

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação da resistência à *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranja doce
expressando o gene *attA* ou *hrpN***

Rafaella Teles Arantes Felipe

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas

**Piracicaba
2011**

Rafaella Teles Arantes Felipe
Bióloga

Avaliação da resistência à *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranja doce expressando o gene *attA* ou *hrpN*

Orientador: Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**
Co-orientador: Dr. **SILVIO APARECIDO LOPES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Felipe, Rafaella Teles Arantes

Avaliação da resistência à *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranja doce expressando o gene *attA* ou *hrpN* / Rafaella Teles Arantes Felipe. - - Piracicaba, 2012.

83 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Expressão gênica 3. Greening - Doença de planta
4. Insetos vetores 5. Laranja 6. Transformação genética I. Título

CDD 634.31
F315a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

“Amai-vos e intruí-vos”

O Espírito de Verdade

Ao Maurel Behling, meu grande parceiro, por todo amor,
carinho, incentivo, paciência e companheirismo,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e pela bolsa doutorado sanduíche no exterior e ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo auxílio financeiro e apoio técnico.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela oportunidade, pela excelente orientação e convivência, pela confiança, pelos ensinamentos e por ser um grande exemplo de docente/pesquisador.

Ao Dr. Silvio Aparecido Lopes pela co-orientação, pelas ótimas sugestões, pelo apoio e pelo auxílio durante a realização de todo o trabalho.

À professora Dr^a Beatriz M. J. Mendes pelas sugestões, por ter disponibilizado o Laboratório de Biotecnologia Vegetal e por revisar este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, em especial, aos professores Dr. Lázaro E. P. Peres, Dr. Marcílio Almeida, Dr. Ricardo Alfredo Kluge e Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, por contribuírem com a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal, Eder Cintra, David Ulrich e Aparecido Serrano por toda colaboração e apoio. Em especial, ao querido Sr. José Volpato, por toda dedicação e carinho no auxílio com a manutenção das plantas nas estufas.

Aos técnicos e funcionários do FUNDECITRUS por todo apoio com os experimentos e análises, em especial, à Michele Souza.

Ao Dr. Marcelo Miranda (FUNDECITRUS) pelo grande apoio com os experimentos com psilídeos.

Ao professor Dr. João Roberto S. Lopes pelo apoio com os experimentos com psilídeos, por ter disponibilizado o Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, pelas sugestões e pelos esclarecimentos.

Ao professor Dr. Angelo Pedro Jacomino, por ter disponibilizado o Laboratório de Pós-Colheita de Plantas Hortícolas e ao técnico Marcos Trevisan pelo auxílio em algumas análises bioquímicas.

Ao professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo por ter disponibilizado o Laboratório de Genética Molecular e à Thais Egreja pelo auxílio na quantificação de RNA.

Ao Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico), pelo auxílio, principalmente, na fase inicial do trabalho.

À querida amiga e técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA) Renata B. Cruz, pelo auxílio nas análises moleculares e por todo carinho de sempre.

Aos professores Dr^a Helaine Carrer e Dr. Daniel S. de Moura pela oportunidade de aprendizado durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) junto à disciplina Biologia Molecular.

Ao colega Geraldo Silva e ao Dr. Daniel Ramiro do Laboratório de Biotecnologia Agrícola (CEBETC) pelo auxílio e pelas dúvidas esclarecidas. E em especial, ao colega Fausto Andres por todo apoio e amizade durante a monitoria da disciplina Biologia Molecular.

Ao João Geraldo Brancolion, funcionário do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA) pelo auxílio nos serviços de computação gráfica.

Ao Dr. Mariano Justo Cambra Álvarez e à Dr^a María López González, pela excelente orientação e convivência durante o doutorado sanduíche realizado no Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valência, Espanha. Aos colegas Dr. Edson Bertolini, Dr. Eduardo Vidal, Maria Carmen Martinez e Gabriela Teresani por todo auxílio e apoio.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Fisiologia Vegetal, Marcelo Lattarulo, João Paulo Marques, Frederico de Jesus e Giovani Rossi.

Aos queridos amigos do Grupo Espírita de Estudos Filosóficos Professor Walter Radamés Acorsi, Horst Bremer (horse), Frederico Vieira, Meire Bassan (royal), Janayne Resende, Gabriela Oliveira, Gustavo Andrade (xavier) e demais colegas, por todos os encontros na ESALQ e pelas atividades maravilhosas que desenvolvemos juntos. Em especial, à minha querida amiga e comadre Vanessa Caron pela amizade, pelo apoio, companheirismo e por todos os trabalhos que realizamos juntas.

Ao querido amigo Leonardo Soriano, companheiro de laboratório, de grupo de estudo e de representação discente, por todo auxílio e por ser um grande amigo.

À querida amiga Janaynna Barbosa-Mendes por todo carinho, auxílio e pela convivência maravilhosa.

À querida Gabriela Leão, pela linda amizade que compartilhamos.

À minha irmãzinha-comadre Pâmela Fávero (lebre) por toda amizade, carinho e companhia.

Ao Ernani Pereira Junior (golaço) por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho e por ter sido um ótimo estagiário.

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia em Plantas Hortícolas - ESALQ (Suane Cardoso, Roseli Pereira, Livia Mendes, Luzia Miyata, Marina Caputo, Lísia Borges, Tatiane Loureiro, Flávia Zambon, Filipi Capi, Rodrigo Cassarotti, André Beltrame, Luana Coletti, Liliane Stipp) e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – CENA (Fabiana Muniz e Eveline Tavano).

Às queridíssimas Solizete Silva (PG Fisiologia e Bioquímica) e Luciane Toledo (PG Fitotecnia) por todo auxílio prestado aos alunos sempre com muita alegria e disposição em ajudar, pela amizade e por todo carinho.

Aos queridos colegas de curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Às queridas colegas de república, Evelin Fagundes (clorofila), Helena Gonçalves (di-tróia), Elizabeth Ravagnani, Mariana Mochizuki, Marília Ribeiro, Luciane Mendes, Lilian Heloisa (encalhada), Simone Brand, Gabriela Teresani e Danielle Thomazoni.

A todos os queridos companheiros de jornada fora da ESALQ, entre eles, Marcelo Marconato, José Nivaldo (Juca), Flávio e Michele Cabrera, André e Andrea Vieira, Antônio Ramirez, Sr. José, Juliano Silva, Dirceu Azevedo, Sr. Antônio Inácio, Gabriela Roza, pelos ensinamentos e por toda alegria que compartilhamos nos trabalhos com os nossos irmãos queridos.

A toda a minha família linda e maravilhosa, minha mãe Erly, meus irmãos Diogo, Natália e Andressa, meu sobrinho João Vitor e ao meu pai Amilton (*in memoriam*), por todo apoio, pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado e por terem compreendido a minha ausência.

Ao meu marido-parceiro Maurel Behling, por tanto amor, carinho, paciência, auxílio no desenvolvimento do meu trabalho e por estar sempre ao meu lado e deixar os meus dias mais alegres mesmo estando a mais de 2.000 km de distância!

À Deus, pelos amigos de luz, pelo amparo, pelas oportunidades de trabalho e pela benção de ter conhecido e convivido com pessoas tão especiais em Piracicaba!

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Aspectos gerais da citricultura	23
2.2 Huanglongbing	24
2.3 Transformação genética visando resistência a doenças	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material Vegetal.....	35
3.2 Análises moleculares das plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene <i>attA</i> para confirmação da integração e transcrição do gene	36
3.3 Multiplicação das plantas.....	38
3.4 Avaliações e delineamento experimental.....	39
3.5 Inoculação de CLas	40
3.6 Avaliação da resistência de plantas de laranja doce transgênicas à CLas – sintomas visuais e detecção da bactéria	42
3.7 Análise dos dados.....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Análises moleculares das plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene <i>attA</i> para confirmação da integração e transcrição do gene	49
4.2 Avaliação da resistência à CLas.....	50
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Avaliação da resistência à *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranja doce expressando o gene *attA* ou *hrpN*

Huanglongbing (HLB), considerada uma das mais graves doenças dos citros, está associada a *Candidatus Liberibacter* spp., bactérias endógenas restritas ao floema e de difícil cultivo em meio de cultura. Diferentemente de outras doenças que afetam plantas cítricas, ainda não foram encontradas dentro do gênero *Citrus* espécies resistentes ao HLB. Genes de interesse agrônomico têm sido empregados na transformação genética de citros visando a resistência a doenças. Dentre estes, destacam-se os que conferem resistência a bactérias incluindo *attA*, que codificam os peptídeos antibacterianos atacinas, e *hrpN*, que ativam a produção de proteínas harpinas, relacionadas ao sistema de defesa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de plantas de laranja doce contendo o gene da atacina A (*attA*) ou o gene da harpina (*hrpN*) à *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) utilizando duas formas de inoculação: borbulhões infectados e o inseto vetor da bactéria, *Diaphorina citri*. Para as plantas contendo o gene *hrpN*, apenas o segundo método foi utilizado. Os principais sintomas do HLB foram observados aos quatro e oito meses após a inoculação por borbulhões. A infecção das plantas foi confirmada com a detecção de CLAs por PCR (quatro e oito meses) e Rt-qPCR (oito meses). Em plantas inoculadas por *D. citri*, os sintomas foram observados oito e doze meses após a inoculação, assim como a detecção da bactéria por PCR. Após 15, 17 e 18 meses, foi realizada uma nova avaliação por Rt-PCR a partir de *spots* (*imprints* em membrana) de folhas. Rt-PCR foi empregado também em *spots* dos psilídeos utilizados na inoculação. Não foi possível avaliar a resistência ao HLB em plantas contendo o gene *attA* ou *hrpN* a partir da inoculação por *D. citri*. Os resultados de detecção da bactéria nas plantas e nos psilídeos utilizados para inoculação indicam que, possivelmente, não ocorreu a inoculação devido ao baixo percentual de psilídeos que continham CLAs utilizados. Dentre as plantas transgênicas contendo o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectivos, oito eventos (cinco de laranja ‘Pera’, dois de laranja ‘Hamlin’ e um de laranja ‘Valência’) apresentaram menores títulos bacterianos e algumas também demonstraram redução dos sintomas do HLB quando comparadas com plantas não transgênicas, oito meses após a inoculação, indicando uma possível ação do peptídeo atacina A contra o agente causal do HLB.

Palavras-chave: Huanglongbing; Transformação genética; Peptídeo antibacteriano; Atacina A; Harpina

ABSTRACT

Evaluation for *Candidatus Liberibacter asiaticus* resistance in sweet orange expressing *attA* or *hrpN* gene

Huanglongbing (HLB), considered one of the most serious diseases of citrus, is associated to *Candidatus Liberibacter* spp., endogenous and phloem-inhabiting bacteria not easily grown in culture medium. No species within the genus *Citrus* is known to resist this bacterial infection. The use of genes of agronomic interest for genetic transformation aiming disease resistance in citrus has been reported. Among these genes, *attA* that codes for the antibacterial peptides attacin, and *hrpN*, that codes for proteins harpin that activate the plant defense system may have potential in searching for HLB resistance. The objective of this study was to evaluate the resistance of sweet orange containing *attA* or *hrpN* to *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) inoculated through infected budstick grafting or the insect vector, *Diaphorina citri*. For the plants containing *hrpN*, only the second method was used. The most obvious HLB symptoms were observed four and eight months after inoculation by infected budstick when CLAs also was detected by PCR (four months) and RT-qPCR (eight months). For those inoculated with *D. citri*, symptoms were observed and bacteria detected eight and twelve months after inoculation. Fifteen, 17 and 18 months after inoculation, a new attempt was made for CLAs detection, now through Rt-PCR from leaf and psyllids imprinting spots on membrane. It was not possible to evaluate the HLB resistance in plants containing *attA* or *hrpN* gene from *D. citri* inoculation. The results of CLAs detection in plants and psyllids indicate that possibly there was no inoculation due the low rate of psyllids contained CLAs used. Among the plants containing *attA*, five, two and one event of, respectively, 'Pera', 'Hamlin', and 'Valencia' sweet orange had lower bacterial titers than those non transgenic plants and some also showed milder HLB symptoms, eight months after inoculation, suggesting a possible effect of attacin A against the causal agent of HLB.

Keywords: Huanglongbing; Genetic transformation; Attacin A; Harpin

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas de HLB observados em plantas de laranja doce contendo ou não o gene *attA*, inoculadas com CLas por borbulhões infectados, 8 meses após a inoculação. 43
- Figura 2 - *Southern blot* (A) e RT-PCR (B) das plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene *attA*. 50
- Figura 3 - Quantificação de CLas por Rt-qPCR em laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA*, inoculadas através de borbulhões infectados, 8 meses após inoculação. Log_{10} (células bacterianas g^{-1} de folha) = média dos valores obtidos do título bacteriano estimado de CLas utilizando amostras de folhas..... 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação..... 51
- Tabela 2 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Natal’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação.....52
- Tabela 3 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Pêra’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação53
- Tabela 4 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação..... 54
- Tabela 5 – Sintomas foliares e detecção de CLas por PCR, 8 e 12 meses após inoculação por *D. citri* em plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA*..... 58
- Tabela 6 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 17 a 18 meses após inoculação e de *spot* dos psilídeos utilizados para inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação 60
- Tabela 7 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranja ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 17 a 18 meses após inoculação e de *spot* dos psilídeos utilizados para inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação 62

Tabela 8 – Sintomas foliares e detecção de CLas por PCR em plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *hrpN* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 8 e 12 meses após inoculação 64

Tabela 9 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *hrpN* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 15 meses após inoculação e de *spot* dos psílídeos utilizados na inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação..... 65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, há décadas, lidera a produção mundial de laranja, seguido pelos Estados Unidos e Índia (FAO, 2011). O cultivo de laranja é realizado em todas as regiões do país, com uma área estimada em 760 mil hectares, sendo que cerca de 560 mil hectares estão localizados no Estado de São Paulo, representando 75% de toda a área (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2011). Dentre as cultivares comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), destacam-se as laranjas ‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Hamlin’. Além de laranjas doces, que representam 90% dos plantios, outras cultivares copas são cultivadas, como tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm F.), limas ácidas (*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka) e pomelos (*Citrus paradisi*, MacFadyen) (PIO et al., 2005; FAO, 2011).

O parque citrícola mundial vem sendo ameaçado por problemas fitossanitários. O Huanglongbing (HLB), também conhecido como greening, associado a três espécies de bactérias *Candidatus Liberibacter*, é considerado a mais grave doença dos citros (BOVÉ, 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre a bactéria, seu vetor e a interação planta-patógeno-inseto vetor.

Embora práticas culturais específicas diminuam os efeitos das doenças, o uso de genótipos resistentes ainda é a melhor alternativa. Porém, até o momento não foi encontrada resistência ao HLB no gênero *Citrus*. Na tentativa de sobrepor barreiras relacionadas aos programas de melhoramento de citros, técnicas de biologia molecular, cultivo *in vitro* e engenharia genética têm sido integradas aos programas de melhoramento (BOSCARIOL et al., 2006; BARBOSA-MENDES et al., 2009).

Desta forma, a transformação genética surge como uma ferramenta de grande importância e com potencial significativo, principalmente, tendo em vista o grande número de trabalhos desenvolvidos com este enfoque, apresentando resultados expressivos com relação à redução da suscetibilidade em diversos patossistemas (CARDOSO et al., 2010; BARBOSA-MENDES et al., 2009). No caso específico de doenças bacterianas, a utilização de genes que codificam peptídeos antibacterianos, como as atacinas (CARDOSO et al., 2010), e os que ativam a produção de proteínas relacionadas ao sistema de defesa das plantas, como as harpinas (BARBOSA-MENDES et al., 2009), têm mostrado bons resultados na obtenção de plantas transgênicas resistentes.

A avaliação da resistência de plantas transgênicas ao agente patogênico alvo é etapa essencial neste processo, pois irá determinar por meio de avaliações da expressão e evolução dos

sintomas e capacidade de multiplicação do patógeno em seus tecidos, o quanto o nível de suscetibilidade foi reduzido.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de plantas de laranja doce, contendo o gene da atacina A (*attA*) ou o gene da harpina (*hrpN*), à *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associada ao HLB, utilizando duas formas de inoculação: borbulhões infectados e psilídeos infectivos. Para as plantas contendo o gene *hrpN*, apenas o segundo método foi utilizado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da citricultura

As principais plantas cítricas cultivadas no mundo pertencem à família Rutaceae e subfamília Aurantioideae. Possuem em geral, três gêneros principais: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, com destaque para o gênero *Citrus*, nativo da região sudoeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967). São cultivadas em diferentes regiões do mundo, sendo que nas regiões tropicais e subtropicais, entre as latitudes de 20° e 40° dos dois hemisférios, se concentram os principais pomares comerciais. Na faixa compreendida entre estas latitudes os regimes térmicos e hídricos são mais adequados para o cultivo de plantas cítricas (SENTELHAS, 2005).

Nas últimas décadas, o Brasil vem liderando a produção mundial de laranja, com 17,618 milhões de toneladas em 2009, seguido pelos Estados Unidos e Índia com 8,280 e 5,201 milhões. Na produção de citros em geral (laranjas, tangerinas, limões, limas e pomelos) a China supera o Brasil desde 2008 com 20% do total produzido em 2009, seguido pelo Brasil com 17% e Estados Unidos com 9%. No contexto mundial, China, Brasil e Estados Unidos detêm aproximadamente 47% da produção mundial (FAO, 2011).

