’. HC e NC: plantas não transgênicas.

4.4. Análises de ativação de PRs após inoculação de *Xac*

Considerando que as plantas H4 e N2 mostraram redução no número de lesões na infecção de *X. axonopodis* pv. *citri*, elas foram utilizadas em um novo experimento para

avaliação da expressão dos genes de PR-proteínas após a inoculação do patógeno. 48 horas após inoculação de *X. axonopodis* sem perfuração do tecido, a transcrição de *PR-1* foi menor nas plantas transgênicas do que nos controles também inoculados (Figura 11). Já a transcrição dos genes *PR-2* e *PR-5* não sofreram aumento significativo em relação ao controle não transgênico, exceto para o gene *PR-5* da planta N2. Malnoy et al., 2007 relataram um aumento na expressão destes dois genes, além do *PR-8*, mas não no gene *PR-10*. Os resultados indicam que a superexpressão de *AtNpr1* somente influenciou a expressão de *PR-5* no transformante N2, que possui o maior nível de transcrição do transgene, sugerindo mais uma vez a correlação entre a expressão deste gene e o nível de transcritos do transgene.

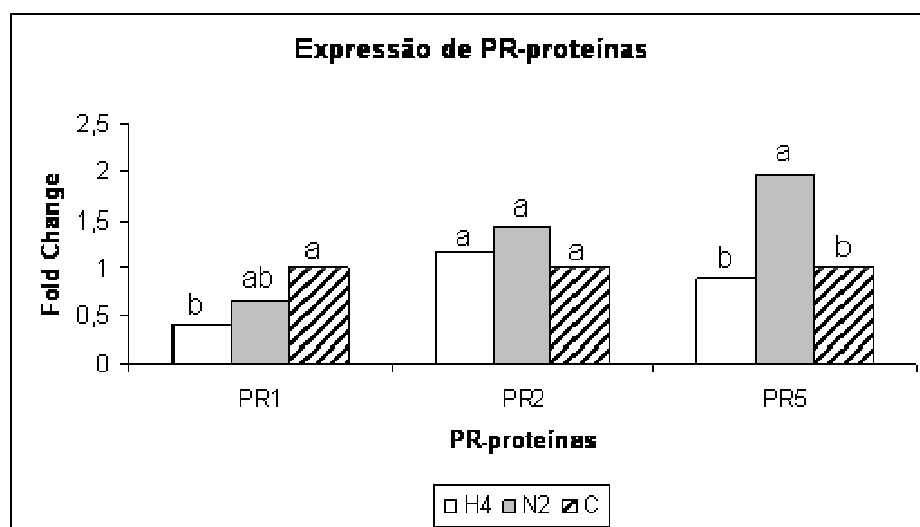


Figura 11 – Expressão dos genes *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* em plantas geneticamente modificadas com o gene *AtNpr1* (H4 e N2), inoculadas com *X. axonopodis*. C, amostra de planta não transgênica utilizada como calibradora. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

4.5. Inoculação da bactéria *Ca. Liberibacter*

Foram realizadas três coletas de borbulhas infectadas para uso como fonte de inóculo. Na primeira coleta foram retiradas cerca de 400 borbulhas, e na segunda realizada três meses

depois, foram coletadas cerca de 350 borbulhas. Ambas as coletas ocorreram em pomar comercial na região de Araraquara – SP, infectado com os variantes *Ca. L. americanus* e *Ca. L. asiaticus*, estas borbulhas foram utilizadas para desafiar as plantas transformadas com as construções *Atacina A* e *Xa21*. A terceira coleta foi realizada no Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’, onde foram obtidas borbulhas contendo o variante asiático da bactéria, as quais, foram enxertadas nas plantas contendo o gene *AtNpr1*. Em cada planta foram enxertadas três borbulhas contaminadas como podemos ver na Figura 12. A sobrevivência das borbulhas foi monitorada nas quatro semanas subsequentes ao processo de enxertia, e quando constatada a morte do tecido, foi realizada uma nova enxertia de material infectado.

O procedimento de inoculação de *Ca. Liberibacter* via enxertia de tecido contaminado se mostrou eficiente para a forma asiática da bactéria, sendo possível detectá-la em todas as plantas testadas. O variante americano foi detectado em apenas uma planta, que também possuía a forma asiática, apesar do uso de borbulhas provenientes de pomar contendo as duas espécies da bactéria. A baixa taxa de transmissão de *Ca. L. americanus* em relação aos outros variantes foi citada por Lopes e Frare (2008), em trabalho sobre a transmissão do patógeno por enxertia que apresentou taxas de transmissão inferiores ao índice encontrado no presente estudo.

4.6. Avaliação de sintomas de HLB

O início da manifestação de sintomas foliares ocorreu após seis meses da data de inoculação (Figura 13), quando cerca de 55% dos eventos de transformação genética avaliados já apresentavam sintomas. O número de plantas e a severidade dos sintomas aumentaram nas inspeções realizadas aos 9 e 12 meses (Tabela 2). O trabalho de Hung et al. (2000) e estudos preliminares realizados no Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ indicaram que o sintoma foliar típico do HLB se manifesta entre 6 e 12 meses depois da inoculação, sendo que os resultados do presente estudo estão de acordo com ambos. O aparecimento de sintomas entre as réplicas de uma mesma planta transgênica não foi uniforme, por este motivo um determinado evento de transformação genética foi considerado como positivo, quando pelo menos uma réplica apresentou em suas folhas o mosqueamento característico da doença.

Muitas plantas também apresentaram sintomas de deficiência mineral, o que dificultou o diagnóstico de HLB em algumas repetições biológicas. Para certificarmos que estes sintomas não estavam relacionados ao desenvolvimento da doença, todas as plantas foram submetidas à fertirrigação com NPK e correção de Mn, Mg e Zn, porém, algumas plantas continuaram com sintomas de deficiência mineral em suas folhas mais jovens. Lopes *et al.* (2008) também encontraram sintomas de deficiência mineral nas plantas infectadas com *Ca. Liberibacter*. Estes resultados podem indicar que o patógeno influencia no desenvolvimento destes sintomas nas plantas hospedeiras.

Um resultado interessante encontrado após 12 meses do início dos experimentos, foi que quatro plantas da variedade ‘Hamlin’ com o gene *AtNpr1* não apresentaram sintomas da doença, sendo que todos os demais eventos de transformação genética foram considerados positivos. Estas plantas devem ser mais investigadas quanto ao tipo de reação que possa estar ocorrendo para a ausência de sintomas. A ausência de sintomas de HLB também foi verificada na espécie *C. limetta*, após inoculação do patógeno, e nas espécies *C. indica* e *C. macroptera*, em locais de alto índice de incidência do patógeno. Porém, os autores não possuem uma hipótese que explique a ausência de sintomas (Halbert e Manjunath, 2004).

