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

Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* Wells et al. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. em plantas transgênicas de *Citrus sinensis* L. Osbeck expressando os genes *atacina A* ou *Xa21*

Suane Coutinho Cardoso

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

**Piracicaba
2008**

Suane Coutinho Cardoso
Engenheiro Agrônomo

Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* Wells et al. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. em plantas transgênicas de *Citrus sinensis* L. Osbeck expressando os genes *atacina A* ou *Xa21*

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia**

Piracicaba
2008

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

Cardoso, Suane Coutinho

Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* Wells et al. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. em plantas transgênicas de *Citrus sinensis* L. Osbeck expressando os genes atacina A ou *Xa21* / Suane Coutinho Cardoso. - Piracicaba, 2008.
99 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cancro – Doença de planta 2. Clorose variegada dos citros 3. Laranja 4.
Plantas transgênicas 5. Variação genética em plantas 6. Xanthomonas I. Título

CDD 634.31

Dedico

A meus queridos pais, Francisca e Agostinho (*in memoriam*) e meus irmãos que sempre torceram pela minha felicidade.

“..... A minha alma engrandece ao Senhor,
E o meu espírito se alegra em Deus, meu Salvador” (Lucas 1, 46-47).
“Deus é o que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho” (Salmo 18, 32).

Ofereço

A meu marido, Alexsandro, por ser uma benção em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a vida e por estar sempre me guiando a caminhos maravilhosos.

Ao meu marido Alessandro pelo companheirismo, paciência, ensinamentos, amor e apoio incondicional.

A minha família maravilhosa pelo apoio, incentivo e por, mesmo de longe, transmitir toda energia positiva necessária para me fortalecer em qualquer situação.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, confiança, atenção constante e ensinamentos.

À professora Dra. Beatriz Madalena Januzzi Mendes pela co-orientação, atenção constante e pelas preciosas sugestões.

Ao professor Dr. João Roberto Spotti Lopes pela colaboração, valiosas sugestões e pela infra-estrutura nas avaliações de resistência a *Xylella fastidiosa*.

Ao professor Dr. Armando Bergamin Filho pela infra-estrutura e apoio nas avaliações de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Ao professor Dr. Antonio Vargas Figueira e Dra. Jeanne Molfeta Blanco, pela colaboração nas análises de PCR quantitativo.

Ao Dr. Rock Seille Carlos Christiano pela colaboração nos experimentos com cancro cítrico, ensinamentos, paciência e amizade.

À técnica do Laboratório Biotecnologia Vegetal do CENA, Renata Beatriz Cruz, a Dra. Janaynna M. Barbosa-Mendes e as estagiárias Joyce Banin e Simone Kerbauy pela contribuição fundamental nas análises de Southern blot.

Ao mestrando Amancio José de Souza pela valiosa colaboração na realização das análises moleculares (Southern blot e northern blot), pela paciência, predisposição em ajudar e amizade.

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

Ao professor Carlos Tadeu dos Santos Dias pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Produção Vegetal e Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

A FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e recursos financeiros para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas da Esalq: Alexandra Pavan, Amancio Souza, Dayse Carvalho, Eduardo Girardi, Evandro Schinor, Fernando Azevedo, Juliana Bonin, Leandro Branco, Livia Castro, Luis Gustavo de Paoli, Pamela Fávero, Rosely Silva e Waner Junior, pelo apoio, aprendizado, colaboração, momentos de descontração e por proporcionarem um doce convívio durante o curso.

Aos amigos do Laboratório Biotecnologia Vegetal do CENA: Alessandra Monteiro-Hara, Alice, Ana Paula Pinto, Andréa Koehler, Eveline Tavano, Fabiana Muniz, Jannayna Barbosa-Mendes, Liliane Stipp, Luciana Castelotti, Renata Cruz e Vânia Nakano, pelo apoio, momentos de descontração e agradável convívio.

Aos amigos do Laboratório de Insetos Vetores da Esalq: Marcelo, Rodrigo, Daniele, Patrick, Rudinei, Cristiane, Flávio, Lucas e Alexandre, pela agradável convivência e em especial a Matê, Fernanda, Joice e Érica, pelo apoio nas análises com *Xylella fastidiosa*.

Aos funcionários e alunos do Setor de Fitopatologia: Silvia, Sr. Pedro, Rock, Silvio, Davi, Ivan, Isolda e Fabrício, pelo convívio e apoio.

À estagiária Pamela Fávero pelo valioso auxílio na realização desse trabalho.

Aos amigos baianos: Amancio Souza, Bruno Almeida, Edmilson Silva, Elaine Pereira, Jovan, Jurema Queiroz, Laércio Carvalho, Marcelo Miranda, Onildo de Jesus, Rosely Silva, Tales Miller e Taís Abreu, pelas reuniões maravilhosas e amizade.

Às amigas queridas, Elaine Pereira, Eloise Viana e Rosely Silva, pelo doce convívio, momentos de descontração, apoio e amizade.

À querida amiga Emile, que mesmo de longe, contribuiu muito com sua amizade, apoio e carinho.

Aos amigos de outros programas de Pós-graduação: Eulália Sobreira, Jaedson Mota, Melissa Oda, Monita Abreu e Roberto Tarazi, pelo agradável convívio e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia: Angelo Jacomino, João Alexio e Pedro Christofolletti, por contribuírem para minha formação e aprendizado.

Aos funcionários do Depto. de Produção Vegetal, Setor do Campo: Aparecido Serrano, David Ulrich e Eder Cintra, pelo apoio e agradável convívio e em especial ao Sr. José Volpato, pela grandiosa ajuda na condução dos experimentos.

Às secretárias do Depto. de Produção Vegetal, Luciane, Célia e Bete, por todo apoio, convívio e atenção.

Aos funcionários D. Helena, Ilze, Edleuza e Chico, pelo apoio.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia: Luzia, Hector, Eliane, Fernanda, Jovan, Vitória e Erik, pelo convívio.

À Eliana Maria Garcia, bibliotecária chefe da Divisão de Biblioteca e Documentação da ESALQ/USP, pela correção das referências.

Aos professores da UFRB, Ana Cristina Soares, Maria Angélica, Weliton Almeida, Clóvis Peixoto e Carlos Alfredo Carvalho, por todo apoio e incentivo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Aspectos gerais da citricultura.....	21
2.2 Clorose variegada dos citros.....	23
2.3 Cancro cítrico	26
2.4 Transformação genética em citros para resistência a doenças	28
2.5 Peptídeo antibacteriano atacina e gene maior de resistência <i>Xa21</i>	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material Vegetal	35
3.2 Análises moleculares das plantas de laranja doce transformadas com os genes <i>atacina A</i> (<i>attA</i>) e <i>Xa21</i> para confirmação da integração e transcrição dos genes.....	35
3.2.1 Análise de “Southern blot”	35
3.2.2 Análise de “northern blot”	36
3.3 Propagação das plantas transgênicas	36
3.4 Avaliação da resistência à <i>Xylella fastidiosa</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>atacina A</i> (<i>attA</i>)	37
3.4.1 Inoculação de <i>Xylella fastidiosa</i>	37
3.4.2 Isolamento e quantificação de <i>X. fastidiosa</i>	39
3.4.3 Análises moleculares	40
3.4.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção de <i>X. fastidiosa</i>	40

3.4.3.2 Quantificação de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>attA</i> por PCR quantitativo (qPCR).....	41
3.4.4 Avaliação dos sintomas foliares de clorose variegada dos citros (CVC).....	44
3.4.5 Inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (<i>Xac</i>) em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>attA</i>	44
3.4.6 Quantificação de cancro cítrico	46
3.5 Avaliação da resistência à <i>Xanthomonas axonopodis</i> (<i>Xac</i>) em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>Xa21</i>	46
3.6 Avaliação do desenvolvimento da <i>X. fastidiosa</i> em plantas laranja doce não transgênicas juvenis e adultas	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Análises moleculares das plantas de laranja doce transformadas com os genes <i>atacina A</i> (<i>attA</i>) e <i>Xa21</i> para confirmação da integração e transcrição dos genes.....	49
4.1.1 Análise de “Southern blot”	49
4.1.2 Análise de “northern blot”	51
4.2 Avaliação da resistência à <i>Xylella fastidiosa</i> e à <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (<i>Xac</i>) em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>attA</i>	53
4.2.1 Avaliação da resistência à <i>Xylella fastidiosa</i>	53
4.2.1.1 Quantificação de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>attA</i> por PCR quantitativo (qPCR).....	62
4.2.2 Avaliação do desenvolvimento da <i>Xylella fastidiosa</i> em plantas laranja doce não transgênicas juvenis e adultas.....	69
4.2.3 Avaliação da resistência à <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (<i>Xac</i>) em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>attA</i>	75
4.3 Avaliação da resistência à <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (<i>Xac</i>) em plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>Xa21</i>	80
5 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO	98

RESUMO

Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* Wells et al. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. em plantas transgênicas de *Citrus sinensis* L. Osbeck expressando os genes *atacina A* ou *Xa21*

A citricultura brasileira vem sendo constantemente ameaçada por doenças que causam sérios prejuízos à produção e a qualidade dos frutos, a exemplo da clorose variegada dos citros e do cancro cítrico. A transformação genética de plantas tem sido considerada uma importante ferramenta para os programas de melhoramento de citros, principalmente com relação à resistência a doenças. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência a *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em plantas de *Citrus sinensis* transformadas com os genes *atacina A* (*attA*) ou *Xa21*. Plantas transgênicas de laranja doce, cvs. ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, contendo o gene *attA* ou *Xa21* foram propagadas por enxertia em limão ‘Cravo’ para avaliação de resistência aos patógenos. A resistência a *X. fastidiosa* foi avaliada com a inoculação mecânica com alfinete da suspensão de bactéria nas plantas transgênicas contendo o gene *attA*. As plantas foram avaliadas em quatro experimentos distintos, sendo oito plantas de laranja ‘Hamlin’ (H), sete de laranja ‘Natal’ (N), cinco de laranja ‘Pêra’ (P) e nove de laranja ‘Valência’ (V). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições e cada experimento foi repetido duas vezes. Aos quatro e oito meses da inoculação foram determinadas as populações bacterianas de todas as plantas por isolamento em meio de cultura e sete plantas (Hat8, Nat1, Nat2, Pat6, Pat7, Vat2 e Vat12) foram selecionadas pelo isolamento para serem analisadas por PCR quantitativo (qPCR), visando quantificar a população bacteriana em relação às plantas testemunhas. A resistência a *X. axonopodis* pv. *citri* foi avaliada nas plantas transgênicas contendo os genes *attA* ou *Xa21*. As mudas, apresentando folhas novas e sem ferimentos, foram inoculadas por aspersão, para penetração via estômatos, com suspensão bacteriana e encubadas em câmara de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 a 10 repetições e cada experimento foi repetido três vezes. A severidade da doença foi determinada 30 dias após inoculação, avaliando-se duas folhas por planta com lesões de cancro cítrico, utilizando um software de quantificação de doença (QUANT v.1.0). Dentre as plantas transgênicas contendo o gene *attA*, quatro (Pat6, Pat7, Vat2 e Vat12) apresentaram menores populações bacterianas de *X. fastidiosa* e 16 apresentaram redução na severidade de cancro cítrico em relação à testemunha. Entre as plantas transgênicas contendo o gene *Xa21*, 11 apresentaram redução na severidade de cancro cítrico em comparação a testemunha.

Palavras-chave: Clorose variegada dos citros; Cancro cítrico; Transformação genética

ABSTRACT

Evaluation of *Xylella fastidiosa* Wells et al. and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. resistance in transgenic *Citrus sinensis* L. Osbeck plants expressing the *attacin* A or *Xa21* genes

The Brazilian citrus industry is constantly threatened by diseases that cause severe damage to production and fruit quality such as the citrus variegated chlorosis and citrus canker. Genetic transformation has been considered an important tool in citrus breeding programs especially regarding disease resistance. This research objective was to evaluate the resistance to *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in *Citrus sinensis* plants, transformed with the genes *attacin* A (*attA*) or *Xa21*. Transgenic sweet orange plants from cultivars ‘Hamlin’, ‘Valencia’, ‘Natal’ and ‘Pera’ containing the *attA* or *Xa21* genes were graft propagated on Rangpur lime for pathogen resistance evaluation. The resistance to *X. fastidiosa* was evaluated by mechanic inoculation of the transgenic plants containing the *attA* gene, using bacterial suspension and pin perforation of plant tissue. The plants were evaluated in four different experiments including, eight ‘Hamlin’ sweet orange plants (H), seven ‘Natal’ sweet orange plants (N), five ‘Pera’ sweet orange plants (P) and nine ‘Valencia’ sweet orange plants (V). The experimental design was fully randomized with ten replications and each experiment was repeated twice. After four and eight months from inoculation, the bacterial population of all plants was determined by isolation in culture medium and seven plants (Hat8, Nat1, Nat2, Pat6, Pat7, Vat2 e Vat12) were selected to be analyzed by quantitative PCR (qPCR) aiming to estimate the bacterial population in relation to control plants. The resistance to *X. axonopodis* pv. *citri* was evaluated in transgenic plants containing the *attA* or *Xa21* genes. Seedlings showing new leaves and free from wounds, were spray-inoculated with bacterial suspension for stomatal penetration, and incubated in growth chamber. The experimental design was fully randomized with seven to ten repetitions and each experiment was repeated three times. The symptom severity of citrus canker was determined 30 days after inoculation, by evaluating two leaves per plant with citrus canker lesions, using a disease quantification software (Quant v.1.0). Within the transgenic plants containing the *attA* gene, four (Pat6, Pat7, Vat2 e Vat12) showed smaller bacterial populations of *X. fastidiosa* and 16 had reduction in the severity of citrus canker in relation to control plants. Within the transgenic plants containing the *Xa21* gene, 11 presented reduction in symptom severity of citrus canker related to control plants.

Keywords: Citrus variegated chlorosis; Citrus canker; Genetic transformation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Inoculação da bactéria <i>X. fastidiosa</i> . A) Suspensão bacteriana em tampão PBS; B) Aplicação de 5µl de suspensão bacteriana em um dos pontos marcados no caule da planta; C) Perfuração da planta com um estilete no ponto de inoculação, para a absorção da suspensão bacteriana.....	38
Figura 2 -	Isolamento de <i>X. fastidiosa</i> . A) Corte das nervuras com lâmina; B) Trituração das nervuras em homogeneizador (Turrax®); C) Plaqueamento das suspensões em meio PWG.....	40
Figura 3 -	Inoculação de <i>Xac</i> ; A) Inoculação por aspersão nas plantas com suspensão de bactérias na concentração de 10^6 UFC mL ⁻¹ ; B) Câmara úmida após a inoculação; C) Plantas em câmara de crescimento após retirada da câmara úmida.....	45
Figura 4 -	Análise de “Southern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene <i>attA</i> . C+ = controle positivo (fragmento do gene <i>attA</i> amplificado por PCR); C- = Controle negativo (planta não transgênica); Colunas identificadas com letras e números correspondem ao DNA, digerido com a enzima <i>HindIII</i> , das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D).....	50
Figura 5 -	Análise de “Southern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene <i>Xa21</i> . C+ = controle positivo (fragmento do gene <i>Xa21</i> amplificado por PCR); C- = Controle negativo (planta não transgênica); Colunas identificadas com letras e números correspondem ao DNA, digerido com a enzima <i>KpnI</i> , das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D).....	51
Figura 6 -	Análise de “northern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene <i>attA</i> . C- = controle negativo (planta não transgênica); colunas identificadas com letras e números correspondem ao RNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D).....	52
Figura 7 -	Análise de “northern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene <i>Xa21</i> . C- = controle negativo (planta não transgênica); colunas identificadas com letras e números correspondem ao RNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D).....	53
Figura 8 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com gene <i>attA</i> , aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	56

Figura 9 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja ‘Natal’ transformadas com gene <i>attA</i> , aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	56
Figura 10 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com gene <i>attA</i> , aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	57
Figura 11 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com gene <i>attA</i> , aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	57
Figura 12 -	A) Experimentos com plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com gene <i>attA</i> , em casa de vegetação com 9 meses após inoculação com <i>X. fastidiosa</i> ; B) Sintomas de CVC na face superior das folhas de planta transgênica; C) Sintomas de CVC na face inferior das folhas de planta transgênica.....	59
Figura 13 -	A) Experimentos com plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com gene <i>attA</i> , em casa de vegetação com 13 meses após inoculação com <i>X. fastidiosa</i> ; B) Sintomas de CVC em folhas de laranja ‘Valência’ transformada.....	59
Figura 14 -	Curva padrão de <i>X. fastidiosa</i> por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix, a partir de diluição serial do DNA da bactéria (10^{-2} a 10^{-6}). Coeficiente de linearidade $R^2 = 0,99598$. Cada ponto da curva representa uma diluição com a média de três repetições da reação de amplificação. CT – Ciclo “Threshold”.....	62
Figura 15 -	Curvas de amplificação de <i>X. fastidiosa</i> por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix, a partir de diluição serial do DNA da bactéria (10^{-2} a 10^{-6} da esquerda para direita). Cada triplicata de curvas representa uma diluição.....	63
Figura 16 -	Derivada das curvas de amplificação de <i>X. fastidiosa</i> por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix, a partir de diluição serial do DNA da bactéria (10^{-2} a 10^{-6} da esquerda para direita). O “Threshold” foi de 0,1. Cada triplicata de curvas representa uma diluição.....	63
Figura 17 -	Curva de “melt” das diluições (10^{-2} a 10^{-6}) do DNA genômico de <i>X. fastidiosa</i> por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix.....	65

Figura 18 -	Curvas de amplificação de <i>X. fastidiosa</i> em algumas amostras de DNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene <i>attA</i> e inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> , obtidas por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix. Cada triplicata de curvas representa uma amostra de DNA.....	66
Figura 19 -	Derivada das curvas de amplificação de <i>X. fastidiosa</i> em algumas amostras de DNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene <i>attA</i> e inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> , obtidas por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix. O “Threshold” foi de 0,1. Cada triplicata de curvas representa uma amostra de DNA.....	66
Figura 20 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja doce determinadas por isolamento aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de 15 plantas. PJ – Pêra juvenil; PA – Pêra adulta; VJ – Valência juvenil e VA – Valência adulta. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). As variedades foram comparadas separadamente.....	71
Figura 21 -	Plantas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> . PJ – ‘Pêra’ juvenil; PA – ‘Pêra’ adulta; VJ – ‘Valência’ juvenil e VA – ‘Valência’ adulta. A) Porcentagem de plantas com sintomas de CVC aos 4 e 8 meses após inoculação; B) Porcentagem de folhas com sintomáticas aos oito meses após inoculação. Médias de 15 plantas. Os dados de porcentagem de folhas sintomáticas foram transformados em $\sqrt{X+1}$. Barras de erro representam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras, representam diferença pelo teste de Tukey ($P<0,05$). As variedades foram comparadas separadamente.....	72
Figura 22 -	A) Plantas juvenis e adultas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ em casa de vegetação com seis meses após inoculação com <i>X. fastidiosa</i> ; B) Sintomas de CVC em folhas de plantas juvenis de laranja ‘Pêra’.....	72
Figura 23 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com gene <i>attA</i> , aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	74
Figura 24 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> (Log UFC g tecido ⁻¹) em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com gene <i>attA</i> , aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	75