As cultivares copa utilizadas em plantios comerciais são, basicamente, representadas pelas laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*C. reticulata* Blanco), limões (*C. limon* (L.) Burm F.), limas ácidas (*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka) e pomelos (*Citrus paradisi*, MacFadyen). As laranjas doces predominam na maioria dos países citrícolas com aproximadamente dois terços dos plantios. Dentre as cultivares comerciais produzidas no Brasil destacam-se as laranjas ‘Pêra’, ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Hamlin’ (PIO et al., 2005). O cultivo é registrado em todas as regiões em uma área estimada de 760 mil hectares, sendo que destes, cerca de 560 mil hectares (75%) somente no Estado de São Paulo. Dos cerca de 17 milhões de toneladas produzidas em 2009, o Estado de São Paulo representou 80%, Bahia 5,5%, Sergipe 4,6% e Minas Gerais 4,4% (IBGE, 2011).

A instalação de um parque industrial voltado ao mercado externo de suco e a proximidade de metrópoles com maior poder aquisitivo tornou o Estado de São Paulo o maior pólo mundial citrícola (NEVES; BOTEON, 2005). Essa conquista também é devida à posição de destaque do Brasil com relação à pesquisa científica em citros. Desde meados do século passado, instituições

brasileiras têm contribuído de forma significativa com diversas pesquisas, em especial, aquelas voltadas ao manejo das doenças que causam grandes prejuízos, tais como a tristeza, o cancro cítrico, a leprose, o declínio, a gomose e a clorose variegada dos citros (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

Apesar da posição de destaque, a produtividade média no Estado de São Paulo ainda é considerada baixa, com a principal causa ainda sendo o ataque de pragas e doenças (PARRA et al., 2005). Dentre as muitas ameaças destacam-se três doenças causadas por bactérias: o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri*, a clorose variegada dos citros, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e, mais recentemente, o huanglongbing (HLB), associado às bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*. O HLB tem sido nos últimos anos a mais grave, destruindo propriedades inteiras principalmente na região central do Estado de São Paulo, e sobre a qual muito ainda está por ser investigado sobre a bactéria associada à doença, seu vetor, e a interação planta-patógeno-inseto vetor.

2.2 Huanglongbing

Relatado pela primeira vez na China em 1919, o HLB foi descrito, inicialmente, como a doença do ramo amarelo “*yellow shoot disease*” (REINKING, 1919 apud BOVÉ, 2006). Desde então, tem-se verificado a sua expansão para vários continentes, inclusive para o continente americano, onde estão presentes os dois maiores centros produtores de laranja, Brasil (São Paulo) e Estados Unidos (Flórida) (BOVÉ, 2006). No Brasil, a presença do HLB foi relatada pela primeira vez em março de 2004, em pomares da região central do Estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Além de ter sido encontrada em praticamente todas as regiões do Estado de São Paulo, está presente também em diversas localidades do Paraná e Minas Gerais (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

Por causa da associação constante entre presença de sintomas e presença do microorganismo, acredita-se que o HLB seja causado por bactérias endógenas, restritas ao floema, conhecidas como *Candidatus Liberibacter* spp. O prefixo *Candidatus* é uma designação temporária (MURRAY; SCHLEIFER, 1994), uma vez que a classificação taxonômica definitiva ainda não foi realizada. Estas bactérias foram recentemente cultivadas *in vitro* (SECHLER et al., 2009), mas os postulados de Koch ainda não foram concluídos. Técnicas moleculares têm sido

utilizadas para confirmar a presença da bactéria, principalmente, em plantas sintomáticas (SECHLER et al., 2009; TYLER et al., 2009).

Muitas bactérias restritas ao floema são fastidiosas por resistirem ao cultivo *in vitro*, apesar de se multiplicarem ativamente na seiva presente nos elementos de tubos crivados (células floemáticas). Isto sugere que a complexa constituição da seiva floemática, em contraste com os meios de cultura, contém nutrientes ainda não identificados e indispensáveis ao crescimento destas bactérias (BOVÉ; GARNIER, 2003; BOVÉ; AYRES, 2007).

Com a utilização da técnica de microscopia eletrônica foi constatado que células de *Candidatus Liberibacter* spp. apresentam membrana externa à camada de peptidoglicano, compondo a parede celular, além da membrana interna, características típicas de bactérias Gram-negativas. Posteriormente, através de comparações de seqüências da região 16S do DNA ribossomal, verificou-se que estas bactérias pertencem à subdivisão alfa do grupo das Proteobactérias (GARNIER; BOVÉ, 1983; JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1994).

Três espécies de *Liberibacter* estão associadas ao HLB: *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf), com maior incidência no continente africano, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), presente nos continentes asiático e americano e, *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), relatada apenas no Brasil (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006). No Brasil, atualmente, CLas predomina, sendo detectada na grande maioria das amostras analisadas (LOPES et al., 2009a).

Assim como as plantas cítricas apresentam como local de origem o continente asiático, a presença do HLB também foi relatada, inicialmente, naquele continente (REINKING, 1919 apud BOVÉ, 2006), com a transmissão de *Liberibacter* sendo feita por meio do psílídeo *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). No Brasil, a presença de *D. citri* foi constatada em 1940 (LIMA, 1942) aonde transmite além, de CLas, a espécie CLam (YAMAMOTO et al., 2006). A transmissão da espécie africana, CLaf, se dá por meio do psílídeo *Trioza erythrae* (Hemiptera: Triozidae). Experimentalmente, ambos os psílídeos podem transmitir CLas e CLaf (MASSONIÉ; GARNIER; BOVÉ, 1976), mas há diferenças tanto do vetor como das bactérias quanto à sensibilidade a altas temperaturas. *T. erythrae*, CLaf e CLam são sensíveis e *Diaphorina citri* e CLas tolerantes (BOVÉ et al., 1974 apud BOVÉ, 2006; LOPES et al., 2009a). O psílídeo *D. citri* possui várias outras plantas hospedeiras na família Rutaceae, entre elas, duas espécies de valor ornamental conhecidas no Brasil como murta, *Murraya paniculata* L. Jack (TSAI; LIU, 2000) e

Murraya exotica (LOPES et al., 2010), as quais hospedam também CLas (DAMSTEEGT et al. 2010; LOPES et al., 2010) e CLam (LOPES et al., 2010; GASPAROTO, 2010).

D. citri é um pequeno inseto, de coloração cinza, com manchas escuras nas asas e mede de 2 a 3 mm de comprimento. No Brasil, até 2004, o psílídeo *D. citri* era considerado uma praga secundária, sendo que seus danos diretos, resultado de sucessivas picadas e sucção de seiva causando, principalmente, enrolamento das folhas, não demandavam cuidados especiais para o seu controle (SANCHES et al., 2009). Atualmente, devido a sua relação direta com o HLB, *D. citri* é uma das pragas de maior importância na citricultura nacional.

D. citri alimenta-se, principalmente, na face abaxial de folhas, com preferência por brotações novas. O ciclo biológico (ovo-adulto) varia de 15 a 40 dias, sendo as temperaturas de 25 a 28 °C as mais adequadas ao seu desenvolvimento. As fêmeas depositam cerca de 800 ovos com eclosão das primeiras ninfas quatro dias após a postura. As ninfas passam por cinco estádios até a fase adulta. A longevidade do adulto varia de 3 a 4 meses. A disseminação a curtas distâncias ocorre por vôos e saltos, enquanto que a disseminação a longas distâncias pode ser favorecida pelo vento. *D. citri* adquire a bactéria do HLB se alimentando em uma planta doente e pode transmiti-la por até várias semanas após a aquisição, caracterizando o tipo de transmissão como persistente propagativa. Nas condições do Estado de São Paulo, *D. citri* pode ser observado durante o ano todo, com pico populacional ocorrendo no final da primavera e início do verão. A reprodução ocorre somente no período de brotação das plantas, quando os ovos são depositados nos brotos novos (NAVA et al., 2007; FUNDECITRUS, 2009; BONANI, 2009; PARRA et al., 2010).

A transmissão da bactéria CLas também pode ocorrer de forma artificial, por enxertia, utilizando-se borbulhões de plantas infectadas (LOPES; FRARE, 2008; COLETTA-FILHO et al., 2010) e, de forma indireta, através da planta cuscuta (*Cuscuta campestris*) (Convolvulaceae) (GARNIER; BOVÉ, 1983). Cuscuta é uma planta parasita que retira nutrientes diretamente do floema de seus hospedeiros e atua como ponte biológica, permitindo que microrganismos presentes no floema de uma planta (infectada) cheguem ao floema de outra planta (sadia). Esta forma de transmissão é de grande utilidade experimental pois permite transmissão da bactéria do HLB para plantas de grupos taxonômicos relativamente distantes da família Rutaceae, como em *Catharanthus roseus* (sinônimo: *Vinca rosea*) (Apocynaceae), onde ela se multiplica ativamente (GARNIER; BOVÉ, 1983; TANAKA et al., 2007).

Os sintomas de HLB iniciam-se com manchas amareladas assimétricas no limbo foliar que contrastam com a cor verde normal das folhas, sintoma conhecido como mosqueado. As manchas amareladas no limbo muitas vezes intensificam-se e o mesmo fica completamente amarelado (clorose). Algumas vezes, os sintomas são confundidos com deficiência de manganês e zinco. Observa-se também limbo foliar com aspecto coriáceo e outras vezes espessamento de nervuras. As folhas dos ramos sintomáticos caem facilmente, podem ser menores e curvadas e se apresentar em menor número. Em estádios mais avançados da doença, com as constantes quedas de folhas, pode também ocorrer morte de ponteiros. Os frutos dos ramos afetados são menores, com amadurecimento incompleto e desenvolvimento assimétrico em relação ao eixo central. A análise de cortes perpendiculares ao eixo desses frutos confirma a presença de assimetria e também de sementes abortadas (BOVÉ; GARNIER, 2003; COLETTA-FILHO et al., 2004; LOPES; FRARE, 2008; BELASQUE JUNIOR et al., 2009). O aparecimento dos primeiros sintomas ocorre de forma lenta, no mínimo quatro meses após a inoculação artificial por borbulhões (LOPES; FRARE, 2008; LOPES et al., 2009a; COLETTA-FILHO et al., 2010) ou por psilídeos infectivos (PELZ-STELINSKI et al., 2010).

Os sintomas foliares, principalmente o mosqueado, podem estar relacionados ao excessivo acúmulo de grânulos de amido com consequente rompimento dos cloroplastos (ETXEERRIA et al., 2008). Alguns autores têm relatado possíveis causas para este excessivo acúmulo de amido. Tem sido verificado que devido ao seu pequeno tamanho ($2\ \mu$ de comprimento e $0,1$ a $0,2\ \mu$ de diâmetro) CLas pode passar livremente pelas placas crivadas presentes nos elementos de tubos crivados (TANAKA et al., 2007; LAFLÈCHE; BOVÉ, 1970 apud TATINENI et al., 2008). Entretanto, alguns autores sugerem que, embora possa passar livremente pelas placas crivadas, a bactéria pode formar aglomerados nestas placas, impedindo o fluxo de fotoassimilados (TATINENI et al., 2008). Outro grupo de pesquisadores afirma que o acúmulo de amido se deve à superexpressão de genes relacionados à síntese de amido e, também, à grande produção de calose, que são polímeros de alto peso molecular que podem promover a obstrução das placas crivadas. Observaram ainda que CLas pode não se apresentar na forma de aglomerados nas células floemáticas, mas sim como células isoladas (KIM et al., 2009). Etxeberria et al. (2008) verificaram excessivo acúmulo de grânulos de amido não apenas nas folhas, mas também em ramos e cascas de plantas com HLB. Por outro lado, não constataram acúmulo de amido nas raízes, sendo que neste órgão, além da ausência de amido, houve também ausência de raízes

secundárias. Estes autores não verificaram obstrução das células floemáticas e sugerem que o acúmulo de amido em folhas, caules e cascas e a diminuição no teor de amido nas raízes, juntamente com a redução da quantidade de raízes secundárias, estejam relacionados ao aumento da redistribuição deste carboidrato das raízes para os outros órgãos da planta. Uma grande quantidade de mitocôndrias foi observada próxima aos cloroplastos de folhas de plantas com HLB, indicando o aumento do metabolismo nestes órgãos, o que justifica a redistribuição do amido da raiz para a parte aérea (ETXEBERRIA et al., 2008).

Ainda que plantas do gênero *Citrus* ou gêneros afins resistentes ao HLB não tenham sido relatadas, alguns autores relatam a ocorrência de resposta diferencial de diversos genótipos quando inoculados com CLas. Folimonova et al. (2009) verificaram experimentalmente que laranja ‘Valência’ e pomelo ‘Duncan’ (*C. paradisi* MacFadyen) foram muito sensíveis à inoculação, manifestando de forma intensa os principais sintomas de HLB. Por outro lado, limão ‘Eureka’ (*Citrus limon* (L.) Burn. f.), lima da Pérsia (*Citrus limettioides* Tanaka), citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e *Severina buxifolia* (Poiret) apresentaram pouco ou nenhum sintoma de HLB e continuaram crescendo vigorosamente de forma semelhante aos controles não inoculados. Marengo (2009) também verificou que *P. trifoliata* apresentou maior resistência ao HLB quando comparada a *Citrus sunki*, revelando menores taxas de infecção e valores de título de CLas. Albrecht e Bowman (2011) comparando plantas de *P. trifoliata* e tangerina ‘Cleopatra’ (*C. reticulata* Blanco) com HLB, também verificaram um melhor desempenho de *P. trifoliata* e seus híbridos. Diante destas observações, uma importante questão tem sido levantada: Por que algumas espécies têm se mostrado altamente sensíveis ao HLB e outras não? Para responder essa questão, é crucial o entendimento dos mecanismos de patogenicidade da bactéria do HLB e seu comportamento nos vários hospedeiros (FOLIMONOVA et al., 2009). Albrecht e Bowman (2011) sugerem que plantas de *P. trifoliata* e seus híbridos sintetizam compostos químicos que estejam agindo contra CLas. A identificação destes possíveis compostos sintetizados e/ou a descoberta de outros mecanismos de defesa nestas plantas podem resultar em estratégias para auxiliar no combate ao HLB (ALBRECHT; BOWMAN, 2011).

Outras diferenças têm sido detectadas no campo com relação ao desenvolvimento da doença em diferentes temperaturas. Lopes et al. (2009b) constataram que CLam é mais sensível a altas temperaturas quando comparada com CLas o que, em parte, pode explicar o aumento

desproporcional de CLas nos pomares brasileiros. Em 2004, 98% das árvores com sintomas de HLB estavam infectadas com CLam e 2% com CLas no Estado de São Paulo. E em 2008, 20% das árvores com sintomas estavam infectadas com CLam e 80% com CLas e em 2011 a proporção CLas para CLam subiu para mais de 99:1 (Nelson A. Wulff, dados não publicados). Esta mais rápida progressão na incidência de CLas no campo também pode ser devida à maior concentração desta espécie em plantas de citros, que chega a ser em média 10^7 células por grama de tecido contra 10^6 para CLam, o que aumenta suas chances de transmissão pelo psilídeo vetor (LOPES et al., 2009b, 2010).

Pesquisas também indicam que a bactéria do HLB, mesmo sendo sistêmica, tem distribuição irregular por toda a planta (raízes, caules, folhas, partes florais e frutos), muitas vezes apresentando-se em baixas concentrações. Estas características dificultam sua detecção, principalmente, em ramos assintomáticos de plantas doentes (TATINENI et al., 2008; LI et al., 2009). A combinação das análises da PCR (*Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase) e da Rt-PCR (*Real-time PCR* – PCR em tempo real) tem sido eficiente na detecção de *Candidatus Liberibacter* spp., reduzindo a frequência de resultados falsos positivos ou negativos (TATINENI et al., 2008).

Independentemente da espécie de *Candidatus Liberibacter*, o manejo nos pomares tem sido obtido com a erradicação de árvores afetadas para a redução do inóculo, pelo controle químico da população do vetor e pela obtenção de mudas saudáveis para o cultivo (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). Embora essas práticas culturais, quando adotadas em conjunto por diversos produtores vizinhos, estejam promovendo diminuição no avanço da doença, elas são muito caras, de difícil adoção em larga escala e danosas ao meio ambiente. O uso de genótipos resistentes deve ser visto, portanto, como a melhor estratégia a ser, um dia, empregada no manejo da doença. Desta forma, a transformação genética surge como uma ferramenta de grande importância e com potencial significativo em programas de melhoramento de citros, especialmente, tendo em vista os diversos trabalhos já desenvolvidos com este enfoque em diversos patossistemas (BARBOSA-MENDES et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010; BOREJSZA-WYSOCKA et al., 2010).

2.3 Transformação genética visando resistência a doenças

A obtenção de cultivares resistentes a doenças auxilia no desenvolvimento da citricultura, diminuindo perdas de produção, assim como reduzindo custos com manejo dos pomares. Os programas de melhoramento genético convencionais via hibridação e seleção recorrente apresentam diversas dificuldades relacionadas à biologia reprodutiva do gênero *Citrus*, entre elas, a alta heterozigose, a esterilidade de pólen e óvulo e o longo período juvenil, que pode variar de 2 a 13 anos, dependendo das condições ambientais e do genótipo (MACHADO et al., 2005).

Na tentativa de sobrepor essas barreiras, técnicas modernas de biologia molecular, cultivo *in vitro* e engenharia genética foram integradas aos programas de melhoramento. Dentre estas técnicas, destacam-se a hibridação somática por fusão de protoplastos, permitindo a combinação genética entre espécies taxonomicamente próximas ou distantes, resultando na possível expressão aditiva das características dos progenitores dos híbridos (MENDES et al., 2001), e a transformação genética, permitindo a introdução de genes exógenos de interesse agrônomico e reduzindo o período para obtenção de uma nova cultivar (PEÑA et al., 2001; BOSCARIOL et al., 2006; DUAN; FAN; GUO, 2010). Esta última tem mostrado resultados promissores, principalmente, visando resistência a doenças.