4.7. PCR quantitativo (qPCR)

As amplificações de diluições de plasmídeos contendo o fragmento 16S da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* (plasmídeo pGEM com inserto de 1200pb) foram utilizadas na construção de uma curva padrão para a quantificação da bactéria *Ca. L. asiaticus* (Figura 14).

Após seis meses da inoculação, as repetições de cada planta foram testadas para a presença dos variantes americano e asiático da bactéria. Apenas uma amostra possuía o variante americano, além de também apresentar a forma asiática. Por este motivo, as análises seguintes se concentraram na detecção de *Ca. Liberibacter asiaticus*. A bactéria *Ca. L. asiaticus* foi capaz de se desenvolver em todos os eventos de transformação testados. O menor título detectado de moléculas do fragmento 16S foi de $2,16 \times 10^4$ e o maior de $1,95 \times 10^7$ cópias de fragmento 16S/ μ L de DNA.



Figura 12 – Enxertia de borbulhas provenientes de planta infectada com *Ca. Liberibacter* sp. As setas indicam duas das três borbulhas enxertadas.



Figura 13 – Sintomas de HLB. **a**, Mosqueamento irregular nas regiões entre nervuras secundárias; **b**, espessamento e clareamento das nervuras; **c**, amarelecimento de ramo.

Tabela 2 - Desenvolvimento de sintomas de HLB em folhas de plantas inoculadas com *Ca. Liberibacter* sp.

Planta	Construção	Sintomas			
		3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Natal 1	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Natal 2	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Natal 3	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Natal 4	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Natal 5	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Pêra 6	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Pêra 7	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Pêra 8	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Valência 2	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Valência 5	<i>Atacina A</i>	-	-	+	+
Valência 11	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Valência 12	<i>Atacina A</i>	-	+	-	+
Valência 13	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Valência 16	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Valência 17	<i>Atacina A</i>	-	+	-	+
Valência 20	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 1	<i>Atacina A</i>	-	-	-	+
Hamlin 2	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 3	<i>Atacina A</i>	-	-	+	+
Hamlin 4	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 5	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 6	<i>Atacina A</i>	-	-	-	+
Hamlin 7	<i>Atacina A</i>	-	-	+	+
Hamlin 8	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 9	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 10	<i>Atacina A</i>	-	+	+	+
Hamlin 11	<i>Atacina A</i>	-	-	-	+
Hamlin 12	<i>Atacina A</i>	-	-	-	+
Valência 1	<i>Xa21</i>	-	+	+	+
Valência 2	<i>Xa21</i>	-	-	+	+
Valência 3	<i>Xa21</i>	-	-	+	+
Valência 4	<i>Xa21</i>	-	-	-	+
Valência 5	<i>Xa21</i>	-	-	-	+
Valência 6	<i>Xa21</i>	-	-	+	+
Valência 8	<i>Xa21</i>	-	-	+	+
Valência 13	<i>Xa21</i>	-	+	+	+
Valência 14	<i>Xa21</i>	-	+	+	+
Hamlin 1	<i>Npr1</i>	-	-	-	-
Hamlin 4	<i>Npr1</i>	-	-	-	-
Hamlin 6	<i>Npr1</i>	-	-	-	-
Hamlin 10	<i>Npr1</i>	-	-	-	-
Natal 2	<i>Npr1</i>	-	-	+	+

+ , planta sintomática; - , planta assintomática.

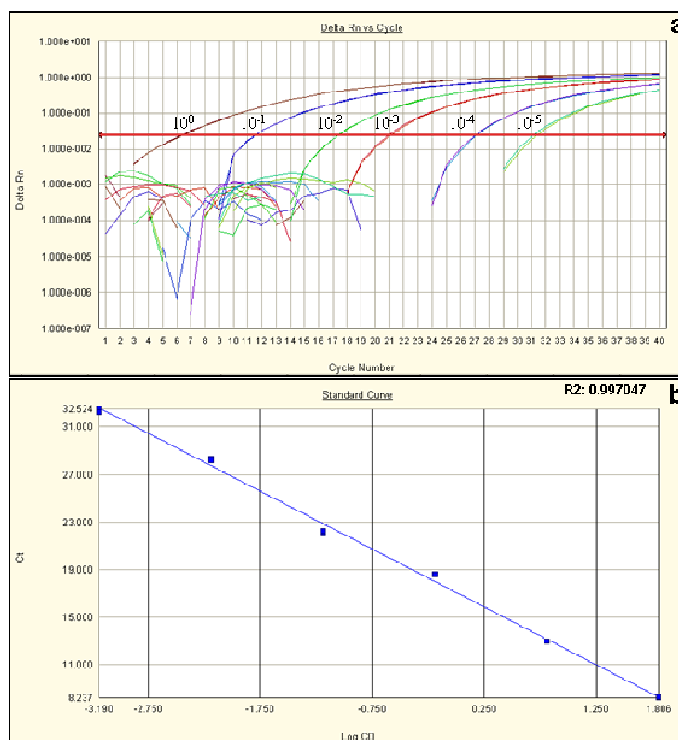


Figura 14 – Curva de amplificação das diluições em série do plasmídeo contendo o fragmento de DNA 16S da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* (a); curva padrão obtida a partir destas diluições seriais (b), os quadrados em azul representam os padrões utilizados na formação da curva padrão.

A quantificação da população bacteriana em plantas transgênicas com o gene *atacina A* mostrou variações no título ao longo do tempo, quinze plantas possuíram uma maior concentração do patógeno após nove meses da inoculação, quatro apresentaram declínio no nível de bactéria detectada, seis tiveram uma diminuição aos nove meses, seguida de um novo aumento aos doze meses, e ainda três plantas mostraram um incremento ao longo do período avaliado. A divergência do nível populacional entre as plantas transgênicas pode ser visto também entre as plantas controle de cada variedade. Porém, a variação encontrada não apresentou um padrão geral entre as plantas. As Figuras 15, 16, 17 e 18 apresentam os resultados obtidos para as plantas das variedades ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ transformadas com o gene *atacina A*.

O peptídeo atacina A foi eficaz contra patógenos bacterianos em outras espécies (Reynold et al., 1999; Ko et al., 2002), e também em plantas transgênicas de laranja doce, que

apresentaram redução no número de lesões causadas por *X. axonopodis* pv. *citri* em estudo anterior (Boscariol et al., 2006). Porém, os dados obtidos neste trabalho indicam que o desenvolvimento e a multiplicação da bactéria *Ca. Liberibacter* não foram afetados pela ação do peptídeo. Provavelmente, esta estratégia não foi eficiente porque a proteína gerada possui um peptídeo sinal que as direciona para a região do apoplasto (Boscariol, 2004) e o patógeno se desenvolve dentro de células do floema (Bové, 2006).

