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

**Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas de
citros às bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., causadoras do
*Huanglongbing***

Luciane Fender Coerini

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Luciane Fender Coerini
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

**Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas de
citros às bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., causadoras do
*Huanglongbing***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa Dra. **JULIANA DE FREITAS-ASTÚA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Coerini, Luciane Fender

Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas de citros às bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., causadoras do *Huanglongbing* / Luciane Fender Coerini.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

100 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Citrus* sp. 2. *Poncirus* sp. 3. Expressão diferencial de genes 4. Transcriptoma 5. HLB 6. Resposta a patógenos 7. Interação planta-patógeno I. Título

CDD 634.3
C672e

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

Este trabalho foi desenvolvido em sua totalidade no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, unidade de pesquisa pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas. Os auxílios financeiros foram provenientes da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genômica para o Melhoramento de Citros (INCT-Citros) e convênio Embrapa-Monsanto.

*Aos meus pais, Roucheli e Cláudio,
meus filhos, Júlio César e Marcos Vinícius e
ao meu esposo, Julio Cesar,
que compreenderam as minhas ausências e angústias e que
sempre me incentivaram a jamais desistir, na certeza de que este
é o início de uma longa caminhada*

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, que sem Ele nada teria sido possível!

À Dra. Juliana de Freitas-Astúa pela orientação, paciência, pelos ensinamentos, carinho e apoio em todos os momentos.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pela disponibilização da infraestrutura necessária e apoio cedidos durante ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente da ESALQ pelo conhecimento adquirido.

À Dra. Michèle Claire Breton pelos ensinamentos e por auxiliar-me nas correções, discussão e avaliação dos resultados.

À Dra. Valdenice M. Novelli, pela oportunidade de trabalho e pelo incentivo ao ingresso no mestrado.

Ao Ms. Tiago S. Oliveira, por todo auxílio e que mesmo longe sempre se preocupou em me ajudar.

Aos queridos companheiros de sala: Inaiara Souza, Laura Melissa, Laís Granato, Cíntia Sagawa, Diogo, Eduardo e Emilyn pelos bons momentos e dificuldades compartilhados.

Às funcionárias do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Rose e Anita, pelo auxílio e pelos momentos de descontração.

Em especial agradeço às minhas grandes amigas Dra. Maria Andréia Nunes, Silvia Dorta, Gabriella Arena, Bruna Cunha e Marcela Bergamini (“minha comparsa”), por sempre me ouvirem nos momentos de dificuldade, pelo incentivo, apoio, carinho e pelos bons momentos que passamos durante esta caminhada.

E a todos os meus colegas dos laboratórios de biotecnologia e acarologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pela relação de carinho e respeito, assim como ensinamentos, auxílios e sugestões; e a todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Um breve histórico da Citricultura Brasileira.....	27
3.2 <i>Huanglongbing</i>	29
3.2.1 Agente etiológico	30
3.2.2 Formas de transmissão	31
3.2.3 Sintomas característicos e detecção	32
3.2.4 Suscetibilidade	33
3.2.5 Manejo da doença.....	33
3.3. Defesa vegetal	33
3.4 Hormônios vegetais.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Condições experimentais	43
4.2. Isolamento de ácido ribonucleico (RNA)	45
4.3 Síntese de cDNA.....	45
4.4 Projeção e validação de <i>primers</i>	46
4.5 Genes <i>housekeeping</i>	48
4.6 PCR convencional para validação de <i>primers</i>	48
4.7 Sequenciamento para confirmação de <i>primers</i>	49
4.8 Análise da expressão gênica através de RT-qPCR	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Observações das plantas inoculadas com bactérias CaLas e CaLam.....	51
5.2 Análises moleculares e do perfil transcricional.....	52
5.3 Jasmonato.....	53
5.3.1 Genes envolvidos em biossíntese e metabolismo de jasmonato	53

5.3.2 Percepção e sinalização da via de jasmonato	58
5.4 Etileno.....	60
5.4.1 Biossíntese de etileno.....	60
5.4.2 Percepção e sinalização da via de etileno	61
5.5 Reguladores da transcrição sinalizada por jasmonato e etileno	67
5.5.1 Fatores de transcrição da família ERF.....	67
5.5.2 Proteínas kinases ativadas por mitógenos - MAPkinases	70
5.6 Proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR).....	71
5.7 <i>Crosstalk</i> entre as vias hormonais.....	73
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	97

RESUMO

Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas de citros às bactérias *Candidatus Liberibacter* spp., causadoras do Huanglongbing

A citricultura destaca-se dentro do agronegócio brasileiro gerando dividendos diretos com exportações e empregos, e indiretos com arrecadação de impostos. No entanto, ainda padece com problemas fitossanitários, com destaque para o HLB (*Huanglongbing*, HLB, ex-greening), que nos últimos dez anos tem dizimado pomares e provocado o abandono da cultura por muitos produtores. Causada no Brasil pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus*, é uma doença sistêmica, restrita aos vasos do floema, e induz ao aparecimento de sintomas semelhantes àqueles causados por deficiência de nutrientes em folhas e ramos, frutos com tamanhos reduzidos e assimétricos e coloração amarelada das plantas, tornando-as economicamente inviáveis. A transmissão da doença acontece naturalmente pelo inseto *Diaphorina citri*, e artificialmente por meio de borbulhas contaminadas. Todas as variedades de citros e rutáceas próximas são comprovadamente suscetíveis ao HLB; entretanto, há diferenças marcantes entre níveis de suscetibilidade entre os genótipos, como *Poncirus trifoliata*, que apresenta certa resistência ou tolerância à doença. Os mecanismos de patogenicidade de *Ca. Liberibacter* spp. e a resposta molecular da planta à infecção ainda não estão bem definidos e o estudo da ativação dos mecanismos de defesa da planta induzidos por hormônios vegetais é um importante foco na elucidação deste complexo patossistema. Diante deste panorama, este estudo propôs avaliar o perfil de expressão de genes associados às vias do jasmonato e do etileno em plantas de *Citrus sinensis* L. Osb. (susceptível) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (resistente ou tolerante) em resposta à infecção pelas duas espécies de bactérias causadoras do HLB no Brasil, separadamente. Os perfis transcricionais dos genes avaliados não foram estatisticamente distintos, mas mereceram destaque os genes de biossíntese e metabolismo de jasmonato *LOX2*, *AOC3* e *JMT*, os genes sinalizadores da via de jasmonato *JAZ2* e *MYC2*, o gene de biossíntese de etileno *SAM1*, os receptores de etileno *ETR1*, *ERS1* e *EIN4*, o regulador negativo de etileno *CTR1*, o regulador positivo da sinalização de etileno *EIN2*, os fatores de transcrição *EIN3*, *EIL1*, *ERF1*, *ERF2*, *ERF/AP2*, uma MAPkinase *MAPK6* e uma proteína PR *PR-4*. Estes resultados mostram que as vias sinalizadas por jasmonato e etileno são modificadas pelas bactérias *Ca. Liberibacter* spp. No entanto, não foi possível comprovar a importância destas vias na resposta diferencial de genótipos suscetível e resistente/ tolerante de citros ao HLB.

