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

**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*)**

Janaynna Magalhães Barbosa-Mendes

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Agronomia, Área de concentração: Fitopatologia.

Piracicaba
2007

Janaynna Magalhães Barbosa-Mendes
Engenheira Agrônoma

**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*)**

Orientadora:
Profa. Dra. **BEATRIZ M. JANUZZI MENDES**

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutora em
Agronomia, Área de concentração: Fitopatologia.

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Barbosa-Mendes, Janaynna Magalhães

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*) / Janaynna Magalhães Barbosa-Mendes . - - Piracicaba, 2007.

78 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Cancro – Doença de planta 2. Engenharia genética 3. Genes
4. Laranja 5. Resistência genética 6. Xanthomonas I. Título

CDD 634.31

“Os caminhos que conduzem o homem ao saber são tão maravilhosos
quanto o próprio saber.”

Johannes Kepler

À minha família querida pelo apoio, incentivo,
amor dedicado e confiança em mim depositada.

Ao meu amado marido Gabriel Klefenz Mendes
pela compreensão durante os momentos de
ausência, pela paciência e por estar sempre ao meu
lado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por ter tornado tudo possível;

À Profa. Dra Beatriz M. J. Mendes (CENA/USP) pela oportunidade, pela confiança e pela orientação, estando sempre presente nos momentos de decisão;

Ao Prof. Dr. Francisco A. A. Mourão Filho (ESALQ/USP) pela colaboração durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Jorge A. Rezende (ESALQ/USP) pelo auxílio e sugestões na análise de proteína;

Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho pelo suporte na realização dos bioensaios com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*;

Aos Profs do Departamento de Fitopatologia (ESALQ/CENA) por contribuírem para a minha formação e aprendizado;

Ao João Geraldo Brancalion, funcionário do Laboratório de Instrumentação e Informática (CENA/USP), pela colaboração e serviços de computação gráfica;

Ao Sr. José Volpato pela ajuda constante com as plantas transgênicas, pelas aulas de enxertia e de manejo das plantas;

Ao Edvaldo Buriolla, técnico do Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia (ESALQ/USP), pelo auxílio durante as análises;

Aos estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP), Joice K. Banin, Simone Kerbaui, Waner Júnior e Luciana Castelletti, que muito me auxiliaram durante a realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Andréa, Eveline, Vânia, Ana Paula e Pedro, pelo convívio e pelo auxílio sempre que necessário;

Às amigas Liliane, Alessandra e Maria Graziela pelo apoio, amizade e pelas longas discussões “filosóficas” e científicas, sempre presentes no dia-a-dia;

Aos colegas do curso de pós-graduação do Departamento de Fitopatologia (ESALQ/CENA), principalmente ao pessoal do laboratório de Virologia e Bacteriologia Vegetal, Adriana, Stela, Débora, Júlio, Eliane, Ana Paula, Izolda e Luciano;

À amiga Raquel L. Boscariol pela amizade, apoio e disposição para ajudar a resolver dúvidas durante as análises;

À colega Suane Cardoso pela ajuda sempre sincera e constante durante as inoculações e avaliações na realização dos experimentos de cancro cítrico;

Aos colegas do Laboratório de Produção Vegetal (ESALQ/USP), Rosely, Amâncio, Deyse, Alexandra, Evandro e Gustavo pela amizade e companheirismo;

Ao Dr. Steven Vincent Beer, Universidade de Cornell, por ter cedido os vetores de expressão e anticorpo para a realização do trabalho;

A todos Muito Obrigada por tudo!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 A citricultura brasileira.....	15
2.2 O cancro cítrico	17
2.3 Cultura de tecidos e transformação genética em citros.....	22
2.4 Transformação genética de plantas para resistência a doenças.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Material vegetal.....	34
3.2 Vetor de expressão e estirpe de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
3.3 Manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
3.4 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
3.5 Análise das plantas regeneradas.....	37
3.5.1 Teste histoquímico (GUS).....	37
3.5.2 Análises de DNA.....	38
3.5.2.1 PCR.....	38
3.5.2.2 Southern Blot.....	38
3.5.3 Análise de RNA.....	39
3.5.3.1 RT-PCR.....	39
3.5.4 Análise de proteína.....	39
3.5.4.1 Isolamento de proteína total.....	39
3.5.4.2 Western blot.....	40
3.6 Avaliação da resistência ao cancro cítrico.....	42
3.6.1 Propagação das plantas.....	42
3.6.2 Obtenção do inóculo e inoculação com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	42

3.6.3 Avaliação da severidade da doença.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Transformação genética com o gene <i>uidA</i>	44
4.2 Transformação genética com o gene <i>hrpN</i>	47
4.3 Análises moleculares.....	53
4.4 Avaliação da resistência a <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	57
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

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*)

A indústria dos citros é de grande importância econômica e social para o Brasil, que é considerado o maior produtor e exportador de suco concentrado de laranja do mundo. Porém, sérios problemas relacionados a doenças têm afetado a produção e qualidade dos citros. Com o desenvolvimento da engenharia genética e a clonagem de genes relacionados à resistência a doenças em plantas, a transformação genética têm se mostrado uma ferramenta auxiliar a programas de melhoramento genético de citros. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de plantas transgênicas de laranja doce das variedades 'Hamlin', 'Valência', 'Natal' e 'Pêra' expressando o gene *hrpN*, sob o controle do promotor *Pgst1*, induzível pelo patógeno. A avaliação da resposta de plantas transgênicas da variedade 'Hamlin' contra o agente causal do cancro cítrico, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, também foi realizada. Segmentos de epicótilo foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens*, e selecionados em meio de cultura suplementado com canamicina ou gentamicina. A transformação genética foi confirmada por PCR e Southern blot. A transcrição do gene foi avaliada por RT-PCR e a produção da proteína harpina foi analisada por western blot. A eficiência de transformação variou de 2,7 e 6,2% de acordo com a variedade de laranja. Algumas linhagens de plantas transgênicas apresentaram desenvolvimento anormal, não permitindo a realização da análise por Southern blot nem a multiplicação por enxertia. Plantas de laranja 'Hamlin' foram propagadas por enxertia e avaliadas para resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Todas as linhagens apresentaram redução na severidade dos sintomas causados pela bactéria *X. axonopodis* pv. *citri*, avaliados 30 dias após a inoculação.

Palavras-chave: Transformação genética; Gene *hrpN*; Promotor induzível; Laranja; Resistência a doenças; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

ABSTRACT

Sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) genetic transformation with the *hrpN* gene (harpin) and evaluation for citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) resistance

The citrus industry has a great economic and social importance for Brazil, which is considered largest producer and orange juice exporter in the world. However, serious problems related to pathogens have affected citrus production and quality. With the development of genetic engineering and the characterization of genes related with plant disease resistance, the genetic transformation became an important tool in citrus breeding programs. The objective of this work was the production of transgenic plants of four sweet orange cultivars 'Hamlin', 'Valencia', 'Natal' and 'Pera' expressing *hrpN* gene under the control of *Pgst1* inducible promoter. The evaluation of 'Hamlin' sweet orange transgenic plants infected with the causal agent of citrus canker, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* was carry out. Epicotyl segments were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*, and selected in a culture medium supplemented with kanamycin or gentamycin. The genetic transformation was confirmed by PCR and Southern blot analysis. The gene transcription was evaluated by RT-PCR and the production of harpin protein was detected by western blot. The genetic transformation efficiency varied from 2,7% to 6,2% depending on the cultivar. Some transgenic lines had abnormal development, not allowing performing Southern blot analysis or multiplication by grafting. Plants of 'Hamlin' sweet orange were propagated by grafting and evaluated for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* resistance. All tested plants presented reduction in the severity of the symptoms caused by bacterium *X. axonopodis* pv. *citri* 30 days after the inoculation.

Keywords: Genetic transformation; *hrpN* gene; Inducible promotor; Sweet orange; Disease resistance; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da região-T do plasmídeo pCPP1300, contendo o gene <i>uidA</i> sob o controle do promotor induzível, clonado de batata, (<i>Pgst1</i>).....	35
Figura 2 - Esquema da região-T presente nos plasmídeos pCPP1294 e pCPP1298, contendo o gene <i>hrpN</i>	35
Figura 3 - Identificação e avaliação de plantas transgênicas de laranja variedade ‘Valência’ contendo o gene <i>uidA</i> dirigido pelo promotor <i>Pgst1</i>	46
Figura 4 - Transformação genética, seleção, regeneração e aclimatização de plantas de laranja transgênicas.....	49
Figura 5 - Desenvolvimento das plantas de laranja transgênicas expressando o gene <i>hrpN</i> aclimatizadas em casa-de-vegetação.....	52
Figura 6 - Análise de Southern blot em plantas PCR+ aclimatizadas em casa-de- vegetação..	54
Figura 7 - Análise da transcrição e tradução do gene <i>hrpN</i> em plantas transgênicas matrizes de laranja ‘Hamlin’ aclimatizadas em casa-de-vegetação ‘Hamlin’.....	56
Figura 8 - Severidade do cancro cítrico em folhas de laranja ‘Hamlin’ transgênica, 30 dias após a inoculação com a bactéria <i>Xac</i>	58
Figura 9 - Análise da severidade do cancro cítrico e transcrição do gene <i>hrpN</i> , 30 dias após a inoculação com a bactéria <i>Xac</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ap1 – gene *apetala1*

APS - Ammonium PerSulfate

AS – Ácido Salicílico

bo – gene da bacterio-opsina

CTAB – Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide

CTV – Citrus Tristeza Virus

EDAS - Electrophoresis Documentation and Analysis System

EDTA – Ethylenediaminetetracetic Acid

Gm' – gene de resistência contra o antibiótico gentamicina

gna – gene lectina (*Galanthus nivalis* aglutinina)

GUS – enzima β -glucuronidase

gst1 – gene glutationa fosfotransferase

hal2 – gene 3'(2'), 5'-bifosfato nucleotidase

lfy – gene *leafy*

manA – gene da fosfomanose isomerase

nptII – gene neomicina fosfotransferase II

PBS - Phosphate-Buffered Saline

PCaMV35S – promotor 35S de cauliflower mosaic virus

PCIB - 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Phosphate

PCR – Polymerase Chain Reaction(Reação em cadeia da Polimerase)

PMSF – Phenylmethysulphonyl Fluoride, inibidor de protease

Proteína RP – proteínas relacionadas a patogênese

NBT - Nitro Blue Tetrazolium

Nos – terminador nopalina sintetase

RT-PCR – transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase

SAR – resistência sistêmica adquirida

SDS – Sodium dodecyl Sulfate

TBE – tampão Tris, ácido Bórico, EDTA

TEMED - N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane

TMV – Tobacco Mosaic Virus

Tris – 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

uidA – gene β -glucuronidase

Xac - *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

X-GLUC - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide

xylA – gene xylose isomerase

1 INTRODUÇÃO

Os cítricos são as frutas mais produzidas em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Na safra de 2004 o Brasil produziu cerca de 18 milhões de toneladas de laranja, o que corresponde a mais de 28% da produção mundial (FAO, 2007). O Estado de São Paulo é responsável por mais de 79% da produção nacional de laranja, produção esta que é quase na sua totalidade, direcionada à indústria de suco de laranja concentrado e congelado, destinado à exportação (FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2006).

A citricultura é a segunda maior atividade agrícola no estado de São Paulo, ficando atrás somente da cana-de-açúcar (FAO, 2007). Porém, a cultura tem se deparado com diversos tipos de doenças que marcaram época na citricultura mundial, doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, que são responsáveis por grandes perdas na citricultura brasileira nos últimos anos. Os problemas de pragas e doenças se agravam ainda mais, devido ao fato do parque citrícola nacional estar formado na sua grande maioria em apenas uma variedade de porta-enxerto, o limão ‘Cravo’, e poucas variedades copa (mais de 90% de laranja ‘Pêra’). Esta característica de uniformidade genética encontrada nos pomares torna estas áreas muito vulneráveis ao ataque de pragas e doenças.

A obtenção de novas variedades cítricas se torna necessário, na tentativa de aumentar a variabilidade genética dos pomares, e conseguir plantas mais resistentes às principais doenças da cultura. Porém o melhoramento convencional dos citrus torna-se uma prática difícil e demorada devido a características da biologia reprodutiva do gênero como o longo período de juvenilidade, o alto grau de heterozigose, a esterilidade de óvulo e pólen e a incompatibilidade entre gêneros (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Por outro lado, as técnicas de transformação genética podem ser utilizadas como alternativa para introdução de genes de interesse agrônômico, incluindo genes para resistência a doenças, mantendo-se as características originais e também evitando a transferência de características indesejáveis (FEBRES et al., 2003; VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990). Dentre as estratégias para obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças podemos citar o uso de genes que estimulam o sistema de defesa de plantas, como o gene que codifica a proteína harpina (*hrpN*) (WEI; BEER, 1992) e o gene que codifica a proteína bacteriopsina (*bo*) (MITTLER; SHULAEV; LAM, 1995; RIZHSKY; MITTLER, 2001),

que conferem resistência pela resposta de hipersensibilidade ou ativando a resistência sistêmica adquirida (SAR).

A grande maioria dos trabalhos de transformação genética baseia-se na expressão constitutiva de transgenes, o que pode acarretar efeitos adversos devido ao acúmulo das proteínas transgênicas e um gasto de energia desnecessário. Uma maneira de contornar estes problemas, para genes relacionados com a defesa de plantas contra doenças, seria o uso de promotores induzíveis, que fossem ativados pelo patógeno. Assim, a expressão destes genes seria ativada apenas no momento e local necessário (RIZSKY; MITTLER, 2001).

O objetivo deste trabalho foi obter plantas transgênicas das principais variedades copa de laranja, 'Hamlin', 'Natal', 'Pêra' e 'Valência', via *Agrobacterium tumefaciens*, expressando o gene *hrpN*, que codifica a produção de uma proteína que ativa mecanismos de resistência da planta, sob o controle de um promotor induzível (*Pgst1*), que ativa a expressão do gene somente no momento do ataque do patógeno, e iniciar a avaliação das plantas obtidas, para resistência a *Xantomonas axonopodis* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A citricultura brasileira

A citricultura iniciou seu crescimento no Brasil por volta do ano de 1960, coincidindo com a ocorrência de grandes geadas no EUA, o que gerou uma carência de matéria prima naquele país. Já nesta época, a produção de laranja se voltava para a indústria de suco, mas foi devido às condições naturais, ao custo de produção competitivo, produto de excelente qualidade e a uma eficiente logística de distribuição, que o Brasil consolidou sua posição como maior produtor de laranja e exportador de suco do mundo (BOTEON; NEVES, 2005).

Atualmente, o Brasil ocupa lugar de destaque na produção de laranja, sendo o maior produtor mundial, com uma área cultivada de 820 mil hectares. No ano de 2004, o Brasil produziu cerca de 18 milhões de toneladas de laranja, quando o mundo produziu um total de cerca de 63 milhões de toneladas (FAO, 2007), o que corresponde a mais de 28% da produção mundial.

As frutas cítricas são cultivadas na maioria dos Estados brasileiros. Entretanto, o Estado de São Paulo é responsável por mais de 79% da produção nacional de frutas cítricas, confirmando sua posição não só de maior produtor de laranja, mas também de lima ácida ‘Tahiti’ e tangerinas (BOTEON; NEVES, 2005, IBGE, 2005), seguido pela Bahia, segundo maior produtor de laranja e limão (IBGE, 2005).

O Estado de São Paulo possui quatro pólos produtores de citros: a região central (São Carlos-Araraquara), a região norte (Bebedouro-São José do Rio Preto), a região sudeste (Araras-Mogi Guaçu) e o novo pólo na região centro-sul (Bauru-Itapetininga). Atualmente, 70 a 80% da produção paulista destinam-se à indústria de suco, sendo que os pólos situados nas regiões norte e central se especializaram na produção de laranja para fins industriais (BOTEON; NEVES, 2005).

Desde o início do estabelecimento da citricultura no Brasil, a cultura vem enfrentando sérios problemas relacionados a doenças causadas por vírus, bactérias ou fungos (SEMPIONATO; GIROTTO; STUCH, 1997), e também por doenças cujos agentes ainda não foram identificados. O desenvolvimento de doenças é o principal problema da citricultura atual, que acaba por influenciar direta e indiretamente a atividade citrícola no Brasil e no mundo (FNP,

2006). Dentre as principais doenças podemos traçar um breve histórico e relatar as mudanças que estas doenças acarretaram na citricultura brasileira ao longo dos anos.