Os eventos de transformação da construção gênica *Xa21* apresentaram um aumento populacional até o nono mês do experimento, e um decréscimo no décimo segundo mês, exceto a planta V14, onde o padrão foi o oposto das demais. Todos os transformantes diferiram do controle não transformado no padrão da população do patógeno, porém a quantidade de bactérias foi superior como mostra a Figura 19. Anteriormente, as plantas de laranja doce transformadas com este gene apresentaram redução no número de lesões causadas por *X. axonopodis* pv. *citri* (Mendes et al., submetido à publicação), porém elas não foram capazes de inibir ou impedir a multiplicação de *Ca. Liberibacter* em seus tecidos, e nem mesmo influenciar na manifestação do sintoma foliar de HLB. O gene *Xa21* codifica para uma proteína de membrana, que atua no reconhecimento do patógeno e ativa mecanismos de defesa da planta (Song et al., 1995). A falta de eficiência deste gene contra *Ca. Liberibacter asiaticus* pode ser causada pelo hábito endocelular destas bactérias (Bové, 2006), que não fica exposta diretamente a proteína de membrana *Xa21*, diferentemente de *X. axonopodis* que coloniza o espaço intercelular (Graham et al., 2004). Provavelmente *Ca. Liberibacter* não possui um sítio de reconhecimento de membrana, como *Xanthomonas* e este gene não tenha capacidade de desencadear resposta de defesa na planta.

As plantas de laranja transgênica contendo o gene *AtNpr1* tiveram um padrão semelhante entre si (Figura 20). Nestas a população de *Ca. Liberibacter* aumentou ao longo do tempo, diferindo dos controles não transformados que apresentaram um aumento da população bacteriana aos nove meses após a inoculação, seguido de uma redução no décimo segundo mês. Porém, no final das avaliações a população bacteriana alcançou o mesmo nível da planta controle, mas apenas o transformante Natal 2 expressou sintomas da doença. De todos os transformantes avaliados, apenas os quatro da variedade 'Hamlin' transformados com o gene *AtNpr1* mantiveram-se assintomáticos um ano após a inoculação, sendo assim, este resultado

pode indicar uma possível tolerância à doença, porém eles devem ser avaliados por um período maior para a confirmação desta hipótese.

A introdução do gene *AtNpr1* em plantas de interesse agrônomo se mostrou uma estratégia interessante no combate a doenças bacterianas, como relataram Lin et al. (2004) em tomate e Chern et al. (2001) em arroz. Em ambos os casos, os autores evidenciaram que suas linhagens transgênicas apresentaram um aumento da resistência aos patógenos bacterianos *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *X. oryzae* pv. *oryzae*. Estes resultados em conjunto com o trabalho de Malnoy et al. (2007) mostram que o gene *Npr1* de *Arabidopsis thaliana* é funcional em outras espécies, não apresentando diferença significativa na indução de mecanismos de defesa em plantas de maçã quando comparado ao gene da própria espécie. As plantas de laranja doce transformadas com este gene também indicaram que esta construção gênica é interessante, tendo em vista que quatro transformantes foram assintomáticos quando inoculados com *Ca. Liberibacter*, e que dois eventos apresentaram redução das lesões causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

As plantas obtidas neste trabalho também devem ser desafiadas contra outros patógenos que afetam a citricultura brasileira, considerando que plantas superexpressando este gene elevaram sua resistência a agentes bacterianos e fúngicos (Lin et al., 2004; Malnoy et al., 2007; Quilis et al., 2008), as laranjeiras transgênicas poderão mostrar resultados positivos no combate a outras doenças. Porém, também serão necessários estudos referentes a infecções viróticas, pois Quilis et al. (2008) evidenciaram que plantas de arroz tiveram respostas negativas em infecções do *Rice Yellow Mottle Virus*, e Lin et al. (2004) que tomateiros não apresentaram diferenças nas respostas aos *TomatoYellow Leaf Curl Virus* e *Cucumber Mosaic Virus*.

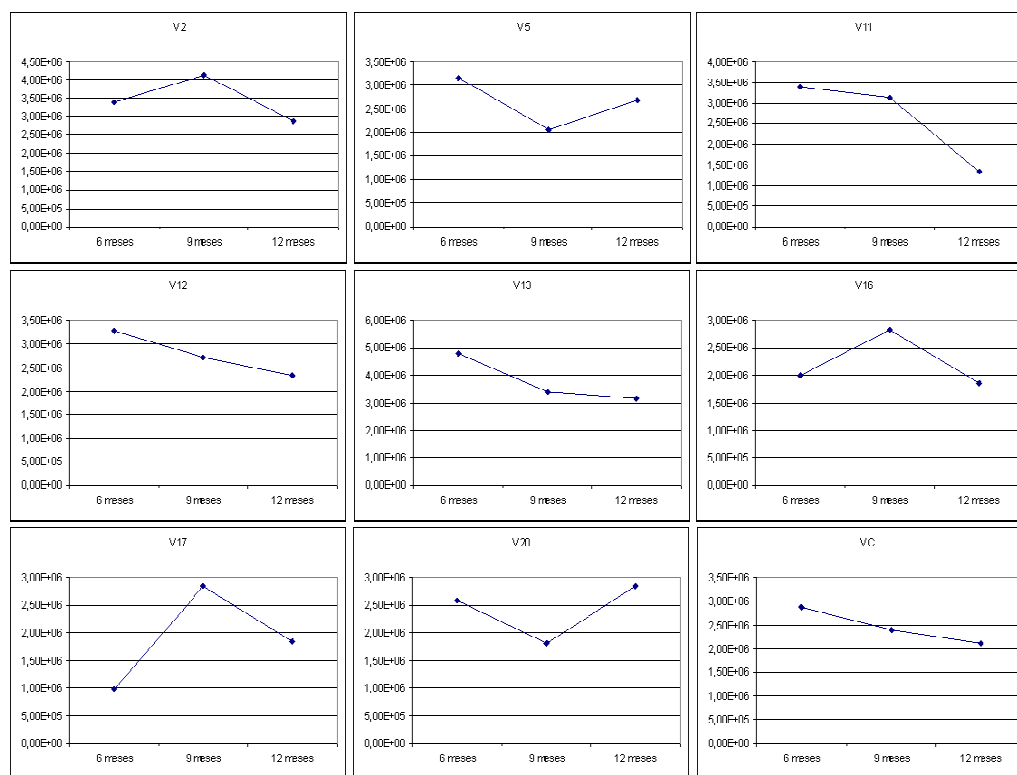


Figura 15 – Número de moléculas do fragmento 16S de *Ca. L. asiaticus* em plantas transgênicas de laranja doce ‘Valência’ da construção *Atacina A*, detectada por meio de qPCR. O eixo x representa a época de avaliação, e o eixo y representa a quantidade de moléculas alvo detectada.