Palavras-chave: *Citrus* sp.; *Poncirus* sp.; Expressão diferencial de genes; Transcriptoma; HLB; Resposta a patógenos; Interação planta-patógeno

ABSTRACT

Expression of genes of the jasmonate and ethylene pathways in the response of citrus plants to *Candidatus Liberibacter* spp., the causal agents of Huanglongbing

The citrus industry stands out in the Brazilian agribusiness generating direct and indirect jobs and significant revenues. However, the citrus crop faces several diseases, especially the HLB (*Huanglongbing*, ex-greening), which, in the last ten years, have caused severe losses to growers. In Brazil, HLB is caused by the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Ca. Liberibacter americanus*, which are restricted to the phloem and induce symptoms similar to those caused by nutrient deficiency in citrus leaves and branches. Fruits are of reduced size and asymmetrical, and the plants tend to show overall yellowing. These symptoms altogether lead to the economical death of the plant. Transmission of the pathogens occurs naturally by the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, or by contaminated buds. All citrus varieties and relatives are considered susceptible to HLB; however, there are clear differences in levels of susceptibility among genotypes. *Poncirus trifoliata*, for instance, exhibits some resistance or tolerance to the disease. The mechanisms involved in the pathogenesis of *Ca. Liberibacter* spp. and the molecular responses of the hosts to the infection are still unknown, but emphasis has been given to the defense mechanisms induced by plant hormones in order to try to elucidate the interactions of such complex pathosystem. Based on this scenario, this study aimed to evaluate the expression profile of *Citrus sinensis* (L.) Osb. (susceptible) and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (resistant or tolerant) genes associated with the jasmonate and ethylene pathways in response to infection by both species of *Ca. Liberibacter* spp. causing HLB in Brazil, separately. The transcriptional profiles did not differ statistically, for the evaluated genes, including those in the jasmonate biosynthesis and metabolism (*LOX2*, *AOC3* and *JMT*), signaling pathway (*JAZ2* and *MYC2*), biosynthesis of ethylene (*SAM1*), ethylene receptors (*ETR1*, *ERS1* and *EIN4*), negative regulator of ethylene (*CTR1*), positive regulator of ethylene signaling (*EIN2*), transcription factors (*EIN3*, *EIL1*, *ERF1*, *ERF2*, *ERF/AP2*), a MAPkinase (*MAPK6*) and a PR protein (*PR-4*). These results suggest that the jasmonate and ethylene pathways exhibit some modulation caused by the bacteria *Ca. Liberibacter* spp. However, it does not seem that these pathways are relevant for the differential response of susceptibility or resistance/ tolerance of the citrus genotypes to HLB.

Keywords: *Citrus* sp.; *Poncirus* sp.; Differential gene expression; Transcriptome; HLB; Response to pathogens; Plant-pathogen interaction

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da via de biossíntese de jasmonato: Ácido Linolênico, LOX - Lipoxigenase, AOS - Aleno Oxido Sintase, AOC – Aleno Oxido Ciclastase, OPDA 12-Oxophytodienoic Acid, OPR3 - Opda Reductase 3, JA - Jasmonato, JMT - Jasmonic Acid Carboxyl Methyl Transferase, MeJA – Methyl Jasmonate, JAR1 - Jasmonate-Amido Synthetase e JA-Ile - Jasmonyl-Isoleucine Conjugate (adaptado de LU et al., 2013) 37
- Figura 2 - Representação esquemática da via de biossíntese de etileno (adaptado de CHEN et al., 2005) 38
- Figura 3 - Representação esquemática da via comum de sinalização de Jasmonato (A), SCF^{COI} (*Coronatine Insensitive 1*), JAZ (*Ethylene Response Factor 1*), MYC2 (*Jasmonate Associated MYC2 Like 2*) e Etileno (B), ETR1 (*Ethylene Response 1*), ERS1 (*Ethylene Insensitive 1*), ETR2 (*Ethylene Response 2*), ERS2 (*Ethylene Response Sensor 2*), EIN4 (*Ethylene Insensitive 4*), CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*), EIN2 (*Ethylene Insensitive 2*), SCF^{EBF1/2} (*EIN3-Binding F Box Protein 1/ EIN3-Binding F BOX Protein 2*), EIN3 (*Ethylene-Insensitive3*), EIL1 (*Ethylene-Insensitive3-Like 1*), ERF1 (*Ethylene Response Factor 1*) (adaptado de MUR et al., 2013) 40
- Figura 4 - Obtenção de plantas inoculadas com *Candidatus Liberibacter americanus* (CaLam) ou *Ca. Liberibacter asiaticus* (CaLas) 43
- Figura 5 - Delineamento experimental de plantas inoculadas com CaLam ou CaLas em experimentos independentes 44
- Figura 6 - Plantas de *Citrus sinensis* (A-B) e *Poncirus trifoliata* (C, D e E) infectadas com *Ca. Liberibacter* spp. em estágio de sintoma. A. Ramos com sintomas semelhantes à deficiência nutricional. B. Folhas com sintomas típicos de mosqueado e espessamento de nervuras e setores cloróticos. C, D e E. Ramos sem manifestação de sintomas. 52
- Figura 7 - Padrão eletroforético de RNA total em gel desnaturante de agarose 1,2%, plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata*; ps - planta sadia, pi - planta infectada; os números representam as réplicas biológicas 53
- Figura 8 - Padrão eletroforético dos amplicons visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. L (marcador molecular de 1Kb, d (DNA), c (cDNA), h (H₂O), A – E (primers validados – amplificação única) 53
- Figura 9 - Perfil transcricional dos genes *LOX2* (A) e *AOC3* (B) em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente. 55
- Figura 10 - Perfil transcricional do gene *JMT* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente. 57

- Figura 11 - Perfil transcricional dos genes *JAZ2* (A) e *MYC2* (B) em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente..... 59
- Figura 12 - Perfil transcricional do gene *SAM1* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente.61
- Figura 13 - Perfil transcricional dos genes *ETR1* (A), *ERS1* (B) e *EIN4* (C) em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente 64
- Figura 14 - Perfil transcricional do gene *CTR1* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente.65
- Figura 15 - Perfil transcricional dos genes *EIN2* (A), *EIN3* (B) e *EIL1* (C) em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente..... 67
- Figura 16 - Perfil transcricional dos genes *ERF1* (A), *ERF2* (B) e *ERF-AP2* (C) em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente 69
- Figura 17 - Perfil transcricional do gene *MAPK6* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente71
- Figura18 - Perfil transcricional do gene *PR-4* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Código e anotação dos genes selecionados para avaliação das vias de jasmonato em resposta à infecção por HLB	46
Tabela 2 - Código e anotação dos genes selecionados para avaliação das vias do etileno em resposta à infecção por HLB	47
Tabela 3 - Sequência dos <i>primers</i> selecionados como normalizadores para qPCR.	48

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ton	toneladas
kg	quilogramas
HLB	<i>Huanglongbing</i> dos citros, ex-greening
CaLaf	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>
CaLam	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>
CaLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
d.a.i.	dias após a inoculação
ha	hectares
RT-qPCR	Reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
pb	Pares de bases
JA	Jasmonato
ET	Etileno
SA	Ácido salicílico

1 INTRODUÇÃO

Na fruticultura mundial, a produção de citros é a mais representativa, totalizando aproximadamente 123 milhões/ton em 2011, correspondendo a 20,21% das frutas produzidas no mundo (FAO, 2013). Os principais países produtores são China, Brasil, Estados Unidos, Índia e México; entretanto, o Brasil é o líder na produção de laranja, com 19,8 milhões/ton, seguido pelos Estados Unidos (8,1 milhões/ton), China (6,2 milhões/ton), Índia (4,6 milhões/ton) e México (4,1 milhões/ton) (PARANÁ, 2012).