O primeiro desafio foi o aparecimento da gomose, causada pelo fungo *Phytophthora* spp, por volta de 1910. Dentre as várias manifestações da doença, a podridão do pé, na base do tronco e as podridões de raízes e radículas são as mais importantes. A gomose foi responsável pela substituição do porta-enxerto laranja ‘Caipira’, suscetível, pela laranja azeda, resistente a gomose.

Pelos anos de 1930, os pomares foram atacados pelo vírus da tristeza dos citros (Citrus Tristeza Vírus-CTV). O CTV pertence ao gênero Closterovirus, é um vírus limitado ao floema (BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989, VALLE et al., 2000), com partículas de RNA de fita simples. Uma série de isolados já foi descrita, variando nos sintomas que induzem nas plantas hospedeiras. O CTV é facilmente transmitido por enxertia, infectando, praticamente todas as espécies, híbridos e gêneros afins de citrus. A tristeza foi responsável pela destruição de milhares de plantas de citros enxertadas sobre o porta-enxerto laranja azeda (FUNDECITRUS, 2006). Após os prejuízos causados pela tristeza, o porta-enxerto laranja azeda que apresentava resistência a *Phytophthora* foi substituído pelo limão ‘Cravo’, este resistente a Tristeza, mas suscetível a gomose.

Em seguida, ocorreu o aparecimento do cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), no ano de 1957, que vem causando danos aos pomares até os dias de hoje (SEMPIONATO; GIROTTO; STUCH, 1997).

Nos anos de 1980, surgiu a Clorose Variegada dos Citros (CVC), constatada pela primeira vez em pomares do Triângulo Mineiro e das regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, de onde se disseminou rapidamente para as demais regiões produtoras brasileiras. A CVC é uma doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, uma bactéria gram-negativa limitada ao xilema (CHANG et al, 1993, LEE et al., 1993). Cigarrinhas da família Cicadellidae são vetores da bactéria e responsáveis pela sua disseminação no campo (FUNDECITRUS, 2006). Atualmente a CVC é uma das doenças de maior importância para a citricultura brasileira, devido aos grandes prejuízos que esta vem causando (ALMEIDA et al., 2001).

Em 1999, surgiu em um dos pomares do município mineiro de Comendador Gomes, uma doença nova denominada ‘Morte Súbita dos Citros’, que já atingiu diversos outros municípios em Minas Gerais e São Paulo (FUNDECITRUS, 2006). O agente causal da doença ainda não foi confirmado, mas alguns pesquisadores da área acreditam que seja um variante do vírus da tristeza

dos citros que sofreu uma alteração no seu genoma, pois os sintomas da doença e sua distribuição são muito semelhantes àqueles observados na tristeza. Esta é também uma doença de combinação entre copa e porta-enxerto, só que desta vez atingindo as plantas enxertadas em limão ‘Cravo’. Uma estratégia de manejo da doença que tem gerado bons resultados é a sub-enxertia de plantas sintomáticas utilizando outras variedades de porta-enxertos, como o citrumelo ‘Swingle’ e tangerina ‘Cleópatra’ (FUNDECITRUS, 2006).

Em março de 2004, foi observado no Brasil, o surgimento de uma nova doença nos pomares de citros. A huanglongbing (ou greening) é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter americanus*, que coloniza os vasos do floema, e causa sintomas em folhas, ramos e frutos, que se tornam deformados, com redução de tamanho e queda intensa. A bactéria é transmitida por *Diaphorina citri*, uma cigarrinha comum nos nossos pomares, e responsável pela transmissão da doença nos países asiáticos. No Brasil, a doença se encontra distribuída em mais de 80 municípios nos Estados de Minas Gerais e São Paulo e não existem variedades de copa ou porta enxerto de citros que sejam resistentes a esta doença (FUNDECITRUS, 2006).

O controle da maioria das doenças que atingem os citros é baseado em medidas preventivas, como obtenção de mudas certificadas, manutenção da nutrição de plantas, controle de vetores, desinfestação de materiais e veículos e o uso de quebra ventos na tentativa de diminuir a disseminação de patógenos pelo pomar (FUNDECITRUS, 2006).

O fácil estabelecimento das doenças nos pomares deve-se principalmente, a falta de variabilidade genética. As principais áreas de plantio brasileiras se caracterizam por uma uniformidade de plantio muito grande, ou seja, cerca de 90% das variedades copas existentes são de laranja ‘Pêra’ e o porta-enxerto quase que exclusivamente, o limão ‘Cravo’. Esta característica torna os nossos pomares muito vulneráveis ao ataque de pragas e doenças, como vem acontecendo desde o aparecimento da gomose. A obtenção de novas variedades, resistentes às principais doenças é uma alternativa para ampliar o número de variedades copa e porta-enxerto utilizados.

2.2 O cancro cítrico

O cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é originário do Sudoeste Asiático (KOIZUMI, 1985), mesmo centro de origem dos citros. O

primeiro relato da doença foi feito na Inglaterra, a partir de folhas herbarizadas de cidra (*Citrus medica*) coletadas no Noroeste da Índia, provavelmente entre 1827 e 1831 (BITANCOURT, 1957, FAWCETT; JENKINS, 1933).

Nas Américas, o cancro cítrico ocorreu primeiramente nos Estados Unidos por volta de 1910, com o uso de mudas de citros infectadas provenientes do Japão (STALL; SEYMOUR, 1983). Na América do Sul, já foi relatada no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai (FEICHETENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997, LEITE JUNIOR, 1990) e mais recentemente na Bolívia (BRAITHWAITE et al, 2002).

No Brasil, o primeiro relato da doença, ocorreu no município paulista de Presidente Prudente, em 1957 (BITANCOURT, 1957). Depois de introduzida no país, a bactéria foi rapidamente disseminada para outras regiões do Estado de São Paulo bem como para outros Estados, como Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais (BARBOSA et al., 2001; FEICHENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997, MACIEL; DUARTE; AYUB, 1998) e mais recentemente Roraima (NASCIMENTO et al., 2003).

O cancro cítrico é um dos mais graves problemas fitossanitários da cultura (BELASQUE JUNIOR, et al., 2005) ocorrendo em diversas regiões produtoras de citros no Brasil (LEITE JUNIOR, 1990) e no mundo (GOTTWALD et al., 2001) devido às características de disseminação do patógeno, e principalmente por não existirem métodos de controle totalmente eficientes (NAMEKATA, 1989).

Os problemas causados pelo cancro cítrico vão desde os sintomas mais comuns da doença, envolvendo principalmente a desfolha, redução de tamanho e queda prematura dos frutos, tornando-os impróprios para consumo (LEITE JUNIOR, 1990, VERNIÈRE; GOTTWALD; PRUVOST, 2003) até restrições na comercialização nacional e internacional de mudas e frutos ‘in natura’ (CIVEROLO, 1985, GOTTWALD et al., 2001).

A *Xac*, pertencente à ordem *Xanthomonadales*, gênero *Xanthomonas*, é uma bactéria gram-negativa, baciliforme, aeróbia e se movimenta por um único flagelo polar (monotríquia). A bactéria se desenvolve sob temperaturas entre 29,5 e 39 °C, e não é capaz de sobreviver por longos períodos em solo, plantas invasoras ou em restos de cultura, necessitando de tecido de citros para garantir sua sobrevivência. Exsudatos bacterianos são produzidos em presença de um filme d’água sobre as lesões, e a penetração ocorre em tecidos jovens pelos estômatos e aberturas naturais, ou por ferimentos (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

O cancro cítrico pode ser diferenciado em cinco grupos, classificados pelos sintomas que produzem e pela patogenicidade em diferentes hospedeiros (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997, GABRIEL et al., 1989, LARANJEIRA et al., 2005): i) cancro cítrico asiático ou cancrose A, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, é o tipo mais importante e mais disseminado, ocorre endemicamente em muitas regiões da Ásia, África, Oceania e Américas. Afeta grande número de espécies da família Rutaceae; ii) cancro cítrico B ou cancrose B, ocorre na Argentina, Paraguai e Uruguai, sendo mais agressivo em limões e lima ácida ‘Galego’. É causada pela estirpe B de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*; iii) cancrose da lima ácida ‘Galego’ ou cancrose C, causada pela estirpe C de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, que está restrita a algumas regiões do Estado de São Paulo, afetando, principalmente, a lima ácida ‘Galego’; iv) cancrose D, causada pela estirpe D de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, que ocorre somente no México e produz lesões apenas em folhas e ramos de lima ácida ‘Galego’, porém ainda não está bem caracterizada; v) mancha bacteriana dos citrus, causada por *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, afeta, principalmente, porta-enxertos de citrumelos, que são híbridos de *Poncirus trifoliata* e pomelo (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997, LARANJEIRA et al., 2005).

Os hospedeiros de *Xac* incluem laranjas, pomelos, limões, tangerinas, lima ácida ‘Galego’ e citrumelos (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*). As principais variedades cultivadas são classificadas como resistentes (tangerinas ‘Ponkan’, ‘Clementina’ e ‘Satsuma’, lima ácida Tahiti e laranja azeda), moderadamente resistentes (tangerina ‘Dancy’, mexerica do Rio, laranjas ‘Valência’ e ‘Pêra’ premunizada), moderadamente suscetíveis (tangerina ‘Cravo’, tangor ‘Murcote’ e laranja ‘Natal’), suscetíveis (laranja ‘Bahia’, ‘Baianinha’, ‘Hamlin’, ‘Seleta’) ou altamente suscetíveis (pomelo Marsh Seedless, lima ácida ‘Galego’, limão Siciliano e tangelo ‘Orlando’) (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

Os sintomas do cancro cítrico podem ser encontrados em toda a parte aérea da planta. Em folhas jovens as lesões no início são levemente salientes em ambas as faces, puntiforme e de coloração creme ou parda na superfície do tecido afetado, tornando-se esponjosas, esbranquiçadas, e circundadas por um halo amarelo. As folhas são suscetíveis à penetração através de aberturas naturais somente no início do desenvolvimento, ou durante o tempo necessário para expansão completa das folhas, momento a partir do qual a bactéria não consegue penetrar via estômatos. Nos frutos, os sintomas são semelhantes àqueles observados nas folhas, mas podem desenvolver um diâmetro maior. Os frutos com sintoma caem das plantas antes de

atingir a maturação, e são suscetíveis entre 60 e 90 dias de idade, após a queda das pétalas. Lesões em ramos, geralmente, encontram-se apenas em variedades muito suscetíveis, e evoluindo podem provocar a morte do ramo. Ataques severos da doença podem provocar desfolha com conseqüente depauperamento de plantas, e queda prematura de frutos (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997, LARANJEIRA et al., 2005).

A principal fonte de inóculo da bactéria é o próprio tecido infectado, onde a *Xac* sobrevive entre estações em folhas e ramos de plantas hospedeiras. Quando não há disponibilidade de plantas cítricas, a bactéria apresenta um período curto de sobrevivência. A bactéria pode sobreviver durante meses na rizosfera de gramíneas (PEREIRA et al., 1978) e de 1 a 2 meses em folhas e frutos em decomposição (LEITE JUNIOR, 1990). Na forma de células livres, a *Xac* se torna muito vulnerável à dissecação e à competição com microrganismos saprófitas (CHRISTIANO, 2003).

Em condições de umidade muito alta, as lesões exsudam bactérias na superfície. A partir destas lesões, a bactéria pode ser disseminada a curtas distâncias com a ajuda da chuva, onde as gotículas de chuva aprisionam a bactéria, que é transportada para folhas e ramos novos. Quando ocorre vento juntamente com a chuva, a dispersão pode ocorrer a distâncias maiores (GOTWALD; TIMMER, 1995).

A *Xac* penetra no hospedeiro por aberturas naturais, principalmente, por estômatos, e ferimentos causados por espinhos, pelo homem ou por insetos. A face inferior das folhas é mais suscetível à penetração da bactéria, devido a maior densidade de estômatos (GRAHAM et al., 1992).

A partir de 1997, observou-se uma mudança drástica no número de focos e no padrão espacial do cancro cítrico no Estado de São Paulo, devido à introdução da lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) nos pomares paulistas. Até então o padrão espacial da doença ocorria de forma altamente agregada e após a introdução da lagarta minadora este padrão mudou para agregação intermediária e distribuição ao acaso (BERGAMIN FILHO et al., 2001).

Ferimentos severos causados por espinhos ou pelo vento cicatrizam em um ou dois dias (GOTO, 1990), enquanto que as galerias formadas pela alimentação da lagarta minadora permanecem de 10 a 14 dias disponíveis para penetração do patógeno. Assim, uma vez havendo penetração da *Xac*, ocorre um aumento na severidade da doença, pois as lesões se tornam maiores

e conseqüentemente, a quantidade de inóculo, que pode ser disperso a distâncias superiores a um quilômetro (KOIZUMI et al., 1996).

O cancro cítrico não possui métodos de controle curativos, por isso as medidas de controle utilizadas se baseiam na exclusão para evitar a entrada de inóculo externo e erradicação, na tentativa de diminuir o inóculo já existente (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

O método de exclusão se baseia, principalmente, em evitar que a bactéria seja introduzida em áreas onde ainda não foi constatada a doença, utilizando métodos preventivos, como a aquisição de mudas sadias e certificadas. Também é prática necessária a restrição ao acesso de pessoal, máquinas e implementos provenientes de outras áreas citrícolas, bem como a desinfestação de veículos, materiais e implementos utilizados durante os tratos culturais e na colheita. Uma alternativa é a construção de “bins” na entrada da propriedade para armazenamento dos frutos colhidos, reduzindo a entrada e circulação de pessoal (FUNDECITRUS, 2006). A implantação de quebra-ventos pode ser uma boa alternativa para reduzir a velocidade do vento no pomar, e assim diminuir os ferimentos causados pelo vento, bem como diminuir a distribuição de aerossóis (LEITE JUNIOR, 1990).

A bactéria causadora do cancro cítrico, *Xac*, é classificada como Praga Quarentenária A2 (AMARAL, 2003), o que torna o cancro cítrico uma doença regulamentada por leis internacionais que visam, principalmente, impedir a entrada do patógeno em áreas livres da doença (CIVEROLO, 1985, GOTTWALD et al., 2001). Desta forma, países com ocorrência de cancro cítrico estão sujeitos à imposição de barreiras fitossanitárias que muitas vezes podem comprometer a comercialização da produção (FUNDECITRUS, 2006, GOTTWALD et al., 2001, STALL; CIVEROLO, 1991).

No estado de São Paulo a erradicação é lei, e as propriedades contaminadas ficam proibidas de comercializar sua produção até que o processo de erradicação seja concluído. Os produtores devem inspecionar rotineiramente seus pomares, e em caso de qualquer suspeita, o órgão responsável deve ser acionado. Se for detectada uma planta contaminada no talhão, três equipes fazem inspeções consecutivas, e se no talhão houver mais de 0,5% de árvores contaminadas, todo o talhão deve ser erradicado. Se o número de plantas contaminadas for menor ou igual a 0,5% são eliminadas apenas as plantas foco e as que estão em um raio de 30 metros (FUNDECITRUS, 2006).

Nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Minas Gerais, a erradicação não tem sido realizada, o que contribuiu para o estabelecimento definitivo da bactéria nestas áreas (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997, MACIEL et al., 1998).

O Estado da Flórida, nos EUA, conseguiu manter o cancro cítrico sob controle por algum tempo, porém devido à ação dos furacões na estação de 2004-2005, tornou-se inviável a continuação do programa de erradicação. Além da destruição dos pomares, os furacões foram responsáveis pela disseminação da bactéria *Xac*, para as principais áreas de cultivo de citros no Estado (CEPEA, 2005, FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2006).

2.3 Cultura de tecidos e transformação genética em citros

A cultura de tecidos *in vitro* de citros foi iniciada pelo cultivo de tecido nucelar em meio de cultura, sem a adição de reguladores vegetais, que favorecia o desenvolvimento de embriões nucleares e a obtenção de plantas livres de vírus (RANGAN; MURASHIGE; BITTERS, 1968). Devido às características de juvenildade destas plantas, hoje se utiliza a microenxertia de meristemas caulinares em plântulas de variedade porta-enxerto germinadas *in vitro* para obtenção de plantas livres de vírus (NAVARRO; ROISTACHER; MURASHIGE, 1975). Este mesmo tecido nucelar, quando cultivado em ausência de luz, favorece o desenvolvimento de calos embriogênicos (OLIVEIRA; MENDES; TULMANN NETO, 1994) os quais podem ser cultivados em meio de cultura líquido, sob agitação, para obtenção de cultura de células em suspensão (CABASSON et al., 1997).