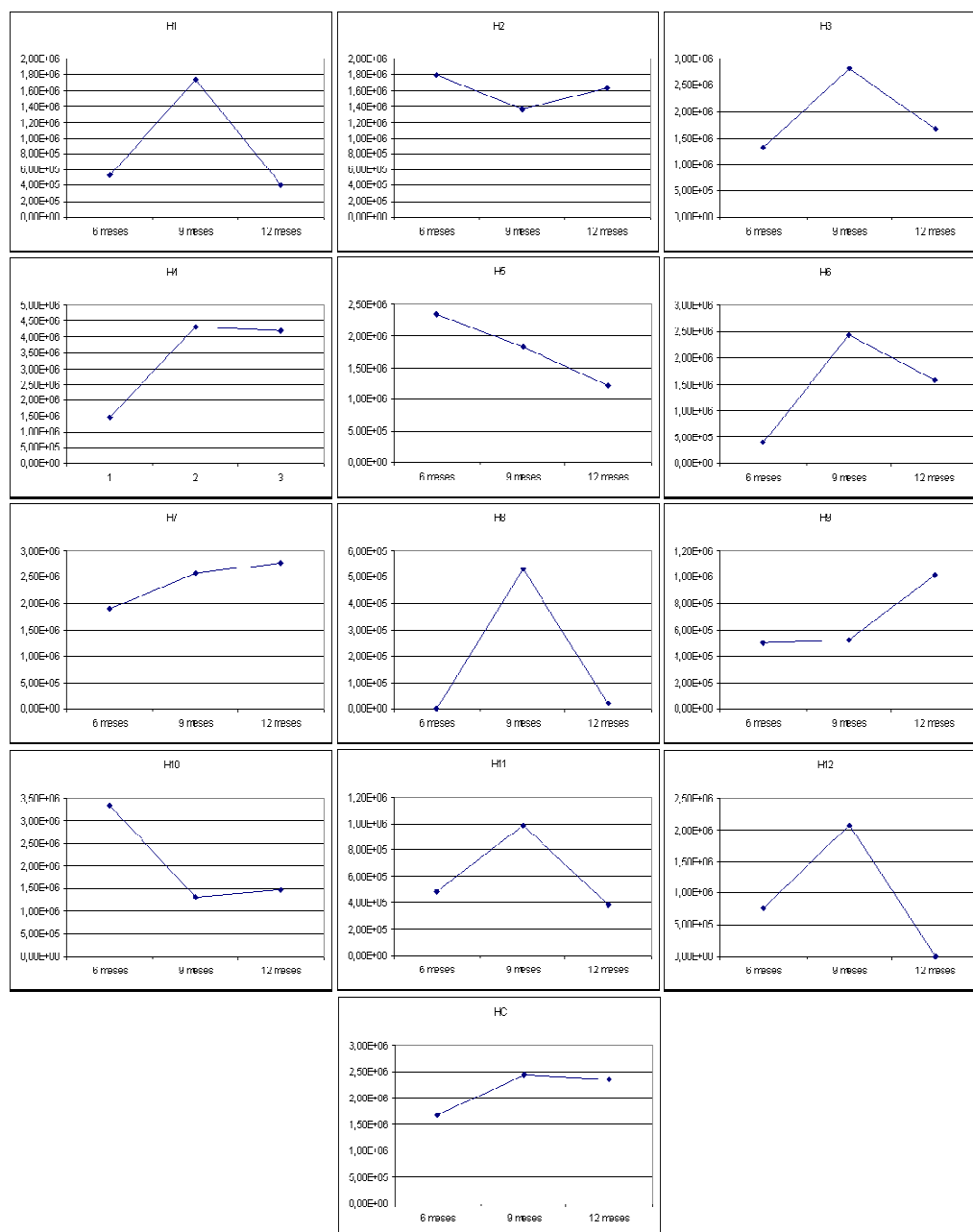


Figura 16 – Número de moléculas do fragmento 16S de *Ca. L. asiaticus* em plantas transgênicas de laranja doce 'Hamlin' da construção *Atacina A*, detectada por meio de qPCR. O eixo x representa a época de avaliação, e o eixo y representa a quantidade de moléculas alvo detectada.

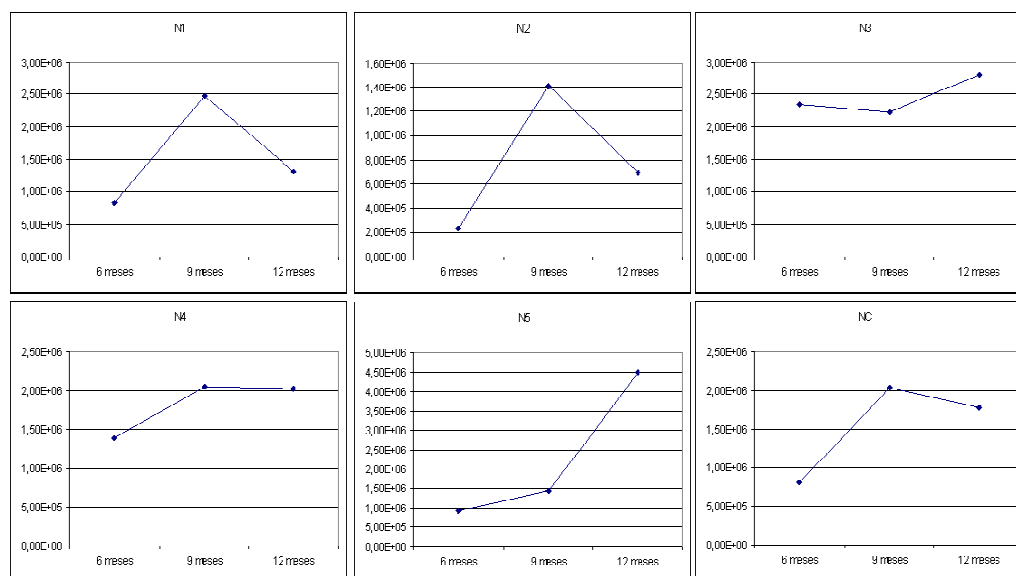


Figura 17 – Número de moléculas do fragmento 16S de *Ca. L. asiaticus* em plantas transgênicas de laranja doce 'Natal' da construção *Atacina A*, detectada por meio de qPCR. O eixo x representa a época de avaliação, e o eixo y representa a quantidade de moléculas alvo detectada.