Figura 25 -	Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene <i>attA</i> , comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	77
Figura 26 -	Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Natal’ transformadas com o gene <i>attA</i> , comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	77
Figura 27 -	Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com o gene <i>attA</i> , comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	78
Figura 28 -	Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene <i>attA</i> , comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	78
Figura 29 -	Sintomas de cancro cítrico em folhas de laranja transgênica, contendo o gene <i>attA</i> , e não transgênica, aos 30 dias após a inoculação com <i>Xac</i>	79
Figura 30 -	Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene <i>Xa21</i> , comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	81
Figura 31 -	Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Natal’ transformadas com o gene <i>Xa21</i> , comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).....	82

- Figura 32 - Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com o gene *Xa21*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$)..... 82
- Figura 33 - Severidade de cancro cítrico em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene *Xa21*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$)..... 83
- Figura 34 - Sintomas de cancro cítrico em folhas de laranja transgênica, contendo o gene *Xa21*, e não transgênica, aos 30 dias após a inoculação com *Xac*..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem de plantas infectadas determinadas pelo isolamento em meio de cultura e PCR e porcentagem de plantas com sintomas de CVC (aos 12 meses da inoculação) em plantas de laranja ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, transformadas com o gene <i>attA</i> , inoculadas com <i>X. fastidiosa</i> . Médias de dois experimentos independentes, total de 20 plantas por tratamento.....	54
Tabela 2 -	Legendas das amostras de diluição do DNA genômico de <i>X. fastidiosa</i> . Ciclo “Threshold” (CT) e unidades formadoras de colônias (UFC mL ⁻¹).....	64
Tabela 3 -	População bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> estimada por PCR quantitativo e por isolamento em meio de cultura de plantas de laranja doce transformadas com o gene <i>attA</i> e inoculadas com o patógeno. Ciclo “Threshold” – CT (piso de fluorescência).....	67
Tabela 4 -	Porcentagem de plantas infectadas determinadas pelo isolamento em meio de cultura e PCR em plantas juvenis e adultas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’, inoculadas com <i>X. fastidiosa</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ap1 – gene *apetala1*
attA – gene *atacina A*
bO – gene da bacterio-opsina
cecropin MB39 - gene isolado de *Hyalophora cecropia*
CTAB – Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide
CTV – Citrus Tristeza Virus
CVC – Clorose variegada dos citros
EDTA – Ethylenediaminetetracetic Acid
gna – gene lectina (*Galanthus nivalis* aglutinina)
hal2 – gene 3'(2'), 5'-bifosfato nucleotidase
lfy – gene *leafy*
LPS – Lipopolissacarídeos
MSC – Morte súbita dos citros
PBS – Phosphate Buffered Saline
PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
Proteína RP – proteínas relacionadas à patogênese
PWG - Periwinkle wilt gelrite
qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SDS – Sodium dodecyl Sulfate
TBE – tampão Tris, ácido Bórico,
Tris – 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UFC – Unidades formadoras de colônias
Xac - *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil mantém a posição de maior produtor mundial de citros, com 20,39 milhões de toneladas em 2006 (FAO, 2007) e também o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado. O Estado de São Paulo é responsável por 81% da produção nacional de citros e a laranja representa 79% dessa produção (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2007). No entanto, a citricultura paulista vem sendo ameaçada por graves doenças como a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a tristeza dos citros, a morte súbita (MSC), a gomose e mais recentemente o Huanglonbing (greening).

O surgimento constante desses problemas fitossanitários pode estar relacionado ao fato da citricultura paulista estar fundamentada em quatro cultivares copa de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ('Pêra', 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin') e três cultivares porta enxerto, com predominância do limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). Além disso, os citros são multiplicados vegetativamente resultando em plantios clonais potencialmente mais suscetíveis ao ataque de pragas e doenças.

A clorose variegada dos citros, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al., atinge todas as variedades comerciais de laranja doce. Restrita ao xilema da planta, a bactéria provoca o entupimento dos vasos responsáveis por levar água e nutrientes da raiz para a copa da planta. Essa doença é considerada de grande importância econômica devido afetar, principalmente, o tamanho e a qualidade dos frutos, tornando-os inadequados tanto para a comercialização "in natura" como para a indústria de suco concentrado.

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. (*Xac*), afeta a maioria das espécies de *Citrus* e provoca graves sintomas nas folhas, ramos e frutos. Os frutos afetados são depreciados para o comércio e caem precocemente, reduzindo a produção da planta. Além disso, induz a restrições na comercialização nacional e internacional de mudas e frutos "in natura" para regiões livres do patógeno. É uma doença de fácil disseminação e apresenta alto custo para erradicação.

Essas duas doenças causam grandes perdas econômicas no agronegócio citrícola de São Paulo. Para minimizar os prejuízos causados por essas doenças, os programas de melhoramento de citros têm buscado desenvolver variedades resistentes e/ou tolerantes a doenças. Entretanto, o

melhoramento convencional de citros é um processo longo e dificultado pela a biologia reprodutiva desse gênero, como poliembrionia, alta heterozigose, esterilidade do óvulo e pólen e juvenilidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Assim, a obtenção de plantas geneticamente modificadas tornou-se uma ferramenta biotecnológica muito promissora, pois permite a introdução de genes específicos no genoma de plantas, encurtando o período para se obter uma nova variedade (MACHADO et al., 2005).

Os trabalhos de obtenção de plantas transgênicas de citros resistentes a doenças têm se concentrado no uso da resistência derivada do patógeno (genes da capa proteica de vírus da tristeza), na introdução de genes que estimulam o sistema de defesa da planta (*bO* e *hrpN*), genes de origem não vegetal que codificam proteínas antibacterianas (atacina e cecropina), bem como uso de genes maiores (R) de resistência (*Xa21*).

O peptídeo atacina A isolado do inseto *Trichoplusia ni* (KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996) pertence a uma das maiores classes de peptídeos antibacterianos (LAZZARRO; CLARK, 2001). As atacinas atuam na parede celular das bactérias Gram-negativas, provocando alterações na permeabilidade da membrana, devido se ligarem aos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa. Essa ligação também causa inibição da síntese de várias proteínas específicas da membrana externa, limitando a capacidade das bactérias de restaurar a função da membrana (ERGSTROM et al., 1984; CARLSSON et al., 1991; 1998). A ação antibacteriana das atacinas foi observada em *Erwinia amylovora* (NORELLI et al., 1994; REYNORD et al., 1999), em *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (MONTEIRO, 2005) e em *X. axonopodis* pv. *citri* (BOSCARIOL et al., 2006).

O gene *Xa21*, clonado de uma espécie silvestre de arroz (*Oryza longistaminata*) confere resistência a mais de 30 isolados da bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, o agente causal do crestamento bacteriano em *Oryza sativa* (SONG et al., 1995; WANG et al., 1996). Este gene codifica para uma proteína quinase (“receptor kinase like-protein”), possui domínio da serina-treonina quinase, domínio transmembrânico e domínio extracelular com regiões ricas em leucina. Por apresentar esta estrutura, sugere-se que a ação deste gene ocorra no reconhecimento da superfície celular do patógeno, com subsequente ativação de respostas de defesa intracelulares (SONG et al., 1995). Baseando-se na característica do gene *Xa21* apresentar ação contra bactérias do gênero *Xanthomonas*, foi levantada por alguns autores (DENG; GMITTER, 2003;

BOSCARIOL, 2004; OMAR; SONG; GROSSER, 2007), uma hipótese de que o gene *Xa21* pode auxiliar na obtenção de resistência a bactéria *X. axonopodis* pv *citri*, agente causal do cancro cítrico.

Considerando-se que ainda não existem variedades de laranja doce comerciais resistentes a clorose variegada dos citros e ao cancro cítrico e que o uso de resistência varietal é o melhor método de controle de doenças de plantas, esse trabalho tem como objetivo avaliar a resistência a *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em plantas transgênicas de *Citrus sinensis*, cultivares ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’, expressando os genes *atacina A* e *Xa21*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da citricultura

As plantas cítricas do gênero *Citrus* pertencem à família Rutaceae e subfamília Aurantioideae e são nativas da região sudeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967; SOOST; CAMERON, 1975). São cultivadas em diferentes regiões do mundo, sendo que a exploração comercial concentra-se, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais entre as latitudes de 20° e 40° dos dois hemisférios, onde os regimes térmicos e hídricos são mais satisfatórios (SENTELHAS, 2005).

Os citros ocupam o primeiro lugar em volume de produção dentre as fruteiras no mundo, com aproximadamente 105,4 milhões de toneladas, seguidas pelas culturas da banana, uva e maçã. O Brasil é o maior produtor mundial de citros, com 20,39 milhões de toneladas em 2006, seguido da China com 16,3 milhões t e dos Estados Unidos com 11,5 milhões t (FAO, 2007). O país também é o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, com uma exportação de US\$ 1,47 bilhão referente a suco de laranja em 2006, o que representa 82% do mercado mundial, cujo consumo cresce a uma taxa de 2% a 4% ao ano. Cerca de 60% dessa exportação destina-se a União Européia e 17% aos EUA (NEVES et al., 2007). Embora ocupe uma posição de destaque no mercado mundial, a produtividade média brasileira de citros, em torno de 2,0 caixas/planta/ano, ainda é baixa, quando comparada com outras regiões produtoras, como a Flórida, que possui uma média de 6,0 caixas/planta/ano. Essa baixa produtividade, associada ao fato de grande parte dos plantios não serem irrigados, deve-se, principalmente, a problemas fitossanitários e às estratégias de manejo do pomar e pós-colheita dos frutos (MACHADO et al., 2005).

Os citros são produzidos na maioria dos Estados brasileiros, no entanto, o Estado de São Paulo é responsável por 81% da produção nacional de citros, dominando a produção de laranja, lima ácida ‘Tahiti’ e tangerinas. Dentre os demais Estados produtores destacam-se Bahia, Sergipe, Minas Gerais e Paraná (BOTEON; NEVES, 2005; IBGE, 2007). O Estado de São Paulo possui quatro pólos produtores de citros: a região central (São Carlos - Araraquara), a norte (Bebedouro - São José do Rio Preto), a sudeste (Araras - Mogi Guaçu) e o novo pólo centro - sul

(Bauru - Itapetininga). O foco comercial da cadeia citrícola é a produção e comercialização industrial da laranja. Atualmente, 70 a 80% da produção paulista destina-se a indústria de suco e maior parte dessa produção é oriunda dos pólos situados nas regiões norte e central que se especializaram no cultivo de laranja para fins industriais (BOTEON; NEVES, 2005).

As variedades copa de citros cultivadas em plantios comerciais são, basicamente, representadas pelas laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos. As laranjas (*C. sinensis*) predominam na maioria dos países citrícolas com, aproximadamente, dois terços dos plantios, ficando o restante para as demais espécies. No Brasil, e particularmente no Estado de São Paulo, elas encontram, de maneira geral, boas condições edafoclimáticas para o cultivo comercial. Dentre as laranjas comerciais destacam-se 'Pêra', 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin'. As três primeiras variedades perfazem mais de 80% da citricultura paulista (PIO et al., 2005).

Diversos problemas fitossanitários têm surgido ao longo do estabelecimento da citricultura no país. Doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e até de etiologia desconhecida vêm causando sérios prejuízos à cultura. As principais doenças fúngicas que afetam os citros são: pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), podridão floral (*Colletotrichum acutatum* Simmonds), verrugose (*Elsinoe* spp.), melanose (*Diaporthe citri* Wolf), rubelose (*Erythricium salmonicolor* Berk. & Br. Burdsall) e a gomose de *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.), esse último patógeno não é mais considerado fungo e foi reclassificado como do Reino Straminipila (FUNDECITRUS, 2008).

Dentre as doenças causadas por vírus, destacam-se a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV) e a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus*) (MÜLLER et al., 2005). A leprose é reconhecida como a doença viral de maior importância econômica para a citricultura paulista, em virtude dos altos custos com o controle químico do ácaro vetor, por meio da aplicação de acaricidas, resultando em gastos anuais na ordem de 75 milhões de dólares (FREITAS-ASTÚA et al., 2005).

As doenças bacterianas de importância econômica nos citros são a clorose variegada dos citros (CVC) (*Xylella fastidiosa*), o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), e mais recentemente, o huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) também conhecido como greening (LARANJEIRA et al., 2005). As perdas econômicas na citricultura paulista ocasionadas apenas pela CVC são estimadas em 100 milhões de dólares anuais (LOPES et al., 2004).

As doenças de etiologia ainda desconhecida são a morte súbita dos citros (MSC) e o declínio dos citros. O agente causal da doença MSC ainda não foi confirmado, mas existem hipóteses de 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 aqueles observados na tristeza (MÜLLER et al., 2005; LARANJEIRA et al., 2005).

A presença das doenças MSC e CVC nas maiores regiões produtoras de citros do Estado de São Paulo, regiões norte e central, influenciou o deslocamento da citricultura para as regiões sudoeste e sul do Estado. Essa migração é uma alternativa encontrada para reduzir os prejuízos provocados por essas doenças, cuja proliferação tornou o controle fitossanitário oneroso e, muitas vezes, tem levado a danos irreversíveis como a erradicação do pomar (NEVES et al., 2007).

O desenvolvimento de variedades tolerantes ou resistentes a doenças tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de citros, no entanto, o melhoramento genético convencional dos citros encontra dificuldades de ordem botânica e genética, tais como esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, poliembrionia, embrionia nucelar, alta heterozigosidade e longo período de juvenilidade (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Com isso, a introdução de ferramentas biotecnológicas como a hibridação somática e a transformação genética têm contribuído para superação desses problemas, permitindo a obtenção de genótipos melhorados (ASTUA-MONGE; FREITAS-ASTUA; MACHADO, 2004).

2.2 Clorose variegada dos citros

A clorose variegada dos citros (CVC), também conhecida como “amarelinho dos citros”, é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Foi constatada pela primeira vez em 1987, em pomares do Triângulo Mineiro e do norte e nordeste do Estado de São Paulo (ROSSETTI et al., 1990; ROSSETTI; DE NEGRI, 1990), de onde se disseminou para as demais regiões produtoras brasileiras. A CVC afeta todas as plantas de laranja doce enxertadas nos principais porta-enxertos utilizados no país (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997). É responsável por perdas anuais estimadas em 100 milhões de dólares (LOPES et al., 2004) e em 2006 apresentou incidência de 43,84% (plantas com sintomas) nos pomares do Estado de São Paulo e sul de Minas Gerais (FUNDECITRUS, 2008).

A bactéria *X. fastidiosa* é gram-negativa, aeróbica, possui forma de bastonete com 0,9 a 3,5 µm de comprimento por 0,25 a 0,50 µm de diâmetro, apresenta parede celular enrugada, não móvel (não possui flagelo), com crescimento lento em meio de cultura, mesmo em condições ótimas de temperatura entre 26 e 28 °C e pH entre 6,5 e 6,9 (WELLS et al., 1987). É chamada de fastidiosa pelas suas exigências nutricionais, crescendo apenas em meio de cultura específico (FERREIRA; SALGADO, 1995). Essa bactéria encontra-se limitada aos vasos do xilema de seus hospedeiros (MOLLENHAUER; HOPKINS, 1976), onde se distribui de forma irregular (HILL; PURCELL, 1995b). A obstrução desses vasos por agregados de células bacterianas, levando ao estresse hídrico, é a hipótese mais aceita para explicar o mecanismo de patogênese da *X. fastidiosa* (HOPKINS, 1995).

X. fastidiosa pode ser transmitida por meio de borbulhas contaminadas ou por insetos vetores das famílias *Cicadellidae* e *Cercopidae*, que se alimentam nos vasos do xilema das plantas (PURCELL, 1994). Até o momento, já foram identificadas 11 espécies de cigarrinhas transmissoras apenas no Estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2008). Entre as espécies de cigarrinhas transmissoras *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia sp* e *Oncometopia facialis* são as mais importantes (GRAVENA et al., 1997; ROBERTO; YAMAMOTO, 1998; LOPES, 1999).

Os sintomas da CVC manifestam-se em ramos, folhas e frutos. Nas folhas maduras são observados os sintomas mais típicos da doença, que são caracterizados como manchas cloróticas esparsas, de formato irregular, localizadas principalmente, próximo às bordas foliares. Na face dorsal, em correspondência às áreas cloróticas na face ventral, surgem pequenas pontuações de cor marrom-claro, que evoluem tornando-se necróticas, de coloração marrom-escuro e ligeiramente salientes (ROSSETTI, 1991; LOPES et al., 2004; LARANJEIRA et al., 2005).

Os ramos afetados têm, comumente, entrenós encurtados, resultando em aspecto “envassourado”. Pode ocorrer subdesenvolvimento ou morte de ramos ponteiros e número excessivo de folhas diminutas, diferindo do padrão das brotações normais. As folhas jovens podem apresentar redução da expansão, permanecendo afiladas e encurvadas para cima (acanoadas) e clorose semelhante ao sintoma típico de deficiência de zinco (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990; LARANJEIRA et al., 1997).

Os frutos de plantas afetadas pela doença são pequenos, endurecidos e amadurecem precocemente (ROSSETTI et al., 1990; HUANG; CHIARADIA, 1998). A perda de peso do fruto

pode chegar a 75% (FUNDECITRUS, 2008). Internamente, o fruto tem suas características organolépticas bastante afetadas, apresentando aumento no teor de sólidos solúveis e acidez (LARANJEIRA; PALAZZO, 1999). Por serem de baixa qualidade, os frutos doentes não são aceitos no mercado de frutas frescas, nem nas indústrias de processamento de suco (HUANG; CHIARADIA, 1998) e o endurecimento dos frutos pode causar danos às máquinas de moagem das fábricas de suco concentrado (LARANJEIRA, 1997). Ayres (2000) constatou, em levantamento amostral nas diversas regiões produtoras de São Paulo, que as perdas da produção chegaram a 80% para a laranja ‘Pêra’, 67% para ‘Natal’ e 76% para a ‘Valência’.

Os pomares cítricos situados nas regiões norte e nordeste do Estado de São Paulo têm a CVC como principal ameaça, inclusive em estágio mais avançado de severidade (plantas com sintomas em frutos). Por consequência, tais regiões têm produzido frutos menores, fazendo com que a indústria demande cerca de 10% a mais de laranja para produzir a mesma quantidade de suco (NEVES et al., 2007).

As laranjas doces (*C. sinensis*) apresentam comportamentos diferentes em relação à CVC. Laranjeira e Pompeu Junior (2002) classificaram as variedades Barão, Pêra Lima, Rubi, Cadenera 17 e 51, Berna e Valência como altamente suscetíveis a CVC, pois apresentaram uma porcentagem estimada de danos variando de 72 a 98%. Souza et al. (2006) utilizando a laranja ‘Pêra’ como padrão de suscetibilidade a CVC, observaram que essa variedade apresenta elevado nível de severidade da doença. Machado et al. (1997), estudando variedades de laranjas sobre enxertadas em laranja ‘Pêra’ com sintomas típicos de CVC, observaram que todas as variedades de laranja apresentaram sintomas, porém houve diferenças na velocidade de expressão. As laranjas ‘Pêra’ e ‘Barão’ mostraram sintomas mais rapidamente, enquanto a laranja ‘Hamlin’ embora tenha sido positiva nos testes sorológicos, apresentaram expressão de sintomas mais tardiamente.

As medidas de controle recomendadas para esta doença são na sua maioria preventivas, sendo o uso da resistência varietal o método mais eficiente de controle (COLETA-FILHO; MACHADO, 2002). As principais medidas preventivas adotadas no manejo da CVC são a poda e/ou erradicação de plantas sintomáticas, controle das cigarrinhas transmissoras e a utilização de mudas sadias, adquiridas em viveiros certificados (FUNDECITRUS, 2008).