A regeneração de plantas a partir de calo e células em suspensão ocorre via embriogênese somática, pela transferência das culturas para meio de cultura suplementado com fontes alternativas de carbono, como galactose e maltose (HIDAKA; OMURA, 1989, TOMAZ et al., 2001) e incubação sob fotoperíodo de 16 horas de luz. A transferência dos embriões somáticos globulares para meio de cultura suplementado com sacarose permite a histodiferenciação e a conversão em plantas inteiras (TOMAZ et al., 2001).

A disponibilidade de protocolos para cultura de calos e células em suspensão com regeneração de plantas estimulou o desenvolvimento da cultura de protoplastos para o gênero

citrus e espécies relacionadas (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990, VARDI; SPIEGEL-ROY; GALUN, 1982).

Protoplastos são células vegetais desprovidas de parede celular. As células neste estado transitório podem ser manipuladas, conservando ainda as potencialidades das células vegetais completas (CARNEIRO et al., 1998). Protoplastos são utilizados em hibridação somática, onde é possível fundir duas células de espécies ou gêneros sexualmente incompatíveis (KOBAYASHI; OHGAWARA, 1988). Mais de 200 híbridos somáticos de citros foram obtidos, e estão sendo avaliados para características como resistência a tristeza, precocidade, qualidade de frutos e redução de porte (GROSSER; GMITTER JUNIOR; CHANDLER, 1998, GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000, KOBAYASHI et al., 1991, MENDES et al., 2001, MENDES-DA-GLORIA et al., 2000, MOURÃO FILHO).

Paralelo a cultura de calos e a regeneração de plantas por embriogênese somática, iniciaram-se o cultivo *in vitro* de diferentes explantes (BHAT; CHITRALEKHA; CHANDEL, 1992, GOH et al., 1995, MOREIRA-DIAS et al., 2000, SIM; GOH; LOH, 1989) em meio de cultura suplementado com citocinina, para o desenvolvimento de protocolos que favoreçam a regeneração de plantas via organogênese (MOURA et al., 2001). A regeneração via organogênese em *Citrus*, tem sido descrita para vários tecidos incluindo raízes (GOH et al., 1995), discos de folha (CHATUVERDI; MITRA, 1974), segmento internodal (DURÁN-VILA; ORTEGA; NAVARRO, 1989), segmento de epicótilo (GARCÍA-LUIS et al., 1999; MOREIRA-DIAS et al., 2000) ou de hipocótilo (MAGNON; SINGH, 1995). A resposta organogênica pode variar de acordo com a espécie, idade, época do ano, composições do meio de cultura e condições de incubação (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1997).

Os resultados destes trabalhos incentivaram o aperfeiçoamento destas técnicas, visando a utilização da cultura de tecidos, não só para obtenção de plantas livre de vírus mas também como uma ferramenta auxiliar no melhoramento genético das espécies de citros (CERVERA et al., 1998a; 1998b, KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989, PEÑA et al., 1995a; 1995b).

Tendo em vista que o melhoramento genético utilizando métodos convencionais é bastante limitado em citros, devido a características relacionadas à biologia reprodutiva do gênero, como por exemplo, alta taxa de heterozigose, a auto-incompatibilidade e a incompatibilidade cruzada, esterilidade de óvulo e pólen e o longo período juvenil (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), a disponibilidade de protocolos de cultura *in vitro* e o

desenvolvimento de técnicas do DNA recombinante estimulou a utilização de técnicas de transformação genética.

A transformação genética tem se mostrado uma técnica com grande potencial para a obtenção de novas variedades por tornar possível a introdução de genes que conferem características agronômicas desejáveis, de forma controlada, sem a transferência de características deletérias (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990).

Diversas variedades e espécies cítricas possuem protocolos de transformação genética que são utilizados rotineiramente por grupos de pesquisa em vários países, dentre eles, a Espanha (PEÑA et al., 1995a; 1995b; 1997; 2001), EUA (FLEMING et al., 2000, GUO et al., 2005; MOORE et al., 1992), Japão (HIDAKA et al., 1990, KANEYOSHI et al., 1994, KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989) e Brasil (ALMEIDA et al., 2003, BOSCARIOL et al. 2006, KOBAYASHI et al., 2003, MENDES et al., 2002).

O primeiro relato de transformação genética em citros foi feito por Kobayashi & Uchimiya (1989), utilizando polietileno glicol (PEG) para introdução direta de DNA em protoplastos de laranja doce ‘Trovita’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Outros trabalhos de transformação genética em citros vêm sendo realizados desde então, pelo tratamento de protoplastos de limão rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990), laranja ‘Itaboraí’ (FLEMING et al., 2000), e laranja ‘Valência’ (GUO et al, 2005) com PEG; eletroporação de protoplastos embriogênicos (NIEDZ et al., 2003); bombardeamento de partículas em células embriogênicas de tângelo (YAO et al., 1996) e pelo co-cultivo de segmentos de epicótilo ou segmentos internodais com *Agrobacterium tumefaciens* (BOND; ROOSE, 1998, CERVERA et al., 1998a; 1998b, GHORBEL et al., 2000, GUTIÉRREZ-E. et al., 1997, HIDAKA et al., 1990, KANEYOSHI et al., 1994, MENDES et al., 2002, MOORE et al., 1992, PEÑA et al., 1995a; 1995b; 1997, 2004, YANG et al., 2000) ou *Agrobacterium rhizogenes* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; OCHOA-ALEJO, 1998).

Em trabalhos mais recentes, o sistema de transformação genética mais utilizado para espécies cítricas tem sido o método de transformação indireta, mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (CERVERA et al., 1998a; 1998b; 1998c, GUTIÉRREZ-E. et al., 1997, PEÑA et al., 1995a; 1997) utilizando-se como explante, principalmente, segmento internodal (CERVERA et al., 1998a, DOMÍNGUEZ et al., 2004, GHORBEL et al., 1999, MOORE et al., 1992, PEÑA et al., 1995a; 1995b), segmentos de epicótilo (ALMEIDA et al., 2003, BOND; ROSE, 1998,

BOSCARIOL et al., 2006, CERVERA et al., 1998a; 2000, COSTA; OTONI; MOORE, 2002, GHORBEL et al., 2000, MOORE et al., 1992, KOBAYASHI et al., 2003, PEÑA et al., 1997, YANG et al., 2000), e mais recentemente iniciou-se a utilização de células plasmolisadas (KAYIM et al., 2004).

Além do tipo de explante, fatores como a estirpe de *Agrobacterium* (BOND; ROSE, 1998, GUTIÉRREZ-E. et al., 1997), o genótipo (GUTIÉRREZ-E. et al., 1997), e as condições de incubação no co-cultivo (ALT-MOERBE et al., 1988) e pós co-cultivo também influenciam a regeneração de plantas transgênicas.

A seleção destas plantas transgênicas é realizada utilizando-se genes de seleção para resistência a antibióticos, como a canamicina (ALMEIDA et al., 2003, BOND; ROSE, 1998, BOSCARIOL et al., 2006, CERVERA et al., 1998a; 2000, COSTA; OTONI; MOORE, 2002, GHORBEL et al., 2000, KOBAYASHI et al., 2003, PEÑA et al., 1997) e a gentamicina (CERVERA et al., 1998b, PEÑA et al., 1997). Porém, a utilização destes genes, além de permitir a regeneração de um grande número de escapes (DOMINGUEZ et al., 2004), estas plantas transgênicas expressando genes que conferem resistência a antibióticos não são bem aceitas pelo mercado consumidor, devido aos riscos que estes genes podem gerar sobre o ambiente e a saúde humana. Em vista disto, outros genes estão sendo estudados como alternativa para seleção de plantas transgênicas de citros, como o gene *xylA* (PEREIRA, 2004) para metabolizar xilose e o gene *manA* para metabolizar a manose (BOSCARIOL et al., 2003).

Embora a obtenção de plantas transgênicas de citros seja conseguida com relativa facilidade, algumas variedades como laranja azeda, tangerina ‘Cleopatra’ e laranja ‘Pêra’ têm se mostrado recalcitrantes ao processo, restringindo o número de plantas obtidas (DOMINGUEZ et al., 2004).

A maioria dos trabalhos foi realizada, predominantemente, com explantes juvenis, porém existe um grande interesse na utilização de explantes coletados de tecidos maduros para obtenção de plantas transgênicas que irão florescer e produzir mais cedo, antecipando o tempo de avaliação de suas características (KOBAYASHI, et al., 2003). Cervera et al. (1998a) e Almeida et al. (2003) obtiveram plantas transformadas de laranja doce a partir de tecido maduro, porém com uma frequência de regeneração muito baixa quando comparada com aquela obtida a partir de tecido juvenil.

Alguns genes de interesse agrônômico já foram introduzidos em citros com sucesso. Podemos citar a introdução do gene *hal2*, que confere tolerância à salinidade, em plantas de citrange ‘Carrizo’ (CERVERA et al., 2000), o gene *gna*, que confere resistência contra afídeos, em plantas de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) (YANG et al., 2000), os genes *lfy* e *apl* de *Arabidopsis*, em plantas de citrange ‘Carrizo’ com expressão constitutiva, que tiveram o período de juvenilidade diminuídos, florescendo já no primeiro ano de cultivo (PEÑA et al., 2001) e o gene de uma enzima pectina metil-esterase, relacionado com a qualidade do suco, em laranja ‘Valência’ (GUO et al., 2005).

Com relação à resistência a doenças, a maioria dos trabalhos de transformação genética de citros têm se concentrado ao uso de métodos associados à resistência derivada do patógeno, como a introdução do gene da capa protéica do vírus da tristeza dos citros (CTV) que permitiu a obtenção de plantas da variedade laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), lima Mexicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) (DOMÍNGUEZ et al., 2000; GUTIÉRREZ-E. et al., 1997) e pomelo (FEBRES et al., 2003) expressando proteínas do CTV (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Mais recentemente, outros genes relacionados com resistência a doenças foram introduzidos em citros. O gene de uma proteína relacionada com patogênese (proteína RP), o gene *PR-5*, foi introduzido em laranja ‘Pineapple’ e levou a uma redução significativa no desenvolvimento de lesões causadas por *Phytophthora citrophthora*; o gene *bO* introduzido em limão Cravo também resultou na redução dos sintomas causados por *Phytophthora* (AZEVEDO et al., 2005); o gene *attA* introduzido em laranja ‘Hamlin’ (BOSCARIOL et al., 2006) conferiu uma redução nos sintomas do cancro cítrico; e o gene *p12*, que codifica uma proteína RP que é encontrada em plantas com sintomas de declínio, e ausente em plantas sadias, foi introduzido em plantas de citrange ‘Carrizo’, mas estas plantas ainda não foram avaliadas devido as características da própria doença, que se expressa a longo prazo (KAYIM et al., 2004).

2.4 Transformação genética de plantas para resistência a doenças

As perdas da produção agrícola devido às doenças são estimadas em mais de 20%, e os métodos de controle utilizados ainda se concentram no emprego de agroquímicos, que acabam por contaminar trabalhadores, consumidores e mananciais hídricos (SHARMA et al., 2000).

A obtenção de variedades resistentes é o melhor método para controle de doenças de plantas, sendo este o objetivo principal da grande maioria dos programas de melhoramento. A obtenção de variedades resistentes a doenças utilizando métodos de melhoramento genético convencional é conseguida por hibridação sexual de espécies cultivadas com espécies selvagens, baseando-se principalmente na transferência de genes maiores (R).

Com o desenvolvimento das técnicas de biotecnologia, os programas de melhoramento podem ser complementados, selecionando-se genes específicos, os quais podem ser transferidos para variedades comerciais que possuem boas características agronômicas, superando as barreiras de incompatibilidade sexual entre as espécies, e também evitando a transferência de características indesejáveis (FEBRES et al., 2003; VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990).

O crescente aumento no número de trabalhos relatando a clonagem de novos genes de resistência tem incentivado o uso destas técnicas biotecnológicas permitindo a introdução destes genes em células vegetais e proporcionando um aumento no número de plantas que apresentam a capacidade de conter o estabelecimento do patógeno e o conseqüente desenvolvimento da doença (CLARKE et al., 1998).

A produção de plantas transgênicas resistentes a doenças tem sido feita utilizando-se diversas estratégias, introduzindo genes que possam interferir no estabelecimento no patógeno do hospedeiro e conseqüentemente no desenvolvimento da doença, como o uso de genes que codificam proteínas antibacterianas, o uso de genes que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade e/ou estimulam o sistema de defesa das plantas, o uso de resistência derivada do patógeno e o uso de genes maiores (R) (MOURGUES; BRISSET; CHEVREAU, 1998, GER et al. 2001).

Genes que codificam pequenas proteínas com propriedades anti-bacterianas têm sido muito relatados na literatura, por serem importantes componentes do sistema de defesa de espécies não vegetais, principalmente em insetos (HULTMARK et al., 1983, KANG et al, 1998), e por atingirem seu alvo a concentrações baixas (REED; EDWARDS; GONZALES, 1997). Estas proteínas agem na membrana externa de bactérias gram-negativas e gram-positivas, alterando a permeabilidade e a síntese de proteínas (CALRSSON et al., 1998). Exemplos destas proteínas são as atacinas e cecropinas, cujos genes foram clonados dos insetos *Hyalophora cecropia* e *Tricoplusia ni*. Plantas transgênicas de tabaco (HUANG et al., 1997) e arroz (SHARMA et al., 2000) expressando o gene da cecropina foram resistentes a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*, respectivamente. Plantas de pêra e maçã foram transformadas para expressar o gene *atacina E*, e mostraram uma suscetibilidade reduzida a *Erwinia amylovora*, agente causal do “fire blight”, em testes realizados “in vitro” ou em casa-de-vegetação (NORELLI et al., 1994; KO et al., 2000; REYNOIRD et al., 1999), e também em condições de campo (NORELLI et al., 1999). Boscariol et al. (2006) obtiveram plantas de laranja ‘Hamlin’ expressando o gene *attA*, que mostraram uma significativa redução na suscetibilidade ao cancro cítrico. Muitos destes sistemas utilizam peptídeos sinal ligados às proteínas para exportá-las para o apoplasto e evitar que sejam degradadas no citoplasma celular (BOSCARIOL et al., 2006, HUANG et al., 1997, SHARMA et al., 2000).

Genes maiores de resistência ou genes *R* são responsáveis pelo reconhecimento de genes *avr* complementares, no patógeno, e assim, quando um gene *avr* é reconhecido, mecanismos de defesa da planta são ativados. Este mecanismo de reconhecimento foi melhor entendido após a clonagem dos genes de avirulência (*avr*) no patógeno e genes de reconhecimento (*R*) na planta.

O gene *R*, *Xa21* isolado de uma linhagem de arroz resistente a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* foi introduzido em cultivares de arroz suscetíveis, e as plantas transgênicas se mostraram altamente resistentes a diferentes isolados de *X. oryzae* pv. *oryzae* (WANG et al., 1996). Outro gene, o gene *Pto*, isolado de tomate que confere resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, foi introduzido em tabaco, que mostrou resistência a *P. syringae* pv. *tabaci* modificada para expressar o gene *avr* que é detectado pelo *Pto* (THILMONY et al., 1995).

Diversos outros genes *R* foram caracterizados, tornando possível a transferência funcional interespecífica ou intergenérica destes genes. O gene *Bs2* de pimentão introduzido em tomate conferiu resistência contra *Xanthomonas campestris* (TAI et al., 1996) e o gene *Pto* de tomate quando introduzido em tabaco resultou em plantas transgênicas resistentes a *P. syringae* pv. *tabaci* (RONALD et al., 1992). O gene *RB* clonado da espécie selvagem de batata *Solanum bulbocastanum* conferiu resistência em variedades comerciais de batata ao patógeno *Phytophthora infestans* (SONG et al., 2003).

Uma outra abordagem para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças é o uso de genes que codificam proteínas relacionadas à reação de hipersensibilidade e que ativam o sistema de defesa das plantas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996).