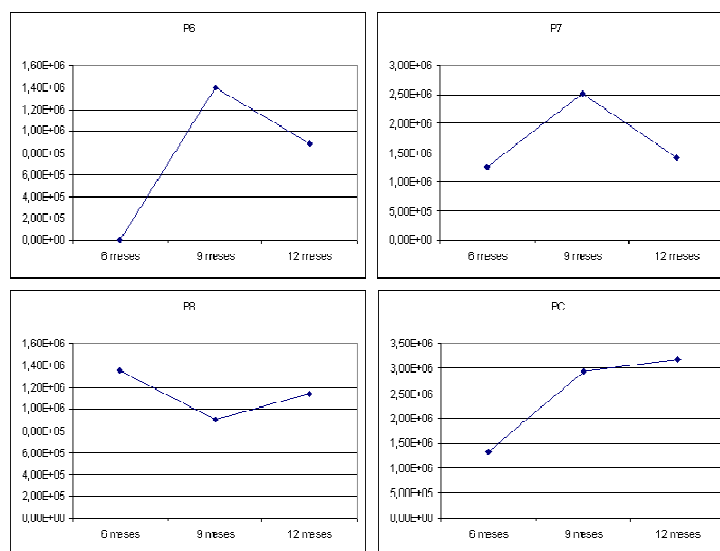


Figura 18 – Número de moléculas do fragmento 16S de *Ca. L. asiaticus* em plantas transgênicas de laranja doce 'Pêra' da construção *Atacina A*, detectada por meio de qPCR. O eixo x representa a época de avaliação, e o eixo y representa a quantidade de moléculas alvo detectada.

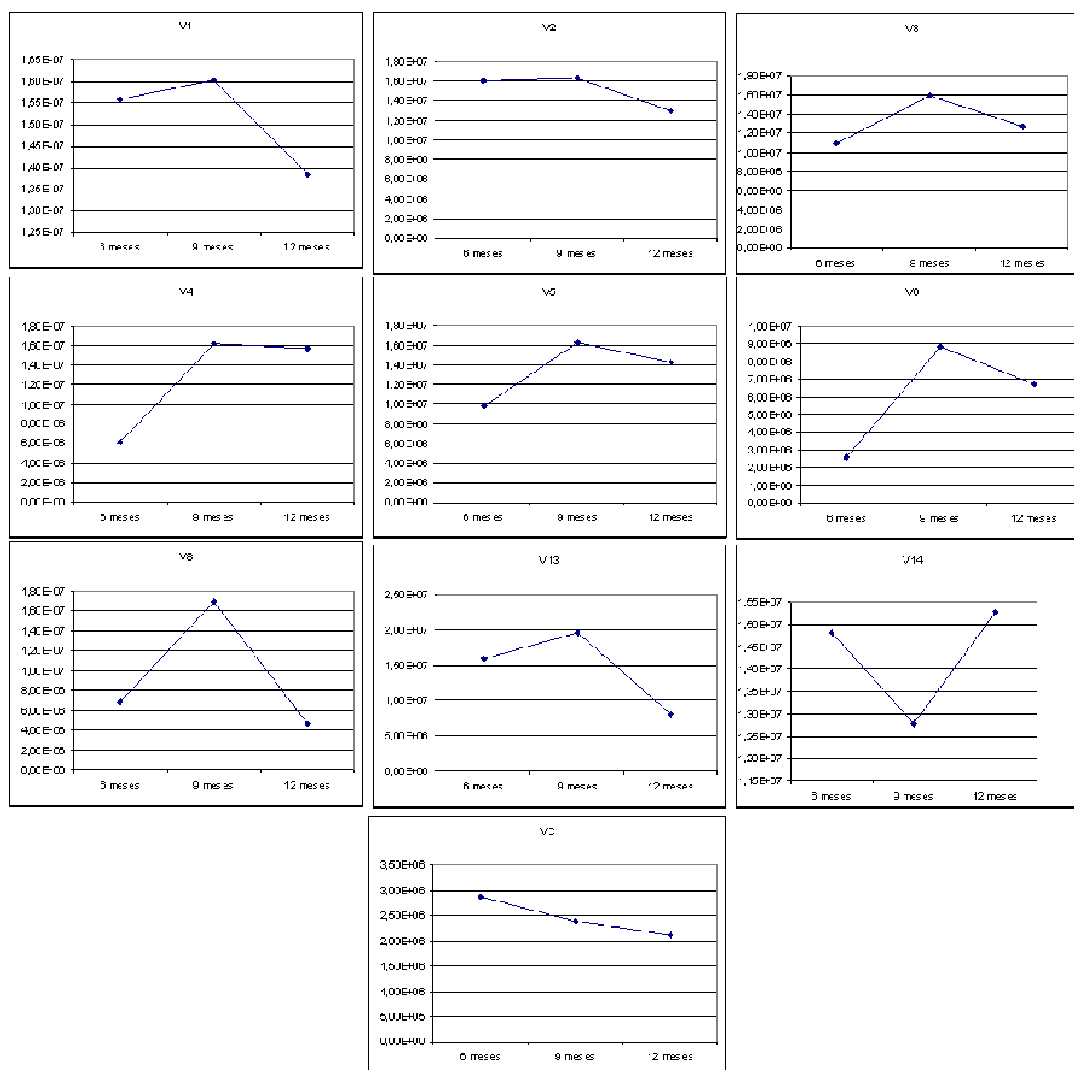


Figura 19 – Número de moléculas do fragmento 16S de *Ca. L. asiaticus* em plantas transgênicas de laranja doce ‘Valência’ da construção *Xa21*, detectada por meio de qPCR. O eixo x representa a época de avaliação, e o eixo y representa a quantidade de moléculas alvo detectada.