O Estado de São Paulo se mantém como o principal produtor de laranja, tanto em volume de produção, 14,8 milhões/ton, como em área plantada, 525,5 mil/ha, seguido pelos Estados da Bahia, Paraná, Minas Gerais e Sergipe (MATA et al., 2012), além de ser o maior exportador de suco concentrado congelado (FCOJ) e não concentrado (NFC) dessa fruta. Entretanto, o cenário atual da produção de laranja no Brasil tem sido norteador por sérios problemas fitossanitários causados por pragas e doenças, com destaque para o *Huanglongbing* (HLB, ex-greening) responsável pela contaminação de 64,1% dos talhões, representando uma expansão de 20% da doença em pomares entre os anos 2010 e 2011 (EMBRAPA, 2013).

Esta doença tem a sua origem na China, cujo primeiro relato data de 1919, e desde então foi se disseminando pelo mundo ao longo dos anos, sendo encontrada atualmente em mais de quarenta países (BOVÉ, 2006). Os primeiros relatos da doença no Brasil e Estados Unidos, maiores produtores mundiais de citros, aconteceram nos anos 2004 e 2005, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2005; COLETTA FILHO et al., 2004; BOVÉ, 2006).

De acordo com Gottwald (2010), associado ao alto custo de manejo, fatores agrobiológicos contribuem para a restrição de alternativas para o convívio com a doença e manutenção da produtividade dos pomares, justificando a sua gravidade. Alguns destes fatores estão intimamente ligados à transmissão e fonte de inóculo, como o longo e não caracterizado período de incubação da doença, acarretando em plantas assintomáticas atuando como fonte de inóculo; eficiência de transmissão da bactéria por todos os estágios de vida do inseto vetor; e um hospedeiro alternativo, tanto para o vetor quanto para a bactéria. Outro fator importante a se considerar, do

ponto de vista genético, é a ausência de fonte de resistência no gênero *Citrus* sp., dificultando o melhoramento clássico.

O HLB é uma doença sistêmica, cujo agente etiológico é uma bactéria Gram negativa, restrita aos vasos do floema provocando sintomas similares àqueles causados por deficiências nutricionais em folhas jovens ou ainda pela presença de fluxos de ramos amarelados e setorizados na copa da planta, com posterior queda de folhas e frutos. Estes por sua vez apresentam tamanho reduzido e assimétrico, columela central distorcida, abortamento de sementes e coloração desuniforme com predomínio da cor verde na face voltada para o interior da planta. A planta apresenta redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos, e seca dos ramos a partir da extremidade, tornando-a improdutiva em pouco tempo e levando à sua morte (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007; COLETTA FILHO; CARLOS, 2010).

O HLB é causado por três espécies da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (LI et al., 2006). *Ca. Liberibacter asiaticus* (CaLas) foi relatada inicialmente na Ásia (REINKING, 1919) e atualmente está disseminada não apenas por aquele continente mas também pelas Américas; *Ca. Liberibacter americanus* (CaLam) foi originalmente encontrada no Brasil e ainda se encontra restrita a esse país (TEIXEIRA et al., 2005), e *Ca. Liberibacter africanus* (CaLaf), é encontrada e disseminada pelo continente Africano (BOVÉ, 2006). Sua transmissão natural acontece durante a alimentação do inseto vetor, o psílideo *Diaphorina citri*, responsável pela transmissão das bactérias CaLas e CaLam, e *Trioza erytreae*, transmissora de CaLaf (AUBERT, 1987; ALBERT; MANJUNATH, 2004). Em condições controladas, ambos os vetores são capazes de transmitir as bactérias CaLas e CaLaf. Artificialmente, material vegetativo contaminado, como borbulhas, também pode transmitir a doença eficientemente. A comercialização de mudas contaminadas com as bactérias constitui uma importante fonte de inóculo, uma vez que os psíldeos têm preferência por se alimentar em tecidos mais tenros (BOVÉ, 2006).

Não há uma variedade de citros ou gênero afim que seja imune a esta doença. Entretanto, pode-se observar uma notável distinção na expressão dos sintomas nas plantas, apontando o *Poncirus trifoliata* como o mais resistente e/ou tolerante (FOLIMONOVA et al., 2009; MACHADO et al., 2010; BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010).

Associado a este fato, a escassez de conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade destas bactérias, a percepção e resposta da planta à infecção, e o conjunto de sintomas apresentado pela planta após um determinado período de infecção, tornou-se um desafio para a ciência. Nos últimos anos, diferentes grupos de cientistas de diversos países têm baseado seus estudos na interação planta-patógeno no âmbito molecular, para melhor compreender este patossistema, utilizando técnicas de análises de transcriptoma (MAFRA et al., 2013; ZHENG; ZHAO, 2013; MARTINELLI et al., 2012; YAN et al., 2013; ARITUA et al., 2013; ALBRECHT; BOWMAN, 2011), proteoma (CONG et al., 2012; NWUGO et al., 2013;) e metabolômica (SLISZ et al., 2012). Apesar de todos os esforços, até o momento, nenhum estudo obteve sucesso em explicar de forma completa os mecanismos da evolução da doença, desde a infecção até o aparecimento dos sintomas e eventual morte da planta.

De um modo geral, o patógeno infecta e coloniza o hospedeiro visando à utilização de seus nutrientes em seu benefício, e, em contrapartida, a planta responde com defesas antimicrobianas e respostas associadas ao estresse (HORA JUNIOR, 2008; WAN et al., 2002). Os níveis de resistência das plantas são influenciados por sinais sistêmicos mediados por hormônios vegetais que desempenham importante papel na regulação dos processos de desenvolvimento e das vias de sinalização envolvidas em respostas de defesa de plantas a patógenos. Dentre estes compostos estão o jasmonato e o etileno, hormônios vegetais que atuam sinergisticamente e em conjunto com outros compostos, como as espécies reativas de oxigênio, ácido salicílico e óxido nítrico, ativando proteínas relacionadas à patogênese, peptídeos antimicrobianos, compostos fenólicos, flavonoides, fitoalexinas e resposta de reforço da parede celular; genes que se encontram downstream na via molecular de resposta da planta à doença (DODDS; RATHJEN, 2010; HORA JUNIOR, 2008)

Baseado no conceito de sinalizador de uma via (BOSTOCK, 1999; SILVA; REIS, 2008), de que “o composto em questão deve ser sintetizado pela planta, apresentar um aumento significativo de sua expressão após a infecção por um patógeno ou em resposta a um indutor, apresentar trânsito pelo floema, promover a indução de genes relacionados à defesa, como as PR proteínas, fitoalexinas ou peroxidases, e finalmente, aumentar a resistência da planta ao patógeno”, buscou-se avaliar neste trabalho o perfil transcricional de 23 genes ao longo das vias do

jasmonato e etileno em dois genótipos contrastantes em relação à tolerância/suscetibilidade ao HLB, *Poncirus trifoliata* (resistente ou tolerante) e *Citrus sinensis* (suscetível), em três tempos da doença: sete dias após a inoculação (d.a.i.), que corresponde ao início da fusão de tecidos da enxertia com borbulha infectada e, possivelmente, início da infecção; 30 d.a.i., período de colonização da planta pela bactéria; e aparecimento dos primeiros sintomas nas plantas. Os resultados obtidos permitiram avaliar a importância do papel destes sinalizadores na percepção e ativação subsequente da resposta da planta e contribuir cientificamente à biotecnologia aplicada ao melhoramento genético, visando a busca por plantas resistentes por cisgenia.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve o propósito de estimar a expressão de genes associados às vias de jasmonato e etileno em dois genótipos contrastantes de citros, *Citrus sinensis* (suscetível) e *Poncirus trifoliata* (resistente ou tolerante) infectados com *Candidatus Liberibacter americanus* (CaLam) ou *Ca. Liberibacter asiaticus* (CaLas), agentes etiológicos do HLB.