A resposta de hipersensibilidade pode estar associada ao sistema de morte programada das células, que pode ser ativado espontaneamente na ausência do patógeno, em mutantes

denominados "disease lesion mimics", que desenvolvem espontaneamente lesões semelhantes às lesões de hipersensibilidade apresentadas pela presença do patógeno (MITTLER; SHULAEV; LAM, 1995; ABAD et al., 1997). Este fenótipo, semelhante à reação de hipersensibilidade tem sido obtido em plantas transgênicas expressando o gene *bO*, clonado de *Halobacterium halobium*, que codifica proteína bacterio-opsina. A expressão do gene *bO* em plantas transgênicas de tabaco resultou num fenótipo semelhante a lesões de hipersensibilidade e aumentou a resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* ao TNV e *Rhizoctonia solani* (MITTLER; SHULAEV; LAM, 1995, RIZHSKY; MITTLER, 2001). Em plantas transgênicas de batata, que apresentavam um fenótipo "lesion mimic", foi possível detectar um aumento no nível de ácido salicílico (AS) e a super expressão de proteínas RP, que são evidências de desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (SAR) (ABAD et al., 1997), coincidindo com um aumento no nível de resistência a *Phytophthora infestans*. A ativação destes mecanismos de defesa pelo gene *bO* sugere que o aumento do fluxo de prótons através da membrana pode imitar a presença do patógeno (PONTIER; MITTLER; LAM, 2002).

Genes *hrp* codificam a produção da proteína harpina, que é uma proteína elicitora da reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras e de patogenicidade em plantas hospedeiras (*hypersensitive reaction and pathogenicity*). Estes genes estão organizados em "clusters" e consistem de vários grupos de complementação que codificam proteínas que estão associadas ao envelope celular de bactérias gram-negativas (WEI et al., 1992). Este "cluster" de genes constitui o sistema secretor de proteínas tipo III em bactérias fitopatogênicas gram-negativas, e está envolvido na liberação de proteínas bacterianas para o interior da célula do hospedeiro, que por sua vez são reconhecidas intercelularmente pelo sistema de defesa da planta (HUANG et al., 1997; OLDROY; STASKAWICZ, 1998).

O gene *hrpN*, clonado de *Erwinia amylovora*, uma bactéria gram-negativa e fitopatogênica para diversas espécies da família Rosaceae, codifica uma proteína denominada harpina. A harpina_{Ea} (*E. amylovora*) é uma proteína de 44 kD, ácida, estável ao calor, rica em glicina, e que atua como elicitor de respostas de resistência na planta (BEER et al., 1991; WEI et al., 1992).

Diversas harpinas já foram identificadas em bactérias fitopatogênicas. A primeira foi a harpina de *Erwinia amylovora* (*HrpN_{Ea}*) (WEI et al., 1992), seguindo, *HrpZ_{Pss}* de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HE; HUANG; COLLMER, 1993), *HrpN_{Ech}* (*Erwinia chrysanthemi*)

(BAUER et al., 1994), *HrpZ_{Psp}* (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) (TAMPAKAKI; PANOPOULOS, 2000), *HrpN_{Pnss}* (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*) (MOR et al., 2001; AHMAD, et al., 2001), *HrpZ_{Pst}* (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (BROWN et al., 2001) e *hpaG_{Xoo}* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) (PENG et al., 2004). Estas proteínas exibem pouca ou nenhuma similaridade de sequência de aminoácidos, mas possuem várias propriedades químicas e físicas em comum (AHMAD et al., 2001).

Harpinas elicitam resposta de hipersensibilidade (BAUER et al., 1997), e algumas tem atuado como elicitoras de resposta de resistência sem causar morte celular (PENG et al., 2004; WEI et al., 1998). Uma vez aplicadas em plantas, estas proteínas promovem a ativação de uma cadeia de transdução de sinais associados à resistência sistêmica adquirida (SAR, Systemic Acquired Resistance) (ADÁM et al., 1997; DESIKAN et al., 1998; DONG et al., 1999; STROBEL et al., 1996; WEI et al., 1992; WEI; BEER, 1996, WEI et al., 1998) indicando que houve a ativação de receptores específicos na planta por elicitores (TRIPATHY et al., 2003), neste caso, a própria proteína.

Os efeitos da aplicação das harpinas se iniciam em minutos, alterando o potencial de membrana em suspensão de células de tabaco (HE; HUANG; COLLMER, 1993), ou em folhas (POPHAM; PIKE; NOVACKY, 1993), provocando explosão oxidativa (BAKER; ORLANDI; MOCK, 1993) e mudanças no fluxo de íons também em suspensão de células de tabaco (BAKER; ORLANDI; MOCK, 1993; HOYOS et al., 1996).

A SAR se caracteriza por ser um tipo de resistência não específica e mais duradoura, que é funcional contra uma ampla gama de patógenos incluindo fungos, vírus, bactérias e nematóides em partes distais da planta (DURRANT; DONG, 2004; STROBEL et al., 1996), ou seja, após ser ativada por uma infecção primária, a SAR protege a planta contra infecções secundárias, enquanto a RH é uma resposta mais específica e ocorre somente no sítio de penetração do patógeno.

Plantas transgênicas de *Arabidopsis* (BAUER et al., 1999) expressando o gene *hrpN_{Ed}*, mostraram resistência contra *Peronospora parasitica*, e plantas transgênicas de maçã estão sendo avaliadas para resistência a *Erwinia amylovora* (ABDUL-KADER et al., 1999). O gene *hpaG* introduzido em plantas de tabaco conferiu resistência não específica contra fungo (*Alternaria alternata*), bactéria (*Ralstonia solanacearum*) e vírus (TMV) (PENG et al., 2004). Plantas de tabaco, expressando o gene *hrpZ_{Pss}* (TAKAKURA et al., 2004) e *hrpN* (JANG; SOHN; WANG,

2006) mostraram aumento na resistência a bactéria *Erwinia cichoracearum* e ao fungo *Botrytis cinerea*, respectivamente, sendo que as plantas contendo o gene *hrpN* mostraram também acelerado crescimento (JANG; SOHN; WANG, 2006). Este aumento no crescimento e produtividade também foi relatado em arroz, tomate, tabaco, algodão, trigo, feijão, milho, dentre outras. Estas plantas apresentaram mais massa de raiz e maior vigor, resultando em maior produtividade (WEI et al., 1998).

Dentre os mecanismos ativados durante as respostas de resistência estão incluídos, o acúmulo de ácido salicílico (AS), síntese de proteínas RP e um aumento na produção de compostos antibióticos chamados fitoalexinas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; RYALS et al., 1996; WARD et al., 1991).

Tudo indica que os genes SAR ou genes de proteínas RP tenham sua transcrição ativada após a liberação de moléculas sinalizadoras. O AS é uma molécula sinalizadora (KLESSING; MALAMY, 1994) que se acumula após a tentativa de penetração do patógeno (MALAMY et al., 1996) e é requerido para indução da SAR (ZOUBENKO et al., 1997).

Trabalhos utilizando mutantes constitutivos para sinalização de defesa apresentam níveis elevados de AS (CLARKE et al., 1998; GREENBERG; SILVERMAN; LIANG, 2000; SHAH; KACHROO; KLESSING, 1999), sendo que além de sinalizar defesa, o AS também promove crescimento (RATE et al., 1999). Outra rota de ativação de defesa, independente de AS, é sinalizada por ácido jasmônico e etileno, e os mecanismos ativados diferem daqueles ativados por AS (CLARKE et al., 1998). Contudo, após iniciada a sinalização diversos tipos de proteínas RP são produzidas em ambas as rotas de sinalização.

As proteínas RP mais utilizadas no sistema de transformação genética são as quitinases e β -1,3-glucanases. O gene RCC2 clonado de arroz, que codifica uma quitinase, foi introduzido em videira que desenvolveu resistência contra os fungos *Uncinola necator* e *Elsinoe ampelina* (YAMAMOTO et al., 2000) e também em crisântemo que foi resistente a *Botrytis cinerea* (TAKATSU et al., 1999). O gene da chitinase do tabaco foi introduzido em amendoim, que desenvolveu resistência a *Cercospora arachidicola*, plantas que não mostraram sintomas tinham altos níveis de atividade específica para quitinase (ROHINI; RAO, 2001). Estes trabalhos demonstram que estas proteínas RP conferem um aumento na resistência, principalmente contra doenças fúngicas (ZOUBENKO et al., 1997), devido ao fato dos fungos verdadeiros possuírem uma parede celular de quitina.

A expressão constitutiva de genes que ativam o sistema de defesa das plantas pode acarretar efeitos adversos, como a formação espontânea de lesões de hipersensibilidade perturbando o desenvolvimento das plantas (RIZSKY; MITTLER, 2001; RUSHTON et al., 2002). Uma maneira de contornar estes problemas seria pela seleção de plantas transgênicas que apresentassem uma baixa expressão do gene, resultando na produção de poucas lesões, mas que influenciasse a resistência da plantas aos patógenos (MITTLER; SHULAEV; LAM, 1995), ou pelo uso de promotores induzíveis, que regulam a expressão dos genes apenas no momento da tentativa de penetração do patógeno, evitando o acúmulo de proteínas transgênicas sobre condições não seletivas (REYNOIRD et al., 1999; RIZSKY; MITTLER, 2001).

Atualmente, novos promotores têm sido identificados ou sintetizados para ativação induzida por patógeno. Plantas transgênicas de tabaco e tomate, expressando o gene *bO* (=lesion mimic gene), dirigido pelo promotor *Ppin2*, não desenvolveram lesões de hipersensibilidade espontaneamente e mostraram resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e *P. s.* pv. *tomato*, respectivamente (RIZSKY; MITTLER, 2001). O promotor *PPin2* é induzido por ferimentos e o fato de muitos patógenos infectarem as plantas através de ferimentos pré-existent, torna interessante a sua utilização associada a genes de resistência a doenças.

O promotor do gene *gst1* (ou *prp1*), que codifica a proteína glutathione S-transferase, ativou a transcrição de genes em resposta à infecção por *Phytophthora infestans* (MARTINI et al., 1993), em plantas transgênicas de batata. Plantas transgênicas de maçã contendo o gene *uidA* sob o controle do promotor *Pgst1* mostraram ativação após inoculação com o fungo *Venturia inaequalis* e a bactéria *Erwinia amylovora* (MALNOY et al., 2006). Plantas de maçã também estão sendo testadas quanto a eficiência deste mesmo promotor em ativar o gene *hrpN* em plantas inoculadas com a bactéria *Erwinia amylovora* (ABDUL-KADER, et al., 1999).

Assim como realizado em plantas transgênicas expressando proteínas com atividade antibacteriana, a utilização de um peptídeo sinal para enviar a proteína até os espaços intercelulares (ABDUL-KADER et al., 1999) tem sido utilizada para exportar as harpinas até o apoplasto para se ligarem ao receptor que pode estar presente na membrana (HAHN, 1996; TAMPAKAKI; PANOPOULOS, 2000) ou na parede celular (HOYOS et al., 1996, TAMPAKAKI; PANOPOULOS, 2000).

Tendo em vista todos estes resultados com a utilização de elicitores de resposta de resistência em plantas, a transformação de plantas perenes com estes genes se torna uma boa

alternativa, principalmente utilizando-se genes como aqueles que codificam as harpinas, que ativam respostas de defesa a uma ampla gama de patógenos, sejam eles, fungos, vírus ou bactérias. Transformar plantas de citros com estes genes tendo sua expressão dirigida por um promotor induzível poderia ser uma boa alternativa para controlar o cancro cítrico, bem como, as demais doenças que atingem a citricultura atualmente, contando ainda com a vantagem destes genes não serem expressos constitutivamente, evitando um gasto de energia desnecessário para estas plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram coletadas sementes de frutos maduros de clones selecionados, das variedades de laranja ‘Pêra’, ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’. As sementes tiveram sua casca retirada e a assepsia feita em solução de água:hipoclorito de sódio (3:1), durante 15 minutos. Após este período, as sementes foram lavadas 3 vezes em água destilada estéril, em condições assépticas, e transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), onde permaneceram incubadas durante 30 dias, no escuro, à temperatura de 27 °C, para germinação e alongamento do epicótilo. Após este período, as plântulas foram transferidas para fotoperíodo de 16 h, por um período de 7 a 10 dias, quando foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de transformação genética.

3.2 Vetor de expressão e estirpe de *Agrobacterium tumefaciens*

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Dr. Steven V. Beer, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Cornell, USA, num acordo de transferência de tecnologia para pesquisa, com o Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP.

Os plasmídeos foram recebidos em *Escherichia coli*, as quais foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura YEP (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 10 g.L⁻¹ de peptona, 15 g.L⁻¹ de ágar, no caso do meio sólido) adicionando-se o antibiótico para seleção da bactéria. As culturas foram incubadas a 37 °C, por 16 h. Para extração dos plasmídeos, uma colônia foi transferida para meio de cultura YEP líquido, contendo antibiótico para seleção, incubando-se a 37 °C, por 16 h, sob agitação constante. Os plasmídeos foram extraídos com o auxílio do kit Wizard® Plus Midpreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA).

O plasmídeo pCPP 1300, clonado no vetor pBIN 19 (FRISCH et al., 1995), contém o T-DNA com o gene *uidA* sob o controle do promotor induzível *Pgsl1* (MARTINI et al., 1993), clonado de batata, e do terminador Nos (Figura 1). Este plasmídeo foi introduzido em *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 105 (HOOD et al., 1993) pelo método de choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). A confirmação da transformação genética foi feita em

colônias bacterianas, por PCR, utilizando-se “primers” específicos para detecção do gene *uidA*, (5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3' e 5'-TGGATCCCGGCATAGTTAAA-3') (PEÑA et al., 1997) . As reações foram feitas em um termociclador PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA, USA) como descrito no item 3.5.2.1.

Figura 1 – Esquema da região-T do plasmídeo pCPP1300, contendo o gene *uidA*, sob o controle do promotor induzível, clonado de batata (*Pgst1*). RB: borda direita, LB: borda esquerda, *NptII*: gene de resistência ao antibiótico canamicina, 35S: promotor constitutivo *PCaMV35S*, Nos: terminador (nopalina sintetase)

Os plasmídeos, pCPP1294, clonado no vetor pBINPLUS (FRED et al., 1995) e o pCPP1298, clonado no vetor pPZP221 (HAJDUKIEWICZ; SVAB; MALIGA, 1994) foram introduzidos em *A. tumefaciens* estirpes EHA 105 (HOOD et al., 1993) e EHA 101 (HOOD et al., 1986), respectivamente, pelo método do choque térmico (LACORTE; ROMANO, 1998). Ambos plasmídeos possuem o mesmo T-DNA, contendo o gene *hrpN*, de *Erwinia amylovora*, ligado a um peptídeo sinal, que tem como função exportar a proteína para o apoplasto, sob o controle do promotor *Pgst1* de batata (MARTINI, 1993) e o terminador nopalina sintetase (Nos) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema da região-T presente nos plasmídeos pCPP1294 e pCPP1298, contendo o gene *hrpN*. RB: borda direita, LB: borda esquerda, *Gm'*: gene de resistência ao antibiótico gentamicina, SS: peptídeo-sinal, *P35S*: promotor constitutivo *PCaMV35S*, Nos: terminador (nopalina sintetase), *Pgst1*: promotor induzível

A transformação genética foi confirmada por PCR, utilizando-se “primers” específicos para a detecção do gene *hrpN* (5'-ACGATATGTTAGGCGGTTTCG-3' e 5'-

TTGACGAAAGAACGGGTTG-3'). Os "primers" foram desenhados com o auxílio do site http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi a partir da sequência do gene *hrpN*, depositada no GenBank (acesso nº M92994). As reações foram feitas em um termociclador PTC 100, como descrito no item 3.5.2.1.

3.3 Manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

Após a transformação genética, os isolados de *Agrobacterium* foram estocados em solução de glicerol (20%), a -80 °C. Para a realização dos experimentos foram mantidos também estoques das bactérias em geladeira, que consistiam de tubos de 2,0 ml, contendo meio de cultura YEP, suplementado com o antibiótico de seleção.

3.4 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Para os experimentos de transformação genética, transferiu-se *Agrobacterium* para placa de Petri contendo meio de cultura YEP líquido + antibiótico de seleção específico para o isolado (EHA 105 - canamicina 100 mg.L⁻¹); EHA 101 - spectinomomicina 150 mg.L⁻¹), incubando-se por 16 h em agitador orbital (200 rpm), à temperatura de 28 °C. Após este período, a suspensão bacteriana foi centrifugada (5000 rpm), à temperatura de 15 °C, durante 15 min. O precipitado obtido foi ressuspensionado na concentração de 5 x 10⁸ células/ml em solução dos sais do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Segmentos de epicótilo ($\pm$ 1,0 cm) foram inoculados com a suspensão bacteriana, em placa de Petri (58 x 15 mm), durante 20 min. Após este período, os explantes foram secos em papel de filtro estéril, para retirar o excesso de bactéria, e incubados em meio de cultura para co-cultivo, composto de meio básico EME (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990) suplementado com sacarose (2,5 %), ágar (0,8 %), acetoseringona (100 mM) e BAP (Benzilaminopurina) (1,0 mg.L⁻¹), pH 5,5, durante 3 dias, na ausência de luz, à temperatura de 24 °C. Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de cultura de seleção e regeneração, que consiste do meio de cultura básico EME (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), pH 5,8, suplementado com BAP (1,0 mg.L⁻¹) de, com os antibióticos de seleção na planta, canamicina (100 mg.L⁻¹) para EHA 105 e gentamicina (100 mg.L⁻¹) para EHA 101, e o antibiótico

cefotaxime (500 mg.L⁻¹) ou timentin (300 mg.L⁻¹) para controle do crescimento de *Agrobacterium*. O material foi incubado a 27 °C, no escuro, sendo subcultivado a cada 2 semanas. Após a formação das gemas adventícias, o material foi transferido para fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C.