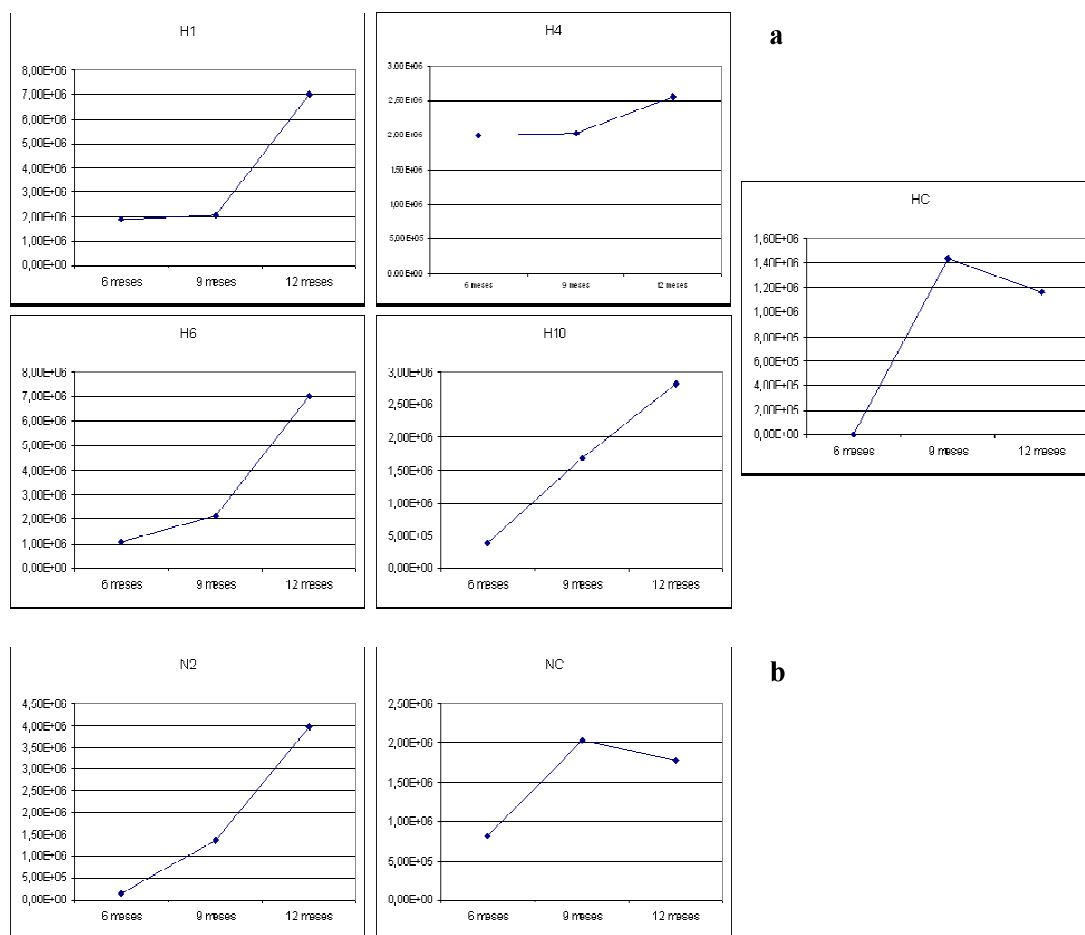


Figura 20 – Número de moléculas do fragmento 16S de *Ca. L. asiaticus* em plantas transgênicas de laranja doce da construção *AtNpr1*, detectada por meio de qPCR. O eixo x representa a época de avaliação, e o eixo y representa a quantidade de moléculas alvo detectada. **a**, plantas da variedade ‘Hamlin’; **b**, plantas da variedade ‘Natal’

4.8. RT-PCR dos transgenes

Ao final das avaliações de sintomas e da população de *Ca. Liberibacter*, o RNA total dos transformantes estudados foi isolado e utilizado como molde para a síntese de cDNA. As reações de amplificação foram realizadas com os iniciadores específicos para cada um dos transgenes e seus produtos submetidos a eletroforese em gel de agarose. Por meio desta técnica

comprovamos que quatro plantas transformadas com o gene *Atacina A* (H7, N1, N3 e V5), duas com o gene *Xa21* (V2 e V6) e uma com o gene *AtNpr1* (H1) foram negativas (Figura 21). Análises de transcrição do gene *AtNpr1* realizadas por meio de qPCR mostram que existe transcrição do transgene nesta planta, porém o nível de expressão foi baixo, dificultando sua detecção por RT-PCR devido a menor sensibilidade da técnica em relação a primeira. Considerando que todos os eventos avaliados produziam transcritos dos transgenes no início dos experimentos (Boscariol et al., 2006; Mendes et al., submetido à publicação), fato comprovado pela técnica Northern blot, os resultados negativos encontrados para sete plantas pela técnica de RT-PCR podem indicar instabilidade dos eventos de transformação genética em citros ou expressão a um nível abaixo da detecção possível por esta técnica.

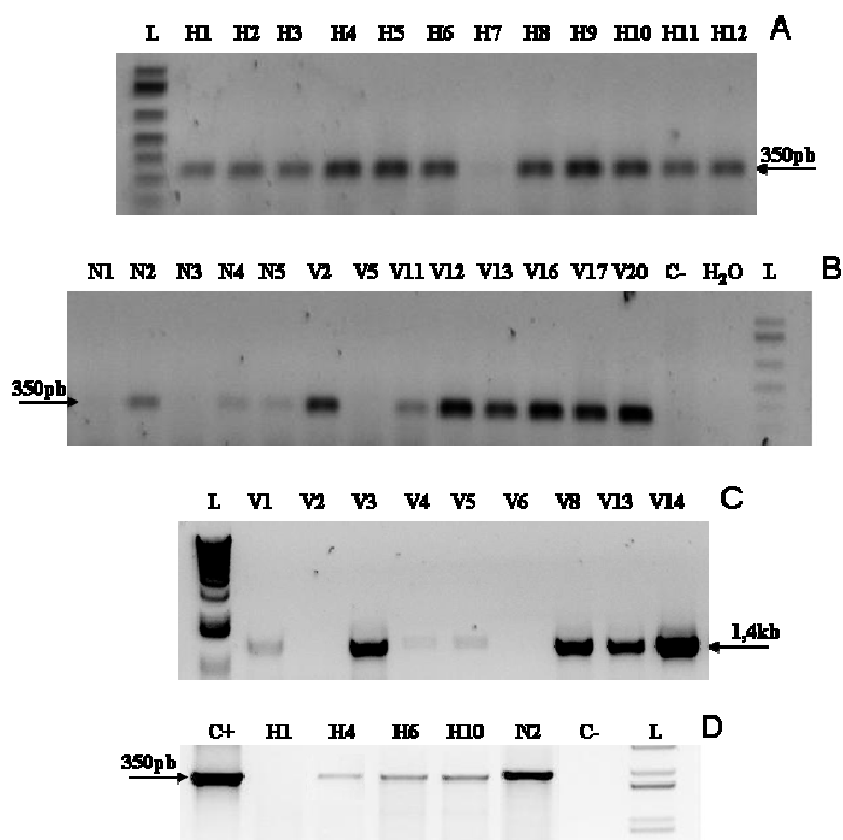


Figura 21- RT- PCR dos transgenes. A e B, amplificação do gene *atacina A*; C, amplificação do gene *Xa21*; D, Amplificação do gene *Npr1*. L: ladder 1kb plus; C-, planta não transgênica.

5. CONCLUSÕES

- O evento de transformação genética N2 apresentou os maiores níveis de expressão do transgene *AtNpr1* e também dos genes de PR-proteínas, indicando que a resposta destes últimos pode ser dependente do nível de expressão do transgene;
- A bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* foi capaz de se desenvolver nas plantas de laranja doce geneticamente modificadas com os genes *Atacina A*, *Xa21* e *AtNpr1*;
- Todos os eventos de transformação da variedade ‘Hamlin’ contendo o gene *AtNpr1* se mostraram interessantes porque não apresentaram sintomas da doença, mesmo após um ano do processo de inoculação e do desenvolvimento da bactéria em seus tecidos vasculares, sendo consideradas uma possível fonte de resistência a doença;
- A falta de transcrição dos transgenes em alguns transformantes indica a instabilidade dos eventos de transformação genética em citros ou seu possível silenciamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico** 86, ISSN 01202-0099, Brasília – DF, nov. 2003.

ANDRADE, G.M.; SARTORETTO, L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia brasileira**, v.28, p.465-476, 2003.

ARCE, P. et al. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. **American Journal of Potato Research**, v.76, p.169-177, 1999.