O primeiro relato envolvendo transformação genética de citros foi realizado na década de 1980, por Kobayashi e Uchimiya (1989), quando utilizaram polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce. Entretanto, não houve regeneração das plantas.

Vários métodos de transformação genética têm sido descritos para citros, como a introdução direta de DNA em protoplastos (GUO et al., 2005), transformação via *Agrobacterium tumefaciens* (ALMEIDA et al., 2003; BOSCARIOL et al., 2006; AZEVEDO et al., 2006; PAOLI et al., 2007; SILVA, 2008; TAVANO, 2008; BARBOSA-MENDES et al., 2009; MIYATA et al., 2011; MUNIZ et al., 2011), bombardeamento de partículas em células *in vivo* (YAO et al., 1996) e eletroporação de protoplastos (NIEDZ; MCKENDREE; SHATTERS JUNIOR, 2003).

Genes de interesse agrônomico têm sido usados na transformação genética de citros, destacando-se genes que conferem resistência ao ataques de fungos (GENTILE et al., 2007; KATOH et al., 2007; DISTEFANO et al., 2008), vírus (SCHINOR, 2006; FEBRES; LEE; MOORE, 2008; ZANEK et al., 2008; SILVA, 2008; MUNIZ et al., 2011) e bactérias

(AZEVEDO, 2005; BOSCARIOL et al., 2006; BARBOSA-MENDES et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010).

Genes de insetos que codificam peptídeos antibacterianos também têm sido introduzidos em plantas visando resistência a bactérias fitopatogênicas (BESPALHOK FILHO et al., 2001; BOSCARIOL et al., 2006; PAOLI et al., 2007). Mais de 500 tipos destes peptídeos foram descritos não somente de insetos, mas também de uma grande variedade de outros organismos como bactérias, fungos e vertebrados (ZASLOFF, 2002).

O sistema imune de alguns insetos, como de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta respostas eficientes contra infecções bacterianas pela indução da síntese de várias proteínas e de peptídeos antibacterianos, como o peptídeo atacina. As atacinas pertencem a uma classe de peptídeos com cerca de 20kD, secretados na hemolinfa de insetos em resposta a infecções bacterianas. Existem nas formas básicas (A, B, C, D) e nas formas ácidas (E, F) e ambas as formas contêm três regiões hidrofóbicas na região amino-terminal (HULTIMARK et al., 1983). A ação das atacinas contra bactérias Gram-negativas ocorre geralmente pela sua ligação a lipopolissacarídeos presentes na membrana externa destas bactérias, acarretando no aumento da permeabilidade desta membrana. Este aumento na permeabilidade pode ocorrer devido à formação de canais nesta membrana e a sua restauração pode ser dificultada pela inibição da síntese protéica (HULTIMARK et al., 1983; ENGSTRON et al., 1984; CARLSSON et al., 1998).

A transformação de plantas com genes que codificam atacinas tem sido utilizada com ação comprovada contra bactérias. Borejsza-Wysocka et al. (2010) comprovaram resistência de plantas de maçã contendo o peptídeo atacina E à bactéria *Erwinia amylovora*. Boscariol et al. (2006) transformaram laranja ‘Hamlin’ com o gene da atacina A e verificaram aumento da resistência de algumas plantas a *Xanthomonas citri* pv. *citri*. Também para este patógeno, Cardoso et al. (2010) avaliaram a resistência de laranjas ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo o gene da atacina A e, verificaram redução da suscetibilidade de algumas plantas. Cardoso (2008) avaliou a resistência de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo o gene da atacina A à bactéria *Xylella fastidiosa* e verificou que a presença deste peptídeo pode ter influenciado no nível de resistência em alguns eventos de transformação.

Outra estratégia utilizada para obtenção de plantas resistentes a bactérias consiste no uso de genes *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) (SHAO et al., 2008; BARBOSA-

MENDES et al., 2009) que codificam as harpinas, que são proteínas relacionadas com o sistema de defesa das plantas (WEI et al., 1992). Harpinas são proteínas multifuncionais produzidas por bactérias patogênicas Gram-negativas. A primeira harpina identificada foi a harpina_{Ea} (gene *hrpN*) que possui 44 kD, é estável ao calor e rica em glicina. Esta harpina é secretada pela bactéria *Erwinia amylovora* (WEI et al., 1992) causadora do fogo bacteriano, principalmente, em plantas da família Rosaceae.

Uma das funções mais conhecidas das harpinas é a capacidade de elicitar respostas de defesa nas plantas levando à indução de reação de hipersensibilidade (*hypersensitive reaction* – HR), ou seja, uma resposta específica que ocorre no sítio de penetração do patógeno, podendo causar morte celular no local da infecção e também induzir a resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR) (WEI et al., 1992; KONG; LI, 2011). A SAR, diferente da HR, é um tipo de resistência não específica e duradoura, que possui ação contra uma ampla gama de patógenos tais como fungos, vírus e bactérias. Após uma infecção primária, a SAR protege a planta contra as próximas infecções e sua ação ocorre em partes distais da planta (STROBEL et al., 1996; DURRANT; DONG, 2004).

A transformação de plantas com o gene da harpina tem resultado no aumento da resistência a diversos patógenos. Peng et al. (2004) constataram, em tabaco expressando o gene *hpaG_{Xoo}*, resistência não específica a *Alternaria alternata*, *Ralstonia solanacearum* e ao vírus do mosaico do tabaco (*Tobacco mosaic virus* - TMV). Também em tabaco expressando o gene *hrpZ_{Pss}*, foi observada resistência à *Erwinia cichoracearum* (TAKAKURA et al., 2004) e, expressando o gene *hrpN*, resistência ao fungo *Botrytis cinerea* (JANG; SOHN; WANG, 2006). Barbosa-Mendes et al. (2009) verificaram redução da suscetibilidade a *Xanthomonas citri* pv. *citri* em plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo o gene *hrpN*.

A ação da proteína harpina contra insetos sugadores de floema também tem sido demonstrada. Zhang et al. (2011) constataram que, após a aplicação exógena da proteína harpina (*hrpN_{Ea}*) em *Arabidopsis*, houve repressão da alimentação pelo afídeo *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) no floema e redução da colonização das plantas por este inseto. Estes autores acreditam que estes resultados podem estar relacionados à superexpressão do gene *AtPP2-A1*, que codifica uma proteína de floema, a PP2-A1. Esta proteína atua juntamente com a proteína PP1 formando a calose, que pode levar à obstrução das placas crivadas dos elementos de tubo crivados (WILL; van BEL, 2006). Hipoteticamente, esta barreira física pode prevenir a

atividade de insetos sugadores de floema, mas isto ainda não foi confirmado (ZHANG et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivares ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo o gene da atacina A (*attA*), obtidas por Boscariol (2004) e das cultivares ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo o gene da harpina (*hrpN*), obtidas por Barbosa-Mendes (2007), foram utilizadas nos experimentos. Para obtenção das plantas transgênicas, contendo o gene *attA*, Boscariol (2004) utilizou como vetor para transformação, *A. tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCatt2300, contendo o gene *attA*, que codifica a proteína atacina A, ligado a um peptídeo sinal de 54 pares de bases, que direciona a proteína formada para o apoplasto, sendo dirigido pelo promotor constitutivo CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus* – vírus do mosaico da couve-flor) 35S duplicado, o terminador Nos (*Nopaline synthase* - Nopalina sintase) e o gene de seleção *nptII* (que codifica para a *neomycin phosphotransferase II* – neomicina fosfotransferase II) que confere resistência ao antibiótico canamicina. Para a obtenção das plantas, contendo o gene *hrpN*, Barbosa-Mendes (2007) utilizou como vetor para transformação *A. tumefaciens*, contendo o plasmídeo pCPP1298, contendo o gene *hrpN*, que codifica a proteína harpina, ligado a um peptídeo sinal, com função de exportar a proteína para o apoplasto, sendo dirigido pelo promotor induzível, clonado de batata *Pgst1* (*Glutathione S transferase 1 gene promoter* – promotor do gene da glutathione S transferase 1), o terminador Nos e o gene *aacC1* (*gentamycin acetyl transferase 3-1 gene* - gene da gentamicina acetiltransferase 3-1) que confere resistência ao antibiótico gentamicina, sendo dirigido pelo promotor constitutivo CaMV 35S. A escolha dos eventos (H5, N4, N6, V6 e V8) contendo o gene *hrpN* utilizados neste trabalho foi realizada a partir da confirmação da integração e expressão deste gene nas plantas e também, devido a maior parte delas apresentarem fenótipo e desenvolvimento semelhantes ao observado em plantas não transgênicas. Algumas destas plantas também apresentaram redução da suscetibilidade à *X. citri* pv. *citri* (BARBOSA-MENDES, 2007).

As plantas matrizes, referentes aos diferentes eventos de transformação, foram mantidas em casa de vegetação, específica para o cultivo de plantas transgênicas com Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), instalada na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) - Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

3.2 Análises moleculares das plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene *attA* para confirmação da integração e transcrição do gene

Dez plantas matrizes de laranja ‘Valência’ que foram avaliadas neste trabalho, possivelmente transformadas com o gene *attA*, necessitaram de análises moleculares para confirmar a integração e a transcrição do gene. As demais plantas utilizadas nos experimentos foram caracterizadas por Boscariol (2004), Cardoso (2008) e Barbosa-Mendes (2007).

As análises moleculares PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) e RT-PCR (*Reverse Transcription by PCR* – Transcrição Reversa pela PCR) foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/ESALQ. A análise *Southern blot* foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP.

3.2.1 Análise da PCR

O DNA das plantas matrizes de laranja ‘Valência’ possivelmente transformadas com o gene *attA* e de uma planta desta mesma cultivar não transformada foi extraído pelo método CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (DOYLE; DOYLE, 1990). A extração de DNA ocorreu após a maceração de 0,3 g de folhas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo gelados. Para a amplificação do DNA extraído, foram utilizados os iniciadores: 5′- GCT GTT CAG CTA GCC AGT CC –3′ e 5′- TTT GGG AAG TCA GGC ATG TT-3′ que amplificam um fragmento de 350 pb do gene *attA* (BOSCARIOL et al., 2006). A reação da PCR foi desenvolvida em 25 µL de uma solução contendo 0,2 µM de cada iniciador, 160 µM de dNTP (desoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,6 µM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão (10 x), 1,25 U *Taq* DNA polimerase, 4 µL do preparado de DNA e o volume completado com água ultra pura. A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-100tm, MJ Research, Inc.), programado para as seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95 °C por 5 min; 40 ciclos envolvendo a desnaturação a 95 °C por 1 min; anelamento a 58 °C por 40 s; extensão a 72 °C por 30 s e, 1 ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min. Após a amplificação, alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE (tampão *Tris* – *Acetate* – EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)) (1 x), corado com brometo de etídeo (0,03 µg mL⁻¹)

a uma voltagem de 60 V, por pelo menos 1 h. O gel foi posteriormente visualizado e fotografado com auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

3.2.2 Análise de Southern blot

As plantas matrizes de laranja ‘Valência’ com resultados positivos para análise da PCR foram analisadas por *Southern blot* (SOUTHERN, 1975; ROMANO, 1998, com modificações) para confirmar a integração do gene *attA* no genoma das plantas. O DNA total das plantas matrizes PCR positivas e da planta não transformada foi extraído após a maceração de 1,4 g de folhas jovens, em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo gelados. O método de extração utilizado foi o CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), acrescentando-se uma lavagem com fenol e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para uma melhor purificação. O DNA foi quantificado por fluorometria (QubitTM Fluorometer - InvitrogenTM) utilizando-se o kit “Quant-iTTM dsDNA BR assay kit” (InvitrogenTM) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Aproximadamente 60 µg de DNA de cada planta foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* (InvitrogenTM), separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE (1 x), corado com brometo de etídio (0,03 µg mL⁻¹), a uma voltagem de 40 V por pelo menos 12-16 h (overnight) e transferidos para membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences).

A sonda para o gene *attA* foi preparada por PCR (conforme descrito no item 3.2.1) e o fragmento amplificado foi purificado utilizando o kit “QIAEX® II Gel Extraction” (Qiagen) e submetido à marcação com o kit “AlkPhos Direct Labelling Reagents” (Amersham Biosciences). As hibridizações foram realizadas a 60 °C e a detecção foi realizada com “CDP-StarTM Detection Reagent” (Amersham Biosciences).

3.2.3 RT-PCR

As plantas matrizes de laranja ‘Valência’ com resultados positivos para análise de *Southern blot* tiveram a transcrição do gene confirmada por RT-PCR. A extração de RNA total das plantas matrizes e da planta não transformada (controle negativo) foi realizada utilizando-se o produto comercial TRIzol (InvitrogenTM), seguindo-se as recomendações do fabricante. A integridade e a qualidade do RNA extraído foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE (1 x), corado com brometo de etídio (0,03 µg mL⁻¹) a uma voltagem de

130 V por 15 min. A quantificação ocorreu por fluorometria - (Qubit™ Fluorometer - Invitrogen™) utilizando-se o kit “Quant-iT™ RNA assay kit” (Invitrogen™) seguindo-se as recomendações do fabricante. Após a quantificação, foi realizada a transcrição reversa das amostras de RNA total com iniciadores específicos para o transgene *attA*, seguida de amplificação por PCR. Para tanto, 2 µg de RNA foram tratados com a enzima DNase “RQI RNase-free DNase” (Promega). Após o tratamento com DNase, ao RNA total extraído foi adicionado oligo dT (polímeros de nucleotídeos de base timina) e, as fitas de RNA mensageiros ligadas ao oligo dT serviram como molde para síntese do cDNA.

Para a síntese de cDNA por RT-PCR, utilizaram-se 3 µg de RNA total tratado com DNase e ligado ao oligo dT e a enzima transcriptase reversa “ImProm-II™ Reverse Transcriptase” (Promega) conforme orientações do fabricante. O cDNA gerado foi então submetido à reação de PCR como descrito no item 3.2.1.

3.3 Multiplicação das plantas

A multiplicação das plantas ocorreu por enxertia, a partir de borbulhas das plantas de laranja ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo o gene *attA* e das plantas de laranja ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo o gene *hrpN* e, também, de plantas não transgênicas retiradas de plantas matrizes. As borbulhas foram enxertadas, na forma de T invertido no porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck).

As mudas foram cultivadas em sacos plásticos de polietileno (4,5 L) contendo substrato comercial de casca de pinus (Rendmax Citrus™ Eucatex) misturado com adubo Osmocote® PRO 22-4-8, na proporção 200 g do produto para cada 25 kg do substrato. As plantas foram fertirrigadas semanalmente com macro e micronutrientes - Kristalon® (06-12-36) com Tenso™ Iron (Fe-EDDHMA 6,0%), Peters Exel® (15-5-15) e Nitrato de Cálcio (Ca(NO₃)₂ + 4H₂O), utilizados de forma alternada. A irrigação ocorreu a cada dois dias ou sempre que necessário. A pulverização das plantas contra pragas e insetos vetores ocorreu quinzenalmente com alternância de produtos dos grupos piretróide, avermectina e organofosforado. As podas das plantas foram realizadas sempre que necessário ou após a avaliação dos sintomas ou coleta de amostras para PCR.

Os experimentos foram desenvolvidos em uma estufa do Departamento de Produção Vegetal, específica para o cultivo de plantas transgênicas e com Certificado de Qualidade em

Biossegurança (CQB), instalada na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

3.4 Avaliações e delineamento experimental

Foram realizadas três avaliações e para cada avaliação, experimentos independentes (um para cada cultivar em estudo) foram instalados, sendo:

1) Avaliação da resistência de plantas de laranja doce contendo o gene *attA* à CLas através de inoculação por borbulhões infectados:

Experimento com laranja ‘Hamlin’ (H): foram avaliados 12 eventos transgênicos: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11 e H12.

Experimento com laranja ‘Natal’ (N): foram avaliados 5 eventos transgênicos: N1, N4, N5, N8 e N9.

Experimento com laranja ‘Pêra’ (P): foram avaliados 6 eventos transgênicos: P6, P7, P8, P10, P11, e P15.

Experimento com laranja ‘Valência’: foram avaliados 16 eventos transgênicos: V1, V2, V3, V4, V7, V8, V10, V11, V12, V13, V15, V16, V17, V18, V19 e V20.

2) Avaliação da resistência de plantas de laranja doce contendo o gene *attA* à CLas através de inoculação por psilídeos infectivos:

Experimento com laranja ‘Hamlin’ (H): foram avaliados 12 eventos transgênicos: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11 e H12.

Experimento com laranja ‘Natal’ (N): foram avaliados 5 eventos transgênicos: N1, N4, N5, N8 e N9.

Experimento com laranja ‘Pêra’ (P): foram avaliados 6 eventos transgênicos: P6, P7, P8, P10, P11, e P15.

Experimento com laranja ‘Valência’: foram avaliados 14 eventos transgênicos: V1, V2, V7, V8, V10, V11, V12, V13, V15, V16, V17, V18, V19 e V20.

3) Avaliação da resistência de plantas de laranja doce contendo o gene *hrpN* à CLas através de inoculação por psilídeos infectivos:

Experimento com laranja ‘Hamlin’ (H): foi avaliado 1 evento transgênico: H5.

Experimento com laranja ‘Natal’ (N): foram avaliados 2 eventos transgênicos: N4 e N6.

Experimento com laranja ‘Valência’ (V): foram avaliados 2 eventos transgênicos: V6 e V8.

Cada experimento incluiu também um tratamento com plantas não transgênicas da mesma cultivar em análise. Além disso, duas plantas transgênicas de cada tratamento e duas plantas não transgênicas da mesma cultivar, não inoculadas, foram utilizadas como controles não inoculados.