As gemas regeneradas foram enxertadas *in vitro* em plântulas de citrange Carrizo ou limão ‘Cravo’, germinadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e incubadas sob fotoperíodo de 16 horas, a 27 °C. Após o pegamento da enxertia e desenvolvimento das plântulas, estas foram transferidas para vasos pequenos (0,5 L) contendo, substrato Rendmax Citrus TM (Eucatex) autoclavado, e mantidas em câmara úmida para aclimatização. A câmara úmida foi sendo retirada gradativamente conforme o desenvolvimento das plantas. Após a aclimatização, as plantas foram transferidas para vasos (5 L), e levadas para casa-de-vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas.

3.5 Análise das plantas regeneradas

3.5.1 Teste histoquímico (GUS)

Para este teste foram utilizadas plantas transgênicas contendo o gene *uidA* (*gus*) dirigido pelo promotor *Pgst1* (Figura 1). Folhas jovens destas plantas foram destacadas e inoculadas com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ou feridas com um alfinete (três ferimentos em cada lado da folha). O objetivo deste teste foi avaliar a ativação do promotor *Pgst1* pela ação do patógeno ou por ferimentos. A reação acontece quando material vegetal a ser analisado é colocado em solução X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida), incubados à temperatura de 37 °C, durante 16 horas, em ausência de luz (JEFFERSON, 1987). Após o período de reação o material foi lavado numa solução de álcool 70%, para retirada da clorofila, a fim de facilitar a visualização da reação. A análise foi feita com o auxílio de microscópio estereoscópio (Carl Zeiss, West Germany).

3.5.2 Análises de DNA

3.5.2.1 PCR

A reação da polimerase em cadeia foi utilizada para a detecção de fragmentos dos genes *hrpN* e *uidA* nas gemas adventícias desenvolvidas. O DNA foi extraído a partir de folhas coletadas de plântulas regeneradas nos experimentos de transformação genética, usando o método de extração CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990). Os “primers” utilizados foram, para *hrpN*: (5'-ACGATATGTTAGGCGGTTCG-3' e 5'-TTGACGAAAGAACGGGTTG-3'), para *uidA*: (5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3' e 5'-TGGATCCCGGCATAGTTAAA-3') (PEÑA et al., 1997). As reações foram feitas em um termociclador utilizando-se 1 ciclo de 94 °C por 3 min para a primeira desnaturação, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1,5 min, 72 °C por 1,5 min, com uma extensão final de 72 °C por 1,5 min, para detecção do gene *hrpN*, amplificando um produto de 563 pb; para o gene *uidA* o programa utilizado foi 35 ciclos de 92 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, e 72 °C por 1,5 min, amplificando um fragmento de 600 pb.

Os produtos da reação de amplificação obtidos foram separados por eletroforese, aplicando-se as amostras em gel de agarose 1%, tampão TBE (0,5 x), a uma voltagem de 65 V. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg por ml) e posteriormente, visualizado e fotografado em luz UV, com o auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

3.5.2.2 Southern Blot

Para a análise de Southern blot foram utilizados de 30 a 50 µg de DNA total, extraído de plantas aclimatizadas, PCR positivas para o gene *hrpN* e plantas controle, não transformadas. O DNA foi extraído pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e digerido com a enzima de restrição *Hind*III. Esta enzima corta o T-DNA apenas uma vez e não corta a sequência do gene, permitindo que seja identificado o número de eventos de inserção do gene no genoma da planta analisada. Os fragmentos gerados na digestão foram separados em gel de agarose 0,8% e transferidos para membranas de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). A hibridização foi realizada a 60 °C em forno de hibridização (Amersham Bioscience), durante 16 horas, com uma sonda obtida por PCR para detectar o gene *hrpN*. O

fragmento de 563 pb obtido por PCR, foi separado em gel de agarose 0,8%, e em seguida purificado, utilizando o kit “QIAEX® II Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Germany), e posteriormente marcado para sua utilização como sonda. A marcação da sonda foi realizada com fluoresceína utilizando-se o kit “Gene Images™ Random Primer Labelling Module” (Amersham Biosciences) e para a detecção da hibridização utilizou-se o kit “Gene Images CDP-Star Detection kit” (Amersham Biosciences), seguindo-se as instruções do fabricante.

3.5.3 Análise de RNA

3.5.3.1 RT-PCR

A extração de RNA total foi feita com 100-200 mg de tecido foliar com o auxílio do produto comercial TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. O cDNA foi obtido utilizando-se a enzima Blue Script II (Invitrogen), onde 2-4 µg de RNA total foram incubados com 2 pmole de primer, 10 mM de cada dNTP, 12 µl água DEPC, durante 5 min, a 65 °C, e rapidamente resfriado em gelo. Em seguida, foi adicionado 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, incubando-se a solução a 42 °C por 5 min, e finalmente adicionou-se 1 µl da enzima SuperScript II RT e incubou-se a solução a 42 °C, por 15 min. Para inativar a reação, a solução foi aquecida a 70 °C, por 15 min. O cDNA obtido foi submetido a uma reação de PCR, como descrito no item 3.5.2.1. Como controle negativo da reação foi utilizado o RNA total de uma planta não transformada ou de plantas não inoculadas com a bactéria *Xac*.

3.5.4 Análise de proteína

3.5.4.1 Isolamento de proteína total

Proteína total foi extraída de plantas aclimatizadas em casa-de-vegetação, que foram positivas para a análise de Southern blot, plantas controle não transformadas e da bactéria *E. coli*. Proteína total isolada a partir de *E. coli* foi obtida conforme descrito por Wei et al. (1992), com algumas modificações. A bactéria *E. coli* DH5α (pCPP2139) foi cedida pelo Dr. Steven Vincent

Beer, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Cornell, EUA. A bactéria foi cultivada em placa de Petri contendo o antibiótico spectinomomicina (50 mg.L^{-1}) para seleção, a 37°C , durante 16 horas. Posteriormente, uma colônia da bactéria foi transferida e incubada em 50 ml de meio de cultura YEP, contendo o antibiótico para seleção, a 37°C , durante 16 horas, sob agitação constante. As células foram coletadas com uma leitura de $\text{OD}_{600} = 0,8$, em seguida submetidas a uma centrifugação de 10.000 rpm, durante 15 min. O pellet foi ressuspensionado em 5 ml de tampão potássio 5 mM, pH 6,5, contendo PMSF 0,1 mM (Phenylmethylsulfonyl fluoride), um inibidor de protease, e as células foram rompidas por sonicação ou utilizando nitrogênio líquido. Os restos celulares foram eliminados por centrifugação (12.000 rpm, 1h), e o sobrenadante foi filtrado em membrana $0,22 \mu\text{m}$. Para obter maiores quantidades de proteínas, o conteúdo filtrado foi precipitado utilizando-se uma solução de sulfato de amônia saturado pH 7,2 (1:10) adicionada gota a gota, e incubada a temperatura ambiente por 1h. Após este período a solução foi centrifugada (5.000 rpm, 10 min), e o precipitado de proteína coletado em 200 μl do tampão potássio 5 mM, pH 6,5, contendo PMSF 0,1 mM. Em seguida, o conteúdo foi transferido para membrana de celulose e submetido a diálise, a 4°C , sob agitação constante, sendo realizadas três trocas do tampão. Para isolamento de proteínas de *E. coli*, para controle negativo, contendo plasmídeo, no qual o gene *hrpN* estava ausente, foi utilizado o mesmo procedimento.

Para extração de proteína total a partir de tecido vegetal, foram coletados 4 g de folhas de plantas transgênicas e não transgênicas já aclimatizadas. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, seguindo a adição de 10 ml do tampão fosfato de potássio e centrifugação a 10.000 rpm, durante 1h. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente, a 10.000 rpm, durante 1h, e em seguida filtrado em membrana $0,22 \mu\text{m}$. A solução filtrada foi precipitada como descrito anteriormente.

3.5.4.2 Western blot

As amostras de proteína purificada foram primeiramente dissociadas, onde para cada amostra foi adicionado igual volume de tampão de dissociação (TRIS 0,5M, pH 6,8; SDS 3,8%; β -mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 0,1%). Em seguida, a desnaturação foi feita em água fervente por 5 min, e os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 5.000 rpm, por 5 min.

As amostras desnaturadas foram aplicadas em gel de empilhamento de poliacrilamida (SDS-PAGE) (TRIS 1,5M, pH 8,8; acrilamida 12,5%; SDS 0,1%; APS 0,05%; TEMED) e submetidas à eletroforese em uma cuba tipo “Mini Protean II” (BioRad, Hércules, CA, USA) a 95 V até que as amostras atingissem o gel separador (TRIS 1,0M, pH 6,8; acrilamida 12,5%; SDS 0,1%; APS 0,076%; TEMED), em seguida a voltagem foi aumentada para 125 V, sendo interrompida somente quando as amostras atingiram o final do gel. O marcador utilizado foi o SeeBlue Plus2 pre-Stained Standard (Invitrogen).

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose “Immobilon-NC transfer membranes” (Millipore, Bellerica, MA, USA) com o auxílio de um aparelho “Mini Trans-blot Cell” (BioRad) em tampão de transferência (TRIS 0,3%; glicina 1,5%; metanol 20%), a 0,25 mA, durante 90 min.

A membrana contendo as amostras foi bloqueada utilizando-se uma solução de BSA (1,5%) (Sigma, Saint Louis, MO, USA), mantida sob agitação constante, durante 30 min. A reação serológica foi feita utilizando-se antissoro policlonal, produzido em coelho, contra a proteína harpina_{Ea}, a uma concentração de 1:1000, durante 16 horas, a 4 °C. O anticorpo policlonal utilizado foi cedido pelo Dr, Steven Vincent Beer, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Cornell, EUA.

Antes de iniciar a reação serológica, o antissoro foi adsorvido com a proteína total purificada da bactéria *E. coli*, cujo plasmídeo não contém o gene *hrpN_{Ea}*, com o objetivo de eliminar as reações inespecíficas. A metodologia utilizada para obtenção da proteína total de *E. coli* está descrita no item 3.5.4.1. A adsorção foi feita com 500 µl de tampão PBS 1x (8 g NaCl; 0,2 g KH₂PO₄; 1,15 g Na₂HPO₄; 0,2 g KCl; 0,2 g NaN₃; 1L H₂O) + 500 µl de proteína total de *E. coli* + 20 µl do anticorpo, incubado durante 16 horas, a 4 °C, depois centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min, e o sobrenadante coletado foi utilizado para a reação serológica da membrana contendo as amostras.

Em seguida a membrana foi incubada sob agitação constante e temperatura ambiente, durante 4 horas, em uma solução contendo imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (Sigma), diluída 1:32.000, em tampão PBS 1x. Passado este período a membrana foi incubada em solução contendo o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/nitro blue tetrazolium (PCIB/NBT), em agitação constante, à temperatura ambiente até que se visualizasse a reação serológica.

3.6 Avaliação da resistência ao cancro cítrico

3.6.1 Propagação das plantas

Plantas aclimatizadas e confirmadas como transgênicas pela análise de Southern blot foram as matrizes fornecedoras de borbulhas para obtenção dos clones, que foram utilizados para os experimentos de inoculação com o patógeno. As borbulhas foram enxertadas em limão ‘Cravo’ utilizando-se a técnica de T-invertido. As plantas de limão ‘Cravo’ foram fornecidas por viveiros produtores de mudas certificadas e transferidas para tubetes (19,5 cm x 5,0 cm). Foram enxertadas de 20-30 borbulhas de cada linhagem transgênica de três variedades de laranja, ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’. As plantas de laranja ‘Pêra’ não puderam ser propagadas devido ao tamanho ainda inadequado para o procedimento. Os clones foram selecionados para os ensaios de resistência, quando desenvolveram 1 ou 2 pares de folhas expandidas.

3.6.2 Obtenção do inóculo e inoculação com *X. axonopodis* pv. *citri*

O isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* utilizados nestes ensaios, foi cedido pelo Dr. Júlio Rodrigues Neto, do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas-SP. A manutenção do isolado foi feita utilizando-se o método de Castellani (1939), para armazenamento até 6 meses, e congelamento em glicerol (20%), a -80 °C, para conservação do inóculo a longo prazo.

A bactéria foi cultivada em meio de cultura Nutriente-água (NA) (3 g.L⁻¹ extrato de carne, 5 g.L⁻¹ peptona, 10 g.L⁻¹ dextrose, 1 g.L⁻¹ NaCl, 15 g.L⁻¹ ágar), durante 48 horas, a 26-28 °C. Para preparo do inóculo a bactéria foi diluída em água destilada e esterilizada. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada por turbidimetria, em colorímetro a 480 nm, determinando-se a concentração em $3,4 \times 10^8$ células/ml, para transmitância de 51,2%. A inoculação foi realizada por aspersão com o auxílio de uma bomba de vácuo, para que a penetração da bactéria ocorresse apenas pelas aberturas naturais. As plantas inoculadas foram incubadas à temperatura de 28 °C, sob fotoperíodo de 16 h de luz, em câmara de crescimento modelo PGW 36 (CONVIRON, Winnipeg, MAN, Canada), permanecendo em câmara úmida, durante 3 dias.

Foram inoculados de 6 a 10 plantas de cada linhagem transgênica. Como testemunhas foram utilizadas plantas não transgênicas provenientes de cultura de tecidos.

Por se tratar de doença quarentenária e sujeita a erradicação no Estado de São Paulo, algumas medidas de segurança foram tomadas para a condução dos experimentos. Os procedimentos de inoculação foram realizados em salas exclusivas, fechadas e com acesso permitido somente para pessoas envolvidas no projeto. Todo o material utilizado durante os experimentos foi esterilizado por autoclave, e o material vegetal incinerado após a autoclavagem, conforme normas de segurança.

3.6.3 Avaliação da severidade da doença

Após 30 dias da inoculação, foram coletadas de 2 a 3 folhas por clone inoculado. As folhas foram digitalizadas utilizando-se um “scanner” HP Scanjet 3770 (Hewlett Packard, Boise, ID, USA) e a severidade de cada folha foi determinada pelo software de quantificação de doença QUANT v.1.0 (VALE et al., 2001).

Os dados de severidade foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) usando software PROC GLM do SAS (SAS, Inc, 2002) e as médias comparadas pelo teste Duncan ($P < 0,01$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A engenharia genética é uma ferramenta com grande potencial para obtenção de plantas resistentes a doenças. Diversos genes relacionados com a defesa de plantas contra patógenos têm sido identificados, clonados e introduzidos em plantas por transformação genética. Estes genes introduzidos em plantas, normalmente são colocados sob o controle de promotores fortes, tais como o *PCaMV35S*, que induz a expressão constitutiva do gene em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento da planta. O uso de um promotor que torne a expressão do gene de interesse, restrita no tempo e local da invasão do patógeno seria ideal para estes casos de indução de resposta de defesa pela planta.

Na tentativa de obter plantas transgênicas de variedades copa de laranja resistentes às principais doenças que atacam os citros, utilizou-se neste trabalho o gene, *hrpN*, que ativa o sistema de defesa em plantas, ligado a um peptídeo sinal para fazer o transporte da proteína até o apoplasto, sob o controle de um promotor, (*PgstI*), induzido por patógenos. Plantas transgênicas da variedade ‘Hamlin’ foram testadas, com a bactéria *Xac*, para avaliação da sua resposta com relação ao desenvolvimento da doença.

4.1 Transformação genética com o gene *uidA*

Os experimentos de transformação genética com o gene *uidA* foram realizados utilizando o plasmídeo pCPP1300 (Figura 1), clonado no vetor pBIN 19 (FRISCH et al., 1995), que carrega o T-DNA contendo o gene *uidA* dirigido pelo promotor *PgstI*. Foram realizados experimentos apenas com a variedade ‘Valencia’, já que estas plantas seriam utilizadas somente para verificar a ativação do promotor *PgstI*. Mais de 10 plantas foram enxertadas *in vitro*, porém apenas 3 plantas sobreviveram e foram aclimatizadas.