AZEVEDO, F.A. Transformação genética de citros com os genes *bacteriopsina (bO)* e *GUS*. Piracicaba, 2005. 76p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.

AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.M.J.; HAKAKAVA, R.; GABRIEL, D. W.; LEE, R.F. GUS gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and 'Valencia' sweet orange. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, p.1623-1628, 2006.

BALLESTER, A.; CERVERA, M.; PENA, L. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. **Plant Cell Reports**, v.26, p.39-45, 2007.

BALLESTER, A.; CERVERA, M.; PENA, L. Evaluation of selection strategies alternative to *nptII* in genetic transformation of citrus. **Plant Cell Reports**, v.27, p.1005-1015, 2008.

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja transgênica – transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.23, p.62-66, 2001.

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

BOSCARIOL, R.L. Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacina A* e *Xa21*. Piracicaba, 2004. 87p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade São Paulo.

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

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. *Citros*. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 929p.

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

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium* – Hospedeiro. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (eds) Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 1998. 309p.

BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.141-157, 2003.

CAO, H., BOWLING, S.A., GORDON, A.S. AND DONG, X. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.6, p.1583-1592, 1994.

CAO, H.; LI, X.; & DONG, X. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.6531-6536, 1998.

CARLOS, E.F., COLLETA-FILHO, H.D., TARGON, M.L.N., MACHADO, M.A. 2006. Quantitative real time PCR based on TaqMan probes to molecular detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. Page 81. In: Proceedings of the Huanglongbing-greening International Workshop, July 16-20, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

CARLSSON, A., T. NYSTRÖM, H. COCK, AND H. BENNICH. Attacin - an insect immune protein- binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. **Microbiol.**, v.144, p.2179-2188, 1998.

CARNEIRO, C. E. A.; MOLINARI, H. B. C.; ANDRADE, Giselly Aparecida *et al.* Produção de prolina e suscetibilidade ao glufosinato de amônio em plantas transgênicas de citrumelo Swingle. **Pesq. agropec. bras.**, vol.41, p.747-753. 2006.

CATI 2008. <http://www.cati.sp.gov.br> (24/out/2008)

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.C.B.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.1721-1730, 2006.

CERNADAS, R.A.; CAMILLO, L.R.; BENEDETTI, C.E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. **Molecular Plant Pathology**, v.9, 2008.

CHERN, M.; FITZGERALD, H.A.; YADAV, R.C.; CANLAS, P.E.; DONG, X.; RONALD, P.C. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.27, p.101-113, 2001.

CHRISTIANO, R.S.C. Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus sinensis*). Piracicaba, 2006. 83p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’.

COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Evaluation of the Genetic Structure of *Xylella fastidiosa* Populations from Different *Citrus sinensis* Varieties. **Applies and Environmental Microbiology**, v.68, p.3731-3736, 2002.

COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; CARLOS, E.F.; MACHADO, M.A. A bactéria *Candidatus Liberibacter* em plantas com Huanglongbing (ex-greening) no Estado de São Paulo. **Laranja**, v.25, p.367-374, 2004.

COLETTA-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, p.848-852, 2005.

DA GRAÇA, J.V. Citrus greening disease. **Annu. Rev. Phytopatology**, v.29, p.109-136, 1991.

DAS, A.K. Rapid detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing (Greening) disease using PCR. **Current Science**, v.87, p.1183-1185, 2004.

DAVIS, M.J.; MONDAL, S.N.; CHEN, H.; ROGERS, M.E.; BRLANSKY, R.H. Co-cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' with Actinobacteria from Citrus with Huanglongbing. **Plant disease**, v.92, p.1547-1550, 2008.

DELANEY, T. P.; FRIEDRICH, L.; & RYALS, J. A. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.6602-6606, 1995.

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

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. *Citros*. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 929p.

DONG, X.; HONG, Z.; CHATTERJEE, J.; KIM, S.; VERMA, D.P.S. Expression of callose synthase genes and its connection with *Npr1* signaling pathway during pathogen infection. **Planta**, DOI 10.1007/s00425-008-0812-3, 2008.

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

ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; KOBAYASHI, Y.; ARAKI, T.; OMURA, M. Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliate* L. Raf.). **Transgenic Research**, v.14, p.703-712, 2005.

FAO 2008. www.fao.org (3/out/2008).

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, v.27, p.93-104, 2008.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Manual Técnico de Cancro Cítrico**, p.2-11, 2006.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Manual Técnico de Greening**, p.2-11, 2007.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Bactéria asiática predomina. **Revista do Fundecitrus** , v.145, p.18-19, 2008a.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). Doença já afeta todo o Estado. **Revista do Fundecitrus** , v., p.14-15, 2008b.

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

GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E. E.; & AUSUBEL, F. M. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. **Genetics**, v.143, p.973-982, 1996.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ANCHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.1-15, 2004.

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

HUNG, T.H.; WU, M.L.; SU, H. J. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. **Journal of Phytopathology**, 148: 321-326, 2000.

JAYNES, J.M.; NAGPALA, P.; DESTEFANO-BELTRAN, N.; HONG-HUNG, J.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, P. Expression of a cecropin B lytic peptide analogue in transgenic tobacco plants. **Plant Science**, v. 8, p. 43-53, 1993.

JOHNSON, C.; BODEN, E.; ARIAS, J. Salicylic Acid and NPR1 Induce the Recruitment of *trans*-Activating TGA Factors to a Defense Gene Promoter in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.15, p.1846-1858, 2003.

KINKEMA, M.; FAN, W.; DONG, X. Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of *PR* Gene Expression. **The Plant Cell**, v.12, p.2339-2350, 2000.

KO, K.; NORELLI, J.L.; REYNOIRD, J.P.; BORESJA-WYSOCKA, E.; BROWN, S.K.; ALDWINCKLE, H.S. Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. **Biotechnology Letters**, v.22, p.373-381, 2000.

KO, K.; NORELLI, J.L.; REYNOIRD, J.P.; ALDWINCKLE, H.S.; BROWN, S. T4 Lysozyme and attacin gene enhance resistance of transgenic ‘Galaxy’ apple against *Erwinia amylovora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.127, p.515-519, 2002.

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

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA-FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.;

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

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p.104-115, 2006.

LIN, W.C.; LU, C.F.; WU, J.W.; CHENG, M.L.; LIN, Y.M.; YANG, N.S.; BLACK, L.; GREEN, S. K.; WANG, J.F.; CHENG, C.P. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. **Transgenic Research**, v.13, p. 567-581, 2004.

LOPES, S.A. e FRARE, G.F. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’. **Plant Disease**, v.92, p.21-24, 2008.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. *Citros*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. 929p.

MALNOY, M.; JIN, Q.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; HE, S.Y.; ALDWINCKLE, H.S. Overexpression of the Apple *MpNPR1* gene confers increase disease resistance in *Malus x domestica*. **MPMI**, v.20, p.1568-1580, 2007.