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Cada planta transgênica (evento transgênico) foi considerada como um tratamento com 2 a 4 repetições (uma planta por parcela) para o experimento utilizando borbulhões e, com 1 a 10 repetições (uma planta por parcela) para os experimentos utilizando psilídeos. O número diferente de repetições ocorreu devido à eficiência final das enxertias.

3.5 Inoculação de CLas

3.5.1 Inoculação de CLas em plantas de laranja doce contendo o gene *attA*, por borbulhões infectados

Oito meses após a obtenção das mudas de plantas de laranja doce contendo o gene *attA* foi realizada a enxertia dos borbulhões infectados com CLas nas quatro cultivares em estudo. As fontes de inóculo da bactéria foram borbulhões de ramos de plantas infectadas com CLas coletados no campo (laranja ‘Valência’ enxertada em limão ‘Cravo’, com 3 anos, talhão 51B, Fazenda Marchesan, localizada no município de Matão, SP).

Os ramos foram retirados de plantas que apresentavam sintomas de HLB e que, posteriormente, foram analisados pela PCR para confirmação da presença de CLas. Estes ramos foram removidos e transportados para a estufa no dia da inoculação. Borbulhões infectados (1/planta) com aproximadamente 5 cm de comprimento foram enxertados nas plantas com auxílio de fitilho plástico e os mesmos foram retirados 40 dias após a enxertia. Após a inoculação, foi realizado um acompanhamento do pegamento do borbulhão utilizado para inoculação. Algumas

plantas apresentaram morte do borbulhão e nova enxertia foi realizada cerca de sessenta dias após a primeira.

Mesmo que a coleta dos borbulhões tenha sido realizada em plantas do campo com HLB, não se pode afirmar que todos estavam infectados devido à distribuição heterogênea de CLAs nas plantas. Portanto, os borbulhões utilizados neste experimento estavam “supostamente infectados”.

Todas as etapas referentes à inoculação, incluindo a coleta dos borbulhões no campo, análise pela PCR para confirmação das plantas infectadas no campo e enxertia das plantas transgênicas ou não transgênicas com os borbulhões infectados, foram realizadas com auxílio dos técnicos e estagiários do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS).

3.5.2 Inoculação de CLAs em plantas de laranja doce contendo o gene *attA* ou o gene *hrpN*, pelo psílídeo vetor *D. citri*

Para a obtenção dos psílídeos vetores infectivos com CLAs, insetos adultos com 2 a 5 dias após a emergência foram confinados em ramos assintomáticos de plantas fontes (laranja ‘Valência’ enxertada em limão ‘Cravo’) da bactéria CLAs para um período de acesso a aquisição de 3 dias. Logo após, os insetos foram transferidos para gaiolas contendo *seedlings* de laranja ‘Caipira’ para um período de latência de 25 dias. Após o período de latência, os psílídeos foram transferidos para plantas de murta (*Murraya paniculata*), com auxílio de sacos de *voile* e transportados para o Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos do Departamento de Entomologia e Acarologia – USP/ESALQ. Estas etapas foram realizadas no FUNDECITRUS com o auxílio de técnicos e estagiários daquela Instituição.

As mudas de plantas de laranja doce (com 14 a 19 meses de idade) contendo ou não o gene *attA* ou *hrpN*, das cultivares em estudo, foram pulverizadas e podadas 30 dias antes da inoculação para obtenção de ramos novos e sem resíduos de pulverização. Dez psílídeos foram confinados em um ramo novo de cada muda (marcado com caneta azul permanente), com auxílio de saco de *voile*, para um período de acesso a inoculação (PAI) de 7 dias. Durante o PAI, estas plantas foram mantidas em uma estufa com CQB do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos.

Após a inoculação, os insetos foram retirados das plantas e armazenados em micro-tubos contendo álcool etílico 100% e armazenados em ultra-freezer a (- 80 °C) para posterior

confirmação da presença da bactéria CLas. As plantas foram então pulverizadas e transportadas para uma estufa do Departamento de Produção Vegetal, onde permaneceram até o final dos experimentos.

Semelhante ao que ocorreu para os borbulhões, não se pode afirmar que todos os psílídeos utilizados neste experimento estavam infectivos, portanto, os psílídeos utilizados estavam “supostamente infectivos”.

3.6 Avaliação da resistência de plantas de laranja doce transgênicas à CLas – sintomas visuais e detecção da bactéria

3.6.1 Avaliação dos sintomas visuais de HLB

As avaliações dos sintomas visuais de HLB foram realizadas 4 e 8 meses após a inoculação com borbulhões infectados e 8 e 12 meses após a inoculação por psílídeos infectivos. Os sintomas típicos de HLB (LOPES; FRARE, 2008; LOPES et al., 2009a) foram observados. Para uma melhor comparação entre as plantas inoculadas elaborou-se uma escala de intensidade dos dois principais sintomas observados, sendo, mosqueado (m) e sintoma de deficiência de manganês (Mn), nas intensidades 1, 2 e 3 (leve, moderado e severo, respectivamente) (Figura 1). Também foram observados sintomas de clorose (c) (Figura 1) e deficiência de ferro (Fe) e de zinco (Zn).

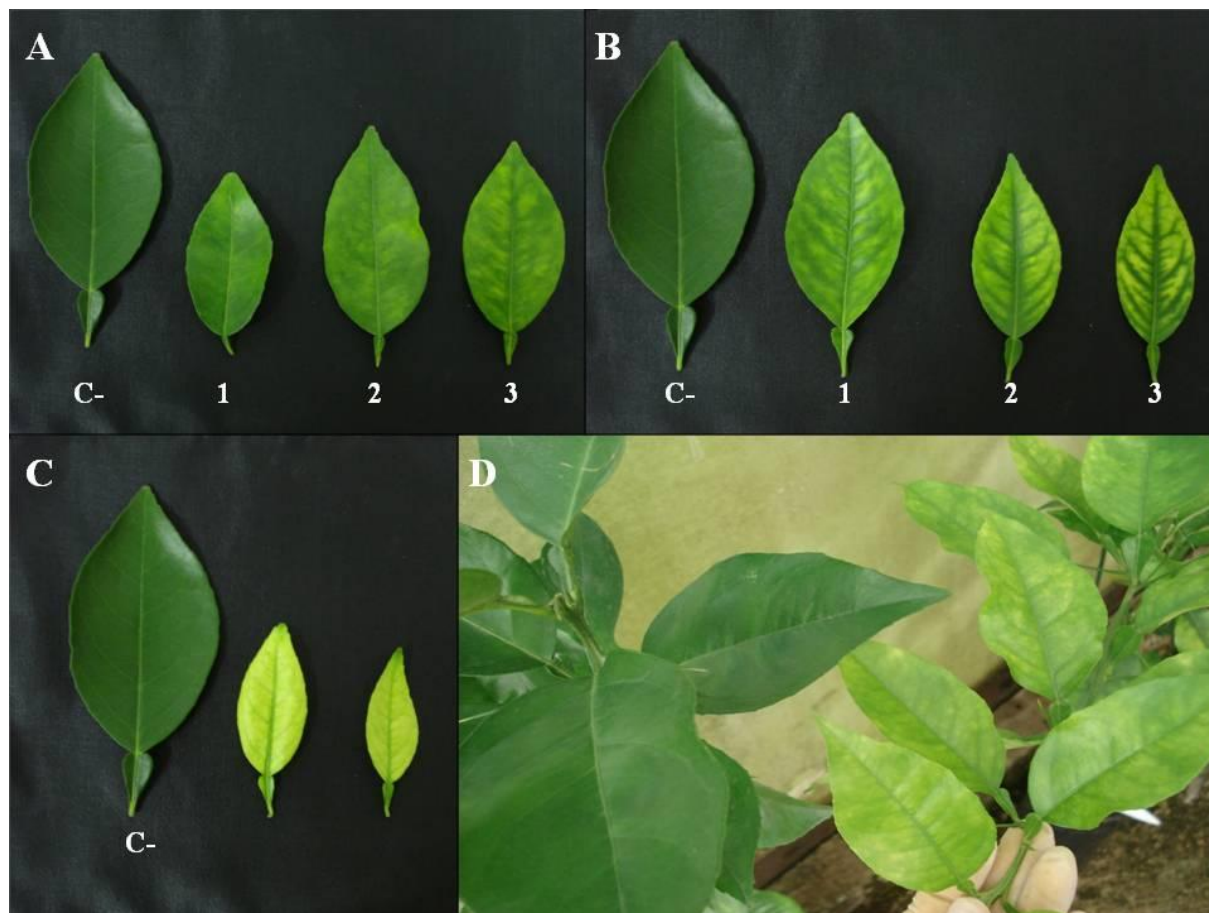


Figura 1 - Sintomas de HLB observados em plantas de laranja doce contendo ou não o gene *attA*, inoculadas com CLAs por borbulhões infectados, 8 meses após a inoculação. Em A, B e C: C- = controle não inoculado; Em A: sintoma de mosqueado nas intensidades 1, 2 e 3 (leve, moderado e severo); Em B: deficiência de Mn nas intensidades 1, 2 e 3 (leve, moderado e severo); Em C: sintoma de clorose; Em D: comparação entre uma planta sadia (esquerda) e um planta com HLB (direita)

3.6.2 Detecção de CLAs

A extração de DNA e detecção de CLAs por PCR em folhas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas – USP/ESALQ. A detecção quantitativa de CLAs em folhas por Rt-qPCR (*Real-time quantitative PCR* – PCR quantitativa em tempo real) foi realizada no laboratório do Centro de Diagnósticos de Pragas e Doenças de Citros do FUNDECITRUS.

A detecção de CLAs em *spots* dos psíldeos utilizados para inoculação da bactéria nas plantas e em *spots* de folhas das plantas inoculadas por Rt-PCR ocorreu no Laboratório de Virología y Immunología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto

Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valência, Espanha. A realização desta atividade neste Instituto fez parte do Doutorado Sanduíche (SWE) sob a orientação do Dr. Mariano Justo Cambra Álvarez e da Dra. María Milagros López González.

3.6.2.1 Extração de DNA de folhas de laranja doce e detecção da bactéria CLas por PCR

A extração de DNA de folhas de plantas de laranja doce contendo ou não o gene *attA* das quatro cultivares em estudo foi realizada 4 e 8 meses após a inoculação por borbulhão infectado e, 8 e 12 meses após a inoculação por psílídeos infectivos. Para as plantas contendo ou não o gene *hrpN*, das três cultivares em estudo, a extração de DNA ocorreu 8 e 12 meses após a inoculação por psílídeos infectivos. As análises realizadas 8 meses após a inoculação ocorreram de forma individual para cada planta e aos 4 e 12 meses após a inoculação, utilizou-se *pool* de amostras (duas folhas de cada repetição por evento transgênico).

O DNA foi extraído utilizando tampão CTAB baseado no método de Murray e Thompson (1980). Cerca de 250 mg de pecíolos de folhas sintomáticas (quando presentes), coletadas na região subapical, do 2° ao 10° nó, foram cortados em pedaços pequenos, macerados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo gelados e armazenados em freezer (- 80°C) até o momento da extração.

Para a amplificação do DNA extraído, foram utilizados os iniciadores: RPLA2: 5' – TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT – 3' e RPLJ5: 5' – ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A que amplificam um fragmento de 703 pb de CLas (HOCQUELTET et al., 1999). A reação da PCR foi desenvolvida em 25 µL de uma solução contendo 0,5 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTP, 2,0 µM de MgCl₂, 2,5 µL de tampão (10 x), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, 1 µL do preparado de DNA e 17,2 µL de água ultra pura. A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-100tm, MJ Research, Inc.), programado para as seguintes condições: 1 ciclo inicial a 94 °C por 30 s; 34 ciclos envolvendo a desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 62 °C por 30 s; extensão a 72 °C por 1 min e 1 ciclo final de extensão a 72 °C por 1 min. Após a amplificação, alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%, em tampão TAE (1x), corado com brometo de etídeo (0,03 µg mL⁻¹) a uma voltagem de 60 V, por pelo menos 1 h. O gel foi posteriormente visualizado e fotografado com auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

3.6.2.2 Detecção quantitativa de CLas em folhas por Rt-qPCR

A extração de DNA de folhas e, posterior detecção de CLas por Rt-qPCR, foi realizada 8 meses após a inoculação com borbulhão infectado, apenas para plantas de laranja doce contendo ou não o gene *attA*, das quatro cultivares em estudo.

O DNA utilizado na análise Rt-qPCR foi o mesmo obtido anteriormente para a detecção por PCR. Para a quantificação do DNA, utilizou-se o equipamento NanoDrop (1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific), assim como para verificação da pureza por meio da razão 260/280 (valores ideais entre 1,8 e 2,0). O DNA foi então diluído para uma concentração final de 100 ng μL^{-1} DNA. A análise Rt-qPCR foi realizada utilizando-se o aparelho StepOne Plus thermocycler (Applied BiosystemsTM). A reação foi desenvolvida em 25 μL de uma solução contendo 1,25 μL de “2 x SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied BiosystemsTM), 0,15 μM de cada iniciador *f-rpILAS*: 5' CGC CCG TTT CCG TTG 3' e *rpILAS*: 5' AGC CTC TTT AAG CCC TAA ATC AG 3', 500 ng do DNA genômico e o volume completado com água ultra pura. Para amplificação do DNA, o programa utilizado foi: 1 ciclo inicial a 95 °C por 10 min.; 40 ciclos envolvendo a desnaturação a 95 °C por 15 s; anelamento a 63 °C por 60 s e, para obtenção da curva de *Melting* a temperatura foi de 69 a 95 °C por 20 s. A análise das amostras foi realizada em duplicata seguido pelo cálculo das médias e os dados foram analisados no software do aparelho StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (TEIXEIRA et al., 2008). O *Cycle Threshold* (C_T) – ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial – permitiu a quantificação baseada na fluorescência de cada amostra.

Para a validação do limite de detecção da quantificação dos *amplicons* (de CLas) foi necessária a construção de uma curva padrão. Dessa forma, plasmídeos contendo a inserção da sequência alvo foram utilizados. Após as etapas de clonagem, seqüenciamento e confirmação pelo BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*), os plasmídeos contendo os *amplicons* foram diluídos para uma concentração final de 10 ng μL^{-1} e mantidos a 4 °C até o momento do uso. A curva padrão foi construída pela obtenção de diluições seriadas e decimais dos plasmídeos. Foram empregadas 6 diluições em série da solução de DNA plasmidial a 10 ng μL^{-1} , contendo na primeira diluição utilizada na curva padrão 150 mil cópias do *amplicon* alvo e na última diluição 1,5 cópias do *amplicon* alvo (TEIXEIRA et al., 2008). O resultado foi calculado e o valor estimado obtido expresso em Log_{10} (logaritmo do número de células bacterianas g^{-1} de pecíolo).

3.6.2.3 Detecção da bactéria CLas por Rt-PCR em *spots* de folhas e de psilídeos

As folhas de plantas contendo ou não o gene *attA* ou o gene *hrpN*, utilizadas para o preparo dos *spots*, foram coletadas 15, 17 a 18 meses após a inoculação por psilídeos infectivos. Devido ao grande número de plantas de laranja doce contendo o gene *attA* avaliadas, apenas as seguintes foram selecionadas para serem avaliadas por esta análise: laranja ‘Hamlin’: H3, H8, H11, H12; e laranja ‘Valência’: V2, V7, V12, V16 e V17. Também foram analisadas as plantas não transgênicas inoculadas, das mesmas cultivares, e os respectivos controles negativos (plantas não inoculadas).

Os psilídeos que foram armazenados, após a inoculação, em micro-tubos contendo álcool etílico 100%, em ultra-freezer (- 80 °C), foram então coletados com auxílio de um pincel de ponta fina e prensados, de forma individual, em papel Whatman 3MM (obtenção do *spot*) com auxílio da ponta de um micro-tubo. Os *spots* foram recortados, colocados em tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 100 µL de solução tampão B (0,1 M de glicina; 0,05 M de NaCl; 1 mM EDTA) (OSMAN; ROWHANI, 2006). Os tubos foram agitados em vortex por 20 s e o *spot* mantido totalmente submerso na solução tampão B.

Os *spots* de folhas foram obtidos utilizando-se pecíolos de 6 folhas/planta, de folhas coletadas na região subapical, do 2° ao 10° nó, também prensados em papel Whatman 3MM. O mesmo procedimento realizado com os *spots* de psilídeos foi realizado para os *spots* de folhas.

O método de detecção de patógenos em *spot* a partir dos *imprints* de folhas e esmagamento de psilídeos em papel Whatman 3MM (originalmente chamado de *Print-Capture* PCR) foi desenvolvido por Olmos et al. (1996) (patenteado (*Spanish Patent* P9601155)) e inicialmente utilizado para detecção de *Plum Pox Virus* em material vegetal. Posteriormente, este método foi também testado, otimizado e validado para detecção de vírus em afídeos (CAMBRA et al., 2000; BERTOLINI et al., 2008).

A Rt-PCR foi desenvolvida em 12 µL de uma solução contendo 0,25 mM de cada iniciador: HLBas 5’ TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG 3’ e HLBr 5’ GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG 3’, 6,0 mL de “2 x TaqMan Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems™), 0,15 mM da sonda HLBp : FAM – AGA CGG GTG AGT AAC GCG – TAMRA, 3 µL do preparado de *spot* em solução tampão B e o volume completado com água ultra pura. As condições da Rt-PCR utilizadas foram: 1 ciclo inicial a 95 °C por 10 min e 45 ciclos a 95 °C por 15 s e 58 °C por 45 s (LI; LEVY; HARTUNG, 2006, com modificações). O

equipamento utilizado foi o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram consideradas amostras positivas (plantas inoculadas ou psilídeos infectivos) todas aquelas em que foi verificada amplificação do fragmento alvo, baseado nos valores de C_T . Além disso, para os resultados de *spot* de psilídeos, obteve-se uma média dos valores de C_T obtidos de cada grupo de psilídeos (aproximadamente 10) utilizados para inocular cada planta e também calculou-se o percentual de psilídeos infectivos utilizados por planta.