2.1 Objetivos específicos

- I. Analisar o perfil de expressão de genes das vias de jasmonato e etileno em resposta à infecção inicial, colonização e desenvolvimento de sintomas em plantas de citros;
- II. Realizar uma análise comparativa da expressão desses genes entre os genótipos contrastantes *Citrus sinensis* (suscetível) e *Poncirus trifoliata* (resistente ou tolerante) infectados com as duas espécies de bactérias encontradas no Brasil, *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca. Liberibacter americanus*, em experimentos independentes, visando entender, do ponto de vista molecular, os mecanismos de sinalização das plantas associados a estas vias.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Um breve histórico da Citricultura Brasileira

As plantas da família Rutaceae, na qual estão os gêneros *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, são de origem asiática e foram introduzidos no Brasil no início do século XVI pelos colonizadores portugueses, adaptando-se de tal forma que se assemelham às plantas nativas (DONADIO et al., 2005; NEVES et al., 2010).

Embora com uma longa trajetória no Brasil, foi somente no século XX que se iniciou o plantio comercial e o histórico de seu cultivo é marcado por grandes lucros e graves crises (BORGES; COSTA, 2006; NEVES et al., 2010). Nos primórdios da cultura, os estados do Rio de Janeiro e São Paulo eram os principais produtores de citros (NEVES et al., 2010), abastecendo o mercado externo e levando o Brasil ao patamar de quinto maior produtor mundial nos anos de 1920, sendo superado apenas pelos Estados Unidos (EUA), Espanha, Japão e Itália (DONADIO et al., 2005; BOTEON; NEVES, 2005). No entanto, na crise cafeeira da década de 1930, o estado de São Paulo foi favorecido com o desenvolvimento da cultura dos citros, através de incentivos do governo, e tornou-se o principal produtor brasileiro no início da década de 1960 (BORGES; COSTA, 2006; NEVES et al., 2010).

Mesmo assim, algumas crises tiveram que ser superadas. A primeira delas ocorreu com a Segunda Guerra Mundial em 1939 e, embora a produção daquele ano tenha sido de 197 mil ton de laranjas, batendo o recorde de produção da época, houve um grande corte nas exportações, fazendo com que essa produção fosse escoada internamente. Com a desvalorização da produção no mercado interno e externo, os produtores, desmotivados, abandonaram os tratos das suas plantações promovendo a disseminação de doenças como a tristeza do citros e o cancro cítrico (BOTEON; NEVES, 2005; BORGES; COSTA, 2006; ARAÚJO, 2006; NEVES et al., 2010).

O estado do Rio de Janeiro não conseguiu se recuperar desta crise; entretanto, o estado de São Paulo ressurgiu no cenário citrícola na década de 60, com a proposta de não somente produzir frutas frescas, mas tornar o cultivo economicamente mais vantajoso com a produção de matéria-prima voltada à

indústria, consolidando-se como maior produtor nacional e mundial de laranja no início da década de 1980, posição que mantém até os dias atuais (HASSE, 1987; RAMOS FILHO, 1999; BOTEON; NEVES, 2005; TROCCOLI; ALTAF, 2010; NEVES et al., 2010).

Na esfera econômica, a cultura dos citros é uma das mais representativas do agronegócio brasileiro, possuindo uma estrutura muito bem organizada desde a base da cadeia produtiva contando com produtores, indústrias, apoio do Estado e iniciativa privada para uma citricultura forte e competitiva (AMARO et al., 2005; ARAÚJO, 2006; TROCCOLI; ALTAF, 2010; NEVES et al., 2010).

Para manter uma receita atrativa, a citricultura necessita de constante aumento de produtividade, no entanto o plantio adensado dos pomares provocou maior ocorrência de pragas e doenças aumentando os custos da produção, impactando negativamente para o produtor, associado à oscilação do preço da caixa de 40,8Kg do fruto no mercado (AMARO et al., 2005; NEVES et al., 2010). São várias as doenças que desafiam a citricultura e, dentre as mais impactantes, podemos citar a Clorose Variegada do Citrus (CVC) (MACHADO et al., 1994), o *Huanglongbing* (HLB, ex-greening) (COLETTA FILHO et al., 2004) e o Cancro Cítrico (MASSARI; BELASQUE JR, 2006), causadas pela bactéria *Xylella fastidiosa* (HOPKINS, 1989), *Candidatus Liberibacter* sp. e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, respectivamente; a Leprose dos Citros e Tristeza dos Citros, causadas por vírus (MÜLLER et al., 2005); e a Pinta Preta, causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (LARANJEIRA et al., 2005). No atual panorama da citricultura mundial, o HLB é considerado a doença que causa mais perdas à citricultura, sendo responsável pela ruína da cultura em vários países e causando severos danos ao Brasil.

3.2 *Huanglongbing* (ex-greening)

Considerada a mais grave doença dos citros na atualidade e responsável pela perda de milhões de plantas e oneração do setor citrícola em vários países produtores, o *Huanglongbing* também conhecido como *Greening*, possui origem, de acordo com os primeiros relatos, no continente asiático datando da segunda metade do século XVIII na Índia e no sul da China no final do século XIX (AUBERT, 1992).

Na década de 1930 já havia se tornado um grave problema para a cultura dos citros de vários outros países asiáticos como Taiwan, Filipinas (LEE, 1921) e Indonésia (AUBERT et al., 1985). Está presente também nos continentes Africano (TOORAWA, 1998), na Oceania e, nas Américas, foi detectado no Brasil e nos Estados Unidos em 2004 e 2005, respectivamente (BOVÉ, 2006).

Os primeiros relatos do HLB no Brasil foram feitos no interior do estado de São Paulo, em uma propriedade do município de Araraquara (COLETTA FILHO et al., 2004). Atualmente ocorre também na região noroeste do estado do Paraná, Triângulo Mineiro e na região sul de Minas Gerais (TEIXEIRA et al., 2005). Nos EUA, a doença foi identificada na Flórida em 2005 (HALBERT et al., 2012), estando hoje relatada também em outros estados como o Texas (KUNTA et al., 2014). Uma planta sintomática foi erradicada na Califórnia em 2013, mas inspeções constantes naquele estado não identificaram outras plantas doentes (KUMAGAI et al., 2013). A doença está presente também em outros países do continente Americano, como Cuba, República Dominicana, Belize, México, Nicarágua, Honduras, El Salvador, Costa Rica e Jamaica (BOVÉ, 2006; BASSANEZI et al., 2010; CASTRO et al., 2010).

Por muitos anos a causa da doença foi atribuída às deficiências nutricionais, toxidez ou fatores climáticos, porém através de experimentos de transmissibilidade por enxertia e através do inseto psílideo *Trioza erytreae* foi constatado a presença de um patógeno (McCLEAN; OBERHOLZER, 1965a, 1965b).

A princípio suspeitou-se que um vírus associado à tristeza do citros seria o agente etiológico da doença (MCCLEAN, 1950). Porém, estudos de microscopia eletrônica (ME) revelaram a presença de envelope citoplasmático espesso delimitando a célula (BOVÉ; GARNIER, 1984; GARNIER et al., 1984). A partir destas observações, foi considerado que o agente etiológico associado ao HLB seria uma bactéria Gram negativa por possuir parede celular complexa constituída de peptidoglicano e lipopolissacarídeos (GARNIER et al., 1984). Estudos prévios de

plantas infectadas com HLB tratadas com penicilina deu suporte a esta hipótese (BOVÉ et al., 1980), pois a penicilina inibe a organização da camada de peptidoglicano em bactérias Gram negativas (MADIGAN et al., 2009). Entretanto, as plantas tratadas com este antibiótico apresentaram remissão de sintomas, mas não houve cura (AUBERT; BOVÉ, 1980; BOVÉ et al., 1980).