MALOSSO, A.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; SILVA-PINHATI, A.C.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. 2007. Expressão temporal de genes associados à tolerância ao estresse hídrico em limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck). 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2-5 de setembro, Águas de Lindóia, SP.

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

MENDES, B.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRUZ, R.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant disease** (submetido à publicação).

MOLINARI, H.B.C.; BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, v.99, p.379-385, 2004a.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGGI, M.; LEITE JUNIOR, R.P.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p. 1375-1381, 2004b.

MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S.M. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.) *Citricultura brasileira*, v.1 2ª Ed. Campinas- Fundação Cargill. 1991. 941p.

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.) *Citricultura brasileira*, v.1 2ª Ed. Campinas- Fundação Cargill. 1991. 941p.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.

NAKEMATA, T. O cancro cítrico. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.) *Citricultura brasileira*, v.2, 2ª Ed. Campinas- Fundação Cargill. 1991. 941p.

OARD, S.V.; ENRIGHT, F.M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Cell Reports**, v.25, p.561-572, 2006.

PAOLI, L.G.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J.; FILHO, F.A.A.M. Transformação genética de laranja ‘Valência’ com o gene *cecropin* MB39. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, p.1663-1666, 2007.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUAREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, v.104, p.183-191, 1995.

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

PEÑA, L.; MARTÍN-TILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. **Nature**, v.19, p.263-267, 2001

PEREIRA, G.A. Uso do gene XylA – Xilose Isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros. Piracicaba, 2004. 39p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia ‘Luiz de Queiroz’

PIETERSE, C. M.J.; VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.456-464, 2004.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.) *Citricultura brasileira*, v.1 2ª Ed. Campinas- Fundação Cargill. 1991. 941p.

QUILIS, J.; PENAS, G.; MESSENGUER, J.; BRUGIDOU, C.; SEGUNDO, B.S. The *Arabidopsis AtNPR1* Inversely Modulates Defense Responses Against Fungal, Bacterial, or Viral Pathogens While Conferring Hypersensitivity to Abiotic Stresses in Transgenic Rice. **MPMI**, v.21, p.1215-1231, 2008.

REYNOIRD, J.P.; MOURGUES, F.; NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H.S.; BRISSET, M.N.; CHEVREAU, E. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacin E* gene from *Hyalophora cecropia*. **Plant Science**, v.149, p.23-31, 1999.

RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QÜESTA, J.; DOW, J.M.; CASTAGNARO, A.P.; VOJNOV, A.A.; MARANO, M.R. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **MPMI**, v.20, p.1222-1230, 2007.

RONALD, P.C.; SALMERON, J.M.; CARLAND, F.M.; STASKAWICZ, B.J. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. **Journal Bacteriology**, v.174, p.1604-1611, 1992.

RONALD, P.; SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y.; HOLSTEN, T.; WANG, B.; WILLIAMS, C.; ZHAI, W.X.; ZHU, L.H.; FAUQUET, C. The rice disease resistance gene, *Xa21*, encodes a receptor kinase-like protein. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, 1996.

ROSSETTI, V. Doenças dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.) *Citricultura brasileira*, v.1 2ª Ed. Campinas- Fundação Cargill. 1991. 941p.

SHAH, J.; TSUI, F.; & KLESSIG D. F. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sail*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tsm2* gene. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.10, p.69-78, 1997.

SONG, W.Y.; WANG, G.L.; CHEN, L.L.; KIM, H.S.; PI, L.Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W.X.; ZHU, L.H.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science**, v.270, p.1804, 1995.

TADA, Y.; SPOEL, S. H.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; MOU, Z.; SONG, J.; WANG, C.; ZUO, J.; DONG, X. Plant Immunity Requires Conformational Changes of *Npr1* via S-Nitrosylation and Thioredoxins. **Science**, v.321, p.952-956, 2008

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In planta distribution of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, v.98, p.592-599, 2008.

TEIXEIRA, J.E.C. Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasítica*. Lavras, 2005a. 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras.

TEIXEIRA, D.C. et al. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.173-179, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; MARTINS, E.C.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A.J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus

Huanglongbing Symptoms in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathology*, v.98, p. 997-984, 2008.

TU, J.; ONA, I.; ZHANG, Q.; MEW, T.W.; KHUSH, G.S.; DATTA, S.K. Transgenic rice variety 'IR72' with Xa21 is resistant to bacterial blight. **Theor. Appl. Genet.**, v.97, p.31-36, 1998.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annu. Rev. Phytopathology**, v. 44, p.135-162, 2006.

WANG, Z.; YIN, Y.; HU, H.; YUAN, Q.; PENG, G.; XIA, Y. Development and application of molecular-based diagnosis for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the causal pathogen of citrus huanglongbing. **Plant Pathology**, 55: 630-638, 2006.

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

ZHAI, W.; CHEN, C.; ZHU, X.; CHEN, X.; ZHANG, D.; LI, X.; ZHU, L. Analysis of T-DNA-*Xa21* loci and bacterial blight resistance effects of the transgene *Xa21* in transgenic rice. **Theor. Appl. Genet.**, v.109, p.534-542, 2004.

ZHAO, B.; LIN, X.; POLAND, J.; TRICK, H.; LEACH, J.; HULBERT, S. A maize resistance gene functions against bacterial disease in rice. **PNAS**, v.102, p.15383-15388, 2005.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado intitulada: Avaliação da resposta ao huanglongbing e ao cancro cítrico em plantas transgênicas de laranja doce"

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(x) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado (CQB 0065/98,DOU 04/09/1998, do Instituto Agrônômico de Campinas)

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno



Orientador

Marcos H. Machado
Centro Citricultura Sylvio Moreira
Pesquisador Científico
RS 9533886/01

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(☒) Deferido () Indeferido



Nome: Prof. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Função: Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP



Campinas, 13 de novembro de 2008.

Ao

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP

13083 - 970 - Campinas, SP

Assunto: Aprovação de projeto de pesquisa pela CIBIO do Instituto Agrônomo de Campinas.

Excelentíssimo Senhor,

De acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP, a CIBIO do Instituto Agrônomo de Campinas, nas suas atribuições, faz saber que o projeto de pesquisa do aluno Thiago Sena Simões, que resultou na dissertação intitulada "Avaliação da resposta ao huanglongbing e ao cancro cítrico em plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.)" foi aprovado por esta comissão para sua execução nas dependências deste Instituto.

Sem mais no momento, colocamo-nos a disposição para eventuais dúvidas.

Respeitosamente,

Marco Aurélio Takita

Pesquisador Científico II

Presidente da Comissão Interna de Biossegurança - Instituto Agrônomo de Campinas

Marcos Antônio Machado

Pesquisador Científico VI

Maembro da Comissão Interna de Biossegurança - Instituto Agrônomo de Campinas