As plantas regeneradas foram analisadas por PCR para detecção do gene *uidA*. O resultado da análise de PCR está representado na Figura 3a, onde é possível observar um fragmento de 600 pb, correspondente à parte do gene amplificada.

O desenvolvimento destas plantas foi normal quando comparado ao desenvolvimento de plantas não transgênicas aclimatizadas em casa-de-vegetação, não tendo sido observado qualquer anormalidade durante o seu crescimento e brotação.

Estas plantas foram testadas para verificar a ativação do promotor *PgstI* em laranja. O promotor *PgstI* foi clonado a partir do gene que codifica a enzima glutathione S-transferase de batata (MARTINI, 1993). Na Figura 3 podemos visualizar que o gene *uidA* foi ativado por ferimentos e também pelo patógeno bacteriano, *Xac*, agente causal do cancro cítrico. Quando folhas adultas foram feridas com alfinete foi possível detectar a expressão do gene *uidA* (Figura 3b) após incubar as folhas com o substrato X-gluc, por 16h, a 37 °C. Nas folhas inoculadas com o patógeno foi possível visualizar a expressão do gene *uidA* 48 h após a inoculação. Na Figura 3c podemos ver uma folha jovem mostrando reação GUS+ depois de inoculada com a bactéria *Xac*, e outra folha adulta mostrando reação negativa, confirmando que a bactéria *Xac* não é capaz de penetrar por aberturas naturais em folhas adultas. E no detalhe (Figura 3d) podemos verificar os pontos em azul, mostrando uma reação GUS+ restrita às células onde houve penetração da bactéria.

Em batata, o gene *gstI* é rapidamente induzido por fungo, bactéria, vírus e nematóide, mas não é induzido por estímulos abióticos (MARTINI et al., 1993, STRITTMATTER et al., 1996), como ferimentos mecânicos, choque térmico ou alta intensidade luminosa (MARTINI et al., 1993). Plantas transgênicas de maçã expressando o gene *uidA* sob o controle do promotor *PgstI* foram testadas para ativação do promotor após ferimento, e o promotor *PgstI* foi apenas fracamente ativado, e não considerou-se este nível de ativação como sendo suficiente para afirmar que o promotor foi induzido por ferimento nestas plantas (MALNOY et al., 2006). Nestas mesmas plantas o promotor foi rapidamente induzido por bactéria (48h) e mais lentamente por fungo (10 dias) mostrando um padrão diferencial de ativação dependente do patógeno. Porém, quando estas plantas foram inoculadas com um mutante da bactéria patogênica *Erwinia amylovora*, deficiente na produção da proteína harpina_{Ea}, o promotor *PgstI* não foi ativado, o que indica que para este patógeno, a proteína harpina_{Ea} é um fator complementar para a ativação do promotor.

Figura 3 – Identificação e avaliação de plantas de laranja transgênicas variedade ‘Valência’ contendo o gene *uidA* dirigido pelo promotor *Pgst1*. a) PCR de gemas adventícias regeneradas após transformação genética. M: marcador 100 pb (Fermentas), C-: controle negativo (planta não transgênica), C+: controle positivo (bactéria carregando o plasmídeo pCPP 1300), colunas 2, 3, 4, 6 e 8: plantas transgênicas, colunas 1, 5 e 7: plantas não transgênicas; b) folha adulta mostrando reação GUS+ após ferimento com alfinete; c) folha jovem e folha adulta após inoculação com a bactéria *Xac*; d) detalhe de folha jovem inoculada, mostrando os pontos de penetração do patógeno e ativação do gene *uidA*

4.2 Transformação genética com o gene *hrpN*

Os experimentos de transformação genética com o gene *hrpN* foram realizados utilizando-se dois plasmídeos, pCPP1294 e pCPP1298, que contêm o gene *hrpN* dirigido pelo promotor *PgstI*. Os experimentos utilizando o plasmídeo pCPP 1294 foram repetidos várias vezes e sempre a quantidade de gemas regeneradas era muito baixa, assim, concentramos os experimentos de transformação genética utilizando somente o plasmídeo pCPP1298, que mostrou maior eficiência na regeneração de prováveis gemas transgênicas.

Os resultados de transformação genética com o plasmídeo pCPP 1298 estão descritos na Tabela 1. Cerca de 2 experimentos foram realizados para obtenção de plantas transgênicas com o gene *hrpN* para cada uma das variedades ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Natal’, sendo que para cada experimento foram utilizados 300 segmentos de epicótilo. Para laranja ‘Pêra’ foram realizados 3 experimentos, já que esta variedade apresenta maior dificuldade na regeneração de gemas adventícias após a transformação genética, resultando sempre em um número muito baixo de brotos transgênicos regenerados e alto número de escapes.

Tabela 1 - Número de gemas adventícias desenvolvidas, plantas avaliadas por PCR, eficiência de transformação genética e total de plantas transgênicas, contendo o gene *hrpN* sob o controle do promotor *PgstI*

Variedades	Nº explantes com gemas/ total de explantes	Nº gemas formadas/ Nº explantes com gemas	Nº brotos PCR+/ brotos avaliados	Eficiência de transformação* (%)	Plantas transgênicas aclimatizadas
Hamlin	55/600	95/55	37/44	6,2	12
Valência	86/600	146/86	34/47	5,6	17
Natal	98/600	95/34	24/78	4,0	22
Pêra	218/925	490/218	25/127	2,7	19

* número de brotos PCR+ por explantes inoculados

Um total de 95, 146, 95 e 490 gemas se desenvolveram a partir dos explantes inoculados para laranja ‘Hamlin’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Pêra’, respectivamente (Figura 4a-b). Como a seleção por antibióticos é ineficiente, foi necessário analisar as plantas regeneradas por PCR para

confirmar a presença do gene de interesse, pois a ocorrência de alto índice de regeneração de escapes é freqüente em trabalhos de transformação genética em citros (PEÑA et al., 1995b). A ausência de amplificação de fragmentos dos tamanhos esperados para ambos os genes foi constante, confirmando a regeneração de escapes.

Do total de brotos regenerados, 44 brotos da variedade ‘Hamlin’, 47 brotos de ‘Valência’, 78 brotos de ‘Natal’ e 127 brotos de ‘Pêra’ foram analisadas por PCR para confirmação da transformação genética. Brotos PCR+ apresentaram amplificação de um fragmento de 563 pb correspondente à parte do gene *hrpN* amplificada (Figura 4c). Os brotos, confirmados por PCR como transgênicos, foram enxertados *in vitro* em plântulas de citrange Carrizo, permanecendo em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS até que pudessem ser transferidas para vasos (Figura 4d-e), porém muitos brotos morreram durante este processo. A enxertia *in vitro* é prática comum em transformação genética de citros, pois muitas plântulas transgênicas não produzem raízes ou produzem muito lentamente (KAYIM et al., 2004, PEÑA et al., 1997, YANG et al., 2000). Dificuldade em obter plantas transgênicas enraizadas *in vitro* é mencionada também em transformação genética de outras espécies lenhosas como maçã (JAMES et al., 1989), ameixa (MANTE et al., 1991) e citrange Carrizo (MOORE et al., 1992).

Os valores de eficiência de transformação genética para as variedades de laranja ‘Hamlin’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Pêra’, para os experimentos em que se usou o plasmídeo pCPP 1298, estão representados na Tabela 1. A eficiência de transformação genética variou entre 2,7 e 6,2% de acordo com a variedade de laranja utilizada. Este valor de eficiência de transformação genética é obtido calculando-se a percentagem do número de brotos PCR+ pelo número de explantes inoculados (PEÑA et al., 1995b). Valores baixos de eficiência de transformação genética são encontrados para variedades de laranja doce (HIDAKA et al., 1990, MOORE et al., 1992, PEÑA et al., 1995a), bem como para outros genótipos de citros, sendo que experimentos com citrange Carrizo resultam nos maiores índices de regeneração de plantas transgênicas (DOMINGUEZ et al., 2004, PEÑA et al., 1995b). Porém valores superiores a 30% de eficiência de transformação genética já foram obtidos para variedades de laranja doce (MENDES et al., 2002).

Figura 4 – Transformação genética, seleção, regeneração e aclimatização de plantas de laranja transgênicas. a) segmentos de epicótilo em meio de cultura de seleção; b) detalhe de uma gema adventícia regenerada a partir de um segmento de epicótilo; c) análise de PCR para identificação de gemas adventícias transgênicas. M: marcador 100 pb (Fermentas), C+: controle positivo (bactéria contendo o plasmídeo pCPP 1298), C-: controle negativo (planta não transgênica), colunas 2, 4, 5, 6, 9 e 10: gemas adventícias transgênicas, colunas 2, 7, 8: gemas adventícias não transgênicas; d) detalhe da enxertia de um broto transgênico; e) planta transgênica em desenvolvimento

A regeneração de escapes é um fato constante em experimentos de transformação genética de citros, porém nossos resultados mostram valores diferenciados de acordo com a variedade. Para as laranjas ‘Hamlin’ e ‘Valência’ houve uma baixa percentagem de regeneração de escapes, já para as laranjas ‘Natal’ e ‘Pêra’ este número foi superior a 60%. A regeneração de escapes pode atingir 95% do total de brotos formados (YANG et al., 2000), contudo essa regeneração de escapes não pode ser atribuída somente à proteção das células não transformadas por células transformadas, localizadas na sua proximidade, mas também à persistência de *Agrobacterium*, em tecidos inoculados, por um longo período de tempo (DOMINGUEZ et al., 2004).

Quanto ao desenvolvimento das plantas transgênicas, a maioria das plantas contendo o gene *hrpN* mostrou um fenótipo anormal, podendo ser observado uma redução no porte, superbrotamento de ramos, folhas deformadas, queda das folhas e lesões necróticas no caule (Figura 5), fenômeno não usual no desenvolvimento de plantas transgênicas de citros em casa-de-vegetação. Logo que as plantas foram transferidas para a casa-de-vegetação já foi possível identificar a deformação das folhas, e com a poda das plantas os sintomas de superbrotamento e queda de folhas se intensificaram. Este fenótipo não se mostra uniforme para todas as plantas aclimatizadas, algumas apresentam desenvolvimento normal (Figura 5a). O número total de plantas com este tipo de desenvolvimento está descrito na Tabela 2. As plantas anormais são predominantes, sendo que do total de plantas aclimatizadas para cada variedade de laranja, 80% de ‘Hamlin’, 67,3% de ‘Valência’, 77,8% de ‘Natal’ e 58% de ‘Pêra’ mostraram algum tipo de deformação.

Tabela 2. Número de plantas transgênicas aclimatizadas que desenvolveram fenótipo anormal, normal e número total de plantas que foi possível propagar por enxertia

Variedades	Plantas normais	Plantas anormais	Plantas propagadas por enxertia
Hamlin	2	8	8
Valência	4	11	10
Natal	6	14	8
Pêra	12	7	-

As plantas de laranja ‘Pêra’ não puderam ser multiplicadas por que ainda eram muito pequenas para a coleta de borbulhas para a enxertia. Porém, as linhagens transgênicas que puderam ser multiplicadas, mostraram desenvolvimento semelhante ao da planta matriz, ou seja, as gemas enxertadas desenvolveram o mesmo fenótipo, e como consequência mostraram um crescimento mais lento quando comparado com a testemunha e até mesmo com plantas transgênicas expressando outros genes.

Dentre aquelas que desenvolveram um fenótipo anormal é possível observar diferentes tipos de deformações, onde algumas possuem ramos e folhas anormais (Figura 5b-i), superbrotamento (Figura 5c-e), necrose em caule (Figura 5g-h), outras desenvolvem folhas encarquilhadas já no início da formação do ramo (Figura 5b, f), mas com o tempo as folhas tendem a se desenvolver normalmente, e uma minoria de plantas permaneceu anã ou atrofiada (Figura 5i), não sendo possível coletar folhas para a análise de Southern blot, nem coletar borbulhas para propagação por enxertia para realização dos testes de resistência com a bactéria *Xac*.

Plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *hrpZ_{P_{SS}}* (TAKAKURA et al., 2004) *hrpZ_{P_{sph}}* (TAMPAKAKI; PANOPOULOS, 2000), que codificam para proteínas harpinas com as mesmas propriedades que a harpina_{Ea}, foram desenvolvidas e não mostraram qualquer anormalidade no seu desenvolvimento mesmo sob o controle de um promotor constitutivo, *P35S*.

Um outro caso, também em tabaco, plantas transgênicas expressando o gene *hrpN*, além de mostrarem desenvolvimento normal, também mostraram maior crescimento, indicando que a proteína harpina_{Ea} desempenhou função estimuladora no crescimento destas plantas. Existem muitos exemplos da aplicação exógena de harpina_{Ea} em condições de campo onde as plantas tratadas com o produto comercial Messenger® além de desenvolverem resistência a diversos patógenos também mostraram um aumento no crescimento e produtividade (JONES, 2001).

Bauer et al. (1999) desenvolveram plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando o gene *hrpN* em dois cassetes de expressão diferentes, um sob o controle do promotor induzível *PgstI* e outro sob o controle do promotor constitutivo *Pnos*, sendo que plantas com o gene *hrpN* sob o controle do promotor *PgstI* mostraram desenvolvimento normal, enquanto plantas com o gene *hrpN* sob o controle do promotor *Pnos*, desenvolveram algum tipo de dano macroscópico não descrito. A ocorrência de anormalidades no desenvolvimento de plantas transgênicas de citros contendo o gene *hrpN*, sob o controle do promotor *PgstI*, indica que existe

Figura 5 – Desenvolvimento de plantas de laranja transgênicas expressando o gene *hrpN* aclimatizadas em casa-de-vegetação. a) planta de laranja ‘Hamlin’ transgênica apresentando desenvolvimento normal; b) planta de laranja ‘Hamlin’ com início de desenvolvimento anormal; c) planta de laranja ‘Hamlin’ com superbrotamento; d) detalhe de ramos com início de superbrotamento e folhas anormais; e) planta transgênica de laranja ‘Valência’ com queda de folhas em alguns ramos; f) detalhe de ramos mostrando áreas sem folhas e aparecimento de áreas com necrose; g) planta transgênica de laranja ‘Natal’ mostrando áreas necrosadas no caule; h) detalhe do tecido necrosado; i) planta transgênica de laranja ‘Pêra’ com atrofia no crescimento

algum fator abiótico ou do próprio genoma da laranja interagindo com estas plantas que levou à ativação constitutiva do promotor, não tornando possível sua ativação somente pela presença de patógenos.

4.3 Análises moleculares

As plantas PCR positivas aclimatizadas em casa-de-vegetação foram analisadas por Southern blot para confirmar a integração do gene *hrpN* e analisar o número de eventos de inserções do gene no genoma das plantas. O DNA genômico extraído de folhas das plantas matrizes das variedades de laranja ‘Hamlin’, ‘Valência’ e ‘Natal’ foi digerido com a enzima *HindIII*, que corta o T-DNA em apenas um local, fora do gene. As plantas de laranja ‘Pêra’ não foram analisadas devido ao tamanho inadequado para retirada de folhas e extração de DNA para esta análise.

Os resultados da análise podem ser visualizados na Figura 6. Foram analisadas 10 plantas de laranja ‘Hamlin’ (Figura 6a), 10 plantas de laranja ‘Valência’ (Figura 6b) e 12 plantas de laranja ‘Natal’ (Figura 6c). Algumas plantas aclimatizadas não foram analisadas por Southern blot devido à dificuldade em coletar folhas para extração de DNA. O número de fragmentos gerados indica o número mínimo de inserções do T-DNA, sendo que o número de eventos contidos nas plantas variou de 1 evento (ex. Figura 6a, colunas 3-6) até 4 eventos (Figura 6b, coluna 6) de inserção.

Duas plantas de cada variedade analisada não mostraram sinais de hibridização, mesmo depois de repetida a análise por 3 vezes (ex. Figura 6b, colunas 1 e 2), indicando que o gene *hrpN* não foi inserido no genoma destas plantas. Isto pode ter ocorrido devido a erros na seleção das plantas durante a microenxertia, contudo, existe grande probabilidade de que estes falsos positivos tenham sido gerados pela presença de *Agroacterium* residual nos tecidos analisados ainda na fase de seleção, em meio de cultura.

Devido aos problemas no desenvolvimento das plantas, e por acharmos que talvez o gene estivesse sendo expresso por algum outro fator que não fossem patógenos, plantas de laranja ‘Hamlin’ foram analisadas por RT-PCR e western blot para verificar a transcrição e tradução do gene *hrpN* nas plantas matrizes da casa de vegetação.