3.2.1 Agente etiológico

A etiologia do HLB está associada às bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* spp., que são Gram-negativas classificadas como α -Proteobactérias pertencentes à família Rhizobiaceae, na qual estão também inseridas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Sinorhizobium* (JAGOEIX et al., 1994; GARNIER et al., 2003; BOVÉ, 2006). O termo *Candidatus* é devido à dificuldade do seu cultivo *in vitro*, pois há relatos de êxitos parciais no seu cultivo (DAVIS et al., 2008, SECHLER et al. 2009), porém sem sucesso na reprodutibilidade por outros grupos (BOVÉ, 2006, BOVÉ et al., 2008; MACHADO et al., 2010)

Atualmente três espécies de bactérias do gênero *Candidatus Liberibacter* spp. foram identificadas como agentes etiológicos do HLB: *Ca. Liberibacter africanus* (CaLaf), *Ca. Liberibacter americanus* (CaLam), e *Ca. Liberibacter asiaticus* (CaLas), que é a principal espécie da bactéria, a mais agressiva e a predominante em todo o mundo, incluindo o Brasil (BOVÉ et al., 2008; MACHADO et al., 2010).

As duas espécies que ocorrem no Brasil já tiveram seus genomas sequenciados (DUAN et al., 2009, TYLER et al., 2009, WULFF et al., 2014) e evidenciaram tamanho de genoma pequeno e dependência de vários metabólitos primários. O tamanho do genoma variou de 1,19Mb a 1,23Mb para CaLam (WULFF et al., 2014) e CaLas (DUAN et al., 2009), respectivamente. Essas bactérias não apresentam sistemas de secreção do tipo III e IV, fatores de avirulência ou enzimas degradativas, o que pode evitar a eliciação de resposta de defesa baseada em degradação de parede celular (MAFRA et al., 2013).

CaLaf é sensível ao calor ocorrendo em áreas de temperatura abaixo dos 30°C, seu vetor possui a mesma característica: em altas temperaturas combinada com baixa umidade relativa não se desenvolvem. O contrário ocorre com CaLas, que é tolerante ao calor. Os sintomas se desenvolvem em temperaturas acima dos 30°C e seu vetor compartilha da mesma característica. CaLam possui sensibilidade à altas

temperaturas, como CaLaf, mas severidade e expressão de sintomas semelhante à CaLas (AUBERT, 1987; BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2010).

3.2.2 Formas de transmissão

A doença é transmitida naturalmente de maneira persistente por insetos psílídeos, *Trioza erytreae* Del Guercio, que transmite CaLaf e *Diaphorina citri* Kuwayama (AUBERT, 1987), CaLas e CaLam que ocorre em diversas regiões das Américas, inclusive no Brasil (YAMAMOTO et al., 2006). Em condições controladas, ambos os vetores podem transmitir os tipos asiático e africano (AUBERT, 1987; BOVÉ, 2006).

Outra forma de transmissão é através de material vegetativo infectado, mudas e borbulhas (ramos laterais), são capazes de transmitir a bactéria causadora do HLB se mostrado importantes fontes de inóculo. Não há métodos eficientes e econômicos conhecidos que curem a planta doente (DA GRAÇA, 2008).

A restrição ao floema é uma condição que influencia as formas de transmissão da bactéria, que possui disseminação sistêmica e irregular na planta. Dados experimentais têm mostrado que CaLas, quando inoculada via borbulha, pode ser detectada na planta receptora já aos 30 dias após a inoculação, sendo os primeiros sintomas da doença observados após aproximadamente 180 dias (PEREIRA et al., 2010).

Muitas dúvidas persistem quanto à capacidade de desenvolvimento in vitro dessas bactérias, por serem dificilmente cultiváveis artificialmente (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). Embora não se tenha informações sobre os mecanismos de patogenicidade de *C. Liberibacter* spp., provavelmente os sintomas são decorrentes de distúrbios fisiológicos e anatômicos ocasionados pela presença da bactéria (COLETTA FILHO; CARLOS, 2010; FOLIMONOVA; ACHOR, 2010). Por ser uma bactéria de difícil manipulação, há necessidade de estudos de outras formas de interação planta-patógeno.

3.2.3 Sintomas característicos e detecção

O HLB é uma doença sistêmica, onde o patógeno habita, restritamente, os vasos do floema e em função destas características, os sintomas causados pelo HLB são semelhantes àqueles causados por deficiência de nutrientes (BOVÉ, 2006, COLETTA FILHO; CARLOS, 2010).

A presença de fluxos de ramos amarelados e setorizados na copa da planta cítrica é a principal característica, com posterior queda de folhas, que podem tornar-se espessas, coriáceas com nervuras proeminentes, amareladas e de tamanho reduzido (McCLEAN; SCHWARZ, 1970).

Os frutos apresentam tamanho reduzido e assimétrico, columela central distorcida, abortamento de sementes e coloração desuniforme com predomínio da cor verde na face voltada para o interior da planta e queda prematura (BOVÉ, 2006: GOTTWALD et al., 2007).

A planta apresenta redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos e seca dos ramos a partir da extremidade. Análises de microscopia revelam alterações anatômicas nos vasos do floema de plantas infectadas com HLB (KIM et al., 2008; ACHOR et al., 2010). Plantas infectadas com HLB apresentam morte econômica em curto espaço de tempo e morte biológica com ataque severo da bactéria (BOVÉ, 2006).

Uma vez infetada, a planta necessita de um tempo para que o patógeno se estabeleça, ou seja, um período de latência do patógeno que depende da temperatura, idade, espécie e variedade da planta e titulação da bactéria nos ramos. Considerando estes fatores, o período de incubação pode variar, geralmente, de seis a doze meses, com sintomas podendo ser manifestados tardiamente (BASSANEZI et al., 2010; COLLETA FILHO; CARLOS, 2010).

Os sintomas característicos são facilmente confundidos com sintomas de deficiências nutricionais e outras doenças, diante disso as técnicas moleculares de PCR e qPCR são as mais apropriadas para o diagnóstico do HLB (LI et al., 2008; COLLETA FILHO; CARLOS, 2010; LIN et al., 2010).

3.2.4 Suscetibilidade

Todas as variedades comerciais de citros são comprovadamente suscetíveis ao HLB. Mesmo em gêneros próximos, como *Merope*, *Fortunela*, *Microcitros* e *Murraya*, é possível detectar a bactéria, muitas vezes com desenvolvimento de sintomas semelhantes àqueles de citros. Devido às características dos sintomas as variedades de citros e gêneros afins foram classificadas em sensíveis, moderadamente tolerantes, tolerantes e com reação variável (FOLIMONOVA et al., 2009; MACHADO et al., 2010).

No entanto, essa clara variação na intensidade da resposta, ou seja, na intensidade dos sintomas observados, aponta o *Poncirus trifoliata* como genótipo mais tolerante ou resistente, pois a taxa de infecção é menor e a multiplicação da bactéria é mais lenta (FOLIMONOVA et al., 2009; BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010).

3.2.5 Manejo da doença

O manejo da doença deve ser feito de maneira integrada empregando a destruição das fontes de inóculo com a remoção e destruição das plantas contaminadas, adotando o uso de material vegetativo sadio, o controle químico preventivo de psílídeos vetores e um constante monitoramento das plantas são as providências que devem ser tomadas em conjunto para que se possa conviver com o HLB (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2010).