2.3 Cancro cítrico

O cancro cítrico, também conhecido como cancro cítrico asiático ou cancriose A, é causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Foi constatado pela primeira vez no Brasil em 1957, na região de Presidente Prudente, SP, (ROSSETTI, 1977; ROSSETTI, FEICHTENBERGER; SILVEIRA, 1981), de onde se disseminou para outras regiões produtoras do Estado de São Paulo e para outros Estados como Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e Roraima (AMARAL, 1957; FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; MACIEL; DUARTE; AYUB, 1998; NASCIMENTO et al., 2003). Essa doença afeta a maioria das espécies de *Citrus* e outros gêneros da família Rutaceae (RODRIGUES NETO, 2004). Por se tratar de uma doença quarentenária, os países com ocorrência de cancro cítrico estão sujeitos à imposição de barreiras fitossanitárias, que visam impedir a entrada do patógeno em áreas livres da doença, dificultando a comercialização da produção (STALL; CIVEROLO, 1991; GOTTWALD et al., 2001).

A bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* apresenta reação gram-negativa, respiração aeróbica, formato baciliforme e motilidade por um flagelo polar (monótriquia) (FERREIRA; SALGADO, 1995). Normalmente apresenta exsudação de polissacarídeos extracelulares, que ajudam na sua dispersão e sobrevivência (GOTO; HYODO, 1985). Essa bactéria cresce na maioria dos meios de culturas usados em microbiologia e é facilmente isolada de tecido cítrico infectado. Colônias da bactéria são visíveis em meio de cultura com agar após dois a três dias de incubação a 28°C (ROSSETTI; FEICHTENBERGER; SILVEIRA, 1981).

O cancro cítrico é considerado altamente contagioso devido à bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* apresentar rápida multiplicação e fácil disseminação (FUNDECITRUS, 2008). A principal fonte de inóculo da bactéria são as plantas de citros infectadas, em folhas, ramos e frutos com sintomas, nos quais a bactéria pode sobreviver durante vários anos (GRAHAM et al., 2000). A disseminação do patógeno pode ser feita pelo vento acompanhado de chuvas, pelo trânsito indiscriminado de pessoas nos pomares, materiais vegetais infectados como frutos, material propagativo e mudas, assim como por meio de materiais de colheita como ferramentas, caixas e veículos (LEITE JUNIOR, 1990; GRAHAN et al., 2004). A bactéria 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). As folhas jovens com 85% de expansão são mais suscetíveis à infecção (GOTO, 1990; GOTTWALD; GRAHAN, 1992), devido à menor resistência do mesófilo (STAL et al., 1982).

Os primeiros sintomas aparecem nas folhas, posteriormente nos frutos e ramos. São lesões salientes de coloração amarela, que logo se tornam amarronzadas. É a única doença conhecida com lesões salientes que aparecem dos dois lados da folha e não induzem a deformações. Em estágio mais avançado, as lesões nas folhas ficam corticosas, aspecto eruptivo, com centro marrom e um anel amarelado em volta (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997). Em altas severidades pode ocorrer desfolha, queda de frutos e seca de ramos (GOTTWALD; McGUIRE; GARRAM, 1988; GOTTWALD; TIMMER; McGUIRE, 1989).

Nos frutos, a doença se manifesta pelo surgimento de pequenas manchas amarelas, com um ponto marrom no centro, que aos poucos vão crescendo e podem ocupar grande parte da casca do fruto. As manchas são salientes, mais superficiais, parecidas com verrugas, de cor marrom no centro. Em estágio avançado, as lesões provocam o rompimento da casca (ROSSETTI, 2001; LARANJEIRA et al., 2005).

O gênero *Citrus* apresenta uma ampla variação nos níveis de resistência a *X. axonopodis* pv. *citri*. Em relação às laranjas doces, são classificadas como resistentes as variedades Folha murcha e Moro; como moderadamente resistentes as variedades Lima Verde, Navelina, Valência e Pêra premunizada; como moderadamente suscetíveis a variedade Natal e como suscetíveis as variedades Bahia, Baianinha, Hamlin, Seleta Vermelha e Piralima (LEITE JUNIOR, 1990).

O controle do cancro cítrico baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação das plantas doentes e das demais plantas suspeitas de contaminação (FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; BARBOSA et al., 2001). As principais medidas preventivas recomendadas para o controle do cancro cítrico são a desinfestação de todos os veículos que entram na propriedade por arco-rodolúvio com amônia quaternária, queima dos restos de colheita; desinfestação de equipamentos de trabalho, construção de reservatórios de frutos no limite da propriedade para evitar a entrada de caminhões durante a colheita, uso de mudas sadias (de viveiros certificados), implantação de quebra-ventos arbóreos, controle do minador dos citros e inspeção rotineira do pomar (KIMATI; BERGAMIN FILHO, 1995;

RODRIGUES NETO et al., 2004). Durante a inspeção no pomar, se no talhão houver mais de 0,5% de árvores contaminadas, todo ele deve ser erradicado. Se o número de plantas contaminadas for menor ou igual a 0,5%, são eliminadas a(s) planta(s) foco e as que estão num raio de 30 metros (FUNDECITRUS, 2008).

A campanha de erradicação do cancro cítrico do Estado de São Paulo, apesar de não conseguir eliminar a bactéria dos seus pomares, não permitiu a introdução do patógeno na área nobre da citricultura paulista durante várias décadas (RODRIGUES NETO et al., 2004). A partir de 1996, com o surgimento no Brasil da lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) que causa ferimentos na planta, facilitando o acesso da bactéria, houve um aumento considerável na severidade de cancro cítrico no Estado de São Paulo (BERGAMIN FILHO et al., 2001). Com isso, a campanha de erradicação se intensificou e tem conseguido manter a doença em baixo nível de incidência nas principais áreas citrícolas do Estado de São Paulo (BARBOSA et al., 2001). Em 2006 o levantamento amostral, revelou que o índice de contaminação por cancro cítrico foi de 0,19% nos talhões de citros do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro (MASSARI; BELASQUE JÚNIOR, 2006), esse índice reduziu para 0,10% em 2007. Essa redução reflete a eficiência da campanha de erradicação da doença no Estado (FUNDECITRUS, 2008). Entretanto, o emprego de cultivares resistentes é fundamental no manejo integrado da doença, pois, corresponde ao método mais econômico e eficiente de controle (LEITE JUNIOR, 1990; BESPALHOK FILHO et al., 2001).

2.4 Transformação genética em citros para resistência a doenças

A transformação genética vem sendo, cada vez mais, incorporada aos programas de melhoramento de plantas. Essa técnica possibilita transferência de genes específicos e com importância agronômica para uma determinada variedade, reduzindo o tempo para obtenção de uma nova variedade em relação ao melhoramento convencional (PEÑA et al., 1995a). Esses genes podem ser isolados de outras plantas ou mesmo de microrganismos e animais (PERIANI et al., 1986). Além de possibilitar a introdução de material genético em situações em que os organismos são incompatíveis, a transformação genética evita a transferência de genes indesejáveis ou deletérios, como ocorre no melhoramento convencional (MACHADO et al., 2005).

Em relação aos citros, a técnica de transformação genética apresenta-se como uma importante ferramenta de auxílio ao seu melhoramento convencional, que possui uma série de limitações atribuídas pela sua biologia (ALMEIDA et al., 2003), tais como a poliembrionia nucelar, elevada heterozigose, esterilidade gametofítica e longo período de juvenilidade (GROSSER; GMITTER, 1990).

O primeiro relato de transformação genética em citros vem do final da década de 80 por Kobayashi e Uchimiya (1989), quando utilizaram polietilenoglicol (PEG) para a introdução direta de DNA em protoplastos de laranja ‘Trovita’. Atualmente, a maioria dos trabalhos utiliza o sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* para obtenção de plantas cítricas transformadas. As estirpes de *A. tumefaciens* mais utilizadas são EHA105 e EHA101, por apresentarem melhores resultados (PEÑA et al., 1995b; MENDES et al., 2002). Dentre os genes de interesse agrônomo introduzidos em citros com sucesso até o momento, tem-se o gene *HAL2* que confere tolerância à salinidade, introduzido em citrange ‘Carrizo’ (CERVERA et al., 2000), os genes *LFY* e *API*, que controlam o florescimento, também introduzidos em citrange ‘Carrizo’ (PEÑA et al., 2001), o gene *gna*, que confere resistência a afídeos vetores do vírus da tristeza, introduzidos em pomelo (YANG et al., 2000), o gene CS-ACS1, que confere resistência a baixas temperaturas, introduzido em diversas espécies cítricas (WONG et al., 2001) e genes visando resistência a doenças.

A busca por plantas cítricas resistentes a doenças tem sido um dos maiores objetivos dos programas de melhoramento de citros, devido os grandes prejuízos econômicos provocados pelas doenças. Além disso, o uso de plantas resistentes constitui-se no método de controle mais eficiente e econômico. Os trabalhos de obtenção de plantas transgênicas de citros resistentes a doenças têm se concentrado no uso de resistência derivada do patógeno (genes da capa proteica de vírus da tristeza), na introdução de genes que estimulam o sistema de defesa da planta (*bO* e *hrpN*), genes relacionados à patogênese (proteínas RP), genes de origem não vegetal que codificam proteínas antibacterianas (atacina e cecropina), bem como uso de genes maiores (R) de resistência (*Xa21*).

Em relação aos genes que estimulam o sistema de defesa das plantas, o gene *bO* foi introduzido em limão Cravo e resultou na redução dos sintomas causados por *Phytophthora* (AZEVEDO et al., 2005). Recentemente, Barbosa-Mendes (2007) introduziu o gene *hrpN* em

plantas de laranja doce e verificou em testes preliminares, que plantas de laranja ‘Hamlin’ demonstraram redução dos sintomas de cancro cítrico.

Trabalhos baseados no uso da resistência derivada do patógeno, com a introdução do gene da capa proteica do vírus da tristeza dos citros (CTV), permitiram a obtenção de plantas transgênicas de laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), lima mexicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) (DOMÍNGUEZ et al., 2000; GUTIÉRREZ-E; LUTH; MOORE, 1997), pomelo (FEBRES et al., 2003) e laranja doce e limão ‘Cravo’ (SCHINOR, 2006).

O gene *PR-5* de uma proteína relacionada com patogênese (proteína RP), foi introduzido em laranja ‘Pineapple’ e resultou em redução significativa no desenvolvimento de lesões causadas por *Phytophthora citrophthora* (FAGOAGA et al., 2001). O gene *p12*, que codifica uma proteína RP, encontrada em plantas com sintomas de declínio e ausente em plantas sadias, foi introduzido em plantas de citrange ‘Carrizo’ visando resistência ao declínio, porém as plantas ainda não foram avaliadas (KAYIM et al., 2004).

A respeito dos peptídeos antibacterianos, as cecropinas isoladas da hemolinfa de insetos (*Hyalophora cecropia*) exibem atividade lítica e antibacteriana contra muitas bactérias (BOMAN; HULTMARK, 1987). Esse peptídeo foi introduzido em plantas de laranja doce visando à resistência as bactérias *X. fastidiosa* e *X. axonopodis* pv. *citri*. Em avaliações preliminares detectou-se tolerância a *X. axonopodis* pv. *citri*. (AZEVEDO, 2005). Recentemente, Paoli et al. (2007) obtiveram plantas transgênicas de laranja doce com o gene da cecropina (*cecropin* MB39), dirigido pelo promotor do gene da fenilalanina amônia-liase que confere expressão gênica nos vasos do xilema, visando resistência a *X. fastidiosa*. Paoli (2007) avaliou plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com o gene da cecropina (*cecropin* MB39) quanto à resistência a *X. fastidiosa* e uma planta revelou resistência ao patógeno. Bessalho Filho et al. (2001) obtiveram plantas transgênicas de laranja ‘Pêra’ contendo o gene da sarcotoxina (peptídeo antibacteriano isolado de larvas de *Sarcophaga peregrina*, pertencente ao grupo das cecropinas) e os resultados da avaliação de resistência a *X. axonopodis* pv. *citri* revelaram que as plantas apresentando maiores quantidades de sarcotoxina foram mais resistentes à bactéria.

Boscariol et al. (2006) introduziram o peptídeo antibacteriano *atacina* A em laranja doce cv. ‘Hamlin’, visando resistência a *X. axonopodis* pv. *citri* e obteve plantas transgênicas com redução da severidade de cancro cítrico em comparação a plantas não transgênicas.

2.5 Peptídeo antibacteriano atacina e gene maior de resistência *Xa21*

Os peptídeos antibacterianos são componentes importantes no mecanismo de defesa de muitos animais, principalmente os insetos, e têm ação bactericida contra bactéria gram-negativas e gram-positivas (MOURGUES; BRISSET; CHEVREAU, 1998). Esses peptídeos têm potencial para aumentar os mecanismos de resistência em plantas devido à rápida habilidade bioestática contra as células alvo, à atividade em baixas concentrações e a sua natureza não tóxica para células eucarióticas superiores (REED; EDWARDS; GONZALES, 1997). São descritos mais de 500 tipos de peptídeos com essas características, procedentes de uma grande variedade de organismos tais como bactérias, fungos, insetos, plantas e vertebrados (ZASLOFF, 2002).

O peptídeo atacina pertence a uma das maiores classes de peptídeos antibacterianos (LAZZARRO; CLARK, 2001). Os genes que codificam a proteína atacina foram isolados de diferentes insetos como *Hyalophora cecropia* (HULTMARK et al., 1983), *Drosophila melanogaster* (ASLING; DUSHAY; HULTMARK, 1995) e *Trichoplusia ni* (KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996). Seis atacinas isoladas de *H. cecropia*, apresentando massa molecular de 20 a 23 kDa, foram divididas em dois grupos de acordo com a composição de aminoácidos, sendo quatro básicas (A, B, C e D) e duas ácidas/neutras (E e F) (HULTMARK et al., 1983). O gene *atacina A* também foi isolado de *Trichoplusia ni* e apresentou alta similaridade com a forma ácida da atacina de *H. cecropia*, com 63% de homologia com a parte madura da proteína (KANG; LUNDSTROM; STEINER, 1996). Este gene possui 1601 pb, com dois introns e com peptídeo sinal de 54 pb, capaz de exportar a proteína para os espaços intercelulares (BOSCARIOL, 2004).

A ação das atacinas nas bactérias gram-negativas ocorre principalmente na parede celular, mais especificamente na membrana externa (ERGSTROM et al., 1984), acarretando uma alteração na permeabilidade da membrana, devido as atacinas se ligarem aos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa. Essa ligação também causa inibição da síntese de várias proteínas específicas da membrana externa, limitando a habilidade das bactérias de restaurar a função da membrana (CARLSSON et al., 1991; 1998). A alteração na permeabilidade da membrana propicia o acesso de outras proteínas antibacterianas como lisozima e cecropina. Além disso,

altas concentrações de atacinas podem causar lise de células bacterianas (ERGSTROM et al., 1984).

O efeito da proteína atacina foi confirmado em trabalhos de transformação de espécies frutíferas e olerícolas. Plantas transgênicas de macieira contendo o gene *atacina* A apresentaram alto nível de resistência a *Erwinia amylovora*, agente causal do “fire blight” (NORELLI; ALDWINCKLE, 1993). O gene *atacina* E introduzido em macieira (NORELLI et al., 1994; KO et al., 2002) e em pereira (REYNORD et al., 1999) apresentaram aumento na resistência a *E. amylovora*. Arce et al. (1999) introduziram o gene *atacina* E em batata e obtiveram aumento de resistência à bactéria *Erwinia carotovora atroseptica*. Monteiro (2005) introduziu o gene *atacina* A em maracujá amarelo visando resistência *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e testes preliminares “in vitro” revelaram resistência ao patógeno.

Genes maiores de resistência ou genes *R* são responsáveis pelo reconhecimento de genes *avr* complementares do 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 (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). Existem muitos genes de resistência de plantas clonados, como por exemplo o gene *Bs2* do pimentão (MINSAVAGE et al., 1990), os genes *Pto* (MARTIN et al., 1993) e *Cf-9* (JONES et al., 1994) do tomate, o gene *Dm3* da alface (MEYRS et al., 1998) os genes *Xa21* (SONG et al., 1995) e *Xa1* (YOSHIMURA et al., 1998) do arroz e o gene *RB* de batata (SONG et al., 2003).

Segundo Song et al. (1995), a transferência intergenérica de genes de resistência pode acarretar na aquisição de resistência a patógenos em diferentes espécies. Como exemplos dessa transferência, têm-se 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 *Bs2* de pimentão introduzido em tomate conferiu resistência contra *Xanthomonas campestris* (TAI et al., 1996) e o gene *RB* clonado da espécie silvestre de batata (*Solanum bulbocastanum*) conferiu resistência ao patógeno *Phytophthora infestans* em variedade comercial de batata (*Solanum tuberosum*) (SONG et al., 2003).

O gene *Xa21*, isolado de uma espécie silvestre de arroz (*Oryza longistaminata*), foi o primeiro gene de resistência de planta clonado e transferido para cereais (SONG et al., 1995; WANGA et al., 1996), confere resistência ao patógeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, causador do cretamento bacteriano em *Oryza sativa* (RONALD, 1997). Este gene pertence a uma família multigênica e codifica para uma proteína quinase (“receptor kinase like-protein”), possuindo domínio da serina-treonina quinase, domínio transmembrana e domínio extracelular com 23 regiões ricas em leucina. Por apresentar esta estrutura, sugere-se que a ação deste gene ocorra no reconhecimento da superfície celular do patógeno, com subsequente ativação de respostas de defesa intracelulares (SONG et al., 1995). O *Xa21* é o único gene de resistência de plantas que apresenta essa estrutura (CENTURY et al., 1999). Segundo Ronald (1997) uma hipótese do mecanismo de ação das proteínas *Xa21* consiste em três fases: uma que detecta os sinais da bactéria, outra que expande a membrana da célula vegetal e uma terceira fase que gera a mensagem dentro da célula, ocorrendo à ativação dos mecanismos de defesa da planta.

A ação do gene *Xa21* no controle da bactéria *X. oryzae* pv. *oryzae* foi relatada em vários trabalhos. Wanga et al. (1996) e Tu et al. (1998), quando introduziram o gene *Xa21* em cultivares comerciais de arroz obtiveram aumento da resistência a diferentes isolados a *X. oryzae* pv. *oryzae*. Ronald (1997) obteve 75% a 90% de redução nas lesões do cretamento bacteriano em arroz comercial suscetível, transformado com o gene *Xa21*. Tu et al. (2000) relatam que a geração F2 de plantas transgênicas de arroz contendo o gene *Xa21* mantiveram o mesmo espectro de resistência ao cretamento bacteriano da geração F1.

Century et al. (1999) relataram que a expressão do *Xa21* em arroz é independente do estágio de desenvolvimento da planta, da infecção com o patógeno ou de ferimento, embora aumentos progressivos de resistência a *X. oryzae* pv. *oryzae* tenham sido observados mediante o avanço nos estágios fenológicos do arroz.