Figura 6 – Análise de Southern blot em plantas PCR+ aclimatizadas em casa-de-vegetação. C+: controle positivo (plasmídeo pCPP 1298 digerido com a enzima HindIII). C-: controle negativo (planta não transgênica). Colunas numeradas correspondem ao DNA digerido com a enzima *HindIII* de laranja ‘Hamlin’ (a); laranja ‘Valência’ (b) e laranja ‘Natal’ (c)

O resultado da análise de RT-PCR encontra-se na Figura 7a, onde pode-se observar na maioria das plantas um fragmento de 563 pb correspondente a parte do cDNA do gene *hrpN* amplificado. A partir destas observações podemos afirmar com certeza, que o promotor *PgstI* está sendo ativado nas plantas matrizes, o que pode explicar o desenvolvimento anormal das plantas. Porém, as linhagens H5, H6 que são normais e a linhagem H9, que mostra algumas folhas anormais, mas o desenvolvimento como um todo não foi afetado, não tiveram a transcrição confirmada por RT-PCR ou mostraram maior dificuldade durante análise. Estas três linhagens foram analisadas repetidas vezes, e ainda assim, não foi possível detectar a transcrição do gene *hrpN* nas linhagens H6 e H9, enquanto as outras linhagens tiveram sua transcrição facilmente confirmada. Esta dificuldade na detecção da transcrição das linhagens H5, H6 e H9 poderia indicar que estas plantas apresentam níveis muito baixos de expressão, quando comparado com as outras linhagens analisadas, o que explicaria o fenótipo normal destas plantas.

Quanto às plantas com fenótipo anormal talvez a própria proteína harpina_{Ea} esteja ativando o promotor, como no caso em que este mesmo promotor em plantas transgênicas de maçã foi ativado após inocular a planta com a bactéria *Erwinia amylovora* (MALNOY et al., 2006), indicando que talvez nas plantas de laranja, tenha ocorrido um efeito “feedback”, onde uma pequena quantidade da proteína esteja ativando o promotor, e desta forma, induzindo a síntese de mais proteína, pois a proteína está ligada a um peptídeo sinal, o que garante que a proteína encontre seu receptor no apoplasto da célula vegetal.

Para confirmar que as plantas matrizes estavam produzindo a proteína, foi feito um western blot com 6 linhagens de laranja ‘Hamlin’. O resultado da análise de western blot pode ser observado na Figura 7b, onde podemos visualizar uma banda de tamanho esperado para a proteína harpina_{Ea}, indicando que todas as plantas analisadas estão sintetizando a proteína transgênica mesmo sem contato com patógenos, inclusive as linhagens em que foi difícil a detecção da transcrição do gene *hrpN*.

Plantas transgênicas de outras espécies, expressando genes que codificam harpinas sempre foram normais, exceto, um caso de *Arabidopsis* em que o gene *hrpN* se encontra sob o controle de um promotor constitutivo, o promotor *Pnos* (BAUER et al., 1999). Em todos os trabalhos o gene não estava ligado a uma sequência sinal, sendo que nas plantas de laranja, o gene *hrpN* está ligado a um peptídeo sinal, para que a proteína seja exportada para o apoplasto da célula onde está localizado o receptor da proteína harpina_{Ea}.

Figura 7 – Análise da transcrição e tradução do gene *hrpN* em plantas matrizes de laranja, variedade ‘Hamlin’ aclimatizadas em casa-de-vegetação. a) RT-PCR para detecção do RNAm do gene *hrpN*. M. marcador 100 pb (Fermentas); C+: controle positivo (DNA planta transgênica); C-: (DNA de planta não transgênica); H3-H12: cDNA de plantas transgênicas matrizes da variedade ‘Hamlin’; b) western blot para detecção da proteína harpina_{Ea} em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’. M: marcador SeeBlue Plus2 pre-Stained Standard (Invitrogen); C-: proteína total de *E. coli* não transformada; C+: proteína total de *E. coli* DH5α superespressando o gene *hrpN*; H4, H5, H7, H8, H9 e H10: proteína total extraída de plantas mantidas em casa-de-vegetação

4.4 Avaliação da resistência a *X. axonopodis* pv. *citri*

Plantas de laranja ‘Hamlin’ propagadas por enxertia foram avaliadas quanto à resistência ao agente causal do cancro cítrico, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Foram propagadas 8 linhagens de plantas transgênicas (H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 e H10) e uma linhagem não transgênica utilizada como testemunha, porém somente 6 linhagens de plantas transgênicas foram inoculadas, utilizando no mínimo 6 repetições. As linhas H11 e H12 não puderam fornecer borbulhas para enxertia devido aos problemas de desenvolvimento discutidos acima. Além da dificuldade em obter borbulhas para propagação, também foi difícil obter plantas com o mesmo estágio de desenvolvimento, sendo que plantas normais se desenvolviam mais rapidamente do que aquelas apresentando fenótipo anormal, por isso não foram testadas todas as linhagens multiplicadas.

A inoculação foi realizada com uma suspensão bacteriana ajustada para $3,4 \times 10^8$ células/ml em plantas contendo brotações e folhas jovens para favorecer a penetração da bactéria *Xac* via estômatos.

O início do desenvolvimento dos sintomas foi observado aos 7 dias após a inoculação, com o aparecimento de pequenas manchas cloróticas com o centro acinzentado. A quantificação da incidência e severidade foi feita 30 dias após a inoculação. A maioria das linhagens apresentou 100% de incidência, somente as linhagens H10 e H8 apresentaram 83% e 89% de incidência, respectivamente.

Na Figura 8, pode-se comparar o número de lesões em folhas analisadas após 30 dias da inoculação, sendo que a H10 é uma linhagem que se mostrou mais resistente, enquanto que a H9 foi uma linhagem menos resistente, indicando que houve uma redução no número de lesões por folha, quando comparados com a testemunha, que é uma planta não transgênica. Também é possível visualizar que as folhas da linhagem H10, que mostraram desenvolvimento anormal, são diferentes quando comparadas com as folhas da planta testemunha e da linhagem H9.

Os resultados na Figura 9a mostram os valores de severidade da doença em porcentagem da testemunha. Todas as linhagens testadas mostraram diferença estatística significativa ($P < 0,01$) pelo teste de Duncan, o que indica que todas as linhagens inoculadas apresentaram uma

Figura 8 – Severidade do cancro cítrico em folhas de laranja ‘Hamlin’ transgênica, 30 dias após a inoculação com a bactéria *Xac*. H9: linhagem mais suscetível; H10: linhagem mais resistente

significante redução nos sintomas do cancro cítrico. A redução nos sintomas variou de 35% na linhagem H9 a 87% na linhagem H5 quando comparados com a planta testemunha (100%). Mesmo, com a redução nos sintomas, nenhuma das linhagens desenvolveu resistência completa contra o patógeno, o que indica, que apesar da proteína harpina_{Ea} induzir determinadas rotas de defesa, existem outros mecanismos de defesa que não foram acionados, o que nos faz concluir que as plantas utilizam vários mecanismos de defesa, que funcionam independentemente.

A inesperada ativação do gene também pode estar interferindo na capacidade da planta em ativar mecanismos de defesa que sejam suficientes para controlar o patógeno. Esta hipótese se baseia na observação do desempenho da linhagem H5, que foi a que apresentou maior redução dos sintomas, correspondendo a 87% de redução quando comparada com a testemunha, mas ainda assim, foi possível visualizar algumas poucas lesões, indicando que os mecanismos de defesa ativados pela harpina não foram suficientes para que a planta desenvolvesse uma resistência completa.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene *hrpN* sob o controle do promotor *Pgst1* foram resistentes a *Peronospora parasitica*, as plantas inoculadas com este patógeno não desenvolveram qualquer tipo de sintoma até 10 dias após a inoculação (BAUER et al., 1999).

A avaliação da transcrição do gene foi realizada também pela análise de RT-PCR em plantas com 30 dias após a inoculação (Figura 9b). O RT-PCR nos mostrou que plantas com 30 dias após a inoculação estavam expressando o gene *hrpN* não só apenas em folhas com sintomas, mas também em folhas sem sintomas de cancro. Nas linhagens H5 e H9, que mostraram maior dificuldade em analisar a transcrição do gene *hrpN* quando não inoculadas, quando analisadas aos 30 dias após a inoculação, a transcrição foi mais facilmente observada. Plantas transgênicas de maçã expressando o gene *uidA* sob o controle do promotor *Pgst1* mostrou evidências de uma indução sistêmica pelo promotor, pois foram encontrados níveis semelhantes da proteína tanto em folhas inoculadas como em folhas não inoculadas (MALNOY et al., 2006).

A planta H5 parecer ser a linhagem mais promissora, pois apresenta desenvolvimento normal, e dentre as linhagens testadas foi a que melhor resistiu à infecção pela bactéria *Xac*. Nesta linhagem talvez o promotor esteja sendo ativado somente no momento da tentativa de penetração pelo patógeno, e por isso, estas plantas podem ser testadas com outros patógenos que afetam as variedades copa de laranja doce, e que causam grandes prejuízos.

Figura 9 – Análise da severidade do cancro cítrico e transcrição do gene *hrpN*, 30 dias após a inoculação com a bactéria *Xac*. a) avaliação da severidade do cancro cítrico em relação à testemunha. Barras de erro indicam o desvio padrão da média. Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,01$). test: planta não transgênica inoculada; H4, H5, H7, H8, H9 e H10: plantas transgênicas inoculadas; b) RT-PCR de cDNA de plantas inoculadas. M. marcador 100 pb (Fermentas); C+: cDNA de planta transgênica; C-: cDNA de plantas não transgênica; H4-H10: cDNA de plantas transgênicas inoculadas

Plantas transgênicas de laranja das variedades ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Pera’ serão analisadas para resistência ao cancro cítrico, e as plantas selecionadas como genótipos promissores poderão ser analisadas em condições de campo no futuro.

5 CONCLUSÕES

- Foi possível obter plantas transgênicas de laranja doce das variedades ‘Hamlin’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Pêra’ com o gene *hrpN*, confirmadas por Southern blot;
- Foi confirmada a inserção do gene, sua transcrição e tradução em proteína pelas análises de Southern blot, RT-PCR e western blot, em plantas transgênicas da variedade ‘Hamlin’;
- Houve redução nos sintomas de cancro cítrico em plantas transgênicas da variedade ‘Hamlin’ inoculadas com a bactéria *Xac*;
- O promotor *Pgst1* foi ativado pelo patógeno, *Xac*, e por dano mecânico;
- Plantas transgênicas de laranja das variedades ‘Hamlin’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Pêra’ expressando o gene *hrpN* mostraram desenvolvimento anormal.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M.S.; HAKIMI, S.M.; KANIEWSKI, W.K.; ROMMENS, C.M.T.; SHULAEV, V.; LAM, E.; SHAH, D.M. Characterization of acquired resistance in lesion-mimic transgenic potato expressing bacterio-opsin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.10, p. 635-645, 1997.
- ABDUL-KADER, A.M.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; BAUER, D.W.; BEER, S.V. Evaluation of the *hrpN* gene for increase resistance to fire blight in transgenic apple. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 489, p. 247-250, 1999.
- ÁDÁM, A.L.; PIKE, S.; HOYOS, E.M.; STONE, J.M.; WALKER, J.C.; NOVACKY, A. Rapid and transient activation of a mycelin basic protein kinase in tobacco leaves with harpin from *Erwinia amylovora*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 115, p. 853-861, 1997.
- AHMAD, M.; MAJERCZACK, D.R.; PIKE, S.; HOYOS, M.E.; NOVACKY, A.; COPLIN, D.L. Biological activity of harpin produced by *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.14, n. 10, p.1223-1234, 2001.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.P.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 4, p. 382-386, 2001.
- ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BOSCARIOL, R.L.; PINO, L.E.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerik, v. 164, p. 203-211, 2003.
- ALT-MOERBE, J.; NEDDERMANN, P.; VON LITIG, J.; WEILER, E.W.; SCHRÖDER, J. Temperature sensitive step in Ti plasmid vir region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria*. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 213, p. 1-8, 1988.
- AMARAL, A.M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília: Embrapa 2003. 31p.(**Comunicado Técnico, 86**).
- AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (bO), cecropina e gus**. 2005. 76p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W.; MOCK, N.M. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 102, p. 1341-1343, 1993.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R.F. The Continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 291-306, 1989.

BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição do cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 30-35, 2001.

BAUER DW.; BOGDANOVE A.J.; BEER, S.V.; COLLMER, A. *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 7, n. 5, p. 573-81, 1994.

BAUER, D.W.; ZUMOFF, C.H.; THEISEN, T.M.; BOGDANOVE, A.J.; BEER, S.V. Optimized production of *Erwinia amylovora* harpin and its use to control plant disease and enhanced plant growth. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 6, S7, 1997.

BAUER, D.W.; GARR, E.R.; BEER, S.V.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S. New approaches to the development of transgenic plants resistant to fire blight, **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 489, p. 301-304, 1999.

BEER, S.V.; BAUER, D.W.; JIANG, X.H.; LABY, R.J.; SNEATH, B.J.; WEI, Z.-M.; WILCOX, D.A.; ZUMOFF, C.H. The *hrp* gene cluster of *Erwinia amylovora*. In: HENNECKE, H.; VERMA, D.P.S. (Ed.). **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Dordrecht: Kluwer Academic publishers, 1991. p. 53-60.

BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; RIBEIRO, L.M.; JESUS JUNIOR, W.C.; AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T.R.; LARANJEIRA, F.F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo – Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8. 2001. Ouro Preto, **Proceeding...** Ouro Preto: International Society of Plant Pathology. 2001. p. 28-29.

BHAT, S.R.; CHITRALEKHA, P.; CHANDEL, K.P.S. Regeneration of plants from long term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 19-25, 1992.

BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico**, São paulo, v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.

BOND, J.E.; ROOSE, M.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p.229-234, 1998.

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

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.; CARODOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MEDES, B.M.J. *Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **Journal of American Society in Horticultural Science**, Alexandria, v. 131, n. 4, p. 530-536, 2006.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. cap. 2, p. 19-36.

BRAITHWAITE, M.; LEITE JÚNIOR, R.P.; SMITH, J.J.; BOA, E.; SADDLER, G.S. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in *Citrus sinensis* in Bolivia. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 51, p.141-157, 2003.

CABASSON, C.; ALVARD, D.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; TEISSON, C. Improvement of citrus somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 50, p. 33-37, 1997.

CARLSSON, A.; NYSTROM, T.; DE COCK, H.; BENNICHI, H. Atacin – an insect immune protein-binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer membrane protein synthesis. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 2179-2188, 1998.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Maryland, v. 42, p. 225, 1939.

CARNEIRO, V.T.C.; CONROY, T.; BARROS, L.M.G.; MATSUMOTO, K.; Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA; SPI; CNPH, 1998. v.1, p. 423-458.

CEPEA Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em 25 nov. 2005.

CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, London, v.7, p.51-59, 1998a.

CERVERA, M.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.18, p.271-278, 1998b.

CERVERA, M.; LÓPEZ, M.M.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Virulence and supervirulence de *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.52, p 67-78, 1998c.

CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene *HAL2* from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.75, p.26-30, 2000.

CHANG, C.J.; GARNIER, M. ZREIK, L.; ROSSETI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v. 27, p. 137-142, 1993.

CHATUVERDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of citrus from somatic callus culture. **HortScience**, Alexandria, v.9, p.118-120, 1974.

CHISTIANO, R. S. C. **Componentes monocíclicos do cancro cítrico no sistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*-Limão Tahiti-*Phyllocnistis citrella*, sob condições controladas**. 2003. 104p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CIVEROLO, E.L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri* In: CITRUS CANKER: AN INTERNATIONAL PERSPECTIVE, Lake Alfred, 1985. **Citrus Canker: An international perspective**. Lake Alfred; Citrus Research and Education Center, University of Florida, 1985. p. 11-17.

CLARKE, J.D.; LIU, Y.; KLESSING, D.F.; DONG, X. uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis cpr6-1 mutant. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 557-569, 1998.

COSTA, M.G.C.; OTONI, W.C.; MOORE, G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradise* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 365-373, 2002.

DESIKAN, R.; REYNOLDS, A.; HANCOCK, J.T.; NEYLL, S.J. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in Arabidopsis suspension cultures. **Biochemical Journal**, Bristol, v. 330, p.115-120, 1998.

DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of *citrus* tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.427-433, 2000.