O governo brasileiro regulamentou essas práticas de controle do HLB através de legislação pertinente, a IN-53 [Instrução Normativa nº 53/2008 (IN53)] (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

3.3 Defesa vegetal

As plantas por serem fixas ao seu substrato estão sujeitas às mais diversas formas de estresse, como o ataque de pragas e patógenos, as alterações climáticas, o déficit hídrico, a salinidade etc. Porém, durante seu processo evolutivo, aquelas com mecanismos de defesa mais eficientes para se proteger tanto dos estresses

bióticos como abióticos sobreviveram à seleção natural (KOCH et al., 1999; PIETERSE et al., 2005; PINTO et al., 2011; BALLARÉ, 2011).

Os mecanismos de defesa da planta podem ser classificados como defesas pré-formadas como estruturas celulares e teciduais e compostos químicos que podem atuar como barreiras contra microrganismos invasores; e defesas induzidas, que são alterações fenotípicas elicítadas diretamente pela ação de agentes bióticos (GARCIA-BRUGGER et al., 2006; MITHÖFER; BOLAND, 2012).

As defesas induzidas iniciam-se pelo reconhecimento do patógeno e a ativação de genes específicos, cujos produtos irão interferir em vias metabólicas distintas, mas que, ao final, resultarão na formação de barreiras bioquímicas e físicas ou estruturais, que reduzirão a eficiência do patógeno. Essa indução pode ocorrer no local da infecção, sistemicamente ou mesmo em ambas as situações (SCHENK et al., 2000).

Ao detectar a presença do patógeno a planta envia sinais que ativam seus mecanismos de defesa que, geralmente, são complexos, compostos por várias respostas de defesa e são eficazes contra uma diversificada gama de patógenos (SCHENK et al., 2000; BARI; JONES, 2009). De modo geral, estas respostas de defesas podem ser distinguidas entre imunidade inata e resistência baseada na interação gene-a-gene (DYAKOV, 2007).

Na imunidade inata, a planta detecta instantaneamente a presença do patógeno e afasta os potencialmente perigosos. Num primeiro momento, a planta detecta os 'padrões moleculares associados a patógeno/microrganismo' (PAMP ou MAMP), tais como a flagelina, quitina, glicoproteínas e lipopolissacáridos (PIETERSE et al., 2012; HENRY et al., 2012; BOYD et al., 2013). Em seguida são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão da planta (PRR) (NÜRNBERGER et al., 2004), resultando na ativação da imunidade desencadeada por PAMP (PTI), constituindo a defesa primária da planta em resposta a invasão do patógeno, não sendo um mecanismo de resistência específico (JONES; DANGL, 2006; DODDS; RATHJEN, 2010; HENRY et al., 2012; BOYD et al., 2013).

A imunidade inata é suficiente para a planta resistir a micro-organismos não patogênicos e alguns patógenos que não possuam efetores para suprimir PTI. No entanto, quando um patógeno é dotado destes efetores, a doença é estabelecida. As plantas podem reconhecer tais efetores, direta ou indiretamente, ativando sua

imunidade desencadeada por efetores (ETI), ocasionando resistência à doença (PIETERSE et al., 2012; HENRY et al., 2012; BOYD et al., 2013).

O crescimento do patógeno é restringido quando a resistência da planta às doenças é intensificada por PTI ou ETI e a velocidade com que a planta reconhece o patógeno e ativa suas respostas de defesa é crucial para a resistência ou susceptibilidade (BARI; JONES, 2008; DODDS; RATHJEN, 2010; GURURANI et al., 2012; BOYD et al., 2013).

Proposta por FLOR (1971), a interação gene-a-gene é um processo mais lento em relação à imunidade inata, porém, é mais específico (COOK, 1998; CRUTE, 1994). Se a planta possuir gene de resistência (gene R) e o patógeno possuir gene de avirulência (Avr) correspondente, a resistência é efetiva; caso a planta não possui o gene R, o patógeno se instala e a doença se desenvolve (RESENDE et al., 2003; SCHWESSINGER; RONALD, 2012; GURURANI et al., 2012).

Por tanto, na interação entre a planta e o patógeno a compatibilidade ou incompatibilidade são expressas em várias etapas do processo infeccioso. São dependentes das combinações genéticas do patógeno e da planta, determinando o estabelecimento da doença. Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, se multiplica e a doença é estabelecida. Na interação incompatível, ao adentrar o tecido vegetal, o patógeno encontra as defesas da planta, que são rapidamente ativadas impedindo sua multiplicação, produzindo resistência (FLOR, 1971; SCHENK et al., 2000; RESENDE et al., 2003).

3.4 Hormônios Vegetais

A Interação entre as vias de sinalização de defesa é um importante mecanismo para regular as respostas de defesa contra vários tipos de patógenos (DODDS; RATHJEN, 2010). Essa sinalização é mediada por hormônios vegetais que ativam os sinais sistêmicos de defesa da planta, induzindo-a a respostas de defesa ao estresse biótico e abiótico (PIETERSE; DICKE, 2007). Além disso, eles também desempenham funções importantes na regulação do crescimento da planta, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência (PIETERSE et al., 2009).

Os hormônios vegetais agem sempre em pequenas quantidades; entretanto, sob estresse seus níveis são modificados (FORCAT et al., 2008). O estilo de vida e

a estratégia de infecção do patógeno é que determinam a quantidade e composição dos hormônios vegetais produzidos pela planta ao ser atacada (ROBERT-SEILANIAN et al., 2007).

O estilo de vida do patógeno influencia o hormônio vegetal associado às defesas, o ácido salicílico (SA) está associado a patógenos biotróficos, que necessitam de células vivas do hospedeiro para sua sobrevivência, jasmonato (JA) e etileno (ET) estão normalmente associados a patógenos necrotróficos, que se beneficiam de células mortas do hospedeiro. Entretanto muitos organismos não podem ser considerado exclusivamente biotróficos ou necrotróficos; dependendo do seu ciclo, desenvolvimento, maturação, eles podem possuir uma fase biotrófica e outra necrotrófica, sendo denominados hemibiotróficos (GLAZEBROOK, 2005; DODDS; RATHJEN, 2010).

O *crosstalk* entre as vias hormonais sinalizadas por SA, JA e ET é uma prática para refinar as defesas induzidas que serão ativadas em respostas ao ataque de patógenos e danos causados pela herbivoria (TURNER et al., 2002; LEON-REYES et al., 2010). Nos últimos anos, vários componentes que regulam esse *crosstalk* entre as vias hormonais foram identificados; no entanto, os mecanismos moleculares subjacentes não são bem compreendidos (DODDS; RATHJEN, 2010). O *crosstalk* entre as vias de SA, JA e ET têm sido bem estudados, mas sem uma conclusão definitiva, pois dependendo da planta e do patógeno esse *crosstalk* pode ser sinérgico ou antagônico (LEON-REYES et al., 2010; THALER et al., 2012; GIMENEZ-IBANEZ; SOLANO, 2013; DERKSEN et al., 2013).

Descoberto na década de 1960, o jasmonato e seus derivados hoje são o grupo melhor caracterizado, sendo considerados um dos principais hormônios vegetais que regulam tanto o desenvolvimento quanto a defesa de plantas (WASTERNAK, 2007; YAN et al., 2013). Processos como germinação de sementes, crescimento de raízes, formação de tubérculos, maturação de frutos, senescência foliar e abertura estomática, juntamente com respostas de defesa de plantas a insetos e patógenos microbianos, são regulados por este hormônio vegetal (DEVOTO; TURNER, 2003).