Segundo Song et al. (1995), devido o gênero *Xanthomonas* infectar várias espécies de planta em todo o mundo, a transferência do gene de resistência *Xa21* para outras culturas pode ajudar no controle de doenças provocadas por outras espécies de bactérias desse gênero. Essa hipótese tem sido levantada por outros autores, como Deng e Gmitter (2003) que clonaram e identificaram genes candidatos de resistência à doença em citros da classe de proteínas receptora de quinase, semelhante à classe do gene *Xa21*, e encontraram estruturas similares a este gene,

como o mesmo número de repetições ricas em leucina e os domínios transmembrana e quinase. Assim, esses autores sugerem que plantas de citros resistentes a *X. axonopodis* pv. *citri* (agente causal do cancro cítrico) podem ser obtidas com a introdução do gene *Xa21* do arroz e de possíveis genes R de resistência em citros. Baseando-se também na hipótese de que o gene *Xa21* pode ter largo espectro para bactérias do gênero *Xanthomonas*, recentemente, Omar, Song e Grosser (2007), introduziram o gene *Xa21* em protoplastos de laranja doce ‘Hamlin’ usando polietilenoglicol (PEG), visando resistência a *X. axonopodis* pv. *citri*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As plantas transgênicas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) contendo os genes *atacina A* (*attA*) ou *Xa21* (variedades ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’), dirigidas pelo promotor 35S duplicado, foram obtidas por Boscariol (2004), em transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*. Essas plantas são mantidas em casa de vegetação, específica para o cultivo de plantas transgênicas e com Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), instalada na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

3.2 Análises moleculares das plantas de laranja doce transformadas com os genes *atacina A* (*attA*) e *Xa21* para confirmação da integração e transcrição dos genes

As análises de “Southern blot” e “Northern blot” foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP.

3.2.1 Análise de “Southern blot”

Análises de “Southern blot” foram realizadas para confirmar a integração dos transgenes nas plantas obtidas nos experimentos de transformação genética e identificadas como transgênicas por PCR. O DNA total das plantas matrizes e das plantas não transformadas (controle negativo) foi extraído de folhas jovens pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), acrescentando-se uma lavagem com fenol e uma com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para uma melhor purificação. Aproximadamente 60 µg de DNA de cada planta foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *KpnI* (para as plantas transformadas com os genes *attA* e *Xa21*, respectivamente) separados, em gel de agarose 1%, por eletroforese e transferidos para membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences).

As sondas para os genes *attA* e *Xa21* foram preparadas por PCR e os fragmentos amplificados de 350 pb e 1,4 Kb, respectivamente, foram purificados utilizando o kit “QIAEX®

II Gel Extraction” (Qiagen, Hilden, Germany) e submetidos à marcação com o kit “AlkPhos Direct Labelling Reagents” (Amersham Biosciences). As hibridações foram realizadas a 60 °C (*attA*) e 65 °C (*Xa21*) e a detecção foi realizada com “CDP-StarTM Detection Reagent” (Amersham Biosciences).

3.2.2 Análise de “northern blot”

As análises de “northern blot” foram realizadas para confirmar a transcrição dos genes nas plantas transgênicas. O RNA total das plantas transgênicas das plantas não transformadas (controle negativo) foi extraído usando-se o produto comercial TRIzol (Invitrogen), seguido as instruções do fabricante. A eletroforese em gel desnaturante com 1% de agarose, foi realizada com 30 µg (*attA*) e 40 µg (*Xa21*) de cada amostra de RNA. O RNA separado foi transferido para membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences) e hibridizado com a mesma sonda utilizada nas análises de “Southern blot”. As hibridações foram realizadas a 60 °C (*attA*) e 65 °C (*Xa21*) e a detecção foi realizada com “CDP-StarTM Detection Reagent” (Amersham Biosciences).

3.3 Propagação das plantas transgênicas

As mudas foram produzidas por enxertia do tipo borbulhia, utilizando o porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), cultivado em sacos plásticos (3,5 L) e tubetes (19,5 cm x 5,0 cm) contendo substrato comercial de casca de pinus (Rendmax[®] Eucatex[®]) misturado com adubo Osmocote[®] (N-22, P-4 e K-7), na proporção 200 g do adubo para cada 25 kg do substrato. As borbulhas das plantas transgênicas foram retiradas das plantas matrizes (variedades Hamlin, Natal, Pêra e Valência). As borbulhas das plantas testemunhas (não transgênicas), oriundas de borbulheira certificada, foram gentilmente cedidas pela Sanicitrus mudas cítricas, Araras, SP, Brasil. Todos os experimentos de avaliação de resistência a *X. axonopodis* pv. *citri* foram conduzidos em porta-enxerto limão ‘Cravo’ (*C. limonia*), com exceção do experimento com laranja ‘Hamlin’ que foi conduzido em porta-enxerto tangerina ‘Cleopatra’ (*Citrus reshni* hort. ex.Tanaka).

3.4 Avaliação da resistência à *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* em plantas de laranja doce transformadas com o gene *atacina A* (*attA*)

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Insetos Vetores (LIV) e no Laboratório de Epidemiologia, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, e nas casas de vegetação do Departamento de Produção Vegetal, da ESALQ/USP.

3.4.1 Inoculação de *Xylella fastidiosa*

O isolado da estirpe de citros de *X. fastidiosa* utilizado nas inoculações dos experimentos foi o CCT6570 (isolado de plantas infectadas em Bebedouro, SP, Brasil), cedido pelo Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes (Laboratório de Insetos Vetores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP).

A bactéria foi retirada do ultrafreezer (-80°C) e repicada por duas vezes em meio de cultura sólido “periwinkle wilt gelrite” - PWG (HILL; PURCELL, 1995a) (anexo), totalizando cerca de 15 a 20 dias de incubação, a 28 °C. Após esse período de cultivo, preparou-se uma suspensão bacteriana com tampão fosfato salino (“phosphate buffer saline” - PBS) (10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄; 0,14 mM NaCl; 2,7 mM KCL; pH 7,0) (HILL; PURCELL, 1995b). Para quantificação bacteriana dessa suspensão concentrada de bactérias em UFC mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias), foi feita uma diluição serial até 10⁻⁹, e plaqueamento de 40 µL de todas as diluições em meio de cultura sólido PWG. As placas foram acondicionadas em estufa, a 28 °C. Após 15 dias do plaqueamento, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias com auxílio de uma lupa estereoscópica. Foram determinadas concentrações bacterianas variando de 10⁹ a 10¹⁰ UFC mL⁻¹.

Para os experimentos com *X. fastidiosa* foram utilizadas as mudas produzidas em sacos plásticos (3,5 L). As mudas com aproximadamente três meses da enxertia, apresentado caule tenro e sob stress hídrico por 24 h, foram previamente marcadas com dois pontos de inoculação no caule com caneta permanente. A suspensão bacteriana foi inoculada mecanicamente, depositando-se uma gota de 5 µl em cada ponto de inoculação no caule (perfazendo um total de 10 µl por planta), perfurando-se, em seguida, o local por 10 vezes com alfinete entomológico nº0. Como controle negativo de cada experimento, quatro plantas não transgênicas foram inoculadas

apenas com tampão (PBS), (Figura 1). Os experimentos com as laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’ foram inoculados com suspensão bacteriana de 10^{10} UFC mL⁻¹ e os experimentos com a laranja ‘Pêra’ foram inoculados com suspensão bacteriana de 10^9 UFC mL⁻¹. O método de inoculação por alfinete foi escolhido por apresentar uma eficiência média de inoculação superior a 70% (ALMEIDA et al., 2001). Durante todo o período experimental as mudas foram mantidas em casa de vegetação protegida contra a entrada de cigarrinhas, vetoras de *X. fastidiosa*, e com Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB).

Figura 1 - Inoculação da bactéria *X. fastidiosa*. A) Suspensão bacteriana em tampão PBS; B) Aplicação de 5µl de suspensão bacteriana em um dos pontos marcados no caule da planta; C) Perfuração da planta com um estilete no ponto de inoculação, para a absorção da suspensão bacteriana

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todos os experimentos e cada experimento foi repetido 2 vezes. Os experimentos foram os seguintes:

Experimento com a laranja ‘Hamlin’ (H): Foram avaliadas oito plantas transgênicas (eventos de transformação - Hat1, Hat2, Hat3, Hat5, Hat8, Hat9, Hat10 e Hat11) mais a testemunha (planta de laranja ‘Hamlin’ não transgênica), com 10 repetições por tratamento (sendo que uma planta corresponde a uma repetição).

Experimento com a laranja ‘Natal’ (N): Foram avaliadas sete plantas transgênicas (eventos de transformação - Nat1, Nat2, Nat4, Nat5, Nat7, Nat8 e Nat9) mais a testemunha (planta de laranja ‘Natal’ não transgênica), com 10 repetições por tratamento.

Experimento com a laranja ‘Pêra’ (P): Foram avaliadas cinco plantas transgênicas (eventos de transformação - Pat6, Pat7, Pat8, Pat10 e Pat15) mais a testemunha (planta de laranja ‘Pêra’ não transgênica), com 10 repetições por tratamento.

Experimento com a laranja ‘Valência’ (V): Foram avaliadas nove plantas transgênicas (eventos de transformação - Vat2, Vat10, Vat11, Vat12, Vat13, Vat16, Vat17, Vat18 e Vat20) mais a testemunha (planta de laranja ‘Valência’ não transgênica), com 10 repetições por tratamento.

3.4.2 Isolamento e quantificação de *X. fastidiosa*

Para o isolamento de *X. fastidiosa* e quantificação da população bacteriana das plantas de citros inoculadas utilizou-se o método de isolamento primário em meio de cultura descrito por Hill e Purcell (1995b) adaptado por Almeida et al. (2001).

Os isolamentos foram realizados em todas as plantas inoculadas aos quatro e oito meses. Aos quatro meses foram coletadas duas folhas na região do ponto de inoculação para avaliação da eficiência de inoculação e a população bacteriana e, aos oito meses foram coletadas duas folhas a 50 cm do ponto de inoculação para observação da população e movimentação bacteriana. O pecíolo e parte da nervura central de cada amostra foram destacados com uma lâmina e pesados em balança semi-analítica (0,1 - 0,2 g amostra⁻¹). Em câmara de fluxo laminar, utilizando apenas materiais estéreis, cada amostra passou por cinco banhos de imersão de dois minutos em recipientes contendo álcool (92,8%) (1x), hipoclorito de sódio (2%) (1x) e água destilada estéril (3x) para desinfestação superficial. Após a desinfecção, as amostras foram cortadas em secções de 1 - 2 mm sobre papel filtro, com o auxílio de uma lâmina esterilizada, e colocadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão PBS autoclavado. Nestes tubos de ensaio as amostras foram trituradas em homogeneizador tipo Turrax[®] (modelo MA102, Marconi Equipamentos para Laboratório S.A.) por 15 s, com a rotação da haste giratória de aproximadamente 25.000 rpm. A cada trituração, a haste foi desinfestada por imersão em recipientes contendo água destilada estéril (5 s), álcool 92,8% (15 s) e novamente água destilada estéril (5 s). Em câmara de fluxo laminar a suspensão homogeneizada foi diluída 10x em tampão PBS e plaqueadas duas alíquotas de 20 µL de cada amostra em meio de cultura sólido PWG. A suspensão inicial também foi plaqueada em meio PWG (Figura 2). Os plaqueamentos foram acondicionados em estufa a 28 °C, sendo avaliadas em estereoscópio após 15 dias de incubação, determinando-se o número médio de unidades formadoras de colônias (UFC) nas duas alíquotas. Para confirmação da identidade da

bactéria *X. fastidiosa* foi realizada PCR (Reação de polimerase em cadeia) em 30% das colônias, de cada tratamento, obtidas no isolamento.

A concentração bacteriana (C), medida em número de UFC por grama de tecido vegetal (UFC g^{-1}) foi calculada com base na massa inicial das amostras foliares e nas diluições no material vegetal em tampão PBS, utilizando-se a fórmula: $C = 100.(1/p). \text{UFC}.(10)$, onde p é a massa da amostra foliar (g) e 10 é o fator de diluição.

Figura 2 – Isolamento de *X. fastidiosa*. A) Corte das nervuras com lâmina; B) Trituração das nervuras em homogeneizador (Turrax®); C) Plaqueamento das suspensões em meio PWG

Os dados de quantificação bacteriana obtidos no isolamento ($\text{Log UFC g de tecido}^{-1}$) foram submetidos à análise exploratória para verificar as pressuposições da análise paramétrica, tais como teste de normalidade (Shapiro-Wilks e Kolmogorov), independência dos erros e pontos discrepantes. Quando tais pressuposições não foram validadas, recorreu-se a análise da variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que para a análise não paramétrica o teste de Tukey foi aplicado às médias dos postos das observações.

3.4.3 Análises moleculares

3.4.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção de *X. fastidiosa*

A extração de DNA foi baseada no protocolo desenvolvido por Murray e Thompson, (1980). Foram utilizadas as mesmas folhas usadas no isolamento aos quatro meses, retirando-se a parte restante da nervura central com auxílio de uma lâmina. As amostras foram cortadas em pedaços pequenos e maceradas com a ajuda de um pistilo em cadinho.

Para a amplificação do DNA extraído das plantas, utilizaram-se os oligonucleotídeos CVC-1 (AGATGAAAACAATCATGCAA) e 272-2-int (GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT) (POOLER; HARTUNG, 1995), que amplificam um fragmento de 500 pb e são específicos para *X. fastidiosa* de citros (COLETTA FILHO; MACHADO, 2001). A reação de PCR foi realizada para um volume final de 25 µL contendo os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão 10x (200mM Tris-HCL pH 8,4; 500 mM KCl); 1,0 µL de Mg Cl₂ (50 mM); 0,5 µL de mix dNTP (10 mM); 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen®); 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM) e 3 µL de DNA da amostra. A amplificação foi realizada em termociclador, programado para as seguintes condições: 1 ciclo inicial a 94 °C por 4 min.; 30 ciclos envolvendo desnaturação a 94 °C por 1 min; anelamento a 62 °C por 1,5 min e extensão a 72 °C por 1,5 min; e 1 ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min; estabilizando a 4 °C por tempo indeterminado (POOLER; HARTUNG, 1995).

Para a confirmação da identidade de *X. fastidiosa* das colônias desenvolvidas no isolamento, selecionaram-se aleatoriamente três amostras de cada tratamento, retirou-se uma colônia com alça de platina, a qual foi diluída em 50 µL de TE (10 mM de Tris HCl; 1m M EDTA – ácido etileno diamonotetracético), dessa solução utilizou-se 2 µL para reação de PCR, seguindo o mesmo procedimento da amplificação de DNA de folha.

Após amplificação, foram adicionados 2 µL de corante de bromofenol (0,25% e sacarose 40%) por amostra e o produto da amplificação (fragmento de 500 pb) foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v), suplementado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹), em tampão TBE 1x (TRIS-HCl, 45 mM; ácido bórico, 45 mM; EDTA pH 8,0, 1 mM). A eletroforese foi conduzida à corrente elétrica de 100 V, durante 50 min e o gel visualizado em luz ultravioleta.

3.4.3.2 Quantificação de *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA* por PCR quantitativo (qPCR)

As análises de PCR quantitativo foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, Piracicaba, com a colaboração do Prof. Dr. Antonio Vargas Figueira e da Dra. Jeanne Blanco de Molfetta Machado.

A) Determinação da curva padrão de *X. fastidiosa*

O isolado de *X. fastidiosa* (CCT6570) foi cultivado em meio de cultura sólido PWG nas mesmas condições citadas para inoculação (Item 3.4.1). A bactéria foi diluída em 1000 µL de tampão PBS (quatro placas para 1000 µL de PBS), em seguida foi feita uma diluição serial até 10^{-9} e o plaqueamento de 40 µL de todas as diluições em meio sólido PWG. As placas foram acondicionadas em estufas a 28 °C e após 15 dias foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹). A extração de DNA da bactéria foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Ausubel et al. (1987), usando 900 µL da suspensão bacteriana inicial. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro ($A_{260\text{nm}}$) e diluído em série (10^{-1} - 10^{-6})

Para a reação de amplificação do DNA da bactéria, foram utilizados os oligonucleotídeos CVC-1 (AGATGAAAACAATCATGCAA) e 272-2-int (GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT) (POOLER; HARTUNG, 1995) e o Kit PLatinum® Sybr® Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen). A mistura da reação (15 µL) foi preparada usando 267 nM de cada oligonucleotídeo; 7,5 µL do Sybr® Green Super Mix e 2,0 µL do DNA diluído (cinco diluições: 10^{-2} a 10^{-6}). Cada amostra foi testada em triplicata e foram adicionadas duas amostras como controle negativo (água). A reação foi conduzida em RotorGene 3000 (Colbert Research), programado para as seguintes condições: uma temperatura inicial (“Hold” 1) de 50 °C por 2 min.; uma segunda temperatura (“Hold” 2) de 95 °C por 2 min; 50 ciclos envolvendo desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 40 s; e uma incubação final (“Hold” 3) a 72 °C por 5 min. Após o término dos ciclos, o aparelho foi programado para detectar a temperatura de desnaturação do fragmento amplificado. Para tanto, foi adotada uma rampa linear de 72 - 95 °C, a qual se inicia em 72 °C por 45 s, aumentando 1 °C a cada 5 s até atingir 95 °C.

A partir dos valores de CT (ciclo onde ocorre o piso de fluorescência – “Threshold” de 0,1), o programa gerou uma reta com os pontos de diluição. Buscou-se a obtenção de um coeficiente de linearidade (R^2) de aproximadamente 0,99. As análises foram realizadas pelo software Rotor-Gene Real-Time.

B) PCR quantitativo (qPCR) das plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA* e inoculadas com *X. fastidiosa*

Para a quantificação de *X. fastidiosa* nas plantas cítricas transgênicas inoculadas com o patógeno, foram selecionadas sete plantas (Hat8, Pat6, Pat7, Vat2, Vat12, Nat1 e Nat2). O critério para a seleção de tais plantas baseou-se na ordem de grandeza da população bacteriana obtida no isolamento em meio de cultura aos oito meses após a inoculação (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Para cada planta selecionada, utilizaram-se três repetições (plantas) que foram positivas no isolamento em meio de cultura e PCR. Foi realizada uma coleta de duas folhas de cada planta, a 50 cm do ponto de inoculação, para extração de DNA. No período da coleta, a planta Hat8 estava com 20 meses da inoculação e as plantas Pat6, Pat7, Vat2, Vat12, Nat1 e Nat2 estavam com 14 meses da inoculação. Como controle positivo foram utilizadas as plantas testemunhas (não transformadas e inoculadas) de cada variedade e uma planta transformada e inoculada de cada variedade (Hat2, Pat10 e Vat18), que obteve população bacteriana tão alta quanto a testemunha. Como controle negativo foram utilizadas as plantas testemunhas, não transformadas e não inoculadas, também de cada variedade.

O DNA genômico das folhas foi extraído de acordo o protocolo descrito por Laranjeira et al. (1998). O pecíolo e a nervura central de duas folhas maduras foram retirados com auxílio de uma lâmina e cortados em pedaços pequenos, em seguida macerados em nitrogênio líquido em almofariz. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro ($A_{260\text{nm}}$).

Para a amplificação de qPCR, utilizou-se a mesma mistura da reação para o DNA da bactéria *X. fastidiosa*, com volume final de 15 μL e 100 ng de DNA das amostras. Cada amostra foi testada em triplicata e foram adicionadas duas amostras como controle negativo (água). As reações foram conduzidas em RotorGene 3000 (Colbertt Research) programado com o mesmo ciclo de amplificação citado anteriormente (Item A). A cada corrida importou-se a curva padrão realizada com o DNA de *X. fastidiosa* e o programa comparou e estimou a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC ng DNA⁻¹) de cada amostra de DNA de planta. As análises foram realizadas pelo software Rotor-Gene Real-Time.