DOMÍNGUEZ, A.; MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) in plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.10, p. 1-10, 2002.

DOMÍNGUEZ, A.; CERVERA, M.; PÉREZ, R.M.; ROMERO, J.; FAGOAGA, C.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M.M.; JUÁREZ, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 171-183, 2004.

DONG, H.; DELANEY, T.P.; BAUER, D.W.; BEER, S.V. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. **The Plant Journal**, York, v.20, p. 207-215, 1999.

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

DURÁN-VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of three *citrus* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 16, p. 123-133, 1989.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

FAO. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em 03 de jan. 2007.

FAWCETT, H.S.; JENKINS, A.E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 23, p. 820-824, 1933.

FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradise*) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, p. 421-428, 2003.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. v. 2, p. 261-296.

FLEMING, G.H.; OLIVARES-FUSTER, O.; FATTA DEL-BOSCO, S.; GROSSER, J.W. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. **In vitro Cellular Development Biology**, Columbia, v.36, p.450-455, 2000.

FNP Consultoria & Comércio. **Agrianual: anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo. 2006. 504p.

FRISCH, D.A.; HARRIS-HALLER, L.W.; YOKUBAITIS, N.T.; THOMAS, T.L.; HARDIN, S.H.; HALL, T.C. Complet sequence of the binary vector Bin 19, **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, p. 405-409, 1995.

Fundecitrus. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em 22 nov. 2006.

GABRIEL, D.W.; KINGSLEY, M.T.; HUNTER, J.E.; GOTTWALD, T.R. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 39, p. 14-22, 1989.

GARCÍA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 715-723, 1999.

GER, M.; CHEN, C.; HWANG, S.; HUANG, H.; PODILE, A.R.; DAYAKAR, B.V.; FENG, T. Constitutive expression of *hrap* gene in transgenic tobacco plant enhances resistance against virulent bacterial pathogens by induction of hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 8, p. 764-773, 2001.

GOH, C.J.; SIM, G.E.; MORALES, C.L.; LOH, C.S. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, p. 301-303, 1995.

GHORBEL, R.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plant. **Theoretical and Applied Genetics**, London, v. 99, p. 350-358, 1999.

GHORBEL, R.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, p. 1183-1189, 2000.

GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. chap. 14. p.335-369.

GOTTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic press, 1990. 342p.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. The efficacy of windbrakes in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 72, n. 3, p.194-201, 1995.

GOTTWALD, T.R.; HUGES, G.; GRAHAM, J.H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 91, p. 30-34, 2001.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n.11, p. 1319-1325, 1992.

GREENBERG, J.T.; SILVERMAN, F.P.; LIANG, H. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5*. **Genetics**, Pittsburgh, v. 156, p. 341-350, 2000.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Review**, Belgium, v. 8, p. 339-374, 1990.

GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, p. 5-8, 1998.

GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, p. 434-449, 2000.

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.

GUTIÉRREZ-E, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *citrus* tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 745-753, 1997.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAJDUKIEWICZ, P.; SVAB, Z.; MALIGA, P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation, **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 25, p. 989-994, 1994.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HE, S.Y.; HUANG, H.C.; COLLMER, A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. **Cell**, Cambridge, v. 73, p. 1255-1266, 1993.

HIDAKA, T.; OMURA, M.; Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture. Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station**, Ibaraki, v. 13, B16, p. 1-7, 1989.

HIDAKA, T.; OMURA, M.; UGAKI, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; HOHSHIMA, M.; MOTOYOSHI, F. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 40, p. 199-207, 1990.

HOOD, E.E.; HELME, G.L.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M.D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, p. 1291-1301, 1986.

HOOD, E.E.; GELVIN, S.B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, London, v. 2, p. 208-218, 1993.

HOYOS, A.E.; STANLEY, C.M.; HE, S.Y.; PIKE, S.; PU, X.-A.; NOVACKY, A. The interaction of harpin_{PS} with plant cell walls. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 9, p. 608-616, 1996.

HUANG, Y.; NORDEEN, R.O.; DI, M.; OWENS, L.D.; McBEATH, J.H. Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 5, p. 494-499, 1997.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em nov. 2005.

JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; BARBARA, D.J.; BEVAN, M. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. **Plant cell reports**, Berlin, v. 7, p. 658-661, 1989.

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**, Berlin, v. 223, p. 449-456, 2006.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v.6, p.3901-3907, 1987.

JONES, J. Harpin. **Pesticide Outlook**, London, v. 12, p. 134-135, 2001.

KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.13, p.541-545, 1994.

KANG, D.; LUNDSTRÖM, A.; STEINER, H. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. **Gene**, Oxford, v. 174, p. 245-249, 1996.

KAYIM, M.; CECCARDI, T.L.; BERRETA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; DERRICK, K.S. Introduction of a citrus blight-associated [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 377-385, 2004.

KLESSING, D.F.; MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, p. 1439-1458, 1994.

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

KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, p. 99-10, 2003.

KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T. Production of somatic hybrid plants through protoplasts fusion of citrus. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Ibaraki, v. 22, p.181-188, 1988.

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

KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S.; Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of *Rutaceae*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, p. 207-210, 1991.

KOIZUMI, M. Citrus canker: the world situation. In: TIMMER, L.W. (Ed.). **Citrus canker: An international perspective**. University of Florida Institute of Food and Agricultural Science. Gainesville: University of Florida Press, 1985. p. 2-7.

KOIZUMI, M.; KIMIJIMA, E.; TSUKAMOTO, T.; TOGAWA, M.; MASUI, S. Dispersion of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1996. Tokyo, **Proceeding...** Tokyo: ISC, 1996. p. 340-344.

LACORTE, C. β -glucuronidase. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.) **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 127-141.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; DELLA COLETTA FILHO, H. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. cap. 18, p. 509-566.

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.19, p. 123-125, 1993.

LEITE JUNIOR, R.P. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v.9, p. 3-7, 1990.

- MACIEL, J.L.N.; DUARTE, V.; AYUB, M.A.Z. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p. 116-120, 1998.
- MAGNON, R.; SINGH, B.D. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.63, p. 123-128, 1995.
- MALAMY, J.; SÁNCHEZ-CASAS, P.; HENNING, J.; GUO, A.; KLESSING, D.F. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, p. 474-482, 1996.
- MALNOY, M.; REYNOIRD, J.P.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.E.; ALDWINCKLE, H.S. Activation of the pathogen-inducible *gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus x domestica*). **Transgenic Research**, London, v. 15, p. 83-93, 2006.
- MANTE, S.; MORGENS, P.; SCORZA, R.; CORDTS, J.M.; CALLAHAM, A.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. **Bio/Technology**, New York, v. 9, p. 853-857, 1991.
- MARTINI, N.; EGEN, M.; RUNTZ, I.; STRITTMATTER, G. Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediated transcriptional activation selectively upon fungal infection. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 236, p.179-186, 1993.
- 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 Development Biology-Plant**, Columbia, v. 37, p. 490-495, 2001.
- MENDES, B.M.J.; BOSCARIOL, R.L.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of 'Hamlin' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 955-961, 2002.
- MENDES-DA-GLORIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CAMARGO, L.E.A.; MENDES, B.M.J. Caipira sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 490-495, 2000.
- MITTLER, R.; SHULAEV, V.; LAM, E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 29-42, 1995.
- MOORE, G.A.; JACONO, C.C.; NEIDIGH, J.L.; LAWRENCE, S.D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.85, p.238-242, 1992.

MOR, H.; MANULIS, S.; ZUCK, M.; NIZAN, R.; COPLIN, D.L.; BARASH, L. Genetic organization of hrp gene cluster and dspAE/BF operon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsofilae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 431-436, 2001.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. **Annals of Botany**, London, v.85, p. 103-110, 2000.

MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explant. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, p. 240-245, 2001.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus development. **Fruit Varieties Journal**, Massachusetts, v. 50, p. 76-80, 1996.

MOURGUES, F.; BRISSET, M.N.; CHEVREAU, E. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. **Trends in Biotechnology**, London, v.16, p. 203-210, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.

NAMEKATA, T. Pesquisas em cancro cítrico no estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 10, n. 2, p. 477-487, 1989.

NASCIMENTO, J.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J.M.A.; RÊGO, M.M.; ARAÚJO, A.E.S. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 81-82, 2003.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus free citrus. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 100, p. 471-479, 1975.

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

NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; DESTÉFANO-BELTRÁN, L.; JAYNES, J.M. Transgenic 'Mailing 26' apple expressing the *attacin E* gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. **Euphytica**, New York, v.77, p. 123-128, 1994.

NORELLI, J.L.; BOREJSZA-WYSOCKA, E.; MOMOL, M.T.; MILLS, J.Z.; GRETHEL, A.; ALKWINCKLE, H.S.; KO, K.; BROWN, S.K.; BAUER, D.W.; BEER, S.V.; ABDUL-KADER, A.M.; HANKE, V. Genetic transformation for fire blight resistance in apple. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 489, p. 295-296, 1999.

OLDROY, G.E.D.; STASKAWICZ, B.J. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. **Proceeding of National Academy of Science USA**, Washington, v. 95, p. 103000-10305, 1998.

OLIVEIRA, R.P.; MENDES, B.M.J.; TULMANN NETO, A. Obtenção e cultura de calos nucelares de limão ‘Cravo’, Tangerina Cleópatra e *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 115-119, 1994.

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

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, p.616-619, 1995a.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J.A.; DURÁN-VILLA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v.104, p. 183-191, 1995b.

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

PEÑA, L.; PÉREZ, R.M.; CERVERA, M.; JUAREZ, J.A.; NAVARRO, L. Early events *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. **Annals of Botany**, London, v. 94, p. 67-74, 2004.

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.

PEREIRA, A. L.; WATANABE, K.; ZAGATTO, A. G.; CIANCIULLI, P. L. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, the causal agent of “citrus canker” in the rhizosphere of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **O Biológico**, São Paulo, v. 44, p. 135-138, 1978.

PEREIRA, G.A. **Uso do gene XylA-xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros**. 2004. 39p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. In vitro regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v. 32, p. 931-934, 1997.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, p.591-596, 1998.

PONTIER, D.; MITTLER, R.; LAM, E. Mechanism of cell death and disease resistance induction by transgenic expression of bacterio-opsin. **The Plant Journal**, York, v. 30, n. 5, p. 499-509, 2002.

POPHAM, P.; PIKE, S.; NOVACKY, A. Membrane potential alterations induced by the bacterial HR-elicitor harpin. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 102, S, 111, 1993.

RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro initiation for nucellar embryos in monoembryonics *Citrus*. **HortScience**, Alexandria, v. 3, p. 226-227, 1968.

RATE, D.N.; CUENCA, J.V.; BOWMAN, G.R.; GUTTMAN, D.S.; GREENBERG, J.T. The gain of function Arabidopsis *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1695-1708, 1999.

REED, J.D.; EDWARDS, D.L.; GONZALES, C.F. Synthetic peptide combinatorial libraries: A method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, p. 537-549, 1997.

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

RIZHSKY, L.; MITTLER, R. Inducible expression of bacterio-opsin in transgenic tobacco and tomato plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 46, p. 313-323, 2001.

ROHINI, V.K.; RAO, K.S. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 889-898, 2001.

ROMMENS, C.M.; SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.E.D.; STASKAWICZ, B.J. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene *Pto*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1537-1544, 1995.

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

RUSHTON, P.J.; REINSTÄDLER, A.; LIPKA, V.; LIPPOK, B.; SOMSSICH, I.E. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen and wound induced signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 749-762, 2002.

RYALS, J.A.; NEUNSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.-Y.; HUNT, M.H. Systemic Acquired Resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SEMPIONATO, O.R.; GIROTTI, L.F.; STUCHI, E.S. Produção de mudas sadias. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**, Bebedouro: Fundecitrus, 1997. 162p.

SHAH, J.; KACHROO, P.; KLESSING, D.F. The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 191-206, 1999.

SHARMA, A.; SHARMA, R.; IMAMURA, M.; YAMAKAWA, M. MACHII, H. Transgenic expression of *cecropina B*, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. **Federation of European Biochemical Societies**, Copenhagen, v. 48, p. 7-11, 2000.

SIM, G.E.; GOH, C.J.; LOH, C.S. Micropropagation of *Citrus mitis* blanco-multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. **Plant Science**, Limerick, v. 59, p. 203-210, 1989.

SONG, J.; BRADEEN, J.M.; NAESE, S.K.; RAASCH, J.A.; WIELGUS, S.M.; HABERLACH, G.T.; LIU, J.; KUANG, H.; AUSTIN-PHILLIPS, S.; BUELL, C.R.; HEGESON, J.P.; JIANG, J. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 100, n. 16, p. 9128-9133, 2003.

STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 581-585, 1983.

STALL, R.E.; CIVEROLO, E.L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p.339-420, 1991.

STRITTMATTER, G.; GHEYSEN, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; HAHN, K.; NIEBEL, A.; ROHDE, W.; TACKE, E. Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9, n. 1, p. 68-73, 1996.

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

TAI, T.H.; DALHBECK, D.; CLARCK, E.T.; GAJIWALA, P.; PASION, R.; WHALEN, M.C.; STALL, R.E.; STASKAWICZ, B.J. Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. **Proceedings of National Academy of Science USA**, Washington, v. 96, p. 14153-14158, 1996.

TAKAKURA, Y.; ISHIDA, Y.; INOUE, Y.; TSUTSUMI, F.; KUWATA, S. Induction of a hypersensitive response-like reaction by powdery mildew in transgenic tobacco expressing harpin_{PS}. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, p. 83-89, 2004.

TAKATSU, Y.; NISHIZAWA, Y.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema drandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, p. 113-123, 1999.

TAMPAKAKI, A.P.; PANOPOULOS, N.J. Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly target *hrpZ_{P_{sph}}* produced in planta. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 13, n. 12, p. 1366-1374, 2000.

THILMONY, R.L.; CHEN, Z.; BRESSAN, R.A.; MARTIN, G.B. Expression of the tomato *Pto* gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* expressing *avrPto*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1529-1536, 1995.

TOMAZ, M.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; DEMÉTRIO, C.G.B.; JANSAKUL, N.; RODRIGUEZ, A.P.M. Somatic embryogenesis in citrus spp.: carbohydrate stimulation and histodifferentiation. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 37, p. 446-452, 2001.

TRIPATHY, S.; KLEPPINGER-SPARACE, K.; DIXON, R.A.; CHAPMAN, K.D.; N-acylethanolamine signaling in tobacco is mediated by a membrane-associated, high-affinity binding protein. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 131, p. 1781-1791, 2003.

VALLE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L. Quant-A software to quantify plant disease severity. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8. 2001. Ouro Preto, **Proceeding...** Ouro Preto: International Society of Plant Pathology. 2001. p. 160.

VALLE, V.G.R.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; LEE, R.F. Characterization of citrus tristeza isolates by RFLP analysis of coat protein gene. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 175-181, 2000.

VAN ENGELN, F. A.; MOLTHOFF, J.W.; CONNER, A.J.; J.P.N.; PEREIRA, A.; STIEKEMA, W.J. pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. **Transgenic Research**, London, v. 4, p. 288-290, 1995.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 62, p. 171-176, 1982.

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of *citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, Limerick, v.69, p.199-206, 1990.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEURBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J.B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J.C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant Journal**, York, v. 16, p. 651-659, 1998.

VERNIÈRE, C.J.; GOTTWALD, T.R.; PRUVOST, O. disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 832-843, 2003.

VERBERNE, M.C.; VERPOORTE, R.; BOL, J.F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H.J.M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

YAMAMOTO, T.; IKETANI, H.; IEKI, H. NISHIZAWA, Y.; NOTSUKA, K.; HIBI, T.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 639-646, 2000.

YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.) **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, p.1203-1211, 2000.

YAO, J.L.; WU, J.H.; GLEAVE, A.P.; MORRIS, B.A.M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, Limerick, v.113, p.175-183, 1996.

WANG, G.L.; SONG, W.Y.; RUAN, D.L.; SIDERIS, S.; RONALD, P.C. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 9, p. 850-855, 1996.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.P.; RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, p. 1085-1094, 1991.

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.

WEI, Z.-M.; BEER, S.V. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 411, p. 223-225, 1996.

WEI, Z.-M.; QIU, D.; KROPP, M.J.; SCHSDING, R.L. Harpin, an HR elicitor, activates both defense and growth systems in many commercially important crops, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, S96, 1998.

ZOUBENKO, O.; UCKUN, F.; HUR, Y.; CHET, I.; TUMER, N. Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 992-996, 1997.