A biossíntese dos jasmonatos ocorre a partir do ácido linolênico na via octadecanóide, podendo seguir dois caminhos, a composição da forma ativa jasmonato-isoleucina (JA-Ile) ou a volatilização a metil jasmonato (MeJA) (Figura 1). Estudos têm demonstrado que as concentrações de JA aumentam no local do dano

em resposta à infecção do patógeno ou lesão no tecido, e a aplicação exógena de JA induz a expressão de genes ligados à defesa (LORENZO; SOLANO, 2005; WASTERNAK, 2007; BARI; JONES, 2009; SANTNER et al., 2009).

Figura 1 - Representação esquemática da via de biossíntese de jasmonato: Ácido Linolênico, LOX - Lipoxigenase, AOS - Aleno Oxido Sintase, AOC - Aleno Oxido Ciclase, OPDA 12-Oxophytodienoic Acid, OPR3 - Opda Reductase 3, JA - Jasmonato, JMT - Jasmonic Acid Carboxyl Methyl Transferase, MeJA - Methyl Jasmonate, JAR1 - Jasmonate-Amido Synthetase e JA-Ile - Jasmonyl-Isoleucine Conjugate (adaptado de LU et al., 2013)

O etileno é um hormônio vegetal gasoso sintetizado a partir do aminoácido metionina, que catalisado forma S-adenosilmetionina, e dá origem ao aminociclopropano-1-carboxílico que culmina com a formação do etileno (Figura 2).

Essas reações são catalisadas pelas enzimas SAM sintase, ACC sintase e ACC oxidase, respectivamente (KENDE, 1993).

Este hormônio é um potente regulador do desenvolvimento vegetal afetando vários processos como o crescimento de mudas, maturação de frutos, senescência foliar, abscisão (YANG; HOFFMAN, 1984; KADER, 1985; WANG et al., 2002), podendo estimular a germinação e superar a dormência em várias espécies (ESASHI, 1991; ABELES et al., 1992). Possui também importante papel na defesa das plantas, nos processos de resistência ao estresse, injúria e doenças. Sua ação nestes processos depende, essencialmente, de sua percepção pelas plantas, para determinar o percurso que será executado juntamente com outros hormônios vegetais potencializando os mecanismos de defesa (DE VOS et al., 2005).

Figura 2 - Representação esquemática da via de biossíntese de etileno (adaptado de CHEN et al., 2005)

Através da sinalização por JA e ET (Figura 3) a expressão de vários genes relacionados à defesa é ativada após a inoculação e essa interação de modo geral é sinérgica (PENNINCKX et al., 1998; THOMMA et al., 2001; GLAZEBROOK, 2005; BARI; JONES, 2009; PIETERSE et al., 2013; ZHAHG et al., 2013).

Na sinalização por JA o complexo SCF^{COI} interage com as proteínas JAZ (Jasmonate ZIM-Domain) reprimindo a transcrição de genes responsivos a JA. Após a acumulação de JA, a sua forma ativa (JA-Ile) liga-se as proteínas F-box COI1 no complexo SCF^{COI} degradando as proteínas JAZ no proteassoma 26S e ativando genes responsivos a JA através de fatores de transcrição, tais como MYC2 e ERF1 (KATSIR et al., 2008; VAN DER DOES et al., 2013).

O ET em sua forma gasosa é captado pelos receptores de membrana *ETR1*, *ERS1*, *ETR2*, *ERS2* e *EIN4* que são reguladores negativos da resposta a etileno. Quando na ausência de etileno, estes mantêm a função de regulador negativo de *CTR1* reprimindo o regulador positivo *EIN2*. Após a detecção do etileno, a repressão do *CTR1* é atenuada permitindo a sinalização downstream através de *EIN2*. Em seguida, os reguladores positivos da expressão gênica sensíveis a etileno, tais como *EIN3* e *EIL1*, são ativados, uma vez que o complexo SCF^{EBF1/2}, dependente da degradação destas proteínas pelo proteassoma 26S, é inativado. Fatores de transcrição como *ERF1* são responsáveis pela expressão *downstream* de genes responsivos a ET (PIETERSE et al., 2013).

Figura 3 - Representação esquemática da via comum de sinalização de Jasmonato (A), SCF^{COI} (*Coronatine Insensitive 1*), JAZ (*Ethylene Response Factor 1*), MYC2 (*Jasmonate Associated MYC2 Like 2*) e Etileno (B), ETR1 (*Ethylene Response 1*), ERS1 (*Ethylene Insensitive 1*), ETR2 (*Ethylene Response 2*), ERS2 (*Ethylene Response Sensor 2*), EIN4 (*Ethylene Insensitive 4*), CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*), EIN2 (*Ethylene Insensitive 2*), SCF^{EBF1/2} (*EIN3-Binding F Box Protein 1/ EIN3-Binding F BOX Protein 2*), EIN3 (*Ethylene-Insensitive3*), EIL1 (*Ethylene-Insensitive3-Like 1*), ERF1 (*Ethylene Response Factor 1*) (adaptado de MUR et al., 2013)

Vários estudos têm demonstrado a interação entre JA/ET na indução de resistência de plantas a diferentes patógenos, principalmente os necrotróficos (PIETERSE et al., 2012). Assim, conhecer os níveis destes hormônios vegetais nos

diferentes estágios da doença pode ser extremamente útil para o conhecimento da interação planta-patógeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições experimentais

Os experimentos para desafio de dois genótipos contrastantes de citros, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (suscetível) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (resistente ou tolerante), à infecção por *Ca. Liberibacter asiaticus* ou *Ca. Liberibacter americanus* foram conduzidos em casa de vegetação do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, localizado no município de Cordeirópolis-SP. Cinco plantas de cada genótipo foram inoculadas com borbulhas (Figura 4) infectadas com as bactérias, CaLam ou CaLas, e previamente confirmadas por qPCR. Três plantas saudias, não inoculadas, de cada genótipo foram utilizadas como controle negativo (Figura 5).

Figura 4 - Obtenção de plantas inoculadas com CaLam ou CaLas

Figura 5 - Delineamento experimental de plantas inoculadas com CaLam ou CaLas em experimentos independentes

Foram determinados três tempos para a coleta de material biológico: 7 dias após a inoculação (d.a.i.), período em que ocorre a proliferação celular formando a ponte de callus entre o enxerto e o porta-enxerto e a diferenciação de um novo câmbio; 30 d.a.i., onde a completa lignificação do callus já aconteceu, com a formação de xilema e floema secundário entre enxerto e porta-enxerto (HARTMANN, 2001); e sintoma, período em que as plantas apresentariam sintomas característicos da doença: folhas mosqueadas e amarelecimento dos ramos. Para *P. trifoliata*, a coleta 'sintoma' foi realizada na mesma data que *C. sinensis*, uma vez que este genótipo não apresenta sintomas típicos de HLB.

As plantas utilizadas como controle eram plantas não inoculadas. Em avaliações posteriores entre as plantas não inoculadas e plantas inoculadas com borbulhas sadias (mock) não foram observadas diferenças na expressão gênica (dados não mostrados), evidenciando que o uso de plantas controle não interferiu nos resultados.

Após o período inicial de inoculação e antes do início da primeira coleta, foi realizado a detecção por qPCR das três plantas selecionadas para coleta, confirmando a presença da bactéria e, consequentemente, o sucesso na infecção.

Foram coletadas cinco folhas previamente limpas com água destilada, secas com papel kimwipe e acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados. As amostras foram imediatamente criopreservadas em nitrogênio líquido e levadas

para laboratório, onde foram pulverizadas em almofariz, acondicionadas em tubo Falcon de 50 mL, e armazenadas em freezer -80°C até a extração de RNA total.