3.4.4 Avaliação dos sintomas foliares de clorose variegada dos citros (CVC)

As avaliações dos sintomas de CVC foram visuais e realizadas a cada dois meses. A porcentagem de plantas sintomáticas foi determinada pela proporção de plantas sintomáticas em relação ao total de plantas. As avaliações foram encerradas aos 12 meses após inoculação, quando os sintomas de CVC nas folhas começaram a ser confundidos com sintomas de deficiência de nutrientes e/ou senescência, devido à limitação do recipiente em que as plantas foram cultivadas e competição por luminosidade,

3.4.5 Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) em plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA*

Nos experimentos com *X. axonopodis* pv. *citri* foram utilizadas mudas de laranja doce (variedades ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’, e ‘Valência’) produzidas em tubetes (19,5 cm x 5,0 cm).

Os experimentos foram conduzidos em sala fechada, de acordo com as normas de segurança fitossanitária para o cancro cítrico, com acesso restrito as pessoas envolvidas no projeto e dentro de câmaras de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados.

O isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* (estirpe IBSBF 1421), utilizado em todos os experimentos, foi fornecido pelo Dr. Júlio Rodrigues Neto, do Laboratório de Bacteriologia, do Instituto Biológico de São Paulo, Campinas, SP. A bactéria foi preservada, a curto período (seis meses), pelo método Castellani (1939) e, por longo período, congelada a -80 °C em glicerol 10%, garantindo assim a viabilidade do inóculo durante o período de condução dos experimentos. O inóculo foi preparado a partir de cultura da bactéria cultivada em meio ágar nutriente (NA), por 48 h, a 26 – 28 °C. A bactéria foi suspendida em água estéril destilada e a concentração calibrada por colorímetro a 480 nm e diluída para 10⁶ UFC mL⁻¹.

As mudas com aproximadamente dois meses após enxertia, apresentando folhas novas e imaturas, sem ferimentos, foram inoculadas em ambos os lados com suspensão de Xac, com o auxílio de um aspersor acoplado a uma bomba a vácuo. Este tipo de inoculação favorece a penetração da bactéria por estômatos. As mudas foram mantidas em câmara úmida, feita com sacos plásticos transparentes, por 72 h e mantidas em câmara de crescimento (Convicon® modelo PGW 36) a ± 28 °C e fotoperíodo de 12 h (Figura 3). Após a retirada da câmara úmida, as plantas

permaneceram na câmara de crescimento, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo, por 27 dias.

Figura 3 – Inoculação de *Xac*; A) Inoculação por aspersão nas plantas com suspensão de bactérias na concentração de 10^6 UFC mL^{-1} ; B) Câmara úmida após a inoculação; C) Plantas em câmara de crescimento após retirada da câmara úmida

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todos os experimentos e cada experimento foi repetido três vezes. Cada planta transgênica (evento de transformação) foi considerada como um tratamento com 7 a 10 repetições (uma planta por parcela). O número de repetições (plantas) foi variável em alguns tratamentos devido à dificuldade no pegamento da enxertia e na padronização do tamanho das mudas. Cada experimento apresentou um tratamento com plantas testemunhas, ou seja, plantas não transgênicas da mesma variedade em análise. Os experimentos foram os seguintes:

Experimento com a laranja ‘Hamlin’ (H): Foram avaliadas oito plantas transgênicas (eventos de transformação) Hat1, Hat2, Hat5, Hat8, Hat9, Hat10, Hat11 e Hat12.

Experimento com a laranja ‘Natal’ (N): Foram avaliadas sete plantas transgênicas (eventos de transformação) Nat1, Nat2, Nat4, Nat5, Nat7, Nat8 e Nat9.

Experimento com a laranja ‘Pêra’ (P): Foram avaliadas sete plantas transgênicas (eventos de transformação) Pat6, Pat7, Pat8, Pat10, Pat11, Pat12 e Pat15.

Experimento com a laranja ‘Valência’ (V): Foram avaliadas dez plantas transgênicas (eventos de transformação) Vat2, Vat7, Vat10, Vat11, Vat12, Vat13, Vat16, Vat17, Vat18 e Vat20.

3.4.6 Quantificação de cancro cítrico

A severidade da doença foi avaliada 30 dias após a inoculação, coletando-se o segundo par de folhas abaixo do ápice de cada planta com lesões de cancro cítrico. A escolha do segundo par de folhas para coleta e avaliação da doença foi baseada na observação dos autores Gottwald e Graham (1992); Grahhan et al. (1992), os quais citam que as folhas novas de citros, com 2/3 de área expandida são as mais suscetíveis à infecção pela bactéria *Xac*.

As folhas foram digitalizadas e a severidade determinada por um software de quantificação de doença, QUANT v.1.0 (VALE et al., 2001), que estima a área foliar afetada em relação à área sadia. Os dados de severidade foram submetidos à análise exploratória para verificar as pressuposições da análise paramétrica, tais como teste de normalidade (Shapiro-Wilks e Kolmogorov), independência dos erros e pontos discrepantes. Quando tais pressuposições não foram validadas, recorreu-se a análise da variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que para a análise não paramétrica o teste de Tukey foi aplicado às médias dos postos das observações.

Após finalização de cada experimento as plantas foram autoclavadas (120 °C) e descartadas.

3.5 Avaliação da resistência à *Xanthomonas axonopodis* (*Xac*) em plantas de laranja doce transformadas com o gene *Xa21*

Em todos os experimentos de avaliação de resistência a bactéria *Xac* foram utilizadas mudas transgênicas de laranja doce (variedades ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’), contendo o gene *Xa21*, produzidas em tubetes, de acordo com os procedimentos descritos no item 3.3.

Os procedimentos de inoculação, delineamento experimental e quantificação da severidade de cancro cítrico foram os mesmos descritos nos itens 3.4.5 e 3.4.6. Os experimentos foram os seguintes:

Experimento com a laranja ‘Hamlin’ (H): Foram avaliadas oito plantas transgênicas (eventos de transformação) Hxa1, Hxa3, Hxa4, Hxa5, Hxa6, Hxa7, Hxa10 e Hxa11.

Experimento com a laranja ‘Natal’ (N): Foram avaliadas oito plantas transgênicas (eventos de transformação) Nxa1, Nxa3, Nxa4, Nxa5, Nxa6, Nxa9, Nxa10 e Nxa11.

Experimento com a laranja ‘Pêra’ (P): Foram avaliadas quatro plantas transgênicas (eventos de transformação) Pxa9, Pxa10, Pxa13 e Pxa14.

Experimento com a laranja ‘Valência’ (V): Foram avaliadas seis plantas transgênicas (eventos de transformação) Vxa1, Vxa3, Vxa4, Vxa5, Vxa7 e Vxa8.

3.6 Avaliação do desenvolvimento da *X. fastidiosa* em plantas laranja doce não transgênicas juvenis e adultas

Esse experimento adicional buscou avaliar uma possível diferença no desenvolvimento da bactéria *X. fastidiosa* em plantas de citros não transformadas juvenis e adultas. Foram avaliadas a população e movimentação bacteriana na planta e principalmente a expressão dos sintomas de clorose variegada dos citros (CVC) nas plantas.

As mudas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ foram propagadas por enxertia em porta enxerto de limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), cultivadas em sacos plásticos (3,5 L). As borbulhas juvenis foram retiradas de plantas jovens com 18 meses de idade obtidas de sementes cultivadas em casa de vegetação com tela antiafídica. As borbulhas adultas oriundas de borbulheira certificada foram gentilmente cedidas pela Sanicitrust mudas cítricas, Araras, SP, Brasil. O experimento foi conduzido em casa de vegetação protegida contra a entrada de cigarrinhas, vetoras de *X. fastidiosa*.

A inoculação das plantas com a bactéria *X. fastidiosa*, na concentração 10^{10} UFC mL⁻¹, foi realizada dois meses após a enxertia, seguindo o mesmo procedimento citado no item 3.4.1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 15 repetições (sendo uma planta considerada como uma repetição). Os tratamentos foram: PJ - plantas de laranja ‘Pêra’ juvenil; PA - plantas de laranja ‘Pêra’ adulta; VJ - plantas de laranja ‘Valência’ juvenil e VA - plantas de laranja ‘Valência’ adulta.

Foram realizados isolamentos em meio de cultura aos quatro e oito meses após inoculação, PCR aos quatro meses após inoculação, PCR quantitativo aos oito meses após inoculação e avaliação de sintomas de CVC, mensalmente, a partir dos quatro meses após inoculação, por meio da porcentagem de plantas e folhas sintomáticas. A porcentagem de plantas sintomáticas foi determinada pela proporção de plantas sintomáticas em relação ao total de

plantas e a porcentagem de folhas sintomáticas foi estabelecida pela proporção de folhas sintomáticas em relação ao total de folhas da planta.

Os dados de quantificação bacteriana (Log UFC g de tecido⁻¹) e porcentagem de folhas sintomáticas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises moleculares das plantas de laranja doce transformadas com os genes *atacina A* (*attA*) e *Xa21* para confirmação da integração e transcrição dos genes

4.1.1 Análise de “Southern blot”

As análises de “Southern blot” confirmaram a integração dos transgenes no genoma das plantas matrizes com PCR positivo, por meio da hibridização com as sondas dos respectivos genes *attA* e *Xa21*. As plantas transgênicas apresentaram de um a quatro eventos de inserção do transgene (Figuras 4 e 5).

Em relação às plantas transgênicas de laranja contendo o gene *attA*, foram analisadas nove plantas de laranja ‘Hamlin’ (Figura 4A), sete plantas de laranja ‘Natal’ (Figura 4B), sete plantas de laranja ‘Pêra’ (Figura 4C) e dez plantas de laranja ‘Valência’ (Figura 4). As análises de “Southern blot” das plantas laranja ‘Hamlin’ (Figura 4A), ‘Natal’ (Figura 4B) e ‘Valência’ (Figura 4) foram realizadas pela equipe de trabalho da profa. Beatriz M. Januzzi Mendes do Lab. de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP.

Para as plantas transgênicas contendo o gene *Xa21* foram analisadas oito plantas de laranja ‘Hamlin’ (Figura 5A), oito plantas de laranja ‘Natal’ (Figura 5B), quatro plantas de laranja ‘Pêra’ (Figura 5C) e seis plantas de laranja ‘Valência’ (Figura 5D). As plantas Nxa11 (Figura 5B) e Vxa7 (Figura 5D) apesar de apresentarem PCR positivos (BOSCARIOL, 2004), não apresentaram bandas definidas no “Southern blot”, mesmo após a análise ter sido repetida por três vezes. Isto pode ter ocorrido, provavelmente, por problemas na análise ou na qualidade do DNA.

As análises de “Southern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene *Xa21* (Figura 5) foram realizadas em colaboração com a equipe de trabalho da profa. Beatriz M. Januzzi Mendes do Lab. de Biotecnologia Vegetal do CENA/USP.

Não foram observadas hibridizações nas amostras de DNA das plantas controle (plantas não transgênicas) em todas as análises realizadas.

Figura 4 - Análise de “Southern blot” das plantas transgênicas de laranja doce contendo o gene *attA*. C+ = controle positivo (fragmento do gene *attA* amplificado por PCR); C- = Controle negativo (planta não transgênica); Colunas identificadas com letras e números correspondem ao DNA, digerido com a enzima *HindIII*, das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D). Os resultados das plantas laranja ‘Hamlin’ (A) foram publicados por Boscariol et al., (2006).

Figura 5 - Análise de “Southern blot” das plantas transgênicas de laranja doce contendo o gene *Xa21*. C+ = controle positivo (fragmento do gene *Xa21* amplificado por PCR); C- = Controle negativo (planta não transgênica); Colunas identificadas com letras e números correspondem ao DNA, digerido com a enzima *KpnI*, das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D)

4.1.2 Análise de “northern blot”

As análises de “northern blot” detectaram variações nos níveis de transcrição do gene *attA* nas plantas de laranja ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ (Figura 6). Das 33 plantas transgênicas de laranja contendo o gene *attA* analisadas, 19 plantas (Hat3, Hat5, Nat2, Nat5, Nat7, Nat9, Pat6, Pat7, Pat8, Pat12, Pat15, Vat2, Vat7, Vat10, Vat12, Vat13, Vat16, Vat18 e

Vat20) apresentaram altos níveis de transcrição, 13 plantas (Hat1, Hat2, Hat8, Hat9, Hat10, Hat11, Hat12, Nat4, Nat8, Pat10, Pat11, Vat11 e Vat17) revelaram baixos níveis e para uma planta (Nat1) não foi possível detectar transcrição, provavelmente por problemas na análise.

Figura 6 - Análise de “northern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene *attA*. C- = controle negativo (planta não transgênica); colunas identificadas com letras e números correspondem ao RNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D). Os resultados das plantas laranja ‘Hamlin’ (A) foram publicados por Boscariol et al., (2006).

Para as plantas transgênicas de laranja doce ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ contendo o gene *Xa21*, os níveis de transcrição desse gene foram relativamente semelhantes em todas as plantas (Figura 7). Das 26 plantas analisadas, cinco plantas (Hxa1, Hxa3, Hxa4, Hxa10 e Vxa1) apresentaram níveis um pouco mais expressivos que as demais, 15 plantas (Hxa5, Hxa6, Hxa11, Nxa3, Nxa5, Nxa6, Nxa9, Nxa10, Nxa11, Pxa9, Pxa13, Pxa14, Vxa5, Vxa7 e Vxa8) revelaram baixos níveis e para seis plantas (Hxa7, Nxa1, Nxa4, Pxa10, Vxa3 e Vxa4), não foi possível detectar transcrição do gene *Xa21*, provavelmente por problemas na análise ou na qualidade do RNA.

Não foram detectadas transcrições no RNA das amostras controle (plantas não transgênicas) em todas as análises realizadas.

Figura 7 - Análise de “northern blot” das plantas transgênicas de laranja contendo o gene *Xa21*. C- = controle negativo (planta não transgênica); colunas identificadas com letras e números correspondem ao RNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ (A), ‘Natal’ (B), ‘Pêra’ (C) e ‘Valência’ (D)

4.2 Avaliação da resistência à *Xylella fastidiosa* e à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) em plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA*

4.2.1 Avaliação da resistência à *Xylella fastidiosa*

As plantas transgênicas de laranja doce contendo o gene *attA* foram propagadas por enxertia e inoculadas com *X. fastidiosa* para avaliação da resistência ao patógeno.

Em todos os experimentos com as plantas transgênicas de laranja doce (‘Hamlin’, ‘Valência’, ‘Natal’ e ‘Pêra’), foram encontradas altas porcentagens de plantas infectadas com *X. fastidiosa*, detectadas pelo isolamento em meio de cultura (médias de 82 a 88%) e PCR (médias de 66 a 88%), aos quatro meses da inoculação, demonstrando que houve uma boa eficiência na inoculação mecânica com alfinete (Tabela 1). Almeida et al. (2001) também relataram alta percentagem de infecção de *X. fastidiosa* (em torno de 80%) em “seedlings” de laranja doce, utilizando o mesmo isolado da bactéria (CCT6570) em inoculação mecânica com alfinete.

Tabela 1 – Porcentagem de plantas infectadas por *X. fastidiosa*, determinadas pelo isolamento em meio de cultura e PCR e porcentagem de plantas com sintomas de clorose variegada dos citros em plantas de laranja ‘Hamlin’(H), ‘Natal’ (N), ‘Pêra’ (P) e ‘Valência’ (V), transformadas com o gene *attA*

Tratamentos	Plantas infectadas (%) ^{1,2}		Plantas sintomáticas (%) ^{1,3} 12 meses após inoculação
	Isolamento 4 meses após inoculação	PCR + 4 meses após inoculação	
Hat1	65	60	60
Hat2	95	95	75
Hat3	90	90	70
Hat5	90	60	60
Hat8	70	50	30
Hat9	90	50	70
Hat10	90	60	65
Hat11	80	70	90
Testemunha ⁴	80	70	55
Média	83	67	64
Nat1	100	80	35
Nat2	100	90	95
Nat4	70	70	50
Nat5	90	85	40
Nat7	70	45	45
Nat8	85	50	45
Nat9	95	50	65
Testemunha ⁴	85	70	5
Média	87	66	48
Pat6	90	90	95
Pat7	75	65	85
Pat8	60	60	60
Pat10	90	80	90
Pat15	85	95	90
Testemunha ⁴	90	100	100
Média	82	82	87
Vat2	90	85	70
Vat10	80	80	35
Vat11	80	80	50
Vat12	95	90	65
Vat13	95	90	50
Vat16	100	95	90
Vat17	95	90	75
Vat18	90	95	80
Vat20	70	90	75
Testemunha ⁴	80	80	30
Média	88	88	62

¹Médias de dois experimentos independentes;

²Porcentagem de plantas infectadas em relação ao total de 20 plantas avaliadas;

³Porcentagem de plantas com sintomas de CVC em relação ao total de 20 plantas avaliadas;

⁴Plantas não transgênicas de laranja ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’.

O estágio de desenvolvimento das plantas jovens (três meses após enxertia), homogêneas, com caules tenros, e a alta concentração bacteriana inoculada (10^9 e 10^{10} UFC mL⁻¹) pode ter influenciado positivamente na eficiência de inoculação. Além disso, a inoculação efetuada em dois pontos no caule das plantas provavelmente aumentou a eficiência da infecção (Tabela 1). De acordo com Almeida et al. (2001), a observação da rápida colonização de *X. fastidiosa* e expressão dos sintomas de CVC em “seedlings” de laranja doce, inoculadas mecanicamente com alfinete, indicam que essa técnica de inoculação é uma metodologia eficiente em diversos estudos de fisiologia e patogenicidade de plantas.

A porcentagem de plantas com PCR positivo para *X. fastidiosa* nas folhas, aos quatro meses após a inoculação, foi semelhante à porcentagem de isolamento positivo para a maioria das plantas avaliadas, demonstrando eficiência de detecção da bactéria por esses dois métodos. Embora a porcentagem média de detecção por PCR entre as variedades tenha sido alta (66 a 88%), observou-se uma variação de 45 a 100% na porcentagem entre as plantas avaliadas (Tabela 1). Essa diferença na porcentagem de detecção por PCR entre os tratamentos também foi observada por Coletta-Filho et al. (2007), onde, avaliando a resistência a *X. fastidiosa* em 20 híbridos de laranja ‘Pêra’ x tangor Murcott inoculadas mecanicamente com alfinete, encontraram uma porcentagem de detecção entre 40 e 100%, com média de 70%.

O método de isolamento em meio de cultura, além de detectar a presença do patógeno, possibilita a recuperação das células viáveis e a quantificação da população bacteriana através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). As médias populacionais de *X. fastidiosa* recuperadas nos isolamentos aos quatro e oito meses da inoculação variaram de 10^3 a 10^6 UFC g tecido⁻¹ entre as plantas transgênicas e não transgênicas avaliadas (Figuras 8, 9, 10 e 11). Essas médias populacionais foram similares às observadas por Almeida et al. (2001), que inocularam em laranja doce o mesmo isolado de *X. fastidiosa* (CCT6570). Aos quatro meses da inoculação, apenas a planta Vat2 apresentou menor população bacteriana de *X. fastidiosa* em relação ao tratamento testemunha (planta não transgênica de laranja ‘Valência’) (Figura 11).