Todas as placas analisadas continham, além das amostras de *spot* de folhas ou *spot* de psilídeos, controles positivos (amostras previamente analisadas e positivas para CLas) e negativos (amostras de *spots* de folhas ou psilídeos não infectados, papel Whatman 3MM em solução tampão B, solução tampão B, Master Mix e água estéril).

3.7 Análise dos dados

Testes estatísticos foram realizados para verificar diferenças com relação a concentração de CLas nas plantas pela análise Rt-qPCR. Primeiramente, foram realizados testes para verificar os pressupostos para a realização da análise de variância, normalidade pelo teste Lilliefors e homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene's (RIBEIRO JÚNIOR; MELO, 2001; FREUD; WILSON, 2003).

Após a verificação dos pressupostos, aplicou-se o teste F (5%) para observar se houve diferenças entre os tratamentos. Quando o teste F foi significativo, aplicou-se o teste Dunnett (5%) para comparar os tratamentos entre plantas transgênicas versus não transgênicas. Nos dados dos experimentos com plantas de laranja 'Hamlin', 'Natal' e 'Valência', mesmo após a transformação dos dados, os pressupostos para a realização da análise de variância não foram atendidos. Assim, as comparações entre linhagens transgênicas e as plantas não transgênicas foram realizadas através do desvio do erro padrão da média ($\pm \mathcal{E}$).

4 RESULTADOS

4.1 Análises moleculares das plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene *attA* para confirmação da integração e transcrição do gene

As análises PCR e *Southern blot* foram utilizadas para confirmar a integração do gene *attA* em dez eventos de laranja ‘Valência’ (V1, V3, V4, V5, V6, V8, V9, V14, V15 e V19). Em seis destes dez eventos, verificou-se a hibridização com sonda do gene *attA*, confirmando a integração do gene. O DNA destas plantas foi digerido pela enzima *HindIII* que cliva em apenas uma região do T-DNA (BOSCARIOL, et al., 2006), sendo possível afirmar que as plantas analisadas apresentaram de um a quatro eventos de inserção do gene e, que são eventos independentes de transformação. Não foi verificada hibridização na amostra de DNA da planta não transgênica utilizada como controle negativo (Figura 2 A).

Para confirmar a transcrição do gene *attA* nos seis eventos com resultados positivos para análise *Southern blot*, utilizou-se a análise RT-PCR. A banda de amplificação esperada, de um fragmento de 350 pb, foi verificada em cinco dos seis eventos avaliados (V1, V3, V8, V15 e V19). Para o evento V4, que apresentou quatro eventos de inserção do gene *attA*, não foi verificada a transcrição deste gene. Não foi verificada amplificação de fragmento da amostra de cDNA da planta não transgênica utilizada como controle negativo (Figura 2 B).

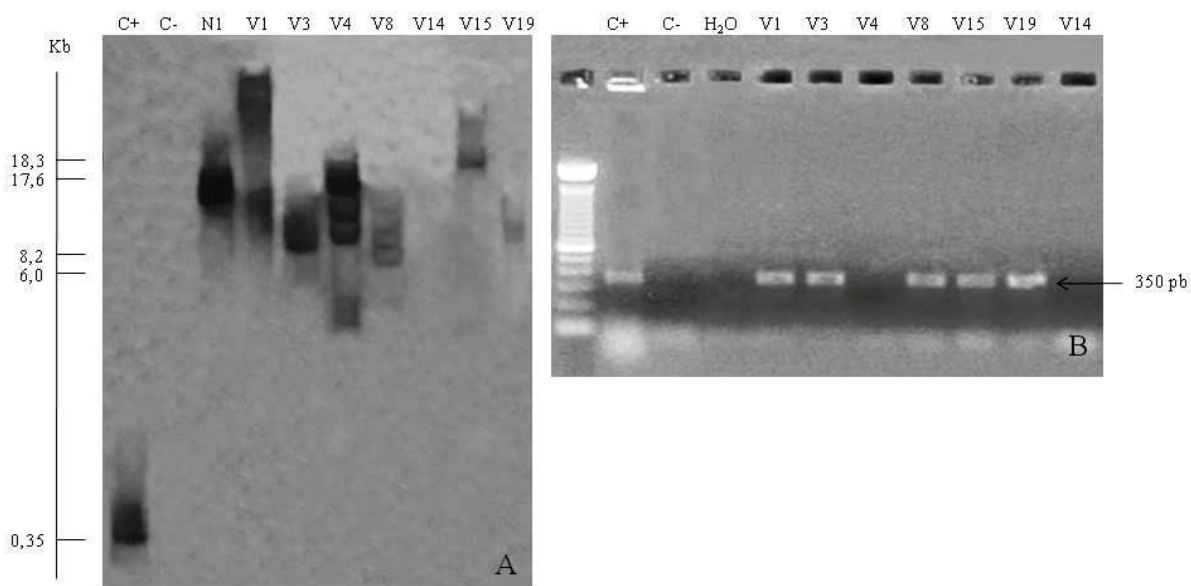


Figura 2 - *Southern blot* (A) e RT-PCR (B) das plantas de laranja 'Valência' transformadas com o gene *attA*. Em A: C+ = controle positivo (fragmento do gene *attA* amplificado por PCR); Em A: N1 e em B: C+ = controle positivo (planta transgênica confirmada anteriormente); Em A e B: C- = controle negativo (planta não transgênica). Colunas com letra V (laranja 'Valência') seguida de números correspondem ao DNA (A) ou cDNA (B) dos eventos transgênicos avaliados

4.2 Avaliação da resistência à CLas

4.2.1 Avaliação da resistência de plantas de laranja doce contendo o gene *attA* à CLas através de inoculação por borbulhões infectados

4.2.1.1 Avaliação dos sintomas visuais de HLB e detecção de CLas por PCR e Rt-PCR

As plantas de laranja 'Hamlin', 'Natal', 'Pêra' e 'Valência' contendo o gene *attA*, utilizadas nos experimentos apresentaram desenvolvimento e fenótipo normais durante todo o experimento, semelhante ao observado em plantas não transgênicas.

A eficiência total de pegamento das enxertias dos borbulhões foi de, em média, 91%, sendo, 94% para plantas de laranja 'Hamlin', 92% para laranja 'Natal', 89% para laranja 'Pêra' e 89% para laranja 'Valência'.

Algumas plantas apresentaram o primeiro sintoma de HLB, mosqueado de intensidade leve (m1), 4 meses após a inoculação. Outras não apresentaram sintomas ou os mesmos não corresponderam ao esperado para HLB, gerando dúvidas (D) se realmente eram sintomas de HLB. Oito meses após a inoculação, outros sintomas relacionados ao HLB foram registrados em

diferentes intensidades e em um número maior de plantas. A detecção de CLas por PCR, para a maioria das plantas analisadas, corroborou com resultados de sintomas observados, apresentando detecção positiva para CLas (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Para laranja ‘Hamlin’, todas as plantas com sintomas de HLB apresentaram detecção positiva para CLas por PCR e Rt-qPCR. Os eventos H8 e H11 apresentaram menor título bacteriano estimado de CLas por Rt-qPCR e também, menor severidade de sintomas quando comparados com as plantas não transgênicas (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação

Eventos ‘Hamlin’	n° plantas ^a	Sintomas ^b		PCR ^d	
		4 meses	8 meses	4 meses ^e	8 meses
Não transgênica	4	4 (m1)	3 (m3), 1 (m2), 3 (Mn3), 1 (Mn2)	4	4
H1	4	3 (-), 1 (m1)	2 (-), 1 (m3), 1 (m2), 1 (Mn3), 1 (c)	1	2
H2	4	2 (-), 2 (m1)	2 (-), 2 (m3)	2	2
H3	4	2 (-), 2 (m1)	1 (-), 2 (m3), 1 (Mn3), 1 (Mn2)	4	4
H4	4	2 (-), 1 (m1), 1 (D)	1 (-), 1 (m3), 1 (m2), 1 (Mn3), 1 (Fe)	1	4
H5	4	2 (m1), 2 (D)	1(-), 2 (m3), 1 (m2), 1 (Mn2), 1 (Mn1)	1	3
H6	3	2 (m1), 1 (D)	1 (-), 2 (m2), 1 (Mn2)	2	2
H7	4	2 (m1), 2 (D)	1 (m3), 1 (m2), 1 (m1), 1 (Mn3), 2 (Mn2), 1 (Fe)	4	4
H8	4	3 (m1), 1 (D)	1 (m2), 3 (m1), 1 (Mn3), 2 (Mn2), 1 (c)	4	4
H9	4	2 (-), 2 (m1)	1 (-), 1 (m1), 2 (m2), 1 (Mn3)	2	3
H10	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	1 (-), 2 (m3), 1 (m2), 2 (Mn2)	2	3
H11	4	4 (m1)	3 (m2), 1 (m1), 1 (Mn2), 2 (Mn1)	4	4
H12	4	4 (-)	2 (-), 2 (m1), 1 (Mn2)	1	2
Controles não inoculados	25	25 (-)	25 (-)	0	0

a = n° plantas inoculadas; b = n° plantas sintomáticas e entre parênteses sintomas observados: m = mosqueado Mn = deficiência de Mn (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); c = sintoma de clorose; D = dúvida se sintoma de HLB; Fe = deficiência de Fe; (-) = sem sintomas; d = n° amostras com diagnóstico positivo para CLas; e = para análise da PCR 4 meses após inoculação, realizou-se “pool” das amostras que apresentaram sintomas semelhantes.

Para laranja ‘Natal’, todas as plantas que apresentaram sintomas de HLB tiveram detecção positiva para CLas por PCR e Rt-qPCR. O evento N9 apresentou menor intensidade de sintomas quando comparado com as plantas não transgênicas. Entretanto, com relação ao título bacteriano

estimado de CLas, apresentou valores semelhantes aos observados nas plantas não transgênicas (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Natal’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação

Eventos ‘Natal’	n° plantas ^a	Sintomas ^b		PCR ^d	
		4 meses	8 meses	4 meses ^e	8 meses
Não transgênica	4	2 (-), 2 (m1)	1 (-), 2 (m3), 1 (m2), 1 (Mn3), 1 (Mn2)	2	3
N1	4	1 (-), 3 (m1)	2 (m3), 1 (m2), 1 (m1), 1 (Mn3), 1 (Mn2)	4	4
N4	4	3 (-), 1 (m1)	2 (-), 1 (m3), 1 (m2), 1 (Mn3), 1 (Mn2)	2	2
N5	4	3 (-), 1 (m1)	4 (m3), 2 (Mn2)	4	4
N8	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	1 (-), 3 (m3), 1 (Mn3), 2 (Mn2)	3	3
N9	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	1 (-), 2 (Mn2), 1 (Mn1), 1 (Mn2), 1 (Mn1)	0	3
Controles não inoculados	12	12 (-)	12 (-)	0	0

a = n° plantas inoculadas; b = n° plantas sintomáticas e entre parênteses sintomas observados: m = mosqueado Mn = deficiência de Mn (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); D = dúvida se sintoma de HLB; (-) = sem sintomas; d = n° amostras positivas; e = para análise da PCR 4 meses após inoculação, realizou-se “pool” das amostras que apresentaram sintomas semelhantes.

Todas as plantas transgênicas de laranja ‘Pêra’ que apresentaram sintomas de HLB tiveram detecção positiva para CLas por PCR e Rt-qPCR. Cinco dos seis eventos de laranja ‘Pêra’ avaliados (P7, P8, P10, P11 e P15), apresentaram menores títulos bacterianos estimados de CLas por Rt-qPCR e, conseqüentemente, maiores valores de C_T , do que as plantas não transgênicas. No evento P11 registrou-se também menor intensidade de sintomas quando comparado com as plantas não transgênicas (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Pêra’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação

Eventos ‘Pêra’	n° plantas ^a	Sintomas ^b		PCR ^d	
		4 meses	8 meses	4 meses ^e	8 meses
Não transgênica	4	3 (-), 1(m1)	1 (-), 1 (m3), 2 (m2), 1 (Mn3), 1 (Fe), 1 (Zn)	1	3
P6	4	1 (-), 3 (m1), 1 (c)	1 (-), 2 (m3), 2 (Mn3), 1 (Fe), 1 (c)	3	3
P7	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	2 (-), 2 (m3), 1 (Mn3), 1 (Mn2), 1 (Zn)	0	2
P8	4	3 (m1), 1 (D)	1 (-), 2 (m3), 1 (m2), 2 (Mn3), 1 (c)	0	3
P10	4	1 (-), 3 (m1)	2 (m3), 2 (m2), 4 (Mn3)	4	4
P11	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	1 (-), 2 (m2), 1 (D), 1 (c)	2	2
P15	4	3 (-), 1 (m1)	2 (m3), 1 (m1), 2 (Mn3), 1 (Mn2)	4	4
Controles não inoculados	14	14 (-)	14 (-)	0	0

a = n° plantas inoculadas; b = n° plantas sintomáticas e entre parênteses sintomas observados: m = mosqueado Mn = deficiência de Mn (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); c = sintoma de clorose; D = dúvida se sintoma de HLB; Fe = deficiência de Fe; Zn = deficiência de Zn; (-) = sem sintomas; d = n° amostras positivas; e = para análise da PCR 4 meses após inoculação, realizou-se “pool” das amostras que apresentaram sintomas semelhantes.

Todas as plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ que apresentaram sintomas de HLB tiveram detecção positiva para CLas por PCR e Rt-qPCR. O evento V18 apresentou menor intensidade de sintomas e título estimado de CLas, por Rt-qPCR, similar ao verificado em plantas não transgênicas. O evento V10 apresentou menor título estimado de CLas porém, com intensidade de sintomas semelhante aos observados nas plantas não transgênicas (Tabela 4 e Figura 3).

Tabela 4 – Sintomas foliares de HLB e detecção de CLas por PCR em plantas de laranja ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas por borbulhões infectados, 4 e 8 meses após inoculação

Eventos ‘Valência’	n° plantas ^a	Sintomas ^b		PCR ^d	
		4 meses	8 meses	4 meses ^e	8 meses
Não transgênica	4	1 (-), 3 (m1)	2 (m3), 2 (m1), 2 (Mn3), 2 (Mn2)	3	4
V1	4	3 (m1), 1 (D)	1 (-), 2 (m1), 3 (Mn2)	3	3
V2	4	1 (-), 3 (m1)	1 (-), 2 (m2), 1 (Mn3), 2 (Mn2), 1 (c)	3	3
V3	4	4 (m1)	2 (m3), 1 (m2), 1 (m1), 1 (c)	4	4
V4	4	4 (-)	2 (-), 1 (m3), 2 (Fe)	0	2
V7	4	1 (-), 3 (m1)	1 (-), 2 (m3), 1 (m2), 1 (Mn2), 2 (Mn1)	3	4
V8	4	4 (-)	1 (-), 1 (m3), 2 (m2), 1 (Mn2)	3	3
V10	4	4 (m1)	3 (m3), 3 (Mn3)	4	4
V11	2	2 (m1)	2 (m3), 1 (Mn3)	2	2
V12	4	4 (m1)	2 (m3), 2 (m2), 2 (Mn3), 1 (Mn2)	3	4
V13	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	2 (m3), 1 (m2), 1 (Mn3), 1 (Mn2), 1 (D), 1 (c)	3	3
V15	4	3 (m1), 1 (D)	1 (-), 1 (m3), 1 (m2), 2 (Mn3), 1 (Mn2), 1 (c)	3	3
V16	4	4 (m1)	1 (Mn3), 3 (c)	4	4
V17	4	1 (-), 3 (m1)	4 (m3), 4 (Mn3), 2 (c)	3	4
V18	4	1 (-), 2 (m1), 1 (D)	2 (-), 1 (m1), 1 (m2), 2 (Mn2)	2	2
V19	4	4 (m1)	1 (m3), 2 (m2), 1 (m1), 1 (Mn3), 3 (Mn2), 1 (c)	4	4
V20	4	4 (m1)	1 (m3), 3 (m2), 3 (Mn3), 1 (Mn2), 1 (c)	4	4
Controles não inoculados	33	33 (-)	33 (-)	0	0

a = n° plantas inoculadas; b = n° plantas sintomáticas e entre parênteses sintomas observados: m = mosqueado Mn = deficiência de Mn (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); c = sintoma de clorose; D = dúvida se sintoma de HLB; Fe = deficiência de Fe; (-) = sem sintomas; d = n° amostras positivas; e = para análise da PCR 4 meses após inoculação, realizou-se “pool” das amostras que apresentaram sintomas semelhantes.

A detecção de CLas por PCR não foi positiva para todas as plantas, 8 meses após a inoculação (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Este resultado foi confirmado por Rt-qPCR (Figura 3), em que a média dos valores de Log₁₀ (células bacterianas g⁻¹ por folha) e de C_T foi obtida das mesmas plantas que apresentaram detecção positiva para CLas por PCR. Para a análise Rt-qPCR o menor e o maior valores de C_T obtidos foram 22,7 e 35,5.

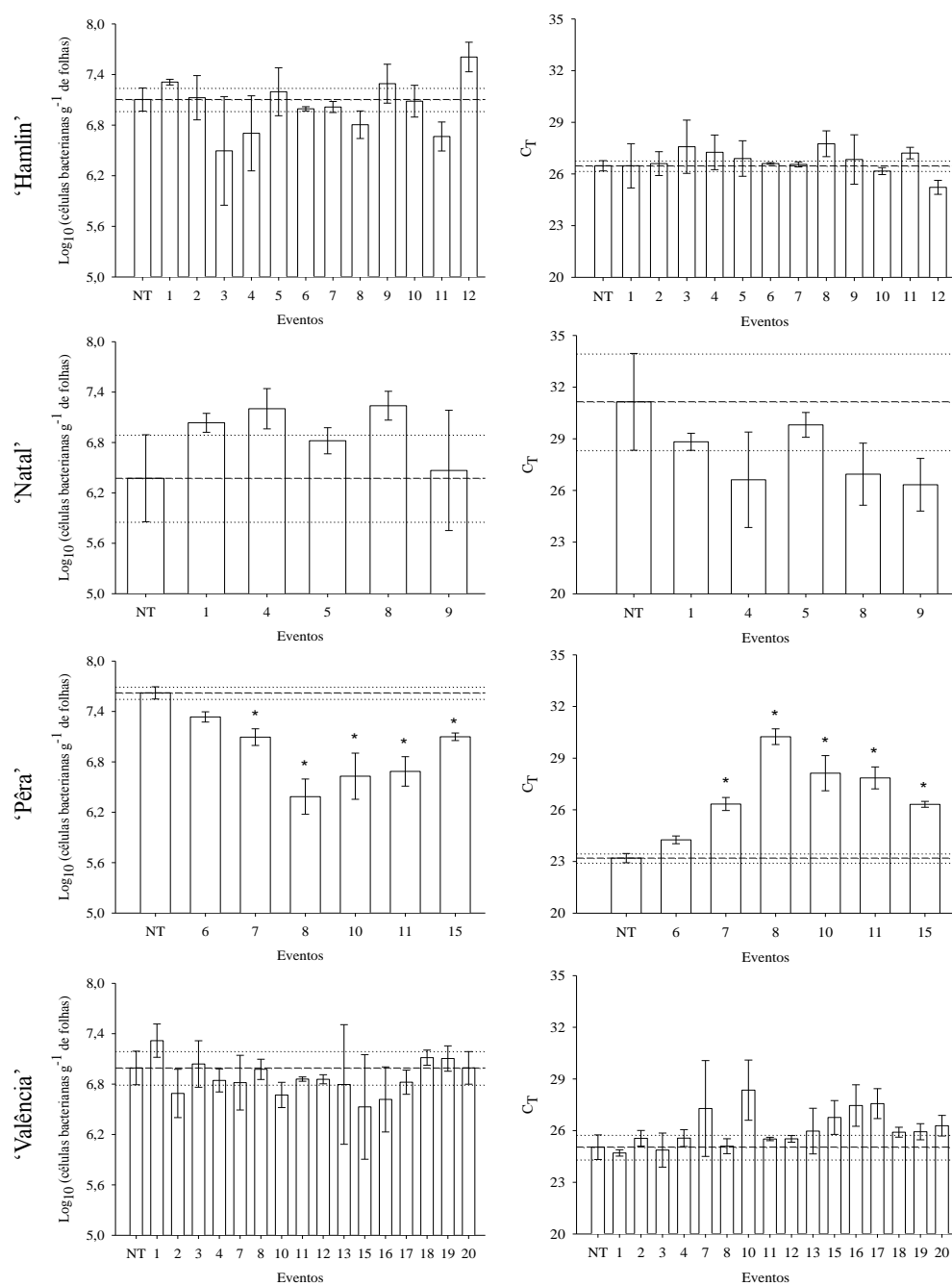


Figura 3 - Quantificação de CLAs por Rt-qPCR em laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA*, inoculadas através de borbulhões infectados, 8 meses após inoculação. Log_{10} (células bacterianas g^{-1} de folha) = média dos valores obtidos do título bacteriano estimado de CLAs utilizando amostras de folhas. C_T = média dos valores obtidos do Ciclo *Threshold*. Valor médio obtido de duas repetições: tratamentos H1, H2, H6, H12, N4, P7, P11, V4, V11, V18; de três repetições: tratamentos H5, H9, H10, ‘Natal’ NT, N8, N9, ‘Pêra’ NT, P6, P8, V1, V2, V8, V13, V15; de quatro repetições: demais tratamentos. Barra vertical corresponde ao erro padrão da média. Linhas horizontais correspondem aos valores de limites superiores, médios e inferiores obtidos pelas plantas não transgênicas. NT = não transgênica. * difere da planta não transgênica pelo teste Dunnett (5%). Quatro experimentos independentes, um para cada cultivar

Suspeitou-se que o método de inoculação usado neste trabalho (enxertia de borbulhão infectado) poderia ser um método superestimado e não estar permitindo avaliar corretamente a resistência dos materiais transgênicos. Além da possível alta quantidade de CLas quando comparada com a que deve ocorrer no inseto vetor, no borbulhão, a bactéria deve estar constantemente se multiplicando e, com a ligação direta floema do borbulhão-floema da planta inoculada, deve haver um constante movimento de CLas da fonte do inóculo para a planta inoculada. Visando minimizar este problema potencial, realizou-se uma poda abaixo do borbulhão nas plantas que apresentaram sintomas de HLB, 8 meses após a inoculação. Os controles não inoculados também foram podados na mesma altura da poda realizada nas plantas inoculadas. As novas brotações surgiram cerca de quinze dias após a poda e os brotos novos de todas as plantas inoculadas, tanto transgênicas como não transgênicas, apresentaram clorose e sintomas de deficiência mineral mais severos do que os registrados antes da poda. Nenhum sintoma de HLB foi observado nas plantas controles não inoculadas.

Em algumas plantas transgênicas (sendo, 15% para laranja 'Hamlin', 8% para laranja 'Natal', 14% para laranja 'Pêra' e 2,9% para laranja 'Valência') não foram observados sintomas de HLB e a detecção de CLas por PCR foi negativa 8 meses após a inoculação, mesmo não sendo observada a morte do borbulhão. Para verificar se isto ocorreu devido à resistência destas plantas ao HLB ou devido à falha na inoculação proveniente da utilização de borbulhões não infectados (devido à distribuição heterogênea da bactéria na planta), os borbulhões foram retirados destas plantas e analisados por PCR. Todos os borbulhões coletados e analisados destas plantas tiveram detecção negativa para CLas. Realizou-se então, uma outra enxertia para nova tentativa de inoculação de CLas nestas plantas. Borbulhões coletados de plantas do próprio experimento, contaminadas com CLas, foram utilizados.

Quatro meses após essa nova enxertia, verificou-se o pegamento de 47% dos borbulhões e sintomas de HLB em todas as plantas que apresentaram pegamento do borbulhão, demonstrando assim que, possivelmente, estas plantas não foram inoculadas de forma eficiente anteriormente. O restante das plantas, ou seja, 53% (sendo, 50% para laranja 'Hamlin', 60% para laranja 'Natal', 33% para laranja 'Pêra' e 50% para laranja 'Valência') apresentaram morte dos borbulhões e não foram observados sintomas de HLB. Estas informações indicam que, as plantas que não apresentaram sintomas de HLB e que tiveram detecção negativa para CLas, não foram inoculadas devido a utilização de borbulhões não infectados ou devido ao não pegamento do borbulhão.

4.2.2 Avaliação da resistência de plantas de laranja doce contendo o gene *attA* à CLas através de inoculação por psilídeos infectivos

4.2.2.1 Avaliação dos sintomas visuais de HLB e detecção de CLas por PCR e Rt-PCR

A avaliação de sintomas de HLB assim como a detecção da bactéria por PCR nas plantas contendo ou não o gene *attA*, ocorreu 8 e 12 meses após a inoculação. O principal sintoma observado em folhas destas plantas foi o mosqueado com intensidades moderada e severa (m2 e m3). Algumas vezes, ocorreram dúvidas (D) se os sintomas observados estavam realmente relacionados ao HLB (Tabela 5).

De um total de 232 plantas inoculadas, 21 apresentaram sintomas de HLB com CLas sendo detectada por PCR em apenas 8, 12 meses após o inoculação. As laranjas ‘Hamlin’ e ‘Natal’ apresentaram menor número de plantas sintomáticas do que as laranjas ‘Pêra’ e ‘Valência’. Também, para as laranjas ‘Hamlin’ e ‘Natal’, a detecção de CLas por PCR foi negativa, com exceção do evento N5, que apresentou detecção positiva para CLas. Algumas plantas de laranja ‘Pêra’ apresentaram sintomas de HLB 12 meses após a inoculação. Entretanto, a detecção de CLas foi negativa por PCR para todas as plantas (Tabela 5).

Dez eventos de laranja ‘Valência’ apresentaram sintomas de HLB 12 meses após a inoculação. Para sete plantas, a detecção de CLas foi positiva por PCR (Tabela 5). Interessante observar que, enquanto a maioria das plantas não apresentaram sintomas de HLB 12 meses após a inoculação, duas plantas do evento V12 apresentaram sintomas, 4 e 6 meses após a inoculação. O principal sintoma foi o mosqueado severo (m3), distribuído por toda a planta. Para estas plantas, a detecção de CLas foi positiva por PCR, já no momento em que os primeiros sintomas haviam sido observados.

Tabela 5 – Sintomas foliares e detecção de CLas por PCR, 8 e 12 meses após inoculação por *D. citri* em plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA*

Eventos	n° plantas ^a	Sintomas ^b		PCR ^d	
		8 meses	12 meses	8 meses	12 meses ^e
‘Hamlin’					
Não transgênica	5	5 (-)	5 (-)	0	0
H1	6	6 (-)	6 (-)	0	0
H2	9	7 (-), 2 (D), 1 (Fe)	9 (-)	0	0
H3	7	5 (-), 2 (D)	7 (-)	0	0
H4	10	8 (-), 2 (D)	10 (-)	0	0
H5	8	5 (-), 3 (D)	8 (-)	0	0
H6	9	6 (-), 3 (D)	9 (-)	0	0
H7	7	6 (-), 1 (D), 1 (Fe)	7 (-)	0	0
H8	4	3 (-), 3 (D), 1 (Fe)	4 (-)	0	0
H9	7	3 (-), 4 (D)	7 (-)	0	0
H10	5	5 (-)	5 (-)	0	0
H11	7	5 (-), 2 (D), 1 (Fe), 1 (Mn)	7 (-)	0	0
H12	7	6 (-), 1 (D)	7 (-)	0	0
Controles não inoculados	26	26 (-)	26 (-)	0	0
‘Natal’					
Não transgênica	7	7 (-)	6 (-), 1 (D)	0	0
N1	7	6 (-), 1 (D)	7 (-)	0	0
N4	8	8 (-)	7 (-), 1 (D)	0	0
N5	5	5 (-)	4 (-), 1 (D)	0	1
N8	3	3 (-)	3 (-)	0	0
N9	8	8 (-)	8 (-)	0	0
Controles não inoculados	12	12 (-)	12 (-)	0	0
‘Pêra’					
Não transgênica	1	1 (-)	1 (-)	0	0
P6	7	7 (-)	2 (-), 3 (m3), 2 (D)	0	0
P7	6	6 (-)	3 (-), 1 (m3), 2 (D)	0	0
P8	7	7 (-)	3 (-), 2 (m3), 2 (D), 1 (c)	0	0
P10	6	6 (-)	4 (-), 2 (m3)	0	0
P11	1	1 (-)	1 (-)	0	0
P15	4	4 (-)	2 (-), 1 (m3), 1 (D)	0	0
Controles não inoculados	12	12 (-)	12 (-)	0	0

Tabela 5 – Sintomas foliares e detecção de CLas por PCR, 8 e 12 meses após a inoculação por *D. citri* em plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA*

Eventos	n° plantas ^a	Sintomas ^b		(conclusão)	
		8 meses	12 meses	8 meses	12 meses ^c
		‘Valência’			
Não transgênica	5	5 (-)	5 (-)	0	0
V1	4	3 (-), 1 (D)	4 (-)	0	0
V2	6	5 (-), 1 (m2), 1 (Fe)	1 (-), 2 (m3), 2 (D), 1 (c)	1	1
V7	7	5 (-), 1 (m3), 1 (Fe), 1 (D)	3 (-), 2 (m3), 2 (D), 1 (c)	1	1
V8	6	6 (-)	5 (-), 1 (D)	0	0
V10	3	3 (-)	2 (-), 1 (m3), 1 (c)	0	0
V12*	6	3 (-), 2 (m3), 1 (m2), 2 (Mn3), 1 (Zn), 1 (Fe)	2 (-), 2 (m3), 2 (m2), 2 (c)	3	3
V13	2	2 (-)	1 (-), 1 (D)	0	0
V15	2	2 (-)	2 (D)	0	0
V16	8	4 (-), 1 (m3), 1 (Mn3), 1 (Fe), 3 (D)	4 (-), 2 (m2), 1 (Mn3), 2 (D)	1	1
V17	7	5 (-), 2 (D)	6 (-), 1 (D), 1 (Mn)	1	1
V18	6	5 (-), 1 (D)	2 (-), 4 (D)	0	0
V19	7	5 (-), 2 (D)	3 (-), 1 (m2), 3 (D)	0	0
V20	2	2 (-)	2 (D)	0	0
Controles não inoculados	28	28 (-)	28 (-)	0	0

Quatro experimentos independentes, um para cada cultivar.

a = n° plantas inoculadas; b = n° plantas sintomáticas e entre parênteses sintomas observados: m = mosqueado (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); Mn = deficiência de Mn (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); c = sintoma de clorose; D = dúvida se sintomas de HLB; Fe = deficiência de Ferro; Zn = deficiência de Zn; (-) = sem sintomas; d = n° amostras positivas; e = para análise da PCR 12 meses após inoculação foi realizado “pool” das amostras que apresentavam sintomas semelhantes; f = uma repetição da planta V12 com sintomas desde 4 meses e outra 6 meses após a inoculação.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, com relação ao baixo número de plantas sintomáticas e com detecção positiva para CLas por PCR, realizou-se uma segunda análise para detecção CLas 17 a 18 meses após a inoculação. Esta detecção foi realizada por Rt-PCR em *spots* de pecíolos foliares em membrana. Além disso, utilizou-se do mesmo procedimento para verificar se os psilídeos utilizados na inoculação continham CLas. Para estas análises, apenas algumas plantas das cultivares ‘Hamlin’ e ‘Valência’ foram selecionadas. Para a análise Rt-PCR a partir de spots, o menor e o maior valores de C_T obtidos foram 19,9 e 43,7.

Todas as plantas de laranja ‘Hamlin’ apresentaram detecção negativa de CLas por Rt-PCR corroborando os resultados observados anteriormente por PCR (Tabelas 5 e 6). Com relação aos

psilídeos, o percentual de indivíduos contendo CLas utilizados por planta variou de 0 a 90%. Mesmo em plantas em que se empregaram psilídeos com altos percentuais de presença de CLas (70 a 90%), e com baixa taxa de mortalidade (1,6% ao final do PAI), a inoculação não foi bem sucedida.

Tabela 6 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranja ‘Hamlin’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 17 a 18 meses após inoculação e de *spot* dos psilídeos utilizados para inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação

Eventos	Repetições	Rt-PCR		% psilídeos infectivos
		C _T de <i>Spot</i> de folhas	C _T de <i>Spot</i> de psilídeos (valor médio de 9 ou 10 indivíduos e entre parênteses menor e maior valores detectados)	
Não transgênica	1	nd	34,9 (31,3 – 37,1)	50
	2	nd	33,2 (33,2 – 33,2)	10
	3	nd	32,9 (26,4 – 38,2)	70
	4	nd	33,4 (30,3 – 38,4)	70
	5	nd	35,1 (29,9 – 37,9)	50
				Média 50
H3	1	nd	nd	0
	2	nd	31,7 (27,6 – 34,5)	50
	3	nd	nd	0
	4	nd	34,5 (30,6 – 40,7)	70
	5	nd	36,4 (35,4 – 37,5)	20
	6	nd	31,3 (28,3 – 32,9)	30
	7	nd	nd	0
				Média 24
H8	1	nd	34,4 (29,6 – 42,6)	90
	2	nd	nd	0
	3	nd	39,3 (37,7 – 41,0)	20
	4	nd	nd	0
				Média 28
H11	1	nd	35,7 (34,1 – 37,0)	40
	2	nd	36,3 (32,5 – 38,8)	56
	3	nd	nd	0
	4	nd	nd	0
	5	nd	33,6 (25,4 – 43,7)	80
	6	nd	nd	0
	7	nd	nd	0
				Média 25
H12	1	nd	35,6 (30,3 – 41,9)	56
	2	nd	nd	0
	3	nd	34,6 (29,5 – 39,5)	50
	4	nd	nd	0
	5	nd	34,0 (29,6 – 41,3)	44
	6	nd	35,5 (34,3 – 37,2)	56
	7	nd	32,0 (26,2 – 37,8)	50
				Média 37

C_T = média dos valores do Ciclo *Threshold* da Rt-PCR;
nd = não determinado.

Para laranja ‘Valência’, os resultados de detecção de CLas por Rt-PCR, a partir de *spot* de folhas, foram semelhantes aos resultados obtidos por PCR. A maioria das plantas que tiveram detecção positiva para CLas por PCR também tiveram diagnóstico positivo para CLas por Rt-PCR, a partir de *spot* de folhas, com exceção de uma planta do evento V7 (repetição 2). Esta planta apresentou detecção positiva para CLas apenas por PCR (Tabelas 5 e 7).

O percentual de psilídeos contendo CLas utilizados por planta foi de 0 a 100% a partir da detecção por *spots*. Para as plantas de laranja ‘Valência’ nas quais foi confirmada a inoculação de CLas, verificou-se relação deste resultado com o percentual de indivíduos contendo CLas utilizados para a inoculação. Para as plantas inoculadas, verificou-se que, no mínimo, 67% dos psilídeos utilizados (do grupo de 10 psilídeos utilizados) continham CLas (Tabela 7). Ao final do PAI verificou-se a morte de 5,5% dos psilídeos utilizados para inoculação.