Figura 8 – População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja 'Hamlin' transformadas com gene *attA*, aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 9 – População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja 'Natal' transformadas com gene *attA*, aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 10 – População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com gene *attA*, aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 11 – População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com gene *attA*, aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

A quantificação bacteriana aos oito meses, determinada pelo isolamento das folhas coletadas a 50 cm do ponto da inoculação, comprovou a ocorrência da movimentação sistêmica da bactéria nas plantas. Foi observada uma redução da população bacteriana para a maioria das

plantas avaliadas, sendo que a redução mais expressiva foi para as plantas Hat8, Nat1, Vat10 e Vat12 (Figuras 8, 10 e 11). Hill e Purcell (1995b) sugerem que para haver uma movimentação sistêmica da *X. fastidiosa* na planta é necessária uma alta concentração bacteriana, entre 10^7 a 10^9 UFC mL⁻¹. Essa redução da população bacteriana aos oito meses da inoculação para a maioria das plantas avaliadas e até mesmo para o tratamento testemunha já era prevista, pois o isolamento aos quatro meses foi realizado com folhas retiradas no ponto da inoculação, local onde teoricamente teria maior colonização bacteriana. No caso do isolamento aos oito meses a 50 cm do ponto de inoculação, foi detectada apenas a população bacteriana que migrou até a proximidade da copa da planta. Além disso, deve-se considerar a influência da distribuição irregular da bactéria nos vasos do xilema (MIZUBUTI; MATSUOKA; PARIZZI, 1994; ALVES, 2003), a flutuação populacional (HOPKINS, 1985), a possibilidade de mortalidade bacteriana em certos hospedeiros (PURCELL; SAUNDERS, 1999) e, para as plantas transgênicas, pode-se considerar também uma possível ação da proteína atacina A no desenvolvimento bacteriano.

Aos oito meses da inoculação, as plantas Pat6 e Pat7 apresentaram menor população bacteriana em relação às plantas não transgênicas (Figura 10). Assim, sugere-se que para essas plantas a presença da proteína atacina A, expressa pelo gene *attA*, pode ter influenciado no desenvolvimento da bactéria.

A ação antibacteriana da proteína atacina A também foi observada em outras bactérias fitopatogênicas. Plantas transgênicas de macieira contendo o gene *atacina A* apresentaram alto nível de resistência a *Erwinia amylovora*, agente causal do “fire blight” (NORELLI; ALDWINCKLE, 1993). Testes “in vitro” com folhas de maracujá amarelo contendo o gene *atacina A* revelaram resistência a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* causadora da bacteriose (MONTEIRO, 2005). Boscariol et al., (2006) avaliando a resistência a *X. axonopodis* pv. *citri* em plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’, revelaram influência da proteína *atacina A* na redução da severidade de cancro cítrico.

Os testes de PCR das colônias crescidas no isolamento aos quatro e oito meses confirmaram que a bactéria era *X. fastidiosa*.

Para os testes de PCR quantitativo foram selecionadas as plantas Hat8, Nat1, Nat2, Pat6, Pat7, Vat2 e Vat12 por apresentarem menores populações bacterianas aos oito meses da inoculação, apesar de apenas as plantas Pat6 e Pat7 terem diferido da testemunha.

O início do aparecimento dos sintomas de CVC foi aos quatro meses nas plantas de laranja ‘Pêra’, aos cinco meses nas plantas de laranja ‘Natal’ e ‘Valência’ e aos oito meses nas plantas de laranja ‘Hamlin’. Os sintomas típicos da doença, lesões cloróticas irregulares, surgiram nas folhas maduras das plantas transgênicas e não transgênicas (testemunha) (Figuras 12 e 13). O aparecimento dos sintomas nos experimentos ocorreu no final da primavera ou durante o verão. Palazzo e Carvalho (1992), avaliando plantas de citros no campo, verificaram aumento da incidência e severidade de sintomas da CVC na época em que ocorre maior desenvolvimento vegetativo, ou seja, na primavera e no verão.

Figura 12 – A) Experimentos com plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com gene *attA*, em casa de vegetação com 9 meses após inoculação com *X. fastidiosa*; B) Sintomas de CVC na face superior das folhas de planta transgênica; C) Sintomas de CVC na face inferior das folhas de planta transgênica

Figura 13 – A) Experimentos com plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com gene *attA*, em casa de vegetação com 13 meses após inoculação com *X. fastidiosa*; B) Sintomas de CVC em folhas de laranja ‘Valência’ transformada

A precocidade no aparecimento dos sintomas nas plantas de laranja ‘Pêra’ em relação as outras variedades de laranjas ‘Hamlin’, ‘Natal’ e ‘Valência’, provavelmente está relacionada a maior suscetibilidade da laranja ‘Pêra’ a expressão dos sintomas de CVC. Esse comportamento da laranja ‘Pêra’ está de acordo com os resultados encontrados por Souza et al. (2006), quando utilizaram a laranja ‘Pêra’ como padrão de suscetibilidade à CVC, no estudo em campo da reação de variedades e clones de laranja a *X. fastidiosa*, a partir da inoculação do patógeno por encostia com mudas infectadas.

O surgimento mais tardio dos sintomas de CVC nas plantas de laranja ‘Hamlin’ indica que, para essa variedade, a bactéria necessita de um maior período de incubação para expressar os sintomas da doença. Machado et al. (1997), estudando variedades de laranjas sobre enxertadas em laranja ‘Pêra’ com sintomas típicos de CVC, observaram que todas as variedades de laranja apresentaram sintomas, porém, houve diferenças na velocidade de expressão. As laranjas ‘Pêra’ e ‘Barão’ mostraram sintomas mais rapidamente, enquanto a laranja ‘Hamlin’, apesar de ser positiva nos testes sorológicos, expressaram sintomas mais tardiamente.

Após 12 meses da inoculação, a porcentagem de plantas com sintomas de CVC variou de 5% a 100% entre os tratamentos de todos os experimentos (Tabela 1). As plantas Hat8, Nat1 e Vat10 apresentaram menores porcentagens de plantas sintomáticas (30%, 35% e 35% respectivamente) em relação à média geral do experimento e crescimento bacteriano moderado em comparação com as outras plantas (Tabela 1; Figuras 8, 9 e 11). No entanto, surpreendentemente, foi observado que as plantas testemunhas (não transformadas) de laranja ‘Hamlin’ ‘Valência’ e ‘Natal’ apresentaram baixas porcentagens de plantas sintomáticas (55%, 30% e 5%, respectivamente), embora tenham apresentado altas porcentagens de infecção (80% , 85% e 88%, respectivamente). Além disso, as médias populacionais dessas plantas (em torno 10^4 UFC g tecido⁻¹) foram semelhantes ou inferiores as plantas transgênicas (Tabela 1; Figuras, 8, 9 e 10). A partir desse resultado, surgiu a hipótese de que o estágio de desenvolvimento das plantas cítricas (maturação de tecidos) pode ter influenciado no desenvolvimento da bactéria e principalmente na expressão dos sintomas de CVC, pois as borbulhas utilizadas na propagação das plantas testemunhas foram oriundas de borbulheiras comerciais, portanto tecido adulto, e as borbulhas das plantas transgênicas foram retiradas de plantas matrizes (com dois ou três anos de idade), originadas de segmentos de epicótilo de plântulas germinadas “in vitro”, consequentemente, tecido juvenil. Sabendo-se que o estágio de desenvolvimento dos citros

influência em muitas técnicas utilizadas em cultura de tecidos, como a dificuldade de regeneração de tecido adulto, por apresentar-se diferenciado, com pouca capacidade morfogênica (CEVERA et al., 1998; ALMEIDA et al., 2003), e que os estágios de desenvolvimento das plantas e de maturação de seus tecidos podem influenciar na resposta à colonização de patógenos e manifestação de sintomas de doenças (ANDRADE; CASELA; ABREU, 2000), sugere-se que as plantas de citros oriundas de tecido adulto (borbulheiras) apresentam menor expressão de sintomas de CVC que as plantas oriundas de tecido juvenil.

Para avaliação dessa hipótese, foi conduzido um experimento adicional com inoculação da bactéria *X. fastidiosa* em plantas de citros não transgênicas, juvenis e adultas. As plantas juvenis foram propagadas com borbulhas retiradas de plantas jovens com 18 meses de idade, obtidas de sementes e as plantas adultas foram propagadas com borbulhas oriundas de borbulheira (tecido adulto) (Itens 3.6 e 4.2.2).

Comparando-se a média geral de plantas com sintomas de CVC de cada experimento (Tabelas 1), observa-se que a variedade Natal apresentou a menor média geral de plantas sintomáticas (48%) e a variedade Pêra a maior média (87%), enquanto que as variedades Hamlin e Valência apresentam médias de plantas sintomáticas semelhantes (64% e 62%). Esses resultados confirmam a maior suscetibilidade da laranja ‘Pêra’ a CVC. Lopes et al. (2005), também obtiveram maior porcentagem de plantas de laranja ‘Pêra’ com sintomas de CVC (93%) em comparação com a laranja ‘Valência’ (83%) e ‘Natal’ (77%), em inoculação de *X. fastidiosa* via injeção no caule de “seedlings”.

Nas plantas testemunha negativas, não transgênicas e inoculadas apenas com tampão PBS, de todos os experimentos não foram detectadas colônias de *X. fastidiosa* nos isolamentos, não houve PCR positivo e nem apareceram sintomas de CVC, comprovando assim, que não houve qualquer disseminação da bactéria dentro da casa de vegetação, nem contaminação durante a realização das análises.

As plantas testemunhas de todos os experimentos, por serem oriundas de borbulheiras (tecido adulto), apresentaram suas características de precocidade como florescimento e frutificação, além da ausência ou redução de espinhos.

4.2.1.1 Quantificação de *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA* por PCR quantitativo (qPCR)

A) Determinação da curva padrão de *X. fastidiosa*

A curva padrão da bactéria *X. fastidiosa* é necessária para estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias nas amostras de DNA de plantas amplificadas por qPCR, sendo determinada a partir dos valores de CT (ciclo onde ocorre o piso de fluorescência – “Threshold” de 0,1) da amplificação de cinco diluições do DNA genômico da bactéria, com concentrações conhecidas. Este DNA foi extraído de 900 μL de suspensão de *X. fastidiosa*. O coeficiente de linearidade (R^2) foi de 0,99598, demonstrando alta precisão e homogeneidade das amostras (Figura 14, 15 e 16).

Figura 14 – Curva padrão de *X. fastidiosa* por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix, a partir de diluição serial do DNA da bactéria (10^{-2} a 10^{-6}). Coeficiente de linearidade $R^2 = 0,99598$. Cada ponto da curva representa uma diluição com a média de três repetições da reação de amplificação. CT – Ciclo “Threshold”

A quantificação das diluições do DNA genômico de *X. fastidiosa* amplificadas no PCR quantitativo em UFC ng DNA⁻¹, foi determinada a partir da comparação de cada produto amplificado com o número de colônias estimado para cada diluição do DNA usado na reação. Essa estimativa foi baseada na contagem de colônias do plaqueamento da diluição serial (10^{-1} - 10^{-9}) da mesma suspensão de bactérias em meio de cultura, que foi de 10^1 a 10^6 UFC mL⁻¹ (Tabela 2).

As curvas de amplificações mostram a emissão de fluorescência de cada diluição de DNA genômico de *X. fastidiosa* (10^{-2} a 10^{-6}) em relação aos ciclos de amplificações. Cada triplicata de curvas representa uma diluição (legenda das cores representada na Tabela 2). O início de

detecção da fluorescência foi entre os ciclos 10 e 15 para a diluição 10^{-2} . A diluição 10^{-1} apresentou uma quantidade de DNA muito alta que interferiu na reação, por isso foi excluída da curva. Os valores de CT variaram de 18,19 a 42,78 em relação à concentração de DNA das diluições (Figura 15; Tabela 2).

Figura 15 – Curvas de amplificação de *X. fastidiosa* por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix, a partir de diluição serial do DNA da bactéria (10^{-2} a 10^{-6} da esquerda para direita). Cada triplicata de curvas representa uma diluição

Figura 16 – Derivada das curvas de amplificação de *X. fastidiosa* por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix, a partir de diluição serial do DNA da bactéria (10^{-2} a 10^{-6} da esquerda para direita). O “Threshold” foi de 0,1. Cada triplicata de curvas representa uma diluição

Tabela 2 - Legendas das amostras de diluição do DNA genômico de *X. fastidiosa*. Ciclo “Threshold” (CT)

No	Colour	Name	Type	CT	Given Conc (ufc/mL)	Calc Conc (ufc/ng DNA)	% Var
1		DNA G Xylella -2	Standard	18.29	2.00E+06	1.54E+06	22.8%
2		DNA G Xylella -2	Standard	18.19	2.00E+06	1.60E+06	19.9%
3		DNA G Xylella -2	Standard	18.38	2.00E+06	1.49E+06	25.5%
4		DNA G Xylella -3	Standard	22.55	2.00E+05	2.95E+05	47.3%
5		DNA G Xylella -3	Standard	22.69	2.00E+05	2.79E+05	39.6%
6		DNA G Xylella -3	Standard	23.02	2.00E+05	2.46E+05	22.8%
7		DNA G Xylella -4	Standard	29.09	2.00E+04	2.33E+04	16.3%
8		DNA G Xylella -4	Standard	29.71	2.00E+04	1.83E+04	8.6%
9		DNA G Xylella -4	Standard	28.76	2.00E+04	2.64E+04	31.9%
10		DNA G Xylella -5	Standard	34.72	2.00E+03	2.60E+03	30.2%
11		DNA G Xylella -5	Standard	35.17	2.00E+03	2.18E+03	9.2%
12		DNA G Xylella -5	Standard	35.19	2.00E+03	2.17E+03	8.4%
13		DNA G Xylella -6	Standard	41.59	2.00E+02	1.81E+02	9.7%
14		DNA G Xylella -6	Standard	42.78	2.00E+02	1.14E+02	43.1%
15		DNA G Xylella -6	Standard	41.99	2.00E+02	1.55E+02	22.7%
16		Água mQ	NTC				
17		Água mQ	NTC				

A curva de “melt” (desnaturação) mostra que não houve formação de dímeros de “primers” e que o fragmento amplificado está específico para o gene de *X. fastidiosa* em que os oligonucleotídeos CVC-1 e 272-2-int amplificam. Não houve formação de outro produto nos controles negativos (água), que continha todos os reagentes menos o DNA genômico da bactéria (Figura 17).

Figura 17 – Curva de “melt” das diluições (10^{-2} a 10^{-6}) do DNA genômico de *X. fastidiosa* por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix

B) PCR quantitativo das plantas de laranja doce transformadas com gene *attA* e inoculadas com *X. fastidiosa*

As análises de qPCR das plantas transgênicas Hat8, Vat2, Vat12, Pat6, Pat7, Nat1 e Nat2 foram realizadas com o objetivo de detectar maiores diferenças na população bacteriana de *X. fastidiosa* em comparação as plantas testemunhas (não transgênicas).

Em todas as amostras de DNA (padronizadas para 100 ng) das plantas de laranja doce transformadas e plantas testemunhas (não transgênicas), inoculadas com *X. fastidiosa*, foram observadas emissões de fluorescência, indicando que houve amplificação específica do fragmento (500 pb) do gene de *X. fastidiosa* flanqueado pelos oligonucleotídeos CVC-1 e 272-2-int. O início de detecção da fluorescência nas amostras foi entre os ciclos 28 e 35 (Figuras 18 e 19 – exemplo das curvas de amplificação das plantas em estudo). O CT (Ciclo “Threshold” – piso de fluorescência) variou de 33,14 (planta Vat18) a 46,19 (planta ‘Natal’ testemunha) entre as amostras de DNA de plantas. A média do CT variou de 34,25 (planta Vat18) a 43,10 (planta ‘Pêra’ testemunha) entre as plantas analisadas. Os menores valores de CT indicam uma maior concentração do template (produto amplificado) e, conseqüentemente, maior população bacteriana de *X. fastidiosa* (Tabela 3).

Figura 18 – Curvas de amplificação de *X. fastidiosa* em algumas amostras de DNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *attA* e inoculadas com *X. fastidiosa*, obtidas por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix. Cada triplicata de curvas representa uma amostra de DNA

Figura 19 – Derivada das curvas de amplificação de *X. fastidiosa* em algumas amostras de DNA das plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *attA* e inoculadas com *X. fastidiosa*, obtidas por PCR quantitativo usando Sybr® Green Super mix. O “Threshold” foi de 0,1. Cada triplicata de curvas representa uma amostra de DNA

Legenda das Figuras (18 e 19)

- Planta H2 (planta transgênica e inoculada com *X. fastidiosa* - controle positivo)
- Planta H2 (planta transgênica e inoculada com *X. fastidiosa* - controle positivo)
- Planta H2 (planta transgênica e inoculada com *X. fastidiosa* - controle positivo)
- Planta H8 (planta transgênica e inoculada com *X. fastidiosa*)
- Testemunha (não transgênica e inoculada com *X. fastidiosa* - controle positivo)
- Testemunha (não transgênica e inoculada com *X. fastidiosa* - controle positivo)
- Controle negativo (planta não transgênica e não inoculada com *X. fastidiosa*)
- Controle negativo (água)

Após a importação da curva padrão de *X. fastidiosa* para comparação e quantificação dos produtos amplificados em cada reação, foi estimada a população bacteriana (UFC ng DNA⁻¹) das amostras de DNA das plantas. A população bacteriana encontrada nas amostras de DNA de plantas variou de $3,2 \times 10^1$ a $4,88 \times 10^3$ UFC ng DNA⁻¹ (ou Log 1,51 a Log 3,69 UFC ng DNA⁻¹), com médias variando de Log 2,03 a Log 3,50 UFC ng DNA⁻¹ (Tabela 3). Esses valores médios de população bacteriana foram semelhantes aos encontrados por Coletta-Filho et al. (2007), em que analisaram a resistência a *X. fastidiosa* em híbridos de laranja ‘Pêra’ x tangor ‘Murcott’, inoculadas mecanicamente com alfinete. O erro padrão encontrado entre as repetições das amostras de DNA variou de 0,01 a 0,08, demonstrando precisão na análise. Não houve amplificação em nenhuma amostra dos controles negativos (planta de laranja doce não transgênica e não inoculada, e água).

Tabela 3 - População bacteriana de *X. fastidiosa* estimada por PCR quantitativo e por isolamento em meio de cultura de plantas de laranja doce ‘Hamlin’ (H), ‘Natal’ (N), ‘Pêra’ (P) e ‘Valência’ (V), transformadas com o gene *attA* e inoculadas com o patógeno. Ciclo “Threshold” – CT (piso de fluorescência)

Plantas	CT ²	Log UFC ng DNA ⁻¹ (qPCR ^{2,3})	Log UFC g tecido ⁻¹ (Isolamento 8 meses ⁴)
Hat8 *	38,64	$2,77 \pm 0,13^5$ b	$2,85 \pm 0,55$ b ⁵
Hat2 **	36,09	$3,20 \pm 0,62$ a	$5,89 \pm 0,48$ a
‘Hamlin’ testemunha ¹	38,33	$2,83 \pm 0,09$ b	$4,28 \pm 0,54$ b
Nat1 *	35,92	$3,23 \pm 0,04$ a	$3,18 \pm 0,43$ a
Nat2 *	35,20	$3,35 \pm 0,08$ a	$4,52 \pm 0,43$ a
‘Natal’ testemunha ¹	40,21	$2,51 \pm 0,43$ b	$4,26 \pm 0,62$ a
Pat6 *	36,54	$3,12 \pm 0,06$ b	$5,16 \pm 0,16$ b
Pat7 *	35,10	$3,49 \pm 0,07$ a	$4,84 \pm 0,17$ b
Pat10 **	37,65	$2,94 \pm 0,12$ b	$5,94 \pm 0,16$ a
‘Pêra’ testemunha ¹	43,10	$2,03 \pm 0,07$ c	$5,82 \pm 0,16$ a
Vat2 *	37,99	$2,88 \pm 0,09$ c	$3,39 \pm 0,45$ b
Vat12 *	37,20	$3,01 \pm 0,04$ c	$2,78 \pm 0,45$ b
Vat18 **	34,25	$3,50 \pm 0,04$ a	$5,83 \pm 0,44$ a
‘Valência’ testemunha ¹	35,77	$3,25 \pm 0,02$ b	$3,22 \pm 0,74$ b

*Planta transgênica com menor população bacteriana determinada pelo isolamento aos 8 meses da inoculação;

**Planta transgênica com alta população bacteriana determinada pelo isolamento aos 8 meses da inoculação, considerada como controle +;

¹ Planta testemunha = planta não transgênica e inoculada com *X. fastidiosa*, também considerada como controle +;

² Médias de três plantas por tratamento e três repetições;

³ As plantas de laranja ‘Hamlin’ foram analisadas aos 20 meses após a inoculação e as plantas de laranja ‘Valência’, ‘Pêra’ e ‘Natal’ foram analisadas com 14 meses após inoculação;

⁴ Médias de dois experimentos, total de 20 plantas por tratamento, após nova análise estatística separadamente das demais plantas do experimento;

⁵ Erro padrão da média;

Médias seguidas de mesma letra em cada variedade não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

A possibilidade da análise de qPCR estimar população bacteriana mínima de 10^1 UFC ng DNA⁻¹ indica maior sensibilidade de quantificação em relação ao isolamento em meio de cultura, que permitiu estimar população mínima de 10^3 UFC g tecido⁻¹. De maneira geral, a análise de qPCR permitiu detectar maiores diferenças nas populações bacterianas entre as plantas estudadas (Tabela 3). Essa sensibilidade da análise de qPCR detectar 10^1 UFC, também foi relatada por Oliveira et al. (2002) quando avaliaram plantas de citros inoculadas com de *X. fastidiosa*.