Tabela 7 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranja ‘Valência’ contendo ou não o gene *attA* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 17 a 18 meses após inoculação e de *spot* dos psilídeos utilizados para inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação

Eventos	Repetições	Rt-PCR		% psilídeos infectivos
		C _T de <i>Spot</i> de folhas	C _T de <i>Spot</i> de psilídeos (valor médio de 7 a 10 indivíduos e entre parênteses menor e maior valor detectado)	
Não transgênica	1	nd	36,9 (32,9 – 40,9)	22
	2	nd	34,3 (30,1 – 37,9)	100
	3	nd	31,3 (27,0 – 36,2)	60
	4	nd	31,9 (29,8 – 33,3)	71
	5	nd	32,1 (23,7 – 35,8)	50
				Média 61
V2	1	29,3	29,9 (19,9 – 40,8)	100
	2	nd	nd	0
	3	nd	31,9 (28,9 – 34,4)	44
	4	nd	39,0 (31,7 – 44,5)	44
	5	nd	36,6 (36,6 – 36,6)	11
	6	nd	34,1 (30,8 – 41,4)	56
				Média 43
V7	1	nd	35,0 (35,0 – 35,0)	10
	2	nd	35,7 (34,3 – 36,6)	38
	3	nd	33,5 (30,7 – 36,8)	30
	4	nd	34,1 (30,7 – 36,7)	40
	5	nd	39,8 (39,8 – 39,8)	10
	6	nd	36,2 (36,2 – 36,2)	11
	7	nd	38,1 (38,1 – 38,1)	10
				Média 21
V12	1	30,2	32,2 (23,5 – 39,0)	100
	2	nd	30,2 (23,7 – 35,4)	30
	3	29,8	31,4 (26,3 – 33,5)	80
	4	41,5	33,1 (30,1 – 36,5)	100
	5	nd	33,2 (31,3 – 38,0)	40
	6	nd	30,4 (23,3 – 35,6)	90
	7	nd	nd	0
				Média 63
V16	1	32,3	34,6 (32,4 – 36,4)	75
	2	nd	29,1 (23,8 – 34,4)	20
	3	nd	34,9 (30,5 – 37,8)	50
	4	nd	34,3 (30,8 – 43,6)	70
	5	nd	30,5 (27,3 – 32,7)	40
	6	nd	35,8 (30,0 – 43,7)	50
	7	nd	nd	0
	8	nd	32,8 (30,8 – 35,8)	30
				Média 42
V17	1	nd	33,1 (30,2 – 37,2)	40
	2	nd	31,6 (24,7 – 34,7)	70
	3	nd	32,8 (28,4 – 35,2)	50
	4	nd	31,5 (26,9 – 39,9)	40
	5	nd	35,4 (31,8 – 37,6)	50
	6	nd	32,7 (27,2 – 35,5)	60
	7	39,4	31,6 (24,2 – 37,6)	67
				Média 54

C_T = média dos valores do Ciclo *Threshold* da Rt-PCR;
 nd = não determinado.

4.2.3 Avaliação da resistência de plantas de laranja doce contendo o gene *hrpN* à CLas através de inoculação por psilídeos infectivos

4.2.3.1 Avaliação dos sintomas visuais de HLB e detecção de CLas por PCR e Rt-PCR

A avaliação dos sintomas de HLB e a detecção de CLas em laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *hrpN* foi realizada 8 e 12 meses após a tentativa de inoculação de CLas por psilídeos infectivos.

O desenvolvimento das plantas transgênicas foi similar ao das plantas não transgênicas, para a maioria das plantas avaliadas, sem qualquer alteração no fenótipo das mesmas durante o período de realização dos experimentos. A única exceção ocorreu para laranja ‘Valência’, em que as plantas do evento V6 apresentaram folhas menores quando comparadas com o tamanho das folhas de plantas não transgênicas.

Não foram observados sintomas de HLB para as três cultivares, com exceção de uma única planta não transgênica, que apresentou o sintoma mosqueado moderado (m2) 4 meses após a inoculação. Esta também foi a única planta que apresentou detecção positiva para CLas por PCR (Tabela 8).

Tabela 8 – Sintomas foliares e detecção de CLas por PCR em plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *hrpN* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 8 e 12 meses após inoculação

Eventos	n° plantas ^a	Sintomas ^b		PCR ^c	
		8 meses	12 meses	8 meses	12 meses ^d
‘Hamlin’					
Não transgênica	5	4 (-), 1 (m2) ^e	4 (-), 1 (m2)	1	1
H5	5	5 (-)	5 (-)	0	0
Controles não inoculados	2	2 (-)	2 (-)	0	0
‘Natal’					
Não transgênica	5	5 (-)	4 (-), 1 (D)	0	0
N4	5	5 (-)	5 (-)	0	0
N6	5	5 (-)	5 (-)	0	0
Controles não inoculados	2	2 (-)	2 (-)	0	0
‘Valência’					
Não transgênica	5	5 (-)	5 (-)	0	0
V6	5	5 (-)	5 (-)	0	0
V8	5	5 (-)	5 (-)	0	0
Controles não inoculados	2	2 (-)	2 (-)	0	0

Três experimentos independentes, um para cada cultivar.

a = n° plantas inoculadas; b = n° plantas sintomáticas; entre parênteses sintomas observados: m = mosqueado (1, 2, 3 = leve, moderado e severo, respectivamente); D = dúvida se sintomas de HLB; (-) = sem sintomas;

c = n° amostras positivas; d = para análise da PCR 12 meses após inoculação foi feito “pool” das amostras que apresentavam sintomas e semelhantes; e = planta com sintomas desde 4 meses após inoculação.

Para complementar e melhor interpretar os resultados obtidos anteriormente, com relação ao baixo número de plantas sintomáticas e com detecção positiva para CLas por PCR, realizou-se a análise de *spot* de folhas para detectar a bactéria por Rt-PCR, 15 meses após a inoculação por psilídeos. Além disso, para verificar se os psilídeos utilizados na inoculação continham CLas, detectou-se a bactéria CLas nos mesmos a partir de *spot* de psilídeos.

Os resultados de detecção de CLas obtidos por Rt-PCR corroboram com os verificados por PCR. Apenas uma planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica apresentou detecção positiva para CLas por Rt-PCR utilizando-se *spot* de folhas. Para esta planta, verificou-se também, através da análise de *spot* de psilídeos por Rt-PCR, que um maior número de psilídeos infectivos foi utilizado para a inoculação (80%) (Tabela 9). Para a análise Rt-PCR a partir de spots, o menor e o maior valores de C_T obtidos foram 19,4 e 43,6.

O percentual de psilídeos contendo CLas por planta utilizados na inoculação variou de 20 a 80% para laranja ‘Hamlin’, de 22 a 80% para laranja ‘Natal’ e de 22 a 60% para laranja

‘Valência’. Para o experimento com plantas de laranja ‘Natal’, mesmo observando os valores de 70 a 80% de psilídeos contendo CLas não foi possível confirmar a inoculação (Tabela 9). Ao final do PAI, verificou-se a morte de 2% dos psilídeos utilizados para inoculação em laranja ‘Hamlin’, 4% em laranja ‘Natal’ e 3,3% em laranja ‘Valência’.

Tabela 9 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *hrpN* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 15 meses após inoculação e de *spot* dos psilídeos utilizados na inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação

Eventos	Repetições	Rt-PCR (C _T)		% psilídeos infectivos
		<i>Spots</i> folhas	<i>Spots</i> psilídeos (valor médio de 8 a 10 indivíduos e entre parênteses menor e maior valores detectados)	
(continua)				
‘Hamlin’				
Não transgênica	1	nd	36,6 (33,5 – 39,7)	20
	2	nd	35,2 (33,7 – 37,4)	50
	3	nd	36,6 (32,8 – 39,2)	30
	4	nd	34,3 (31,9 – 38,4)	30
	5	34,47	28,5 (19,4 – 34,0)	80
				Média 42
H5	1	nd	34,3 (30,5 – 37,5)	67
	2	nd	33,7 (27,5 – 41,3)	40
	3	nd	35,5 (31,2 – 40,1)	30
	4	nd	35,7 (29,3 – 43,6)	60
	5	nd	31,8 (31,5 – 32,1)	22
				Média 44
‘Natal’				
Não transgênica	1	nd	31,1 (24,8 – 36,9)	80
	2	nd	34,2 (32,5 – 36,5)	30
	3	nd	36,4 (30,3 – 43,1)	60
	4	nd	32,7 (29,1 – 35,9)	40
	5	nd	36,5 (33,1 – 38,7)	50
				Média 52
N4	1	nd	33,8 (33,4 – 34,5)	30
	2	nd	33,2 (32,7 – 34,1)	38
	3	nd	31,3 (29,9 – 32,7)	22
	4	nd	31,2 (24,0 – 39,2)	60
	5	nd	30,1 (27,1 – 33,8)	70
				Média 44
N6	1	nd	32,8 (29,2 – 36,9)	44
	2	nd	32,9 (31,7 – 34,1)	44
	3	nd	32,2 (28,4 – 35,8)	60
	4	nd	31,6 (30,0 – 32,8)	70
	5	nd	32,5 (30,0 – 35,0)	22
				Média 48

Tabela 9 – Detecção de CLas por Rt-PCR a partir de *spot* de folhas de plantas de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ contendo ou não o gene *hrpN* inoculadas com CLas, por *D. citri*, 15 meses após inoculação e de *spot* dos psilídeos utilizados na inoculação de cada planta, coletados sete dias após a inoculação

Eventos	Repetições	Rt-PCR (C_T)		(conclusão)
		<i>Spots</i> folhas	<i>Spots</i> de psilídeos (valor médio de 8 a 10 indivíduos e entre parênteses menor e maior valores detectados)	
			‘Valência’	
Não transgênica	1	nd	32,2 (29,9 – 34,6)	22
	2	nd	32,7 (29,7 – 35,2)	30
	3	nd	33,6 (31,6 – 35,0)	44
	4	nd	31,7 (30,4 – 34,5)	40
	5	nd	32,8 (29,6 – 34,9)	40
				Média 35
V6	1	nd	32,9 (26,1 – 36,2)	56
	2	nd	33,2 (29,9 – 36,8)	33
	3	nd	31,1 (28,4 – 33,7)	22
	4	nd	33,4 (30,3 – 36,3)	30
	5	nd	32,6 (30,4 – 36,4)	60
				Média 40
V8	1	nd	33,2 (27,8 – 37,2)	30
	2	nd	38,6 (36,9 – 40,6)	50
	3	nd	36,1 (30,0 – 42,2)	20
	4	nd	32,5 (28,8 – 26,2)	20
	5	nd	32,4 (29,1 – 35,7)	20
				Média 28

C_T = média dos valores do Ciclo *Threshold* da Rt-PCR;
nd = não determinado.

5 DISCUSSÃO

Os genes presentes nas plantas transgênicas utilizadas neste trabalho, *attA* e *hrpN*, têm demonstrado bons resultados com relação à redução da suscetibilidade a outros patógenos de citros (BOSCARIOL et al., 2006; BARBOSA-MENDES et al., 2009; CARDOSO et al., 2010; MENDES et al., 2010). Um dos efeitos conhecidos do peptídeo atacina A, sintetizado a partir do gene *attA*, é sua ação contra bactérias Gram-negativas, causando um aumento na permeabilidade da membrana externa destas bactérias, pela formação de canais nas membranas, além de inibir a síntese protéica (HULTIMARK et al., 1983; CARLSSON et al. 1998).

Neste trabalho, a atacina A pode ter influenciado a capacidade de multiplicação da bactéria do HLB em cinco eventos transgênicos (P7, P8, P10, P11 e P15) de laranja ‘Pêra’, em dois eventos transgênicos (H8 e H11) de laranja ‘Hamlin’ e em um evento transgênico (V10) de laranja ‘Valência’. Estas plantas apresentaram menores títulos bacterianos e, em algumas, redução dos sintomas de HLB, 8 meses após a inoculação por borbulhões infectados, quando comparadas com plantas não transgênicas. A construção gênica contendo o gene *attA* utilizada contém um peptídeo sinal que transporta a atacina A para o apoplasto (BOSCARIOL; 2004), sítio de colonização de muitas bactérias fitopatogênicas (BOVÉ; GARNIER, 2003). No entanto, diferente da maioria das bactérias fitopatogênicas, o sítio de colonização da bactéria do HLB é intracelular (BOVÉ; GARNIER, 2003; KIM et al., 2009). Dessa forma, pode-se sugerir que o peptídeo atacina A possa ter agido, pelo menos, parcialmente contra a bactéria CLas presente nas plantas avaliadas, pois, mesmo que este peptídeo esteja sendo exportado para o apoplasto, verificou-se um possível efeito contra a bactéria, em pelo menos, 8 eventos transgênicos.

Interessante observar que os mesmos eventos empregados neste estudo, embora com ação parcial contra CLas, já haviam influenciado na resposta de laranjas a outras bactérias patogênicas de citros. É o caso do evento P7, que levou a redução da taxa de multiplicação de *X. fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CARDOSO, 2008), e dos eventos H8 e H11 os quais revelaram redução da taxa de multiplicação de *X. citri* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico (BOSCARIOL et al., 2006). A ação da atacina A sobre *X. citri* pv. *citri* foi aparentemente mais efetiva do que sobre CLas ou *X. fastidiosa*. Isto se deve, provavelmente, à localização apoplástica desta bactéria.

Além das duas estratégias para obtenção de plantas cítricas resistentes a patógenos utilizadas neste trabalho (peptídeo antibacteriano e proteína que estimula o sistema de defesa das

plantas) outras estratégias vêm sendo utilizadas como genes maiores de resistência, entre eles o *Xa21* (MENDES et al., 2010), genes que codificam proteínas relacionadas a patogênese como o *PR-5* (FAGOAGA et al., 2001) e genes do próprio genoma do patógeno, baseando-se na resistência derivada do patógeno, como genes da capa protéica do *Citrus tristeza virus* (CTV) (ZANEK et al., 2008; FEBRES et al., 2008; MUNIZ et al., 2011).

Embora muitas destas estratégias sejam promissoras para obtenção de plantas resistentes a doenças bacterianas e fúngicas, os melhores resultados foram obtidos para resistência a vírus (COLLINGE; LUND; THORDAL-CHRISTENSEN, 2008). Os resultados obtidos para enfermidades bacterianas apresentam resistência de forma parcial. Entretanto, ainda que a obtenção de plantas resistentes a patógenos bacterianos seja o ideal, a resistência apenas parcial, como foi obtida para CLas nas plantas contendo a atacina A, pode ter efeito sobre a progressão e manejo do HLB no campo, necessitando de futuras investigações.

Outro importante aspecto a ser levado em conta neste trabalho diz respeito ao método usado na inoculação da bactéria. A enxertia de borbulhão é altamente eficiente em transmitir CLas. Isto se deve provavelmente aos altos títulos bacterianos encontrados neste tecido (TATINENI et al., 2008) quando comparados aos psilídeos, por meio dos quais, no campo, as bactérias do HLB são transmitidas de planta a planta. Mas, por essas razões, considerou-se que este método pode ter sido drástico demais para se avaliar a resistência dos materiais transgênicos. Sendo assim, o psilídeo *D. citri* também foi usado nas inoculações de um segundo lote de plantas. Também foram testadas com este método mais natural de inoculação, plantas contendo o gene *hrpN*.

O gene *hrpN* codifica para a proteína harpina, que está relacionada com mecanismos inespecíficos de defesa em plantas (WEI et al., 1992). Enquanto a atacina age sobre bactérias Gram-negativas, principalmente, a harpina age sobre bactérias, fungos e vírus (PENG et al., 2004; BARBOSA-MENDES et al., 2009). O reconhecimento da harpina em plantas pode ocorrer a partir da ligação da mesma a receptores presentes na membrana (LEE; KLESSIG; NÜRNBERGER, 2001). Após este reconhecimento ocorre uma série de reações em cadeia levando a uma HR que poderá levar até ao estabelecimento da SAR (KONG et al., 2011).

Esta forma de defesa pode ser de extrema importância principalmente para patossistemas complexos como o HLB. Além de se tratar de uma interação planta-patógeno compatível (todas as plantas cítricas são suscetíveis), onde, possivelmente, não há reconhecimento da bactéria CLas

ou ativação de mecanismos de defesa como a HR e SAR, este patógeno é intracelular, como já foi relatado e sua entrada na célula se dá de forma passiva e eficiente pelo vetor *D. citri* (BOVÉ; GARNIER, 2003). A maioria dos processos de reconhecimento de patógenos pelas plantas acontece na membrana plasmática, por receptores específicos presentes neste local, o que pode determinar o sucesso da proteção contra os patógenos (BAKER et al., 2007). Mesmo que em citros houvesse reconhecimento da bactéria do HLB ao nível de membrana, este seria prejudicado pela forma de inoculação que ocorre no campo, aonde o inseto, ao se alimentar, introduz a bactéria diretamente nas células floemáticas.

Dessa forma, a proteína harpina pode ser promissora em proteger as plantas cítricas contra o HLB uma vez que, a partir do reconhecimento desta proteína por receptores de membrana (após sua exportação para o apoplasto), poderá ocorrer ativação de mecanismos de defesa nas plantas, que normalmente não podem ser ativados pela simples presença da bactéria intracelular causadora do HLB. O sucesso desta resposta também está relacionado à escolha do promotor a ser utilizado na construção gênica, para obtenção de plantas transgênicas que sintetizem essa proteína. Promotores induzíveis, como o obtido de batata, *Pgst1*, é uma opção favorável no caso do HLB, uma vez que a ativação deste promotor pode ocorrer pela presença do patógeno e por estresse abiótico (BARBOSA-MENDES et al., 2009). Testes adicionais devem ser realizados para verificar se CLas é capaz de induzir a produção da proteína harpina, assim como, o estresse abiótico provocado por psilídeos no momento da sucção da seiva.

Tanto nos experimentos com plantas contendo o gene *attA* como o gene *hrpN*, inoculadas por meio de psilídeos, poucas plantas tiveram detecção positiva de CLas e sintomas de HLB, 12 meses após a inoculação. Para tentar esclarecer se a inoculação das plantas foi eficiente ou não, uma nova análise de detecção da bactéria CLas foi realizada, a partir da utilização de *spots* de folhas. Também, para verificar se os psilídeos utilizados na inoculação continham a bactéria, detectou-se CLas em *spots* dos psilídeos utilizados para a inoculação.

Os resultados de detecção de CLas obtidos para *spots* de folhas, por Rt-PCR corroboram com os resultados obtidos por PCR, com exceção de um evento, que apresentou detecção positiva para CLas por PCR e negativa por Rt-PCR. A utilização de *spot*, embora tenha diversas vantagens na detecção de vírus (CAMBRA et al., 2000; OSMAN; ROWHANI, 2006; BERTOLINI et al., 2008), pode não ter sido eficiente na detecção de CLas, devido, provavelmente, à pequena quantidade de material usado na obtenção do *spot* e à distribuição

irregular da bactéria nas plantas. Sendo assim, novos testes devem ser realizados para otimização desta técnica para detecção de CLas. Os resultados de detecção da bactéria CLas nos psílídeos, de forma individual, indicam que, possivelmente, muitas plantas nem sequer chegaram a ser inoculadas devido ao baixo percentual de insetos utilizados que continham a bactéria do HLB. Isto pode estar relacionado ao pequeno período de acesso à aquisição (PAA) e à idade dos psílídeos utilizados. Neste trabalho, foram utilizados psílídeos adultos mantidos por apenas três dias em plantas infectadas com HLB para o PAA de CLas. Pelz-Stelinski et al. (2010) verificaram que a eficiência de aquisição de CLas está correlacionada com o tempo de confinamento dos insetos em plantas infectadas e que ninfas (de quarto e quinto ínstars) apresentam maior eficiência de aquisição (acima de 60% com 11 a 15 dias de PAA) do que adultos (0% com 7 dias da PAA e 39% com 35 dias de PAA). Resultados semelhantes foram obtidos por Nascimento (2010). Pelz-Stelinski et al. (2010) verificam também que, embora a aquisição de CLas por ninfas possibilite a transmissão da bactéria pelos mesmos insetos na fase adulta, a concentração de CLas nos insetos adultos diminui com o tempo. No presente trabalho, o período de latência utilizado foi de 25 dias. Como nenhum teste de PCR foi aplicado nos insetos logo após o PAA e no momento da inoculação, não se pode afirmar que este fenômeno também tenha ocorrido com os lotes de insetos usados neste estudo.

6 CONCLUSÕES

- Cinco eventos de laranja ‘Pêra’, dois de laranja ‘Hamlin’ e um de laranja ‘Valência’ contendo o gene *attA*, inoculados com CLas por meio de borbulhões infectados, apresentaram menor concentração da bactéria, indicando uma possível ação do peptídeo atacina A contra CLas. Não foi possível avaliar a resistência destas plantas à CLas com o emprego de psilídeos na inoculação, devido a baixa taxa de transmissão da bactéria do HLB.
- Devido a baixa eficiência de inoculação da bactéria CLas em plantas de laranja doce contendo o gene *hrpN*, não foi possível avaliar a resistência destas plantas à CLas.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to huanglongbing. **HortScience**, Alexandria, v. 46, n. 1, p. 16-22, 2011.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, p. 23-29, 2003.
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes *bacteriopsina (bO)*, *cecropin e gus***. 2005. 76p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SCHINOR, E.H.; PAOLI, L.G.; MENDES, B.M.J.; HARAKAVA, 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**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1623-1628, 2006.
- BAKER, B.; ZAMBRYAKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interaction. **Science**, Washington, v. 276, p. 726-733, 1997.
- BARBOSA-MENDES, J. M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *hrpN* (harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2007. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BARBOSA-MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, p. 109–115, 2009.
- BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE JUNIOR, R.P.; AYRES, A.J., MASSARI, C.A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, greening) visando controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.
- BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, E.; OLMOS, A.; LUIS, A.; VIDAL, E.; PÉREZ-PANADÉS, J.; CAMBRA, M. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, p. 177-188, 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**, Brasília, v. 23, p. 62-66, 2001.

BONANI, J.P. **Caracterização do aparelho bucal e comportamento alimentar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.** 2009. 82 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

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

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* ‘Hamlin’. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 31 p. 530-536, 2006.

BOREJSZA-WYSOCKA, E.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; MALNOY, M. Stable expression and phenotypic impact of attacin E transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period. **BioMed Central Biotechnology**, London, v. 10, n. 41, p. 2-9, 2011.

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

BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo state: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, Malden, v. 59, p. 346-354, 2007.

BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 423-438, 2003.

BOVÉ, J.M.; CALAVAN, E.C.; CAPOOR, S.P.; SCHWARZ, R.E. Influence of temperature on symptoms of California stubborn, South African greening, Indian citrus decline and Philippines leaf mottling diseases. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST CONFERENCE, 6., 1974, Riverside, **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologist, 1974. p. 12-15.

CAMBRA, M.; OLMOS, A.; GORRIS, M.T.; MARROQUÍN, C.; ESTEBAN, O.; GARSEY, S.M.; LLAUGER, R.; BATISTA, L.; PEÑA, I.; MENDOZA, H. Detection of *Citrus Tristeza Virus* by Print Capture and Squash Capture-PCR in plant tissues and single Aphids. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST CONFERENCE, 14., 2000, Riverside. **Proceedings of International Organization of Citrus Virologist Conference.** Riverside: International Organization of Citrus Virologist, 2000. p. 42-49.

CARDOSO, S.C. **Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* Wells et al. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. em plantas transgênicas de *Citrus sinensis* L. Osbeck expressando os genes *atacina A* ou *Xa21*.** 2008. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CARDOSO, S.C.; BARBOSA-MENDES, J.M.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M.L.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the *attacin* A gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 28, p. 185–192, 2010.

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

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

COLETTA-FILHO, H.D.; CARLOS, E.F.; ALVES, K.C.S.; PEREIRA, M.A.R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 53-60, 2010.

COLLINGE, D.B.; LUND, O.S.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants? **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, p. 217-213, 2008.

DAMSTEEGT, V.D.; POSTNIKOVA, E.N.; STONA, A.L.; KUHLMANN, M.; WILSON, C.; SECHLER, A.; SCHAAD, N.W.; BRLANSKY, R.H.; SCHNEIDER, W.L. *Murraya paniculata* and related species as potential host and inoculum reservoirs of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', casual agent of huanglongbing. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 528-533, 2010.

DISTEFANO, G.; MALFA, S.L.; VITALE, A.; LORITO, M.; DENG, Z.; GENTILE, A. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 5, p. 873-879, 2008.

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.; NEGRI, J.R.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 1, p. 1-18.

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

DUAN, Y.X.; FAN, J.; GUO, W.W. Regeneration and characterization of transgenic kumquat plants containing the *Arabidopsis APETALA1* gene. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 273-281, 2010.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-201, 2004.

- ENGSTROM, P.; CARLSSON, A.; ENGSTROM, A.; TAO, Z.-j.; BENNICHI, H. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**, London, v. 3, n. 13, p. 3347-3351, 1984.
- ETXEABERRIA, E.; GONZALEZ, P.; ACHOR, D.; ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia oranges tress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, p. 76-83, 2009.
- FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PENÁ, L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, n.7, v. 2, p. 175-185, 2001.
- FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 07 jul. 2011.
- FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to *Citrus tristeza virus* in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 93–104, 2008.
- FOLIMONOVA, S.Y.; ROBERTSON, C.J.; GARNSEY, S.M.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 1346-1354, 2009.
- FREUD, R.J.; WILSON, W.L. **Statistical methods**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2003. 637 p.
- FUNDECITRUS. **Diaphorina citri**: inseto transmissor do greening. Araraquara, 2009. 7 p.
- GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 1358-1363, 1983.
- GASPAROTO, M.C.G. **Epidemiologia comparativa entre ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ em ambiente controlado**. 2010. 109 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- GENTILE, A.; DENG, Z.; LA MALTA, S.; DIPTERANS, G.; DOMINO, F.; VITALE, A.; PALAZZO, G.; LORETO, M.; TRIBULATION, E. Enhanced resistance to *Home tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. **Plant Breeding**, Westport, v. 126, p. 146—151, 2007.
- GUO, W.; DUAN, Y.; OLIVARES-FUSTER, O.; WU, Z.; ARIAS, C.R.; BURNS, J.K.; GROSSER, J.W. Protoplast transformation and regeneration of transgenic Valencia sweet orange plants containing a juice quality-related pectin methylesterase gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 24, p. 482-486, 2005.

HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. Detection and identification of the two ‘*Candidatus Liberobacter sp.*’ associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 13, p. 373-379, 1999.

HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; ANDERSSON, K.; STEINER, H.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Insect immunity, Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. **The EMBO Journal**, London, v. 2, n. 4, p. 571-576, 1983.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

JAGOEIX, S.; BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 44, p. 379-386, 1994.

JANG, Y.S.; SOHN, S.I.; WANG, M.H. The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. **Planta**, New York, v. 223, p. 449-456, 2006.

KATOH, H.; NALUMPANG, S.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Overexpression of citrus polygalacturonase-inhibiting protein in citrus black rot pathogen *Alternaria citri*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 527-535, 2007.

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

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

KONG, X.; LI, D. Hydrogen peroxide is not involved in HrpN from *Erwinia amylovora* – induced hypersensitive cell death in maize leaves. **Plant Cell Reports**, New York, v. 30, p. 1273-1279, 2011.

LAFLÈCHE, D.; BOVÉ, J.M. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d’orangers atteints de la maladie du greening. **Comptes Rendus de l’Académie des Sciences**, Paris, v. 270, p. 455-465.

LEE, J.; KLESSIG, D.F.; NÜRNBERGER, T. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1079-1093, 2001.

LI, W., LEVY, L.; HARTUNG, J.S. Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 139-144, 2009.

LIMA, A.C. **Insetos do Brasil**: homópteros. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 327 p. (Série Didática, 4).

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

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M.; FERNANDES, N.G.; MARIN, D.R.; BOVÉ, J.M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 257-262, 2009a.

LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 301-306, 2009b.

LOPES, S.A.; FRARE, G.F.; CAMARGO, L.E.A.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; BASSANEZI, R.B.; BEATTIE, G.A.C.; AYRES, A.J. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. **Plant Pathology**, Malden, v. 59, p. 1044-1053, 2010.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.R.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 9, p. 223-227.

MARENGO, S. **Mapeamento genético de tangerina sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao huanglongbing (greening) dos citros**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009.

MASSONIÉ, G., GARNIER, M., BOVÉ, J.M. Transmission of India citrus by *Trioza erytreae* (Del Guercio), the vector of South African greening. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGIST CONFERENCE, 7., 1976, Riverside, **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologist, 1976. p. 18-20.

MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; FARIAS, P.C.M.; BENEDITO, V.A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 37, p. 490-495, 2001.

MENDES, B.M.J.; CARDOSO, S.C.; 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 Pathology**, Leicestershire, v. 59, p. 68-75, 2010.

MIYATA, L.Y., MOURÃO FILHO, F.A.A., SCARPARE FILHO, J.A., ZAMBON, F., BASSAN, M.M., MENDES, B.M.J., HARAKAVA, R. Eficiência de transformação genética de citrange ‘Carrizo’ com duas construções gênicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.1, p. 311-315, 2011.

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

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

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.J. de; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.; FREITAS, W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with *Citrus tristeza virus* (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, DOI: 10.1007/s10535-011-0195-3, 2011. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/504711t1x4w64306/fulltext.pdf>. Acesso em: 15/11/2011.

NASCIMENTO, F.E. **Estudos sobre aquisição e concentração de “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” e “*Candidatus Liberibacter americanus*” em *Diaphorina citri* Kuwayama**. 2010. 87p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NAVA, D.E.; TORRES, M.L.G.; RODRIGUES, M.D.L.; BENTO, J.M.S.; PARRA, J.R.P. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Malden, v. 131, n. 9-10, p. 709-715, 2007.

NEVES, E.M.; BOTEON, M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.R.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 2, p. 21-36.

NIEDZ, R.P.; MCKENDREE, W.L.; SHATTERS JUNIOR, R.G. Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and regeneration of transformed plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 39, p. 586-594, 2003.

OLMOS A., DASÍ M.A., CANDRESSE T., CAMBRA M. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of *Plum pox virus* (PPV) in plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2192-2193, 1996.

OSMAN F., ROWHANI A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 133, p. 130-136, 2006.

- PAOLI, L.G.; CAMARGO, R.L.B.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1663-1666, 2007.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; ZUCCHI, R.A.; GUEDES, J.V.C. Biologia de insetos-praga e vetores. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: IAC, Fundag, 2005. cap. 22, p. 655-687.
- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e a transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research and Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.
- PENG, J.L.; BAO, Z.L.; REN, H.Y.; WANG, J.S.; DONG, H.S. Expression of Harpin_{Xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 10, p. 1048-1055, 2004.
- PELZ-STELINSKI, K.S.; BRLANSKY, R.H.; EBERT, T.A.; ROGERS, M.E. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 5, p. 1531-1541, 2010.
- PEÑA, L.; MARTÍN-TRILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263-267, 2001.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copa. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: IAC, Fundag, 2005. cap. 3, p. 37-66.
- REINKING, O.A. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agricultural**, Manila, v. 8, p. 109-135, 1919.
- RIBEIRO JÚNIOR, J.L.; MELO, A.L.P. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2001. 287 p.
- ROMANO, E. Análise da Integração do DNA pela Técnica de Southern Blot. In: BRASILEIRO, A.C.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-Cernargen, 1998. cap. 14, p. 205-222.
- SANCHES, A.L.; FELIPPE, M.R.; CARMO, A.U.; RUGNO, G.R.; YAMAMOTO, P.T. Eficiência de inseticidas sistêmicos, aplicados em mudas cítricas, em pré-plantio, no controle de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). **BioAssay**, Santo Antônio de Goiás, v. 4, n. 6, p. 1-7, 2009.
- SHAO, M.; WANG, J.; DEAN, R.A.; LIN, Y.; GAO, X.; HU, S. Expression of harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, p. 73-81, 2008.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 89 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SECHLER, A.L.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with huanglongbing. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 480-486, 2009.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomico; Fundag, 2005. cap. 11, p. 319-341.

SILVA, R.P. **Organogênese *in vitro* em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e transformação genética de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) e laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene da replicase do *Marafivirus***. 2008. 102 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, p. 503-517, 1975.

STROBEL, N.E.; JI, C.; GOLAPAN, S.; KUC, J.A.; HE, S.Y. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZ_{PSS} protein. **The Plant Journal**, Malden, v. 9, n. 4, p. 431-439, 1996.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. chap. 3, p. 190-430.

TAKAKURA, Y.; ISHIDA, Y.; INOUE, Y.; TSUTSUMI, F.; KUWATA, S. Induction of hypersensitive response-like reaction by powdery mildew. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, p. 83-89, 2004.

TANAKA, F.A.O.; COLETTA-FILHO, H.D.; ALVES, K.C.S.; SPINELLI, M.O.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Detection of the “*Candidatus Liberibacter americanus*” in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 519, 2007.

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In plant distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. 592-599, 2008.

TAVANO, **Organogênese *in vitro* e transformação genética de limão ‘Volkameriano’ (*Citrus volkameriana*) e laranja azeda (*Citrus aurantium*)**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em

Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

TEXEIRA, D.C.; AYRES, J.; KITAJIMA, E.W., TANAKA, F.A.O.; DANET, L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 107, 2005.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD-JAGOUEIX, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brazil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 139–150, 2008.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1721-1725, 2000.

TYLER, H. L.; ROESCH, L.F.W.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O.; TRIPLETT, E.W. Confirmation of the sequence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and assessment of microbial diversity in huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, p. 1624-1634, 2009.

WEI, Z.M.; LABY, R.J.; ZUMOFF, C.H.; BAUER, D.W.; HE, S.Y.; COLLMER, A.; BEER, S.V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**, Washington, v. 257, p. 85-88, 1992.

WILL, T.; van BEL, A.J.E. Physical and chemical interactions between aphids and plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 729-737, 2006.

YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; COELHO, J.H.C.; XIMENES, N.L.; MARTINS, E.C.; LEITE, A.P.R.; SOUSA, M.C.; ABRAHAO, D.P.; BRAZ, J.D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Homoptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: HUANGLONGBING-GREENING INTERNATIONAL WORKSHOP, 2006, Ribeirão Preto. **Proceedings Huanglongbing-Greening International Workshop**. Ribeirão Preto: Huanglongbing-Greening International Workshop, 2006. p. 96-97.

YAO, J.L.; WUB, J.H. GLEAVE, A.P., MORRISA, B.A.M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, Limerick, v. 133, p. 175-183, 1996.

ZANEK, M.C.; REYES, C.A.; CERVERA, M.; PEÑA, E.J.; VELÁZQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; GRAU, O.; PENA, L.; GARCÍA, 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**, New York, v. 27, p. 57–66, 2008.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZHANG, C.; SHI, H.; CHEN, L.; WANG, X.; LU, B.; ZHANG, S.; LIANG, Y.; LUI, R.; QIAN, J.; SUN, W.; YOU, Z.; DONG, H. Harpin-induced expression and transgenic overexpression of the phloem protein gene *AtPP2-A1* in *Arabidopsis* repress phloem feeding of the green peach aphid *Myzus persicae*. **BioMed Central Plant Biology**, London, v. 11, p. 2-19, 2011.