Nesse trabalho não foi possível fazer uma correlação entre as populações bacterianas estimadas pelo qPCR e pelo isolamento em meio de cultura aos oito meses da inoculação, provavelmente devido a diferenças na sensibilidade de detecção da bactéria entre essas análises ou devido as análises serem realizadas em épocas diferentes, pois as plantas de laranja ‘Hamlin’ foram analisadas por qPCR aos 20 meses após a inoculação e as plantas de laranja ‘Valência’, ‘Pêra’ e ‘Natal’ foram analisadas por qPCR aos 14 meses após inoculação, e no isolamento em meio de cultura todas as plantas foram avaliadas aos oito meses após inoculação. Além da influência da época de coleta na variação da população bacteriana, deve-se considerar a influência da distribuição irregular da bactéria nos vasos do xilema (MIZUBUTI; MATSUOKA; PARIZZI, 1994; ALVES, 2003) e a flutuação populacional da bactéria na planta (HOPKINS, 1985). Embora não tenha sido possível fazer uma correlação entre as populações bacterianas estimadas pelas duas análises, foi observado no resultado de qPCR que as plantas de laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’ apresentaram a mesma tendência descrita no isolamento em meio de cultura, onde as plantas transgênicas selecionadas (Hat8, Vat2 e Vat12) com menores populações bacterianas mantiveram esse resultado.

Na análise de qPCR da planta de laranja ‘Hamlin’ Hat8 comparada com os controles positivos planta de laranja ‘Hamlin’ transgênica Hat2 (planta com alta população bacteriana determinada pelo isolamento) e planta de laranja ‘Hamlin’ testemunha (não transgênica), foi observado que a planta Hat8 apresentou população bacteriana de *X. fastidiosa* semelhante a testemunha e menor que a planta Hat2, confirmando a quantificação bacteriana realizada pelo isolamento em meio de cultura (Tabela 3).

As plantas transgênicas de laranja ‘Natal’ Nat1 e Nat2 apresentaram maiores populações bacterianas de *X. fastidiosa* que a planta testemunha de laranja ‘Natal’, usada como controle positivo (Tabela 3). Esse resultado também foi observado para as plantas transgênicas de laranja ‘Pêra’, Pat6 e Pat7, que apresentaram populações bacterianas de *X. fastidiosa* significativamente

superiores ao controle positivo planta de laranja ‘Pêra’ testemunha (não transgênica). Esses resultados foram diferentes dos observados no isolamento em meio de cultura aos oito meses, onde as plantas Nat1 e Nat2 apresentaram populações bacterianas semelhantes à testemunha e as plantas Pat6 e Pat7 tiveram crescimento bacteriano inferior à testemunha (Tabela 3).

As plantas de laranja ‘Valência’ Vat2 e Vat12 apresentaram menores populações bacterianas que os controles positivos ‘Valência’ testemunha (não transgênica) e Vat18 (planta com alta população bacteriana determinada pelo isolamento). Esses resultados foram similares aos obtidos no isolamento em meio de cultura, no qual as plantas Vat2 e Vat12 apresentaram menor população bacteriana que a planta Vat18, no entanto, foram semelhantes à testemunha (Tabela 3).

A análise de qPCR das plantas transgênicas de laranja demonstrou que as plantas testemunhas (não transgênicas), com exceção da laranja ‘Valência’ testemunha, mantiveram a mesma tendência observada no isolamento, apresentando populações bacterianas similares ou menores que as plantas transgênicas. Baseando-se nos resultados do experimento com avaliação do desenvolvimento de *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce juvenil e adulta (Item 4.2.2), sugere-se que o estágio de desenvolvimento das plantas testemunha (tecido adulto) pode ter influenciado no desenvolvimento da bactéria *X. fastidiosa*, dificultando a comparação da população bacteriana entre as plantas em estudo. Embora as plantas testemunhas (tecido adulto) tenham sido inadequadas, a análise de qPCR permitiu detectar duas plantas (Vat2 e Vat12) com menores populações bacterianas que a testemunha. No entanto, nessa análise não foi possível confirmar o resultado das plantas Pat6 e Pat7 no isolamento aos oito meses após inoculação, onde apresentaram menores populações bacterianas em comparação com a testemunha.

4.2.2 Avaliação do desenvolvimento da *Xylella fastidiosa* em plantas laranja doce não transgênicas juvenis e adultas

Plantas não transgênicas de laranja doce juvenis e adultas, propagadas por enxertia, foram inoculadas com *X. fastidiosa* para avaliação do desenvolvimento da bactéria e expressão dos sintomas de clorose variegada dos citros.

A porcentagem de plantas infectadas com *X. fastidiosa* determinada pelo isolamento em meio de cultura aos quatro meses da inoculação foi de 100% em todos os tratamentos avaliados.

A detecção da bactéria nas folhas por PCR aos quatro meses variou de 54 a 93% (Tabela 4). A alta porcentagem de plantas infectadas confirma a eficiência da inoculação mecânica com alfinete. Resultados similares na porcentagem de plantas infectadas com *X. fastidiosa* foram encontrados por Lopes et al. (2005) em que a inoculação mecânica com alfinete “em seedlings”, resultou em 95% e 96% de plantas infectadas para as laranjas ‘Pêra’ e ‘Valência’, respectivamente.

Tabela 4 – Porcentagem de plantas infectadas determinadas pelo isolamento em meio de cultura e PCR em plantas juvenis e adultas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’, inoculadas com *X. fastidiosa*

Tratamentos	Plantas infectadas (%) ¹	
	Isolamento (4 meses)	PCR + (4 meses)
‘Pêra’ juvenil	100	87
‘Pêra’ adulta	100	87
‘Valência’ juvenil	100	93
‘Valência’ adulta	100	54

¹ Porcentagem de plantas infectadas em relação ao total de 15 plantas avaliadas, determinada pelo isolamento em meio de cultura e PCR aos quatro meses da inoculação.

Em relação à população bacteriana recuperada pelo isolamento em meio de cultura aos quatro e oito meses da inoculação, foi observado que os tratamentos com plantas juvenis de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ apresentaram crescimento bacteriano significativamente superior em comparação às plantas adultas, para as duas variedades comparadas separadamente. Aos oito meses, observou-se uma redução da população bacteriana em todos os tratamentos, com exceção da laranja ‘Valência’ adulta (VA), que teve sua população um pouco elevada. Essa variação na população bacteriana aos oito meses da inoculação também foi encontrada nos experimentos com as plantas transgênicas contendo o gene *attA* (Figura 20).

As plantas juvenis de laranja ‘Pêra’ apresentaram aumento de 5% e 22% na população bacteriana em relação às plantas adultas da mesma variedade, aos quatro e oito meses, respectivamente. E as plantas juvenis de laranja ‘Valência’ apresentaram aumento de 14% e 37% na população bacteriana em comparação às plantas adultas da mesma variedade, aos quatro e oito meses, respectivamente.

Os testes de PCR das colônias crescidas no isolamento aos quatro e oito meses confirmaram que a bactéria era *X. fastidiosa*.

Figura 20 - População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja doce determinadas por isolamento aos 4 e 8 meses após inoculação. Média de 15 plantas. PJ – Pêra juvenil; PA – Pêra adulta; VJ – Valência juvenil e VA – Valência adulta. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As variedades foram comparadas separadamente

O início de aparecimento dos sintomas de CVC foi aos quatro meses após a inoculação em todos os tratamentos, sendo que a maior porcentagem de plantas sintomáticas foi observada no tratamento laranja ‘Pêra’ juvenil (53%). Na avaliação dos sintomas aos oito meses da inoculação, as plantas juvenis de laranja ‘Pêra’ e laranja ‘Valência’ apresentaram o dobro de plantas sintomáticas em relação às plantas adultas. O tratamento laranja ‘Pêra’ juvenil, desde os seis meses apresentou todas as suas plantas com sintomas de CVC. Essa precocidade da laranja ‘Pêra’ confirma sua característica de maior suscetibilidade a CVC (Figura 21A e 22).

Em relação à porcentagem de folhas sintomáticas, os tratamentos com plantas juvenis das duas variedades apresentaram uma porcentagem superior em comparação às plantas adultas. As plantas juvenis de laranja ‘Pêra’ apresentaram uma porcentagem de folhas sintomáticas duas vezes maior que as plantas adultas e as plantas juvenis de laranja ‘Valência’ apresentaram uma porcentagem de folhas sintomáticas três vezes maior que as plantas adultas da mesma variedade (Figura 21B).

Figura 21 – Plantas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ inoculadas com *X. fastidiosa*. PJ – ‘Pêra’ juvenil; PA – ‘Pêra’ adulta; VJ – ‘Valência’ juvenil e VA – ‘Valência’ adulta. A) Porcentagem de plantas com sintomas de CVC aos 4 e 8 meses após inoculação; B) Porcentagem de folhas com sintomas de CVC aos oito meses após inoculação. Média de 15 plantas. Os dados de porcentagem de folhas sintomáticas foram transformados em $\sqrt{X+1}$. Barras de erro representam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras, representam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As variedades foram comparadas separadamente

Figura 22 - A) Plantas juvenis e adultas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ em casa de vegetação com seis meses após inoculação com *X. fastidiosa*; B) Sintomas de CVC em folhas de plantas juvenis de laranja ‘Pêra’

Esses resultados indicam que o estágio juvenil das laranjas ‘Pêra’ e ‘Valência’ influenciou tanto na colonização da bactéria como na expressão dos sintomas de CVC. Assim, sugere-se que nas plantas juvenis de laranja doce a bactéria *X. fastidiosa* está se movimentando e colonizando os vasos do xilema com maior facilidade. De acordo com Fry; Milholland, (1990) e Hopkins (1995), a oclusão dos vasos do xilema pela formação de agregados de células, dificultando a translocação de água e nutrientes, é a hipótese mais aceita para explicar o mecanismo de patogênese da *X. fastidiosa*.

Dessa forma, esse resultados justificam o comportamento das plantas testemunhas de laranja doce (tecido adulto) nos experimentos com as plantas de laranja ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ transformadas com o gene *attA* e inoculadas com *X. fastidiosa*, nos quais as plantas testemunhas apresentaram populações bacterianas semelhantes ou inferiores às plantas transgênicas e menores porcentagens de plantas com sintomas de CVC. Assim, a comparação das plantas transgênicas e a distinção de plantas potencialmente tolerantes ao patógeno foi dificultada nestes experimentos.

A) Análise dos experimentos com as plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ e ‘Pêra’ contendo o gene *attA* ajustando a diferença encontrada no experimento com plantas juvenis e adultas de laranja doce

Na tentativa de estimar o resultado dos experimentos com as plantas transgênicas de laranja doce contendo o gene *attA*, caso tivessem sido analisadas e comparadas com plantas testemunhas juvenis, foi realizado um acréscimo na população bacteriana de *X. fastidiosa* do tratamento testemunha (tecido adulto) e realizada nova análise estatística dos dados. Esse acréscimo refere-se à diferença encontrada na população bacteriana das plantas de laranja doce juvenis e adultas do experimento acima.

No experimento com as plantas transgênicas de laranja ‘Pêra’ foi realizado um acréscimo de 5% e 22% na população bacteriana do tratamento testemunha determinada pelo isolamento aos quatro e oito meses após inoculação, respectivamente. Após nova análise estatística, estimou-se que aos quatro meses após inoculação, as populações bacterianas das plantas transgênicas continuaram semelhantes à testemunha. No entanto, aos oito meses todas as plantas transgênicas

apresentaram menores populações bacterianas em comparação à testemunha (plantas não transgênicas) (Figura 23).

Figura 23 – População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja ‘Pêra’ transformadas com gene *attA*, aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Para o experimento com as plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ foi realizado um acréscimo de 14% e 37% na população bacteriana do tratamento testemunha determinada pelo isolamento em meio de cultura aos quatro e oito meses após inoculação, respectivamente. Após nova análise estatística, estimou-se que aos quatro meses após inoculação, cinco plantas transgênicas (Vat2, Vat11, Vat12, Vat13 e Vat20) apresentaram menores populações bacterianas quando comparadas à testemunha. Entretanto, aos oito meses essas plantas não diferiram da testemunha, pois as plantas testemunhas apresentaram uma expressiva redução na população bacteriana aos oito meses, assim, mesmo com o acréscimo de 37% não foi possível manter a diferença observada aos quatro meses (Figura 24).

Esses resultados confirmam que estágio de desenvolvimento dos tecidos das plantas testemunhas de laranja (tecido adulto) influenciou na distinção de plantas potencialmente resistentes ao patógeno.

Figura 24 – População bacteriana de *X. fastidiosa* (Log UFC g tecido⁻¹) em plantas de laranja ‘Valência’ transformadas com gene *attA*, aos 4 e 8 meses após inoculação. Médias de dois experimentos independentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra em cada época de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Embora a avaliação de resistência a *X. fastidiosa* em plantas transgênicas de laranja doce, contendo o gene *attA*, tenha sido influenciada pelo estágio de maturação dos tecidos das plantas testemunhas, as análises de isolamento em meio de cultura aos oito meses e PCR quantitativo permitiram identificar quatro plantas (Pat6, Pat7, Vat2 e Vat12) com menores populações bacterianas, quando comparadas às plantas testemunhas (não transgênicas) (Figura 10; Tabela 3). Essa redução na população bacteriana, mesmo não considerando a influência do estágio de maturação dos tecidos das plantas testemunhas, foi atribuída a uma provável ação bactericida da proteína atacina A. No entanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar a influência dessa proteína no desenvolvimento da *X. fastidiosa*.

4.2.3 Avaliação da resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) em plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA*

Os primeiros sintomas de cancro cítrico foram observados entre quatro e cinco dias da inoculação com *Xac* nas plantas de laranja ‘Hamlin’ (transgênicas e não transgênicas) e entre sétimo e oitavo dia nas plantas de laranja ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’. Essa diferença no

aparecimento dos sintomas pode está relacionada com as características de suscetibilidade ao patógeno entre as variedades. De acordo com Leite Júnior (1990), as variedades Valência e Pêra são classificadas como moderadamente resistentes à bactéria *Xac*, a variedade Natal como moderadamente suscetível e a variedade Hamlin como suscetível. Os sintomas iniciais da doença em todas as variedades foram pequenas lesões translúcidas distribuídas irregularmente na folha, vistas com maior facilidade na fase inferior do limbo e quando colocadas contra a luz. A partir do décimo dia, as lesões foram aumentando de tamanho e tornando-se amareladas, após 30 dias da inoculação, as lesões ficaram amarronzadas, com formato redondo a irregular, salientes nos dois lados da folha e apresentado halo amarelado (Figura 29). Além dos sintomas nas folhas, foram observadas também lesões no caule e nos espinhos da variedade de laranja ‘Hamlin’. Essa característica confirma a maior suscetibilidade dessa variedade ao patógeno. Segundo Stall e Seymour (1983), lesões em ramos são encontradas, principalmente, em cultivares muito suscetíveis a doença.

Lesões de cancro cítrico foram observadas em todos os tratamentos (plantas transgênicas e testemunhas) de todos os experimentos. A incidência média da doença variou de 73 a 100% entre as plantas de todos os experimentos, sendo que a maioria dos tratamentos apresentou incidência acima 90% e apenas a planta Nat1 apresentou 73% de incidência. A quantificação da severidade da doença foi realizada 30 dias após inoculação em todos os experimentos. Os dados de severidade das plantas transgênicas foram calculados em função da porcentagem de severidade da testemunha.

A quantificação da doença das plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ contendo o gene *attA*, revelou que sete das oito plantas avaliadas apresentaram redução significativa na severidade de cancro cítrico, sendo que as plantas Hat2, Hat8 e Hat12 apresentaram redução na severidade em torno de 60% em comparação com a testemunha (Figura 25). Os resultados desse experimento foram incluídos em trabalho já publicado (BOSCARIOL et al., 2006).

Entre as plantas de laranja ‘Natal’ foi observado que apenas a planta Nat1 apresentou redução significativa na severidade de cancro cítrico (66%), quando comparada à testemunha. (Figuras 26 e 29). Para as plantas de laranja ‘Pêra’ foi observado que nenhuma planta apresentou redução significativa na severidade, quando comparada à testemunha (Figura 27). Entretanto, para as plantas de laranja ‘Valência’, a quantificação da doença mostrou que oito das dez plantas avaliadas apresentaram redução significativa na severidade de cancro cítrico, variando de 51 a

77,8% quando comparadas à testemunha, com destaque para as plantas transgênicas Vat16 e Vat17, que apresentaram reduções na severidade da doença de 73,5% e 77,8%, respectivamente (Figuras 28 e 29).

Figura 25 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *attA*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 26 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja ‘Natal’ transformadas com o gene *attA*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 27 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja 'Pêra' transformadas com o gene *attA*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 28 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja 'Valência' transformadas com o gene *attA*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 29 - Sintomas de cancro cítrico em folhas de laranja transgênica, contendo o gene *attA*, e não transgênica, aos 30 dias após a inoculação com *Xac*

A redução da severidade de cancro cítrico, observada na maioria das plantas dos experimentos com laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’, sugere que o gene *attA* apresenta potencial para o aumento da resistência de plantas de laranja doce a *Xac*. A influência da proteína atacina A no desenvolvimento de resistência a bactérias também foi observado por Norelli; Aldwinckle (1993), quando introduziram o gene *attA* em plantas de macieira e observaram alto nível de resistência a *Erwinia amylovora*, agente causal do “fire blight”. Do mesmo modo, a proteína atacina E aumentou a resistência a *E. amylovora* de macieira (KO et al., 2002) e pereira (REYNORD et al., 1999) transformadas com o gene *atacina E*.

Entre as plantas transgênicas de laranja doce contendo o gene *attA* avaliadas quanto a resistência as bactérias *X. fastidiosa* e *Xac*, as plantas Vat2 e Vat12 apresentaram redução no crescimento de *X. fastidiosa*, determinada pelo qPCR aos 14 meses após inoculação (Tabela 3), e redução na severidade de cancro cítrico determinada 30 dias após a inoculação com *Xac* (Figura 28). Embora tenha sido relatado por Reynord et al. (1999) e Boscariol et al.(2006) que nem sempre os níveis de transcrição dos transgenes correspondem a expressão da resistência a patógenos, para essas duas plantas observou-se altos níveis de expressão do gene *attA* (Figura 6D). Dessa forma, sugere-se que a proteína atacina A influenciou nos níveis de resistência a esses patógenos.

4.3 Avaliação da resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) em plantas de laranja doce transformadas com o gene *Xa21*

Os sintomas de cancro cítrico foram os mesmos observados nas plantas de laranja doce transformadas com o gene *attA* (Item 4.2.3) (Figura 34). O início de aparecimento dos sintomas da doença também foi mais precoce nas plantas (transgênicas e não transgênicas) de laranja ‘Hamlin’, entre quatro e cinco dias da inoculação com *Xac*, enquanto que nas outras variedades (‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’), foi entre o sétimo e oitavo dia da inoculação. Todos os tratamentos (plantas transgênicas e testemunhas) de todas as variedades apresentaram lesões de cancro cítrico. As plantas de laranja ‘Hamlin’ também apresentaram lesões no caule e nos espinhos confirmando a suscetibilidade dessa variedade ao patógeno.

A incidência média da doença variou de 70 a 100% entre as plantas, sendo que a maioria das plantas dos experimentos com as laranjas ‘Hamlin’, ‘Pêra’ e ‘Valência’ apresentou incidência acima 90%. As plantas de laranja ‘Natal’, Nxa16, Nxa9, Nxa10 e Nxa11, apresentaram 70% de incidência. A quantificação da severidade da doença foi realizada 30 dias após inoculação em todos os experimentos. Os dados de severidade das plantas transgênicas foram calculados em função da porcentagem de severidade da testemunha.

Todas as plantas transgênicas de laranja ‘Hamlin’ apresentaram reduções significativas na severidade de cancro cítrico variando de 35 a 58% em relação à testemunha, com destaque para as plantas Hxa4 e Hxa11, que apresentaram reduções na severidade de 54% e 58%, respectivamente (Figuras 30 e 34).

Figura 30 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja ‘Hamlin’ transformadas com o gene *Xa21*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Nos experimentos com as plantas transgênicas de laranja ‘Natal’ e ‘Pêra’, as plantas Nxa11 e Pxa9 apresentaram reduções significativas na severidade da doença de 60% e 68% respectivamente, em comparação as testemunhas. No experimento com a laranja ‘Valência’, nenhuma planta transgênica diferiu da testemunha em relação à severidade de cancro cítrico (Figuras 31, 32, 33 e 34).

Figura 31 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja 'Natal' transformadas com o gene *Xa21*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 32 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja 'Pêra' transformadas com o gene *Xa21*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 33 - Severidade de cancro cítrico, 30 dias após inoculação com *Xac*, em plantas de laranja 'Valência' transformadas com o gene *Xa21*, comparadas com testemunha (planta não transgênica). Cada barra representa a média de no mínimo 14 folhas de três experimentos independentes. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das barras representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Com base nesses resultados de redução de severidade do cancro cítrico em todas as plantas de laranja 'Hamlin' e nas plantas Nxa11 e Pxa9 de laranja de 'Natal' e 'Pêra', respectivamente, sugere-se que o gene *Xa21* apresenta potencial para conferir resistência à bactéria *Xac* em plantas de laranja doce. Esse resultado está de acordo à hipótese levantada por alguns autores (DENG; GMITTER, 2003; BOSCARIOL, 2004; OMAR; SONG; GROSSER, 2007) de que o gene *Xa21*, por apresentar ação contra bactérias do gênero *Xanthomonas* (WANGA et al., 1996; TU et al., 1998), pode auxiliar na obtenção plantas de citros com resistência a bactéria *X. axonopodis* pv *citri*.

Analisando-se os resultados das plantas transgênicas de laranja contendo o gene *attA* e das plantas contendo o gene *Xa21* com relação a avaliação de resistência à bactéria *Xac*, observa-se que nos experimentos com a variedade Hamlin foi possível detectar maior número de plantas transgênicas com menor severidade de cancro cítrico em comparação a testemunha. Considerando-se que os experimento foram conduzidos nas mesmas condições, com igual concentração do isolado de *Xac* e que a variedade 'Hamlin' é mais suscetível ao patógeno em estudo, sugere-se que os diferentes graus de suscetibilidade das variedades de laranja podem influenciar na resposta dos transgenes.

Figura 34 - Sintomas de cancro cítrico em folhas de laranja transgênica, contendo o gene *Xa21*, e não transgênica, aos 30 dias após a inoculação com *Xac*

5 CONCLUSÕES

O nível de resistência de plantas de laranja doce a *X. fastidiosa* pode ser influenciado pela presença da proteína atacina A, produzida pelo transgene *attA*;

A suscetibilidade de plantas de laranja doce a *X. axonopodis* pv. *citri* é reduzida pela presença da proteína atacina A;

A introdução do gene *Xa21* de arroz no genoma de *Citrus sinensis* influencia o nível de resistência a *X. axonopodis* pv. *citri*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; 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, p. 382-386, 2001.

ALMEIDA, W.A.B.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PAVAN, A.; RODRIGUEZ, A.P.M. Agrobacterium-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 23-29, jan./mar. 2003.

ALVES, E. *Xylella fastidiosa*: adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

AMARAL, A.M. **Cancro cítrico**: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília: Embrapa 2003. 31 p. (Comunicado Técnico, 86).

AMARAL, S.F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 112-123, 1957.

ANDRADE, G.A.F.; CASELA, C.R.; ABREU, M.S. Influência da idade das folhas de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.) na duração do período latente de *Puccinia polysora*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 367-372, 2000.

ARCE, P.; MORENO, M.; GUTIERREZ, M.; GEBAUER, M.; DELL’ORTO, P.; TORRES, H.; ACUÑA, I.; OLIGER, P.; VENEGAS, A.; JORDANA, X.; KALAZICH, J.; HOLUIGUE, L. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 76, p. 169-177, 1999.

ASLING, B.; DUSHAY, M.S.; HULTMARK, D. Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the attacin A gene and the evolution of attacin-like protein. **Insect Biochemical Molecular Biology**, Riverside, v. 35, p. 511-518, 1995.

ASTUA-MONGE G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p. 48-53, 2004.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGTON, R.E.; MOORE, D.D.; SELDEMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Wiley-Interscience, 1987. 400p.

AYRES, A.J. **Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares de laranja do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro**. 2000. 59 p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

AZEVEDO, F.A. **Transformação genética de citros com os genes bacteriopsina (bO), cecropina e gus**. 2005. 76 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA, J.M.; GONZALEZ, S.G.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with bO (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, Amsterdam, v. 24, p.185-196, 2006.

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

BARBOSA-MENDES, J.M. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene hrpN (Harpina) e avaliação da resistência ao cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2007. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

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.

BESPALHOK FILHO, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Laranja transgênica: transformação de laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 28, p. 229-234, 2001.

BOMAN, H.G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 103-126, 1987.

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

BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M. TAKAHASHI, E.K. CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C. VIEIRA L.G.E.; PEREIRA L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN A.F.; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin A* gene from *Tricloplucia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* ‘Hamlin’. **Journal of the American Society for 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; Fundag, 2005. cap. 2, p. 19-36.

- CARLSSON, A.; ENGSTROM, P.; PALVA, E.T.; BENNICH, H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, p. 3040-3045, 1991.
- CARLSSON, A.; NYSTROM, T.; DE COCK, H.; BENNICH, H. Attacin-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.
- CENTURY, K.S.; LAGMAN, R.A.; ADKISSON, M.; MORLAN, J.; TOBIAS, R.; SCHWARTZ, K.; SMITH, A.; LOVE, J.; RONALD, P.C.; WHALEN, M.C. Developmental control of Xa21-mediated disease resistance in rice. **The Plant Journal**, New York, v. 20, n. 2, p. 231-236, 1999.
- 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.
- CEVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J.A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, London, v. 7, p. 51-59, 1998.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132, 2001.
- _____. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.
- COLETTA FILHO, H.D.; PEREIRA, E. O.; SOUZA, A. A.; TAKITA M. A.; CRISTOFANI-YALE M.; MACHADO, M.A. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange Murcott tangor **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 4, p.661-668, 2007.
- DENG, Z.; GMITTER JUNIOR, F.G. Cloning and characterization of receptor kinase class disease resistance gene candidates in Citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 53-61, 2003.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 427-433, 2000.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

ENGSTROM, P.; CARLSSON, A.; ENGSTROM, A.; TAO, Z.J.; BENNICH, H. The antibacterial effect of attacin from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 3, p. 3347-3351, 1984.

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU, J. PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Increased tolerance to *Phytophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 175-185, 2001.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

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.; MÜLLER, G.L.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* sp.) In: KIMATI, H.; AMORIM L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, L.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. p. 261-296, 1997.

FERREIRA, L.P.; SALGADO, C.L. Bactérias. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 95-131.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2007**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. 504 p.

FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A.; BASTIANEL, M.; LOCALI, E.C.; NOVELI, V.M. Leprose dos citros: desafios e avanços para um problema crescente. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, n. 46, p. 18-19, 2005.

FRY, S.M, MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 61-65, 1990.

FUNDECITRUS. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em: 20 jan. 2008.

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

GOTO, M.; HYODO, H. Role of extracellular polyssacharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. **Annual Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 51, p. 22-31, 1985.

GOTTWALD, T.R; GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 9, p. 930-935, 1992.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAM, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease process of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

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.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

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 insusceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 1992.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; CUBERO, J.; DROUILLARD, D.L. survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on various surfaces and chemical control of asiatic citrus canker (ACC). In: INTERNATIONAL CITRUS CANKER RESEARCH WORKSHOP, 2000, Fort Pierce. **Proceedings ...** Fort Pierce: Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 2000. Disponível em: <<http://doacs.state.fl.us/canker>>. Acesso em: 20 dez. 2007.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: EECB; Fundecitrus, 1997. p. 37-53.

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

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.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Berkeley, v. 48, p. 575-607, 1997.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 202-212, 1995a.

_____. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* withing grape and four other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 11, p. 1368-1372, 1995b.

HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 713-717, 1985.

_____. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S.; SINGH, R.P.; KOHMOTO, K. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant disease**: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. London: Elsevier Science, 1995. v. 1: Prokaryotes, p. 185-197.

HUANG, G.F.; CHIARADIA, L.A. Clorose variegada dos citros: caracterização e alternativas no manejo da doença. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 11, n. 4, p. 52-55, 1998.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2007.

JONES, D.A.; THOMAS, C.M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; BALINT-KURTI, P.J.; JONES, J.D.G. Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, Washington, v. 266, p. 789-793, 1994.

KANG, D.; LUNDSTROM, A.; STEINER, H. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. **Gene**, Napoli, 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.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In.: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. cap. 34, v. 1, p. 692-709.

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.

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**. 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

LARANJEIRA, F.F.; PALAZZO, D. Danos qualitativos à produção de laranja ‘Natal’ causada pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 1, p. 77-91, 1999.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 401-411, 2002.

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.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J.O.; CARVALHO, S.A.; COLETTA FILHO, H.D. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 147-154, jun. 1998.

LAZZARO, B.P.; CLARCK, A.G. Evidence for recurrent paralogous gene conversion and exceptional allelic divergence in the attacin genes of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, Pittsburgh, v. 159, p. 659-671, 2001.

LEITE JUNIOR, R.P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. **Circular IAPAR**, Paraná, v. 61, p. 51, 1990.

LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 329-344, 1999.

LOPES, S.A.; LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Clorose variegada: perdas anuais de US\$ 100 milhões. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 20,23, 2004.

LOPES S.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; AYRES, A.J.; TORRES, S.C.Z.; BARBOSA, J.C.; LI, W.B. An experimental inoculation system to study citrus - *Xylella fastidiosa* interactions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 250-254, 2005.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 9, p. 223-277.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; BERETTA, M.J.G.; LARANJEIRA, F.F.; CARVALHO, S.A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre enxertadas em laranja Pêra com Clorose Variegada dos Citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 30-33, 1997.

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.

MARTIN, 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.

MASSARI, C.A.; BELASQUE JÚNIOR, J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo - situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, p. 41-55, 2006.

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, n. 7, p. 955-961, 2002.

MEYERS, B.C.; SHEN, K.A.; ROHANI, P.; GAUT, B.S.; MICHELMORE, R.W. Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1833-1846, 1998.

MINSAVAGE, G.V.; DAHLBECK, D.; WHALEN, M.C.; KEARNEY, B.; BONAS, U.; STASKAWICZ, J.B.; STALL, R.E. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 3, p. 41-47, 1990.

MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K. PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 241-244, 1994.

MOLLENHAUER, H.H.; HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiological Plant Pathology**, Michigan, v. 9, p. 95-100, 1976.

MONTEIRO, M. **Transformação genética de maracujá amarelo visando resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2005. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

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.

MULLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.S.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, P (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. p. 569-596.

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

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.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; AMARO, A.A., NEVES, E.M.; JANK, M.S. **Caminhos para a citricultura: uma agenda para manter a liderança mundial**. São Paulo: Atlas, 2007. 110 p.

NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H. Increasing the fire blight resistance of apple by transformation with genes encoding antibacterial proteins. **Acta Horticulturae**, Belgium, n. 338, p. 385-386, 1993.

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.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A. SEMIGHINI, C.P.; ARAÚJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 10, p. 1048-1054, 2002.

OMAR, A.A.; SONG, W.J.; GROSSER, J.W. Introduction of *Xa21*, a *Xanthomonas*-resistance gene from rice, into 'Hamlin' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 82, n. 6, p.914-923, 2007.

PALAZZO, D. A.; CARVALHO, M.L.V. Desenvolvimento e progresso da Clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina-SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.489-502, 1992.

PAOLI, L.G. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *cecropin* MB39 e avaliação de plantas transgênicas inoculadas com *Xylella fastidiosa* Wells et al.** 2007. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

PAOLI, L.G.; BOSCARIOL CAMARGO, R.L.; HARAKAVA, R.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene *cecropin* MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1663-1666, 2007.

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.; 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-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v. 104, p. 183-191, 1995b.

PERIANI, L.; RADKE, S.; WILKE-DOUGLAS, M.; BOSSERT, M. Gene transfer methods for crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 68, p. 566-570, 1986.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copa. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.) **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. p.37-66p.

- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chorois. **Current Microbiology**, New York, v. 31, p. 377-381, 1995.
- PURCELL, A.H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: DONADIO, L.C.; GRAVENA, S. **Manejo integrado de pragas dos citros**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p. 195-209.
- PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strain of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 825-830, 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.
- ROBERTO, S.R.; YAMAMOTO, P.T. Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, p. 269-284, 1995.
- RODRIGUES NETO, J.; BELASQUE JUNIOR, J.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A. Larva-minadora aumenta a incidência do cancro cítrico. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 14-19, 2004.
- RONALD, P.C. Making rice disease-resistant. **Scientific American**, New York, v. 277, p. 68-73, 1997.
- 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 of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 1604-1611, 1992.
- ROSSETTI, V. Citrus canker in Latin America: a review. INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 2, Orlando, 1977. **Proceedings ...**Riverside: International Society of Citriculture, 1977, v. 3, p. 918-924.
- _____. Clorose variegada dos citros (CVC). In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, E. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargil, 1991. v. 2, p. 714-721.
- _____. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: FEALQ; Fundecitrus, 2001. 207p.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, D. Clorose variegada dos citros (CVC). **Laranja**, Cordeirópolis, v. 1, n. 1, p. 1-14, 1990.
- ROSSETTI, V.; FEICHTENBERGER, E.; SILVEIRA, M.L. **Cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*)**: bibliografia analítica. São Paulo: Instituto Biológico, 1981. 203 p.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus Academie des Sciences de Paris**, Paris, Series 3. Sciences de la Vie, v. 310, p. 345-349, 1990.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa protéica e uma seqüência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. 2006. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

SONG, J.; BRADEEN, J.M.; NAEISS, 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.

SONG, W-Y.; WANG, G-H.; CHEN, L-L.; KIM, H-S.; PI, L-Y.; HOLSTEN, T.; GARDNER, J.; WANG, B.; ZHAI, W-X.; ZHU, L-H.; FAUQUET, C.; RONALD, P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **Science**, Washington, v. 270, n. 5243, p. 1804-1806, 1995.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SOUZA, P.S.; GOES, A.; STUCHI, E.S.; GONZÁLEZ, J.; WICKERT; SILVA, S.R.; DONADIO, L.C. Reação de variedades e clones de laranjas a *Xylella fastidiosa*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 144-147, 2006.

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.

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

STALL, R.E.; MARCO, G.M.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B.I. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to cancris of citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 8, p. 1097-1100, 1982.

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

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 of the USA**, Washington, v. 96, p. 14153-14158, 1996.

TU, J.; DATTA, K.; KRUSH, G.S.; ZHANG, Q.; DATTA, S.K. Field performance of *Xa21* transgenic indica rice (*Oryza sativa* L.), IR72. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p.15-20, Nov. 2000.

TU, J.; ONA, I.; ZHANG, Q.; MEW, T.W.; KRUSH, G.S.; DATTA, S.K. Transgenic rice variety 'IR72' with *Xa21* is resistance to bacterial blight. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 31-36, 1998.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R.; ZAMBOLIM, L. Quant-A software to quantify plant disease severity. In: INTERNACIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 8., 2001, Ouro Preto. **Proceedings ...** Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, 2001. p.105.

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.

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H-Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 37, n. 2, p. 136-143, 1987.

WONG, W.S.; LI, G.G.; NING, W.; XU, Z.F.; HSIAO, W.L.W.; ZHANG, L.Y.; LI, N. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. **Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 969-977, 2001

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.

YOSHIMURA, S.; YAMANOUCHI, U.; KATAYOSE, Y.; TOKI, S.; WANG, Z.X.; KONO, I.; KURATA, N.; YANO, M.; IWATA, N.; SASAKI, T. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 95, p. 1663-1668, 1998.

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

ANEXO

Meio de cultura sólido para *Xylella fastidiosa* – “Periwinkle wilt gelrite” (PWG)

Água destilada	900 mL.L ⁻¹
Phytone Peptone	4,0 g.L ⁻¹
Tryptcase Peptone	1,0 g. L ⁻¹
MgSO ₄ • 7H ₂ O (Sulfato de Magnésio)	0,4 g. L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O (Fosfato de Potássio Dibásico)	1,2 g. L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Monobásico)	1,0 g. L ⁻¹
Phenol Red (solução estoque 0,2%)	10 g. L ⁻¹
Hemin Chloride (solução estoque)	10 g. L ⁻¹
Gelrite Gellan Gum	8,0 g. L ⁻¹
L-glutamina	4,0 g. L ⁻¹ / 50 mL.L ⁻¹
BSA (Albumina de soro bovino)	3,0 g / 100 mL.L ⁻¹
Autoclavar por 20 minutos, a uma pressão de 15 psi 15 psi	

Meio de cultura sólido para *Xantomonas axonopodis* pv *citri* – Ágar nutrientes (NA)

Extrato de carne	3,0 g. L ⁻¹
Peptona	5,0 g. L ⁻¹
Ágar	20 g. L ⁻¹
Água destilada	1000 mL ⁻¹
pH	7.2
Autoclavar por 20 minutos, a uma pressão de 15 psi	