4.2 Extração de ácido ribonucleico total (RNA)

A extração de RNA total das amostras de folhas pulverizadas armazenadas em freezer -80°C de cada planta foi feita utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), com algumas modificações. Foram utilizadas duas colunas de extração para cada amostra com o dobro do material vegetal sugerido pelo fabricante, a fim de se obter maior concentração de RNA total, principalmente das amostras sintomáticas, cujos rendimentos eram reduzidos em 1/3 em relação às amostras assintomáticas.

A quantificação da concentração do RNA total era mensurada em espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), e somente as amostras que apresentaram valores entre 1,8 a 2,1 como razão A260/A280 foram consideradas adequadas para as análises posteriores.

A integridade do RNA total obtido era verificada em gel desnaturante de agarose 1,2%, preparado em 10% de solução tampão de formaldeído 10X (200 mM MOPS, 50 mM Acetato de sódio, 10 mM EDTA, pH 7,0), adicionado 1,8% de formaldeído 37% (12,3 mM), e corado com brometo de etídio (1,5 µL/1,2 g de agarose). O gel era previamente imerso em tampão de formaldeído 1X [10% de tampão formaldeído 10X, 2% de formaldeído 37% (12,3 mM)] por 30 minutos. Cada amostra era preparada com solução contendo 1 µL de tampão de azul de bromofenol para 4 µL de amostra de RNA total, seguida por desnaturação a 65°C por 5 minutos. A migração das amostras por eletroforese era feita a 70 volts (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

4.3 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA total foram padronizadas para a concentração de 1µg/ul, a fim de se partir da mesma quantidade de moléculas para a síntese de cDNA. A reação de transcrição reversa foi feita utilizando o

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante.

4.4 Projeção e validação de primers

Após uma extensa busca sobre genes que compõem as vias de síntese e sinalização de etileno e jasmonato que atuam na resposta de defesa da planta, foram selecionados 10 genes pertencentes à via do jasmonato (Tabela 1) e 13 genes da via do etileno (Tabela 2). Utilizando o código do banco de dados TAIR (LAMESCH et al.,2012) oriundas das anotações destes genes, foi possível resgatar as sequências de nucleotídeos das regiões CDS de cada um dos genes selecionados no banco de *Arabidopsis thaliana*. De posse destas sequências, foi feita uma mineração por similaridade em sequências de *Citrus sinensis* e *Poncirus trifoliata* depositadas nos bancos de dados Phytozome (GOODSTEIN; SHU, 2012) e CitEST (CARAZZOLLE; FORMIGHIERI, 2007), usando a ferramenta BlastX.

Tabela 1 - Código e anotação dos genes selecionados para avaliação das vias de jasmonato em resposta à infecção por HLB

GENE	Gene Name	TAIR	Phytozome
LOX2	LIPOXYGENASE 2	At3g45140	orange1.1g002617m.g
AOC3	ALLENE OXIDE CYCLASE 3	At3g25780	orange1.1g025155m.g
JMT	JASMONIC ACID CARBOXYL METHYL TRANSFERASE	At1g19640	orange1.1g017514m.g
JAZ2	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 2	At1g74950	orange1.1g023369m.g
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1	AT2G39940	orange1.1g007586m.g
MYC2	JASMONATE INSENSITIVE 1	AT1G32640	orange1.1g005651mg
MKK4	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 4	At1g51660	orange1.1g016959m.g
MAPK6	MAP KINASE 6	At2g43790	orange1.1g017231m.g
PR4	PATHOGENESIS-RELATED 4	At3g04720	orange1.1g032389m.g
NAC019	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 19	AT1G52890	orange1.1g019011m.g

Tabela 2 - Código e anotação dos genes selecionados para avaliação das vias do etileno em resposta à infecção por HLB

GENE	Gene Name	TAIR	Phytozome
SAM1	S-ADENOSYL METHIONINE SYNTHETASE-1	At1g02500	orange1.1g045474m.g
ETR1	ETHYLENE RESPONSE 1	At1g66340	orange1.1g004636m.g
ERS1	ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1	At2g40940	orange1.1g005591m.g
EIN4	ETHYLENE INSENSITIVE 4	At3g04580	orange1.1g004510m.g
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1	At5g03730	orange1.1g005247m.g
EIN2	ETHYLENE INSENSITIVE 2	At5g03280	orange1.1g000799m.g
EIN3	ETHYLENE-INSENSITIVE3	At3g20770	orange1.1g007186m.g
EIL1	ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE 1	At2g27050	orange1.1g007017m.g
EBF1	EIN3-BINDING F BOX PROTEIN	At2g25490	orange1.1g006426m.g
ERF1	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1	At3g23240	orange1.1g039409m.g
ERF2	ETHYLENE RESPONSE FACTOR- 2	At5g47220	orange1.1g044938m.g
ERF/B4	ETHYLENE RESPONSE FACTOR - SUBFAMILY B4	At5g61890	orange1.1g043184m.g
ERF/AP2	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 1	At4g17500	orange1.1g044938m.g

A fim de obter especificidade dos *primers* para cada gene cujo *e-value* foi menor ou igual a 0.0, foram feitos alinhamentos das sequências selecionadas e similares relacionadas pela ferramenta Blast na ferramenta ClustalW (LARKIN et al., 2007), a fim de se visualizar regiões exclusivas no gene candidato para a projeção do *primer*. Para a projeção e avaliação das penalidades dos *primers*, foram utilizadas as ferramentas PrimerBlast (YE et al., 2012) e Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012), com tamanho de *amplicon* variando entre 70-200 pb e temperatura de anelamento de 60°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Para os critérios estabilidade e formação de alças (*hairpin*) e dímeros (*primer dimer* e *cross dimer*) foi utilizado o NetPrimer (Premier Biosoft).

Todos os *primers* selecionados foram testados por PCR convencional e os seus respectivos *amplicons* foram sequenciados (ABI 3730 – Applied Biosystems) para confirmar suas identidades.

4.5 Genes *housekeeping*

Baseado no trabalho de Mafra et al., 2012 e Oliveira, 2013, foram utilizados para este trabalho os genes *GAPDH* e *TIP41-like* (Tabela 3) por terem sido considerados o par mais estável na comparação par-a-par pelo geNorm, com *M-value* (anti Log2) de 0,372 e 0,327, respectivamente.

Tabela 3 - Sequência dos primers selecionados como *housekeeping* para as qPCR

Símbolo	Nome do gene	Sequência dos Primers (5'→3')
<i>TIP41</i>	TIP41-like Family	Fw – ACGGATAAGCATGGGACTAG Rv – CACTCCATTATCAGCCAACTC
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein	Fw –GGAAGGTCAAGATCGGAATCAA Rv - CGTCCCTCTGCAAGATGACTCT

4.6 PCR convencional para validação de *primers*

A PCR convencional foi composta de 2,5uL de 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1,0uL de dNTP mix (25mM), 1uL Forward Primer, 1uL Reverse Primer, 0,8uL de MgCl₂ (50mM), 2uL de DNA, 0,2uL de Taq DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, recombinant, Invitrogen™) e 16,5uL de água MilliQ autoclavada, totalizando o volume de 25uL. As condições de amplificação foram de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por mais 40 segundos e 72°C por 30 segundos e por fim, um ciclo de 72°C por 7 minutos. Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio.

4.7 Sequenciamento para confirmação dos *primers*

A reação de marcação e precipitação das amostras para sequenciamento foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), utilizando os *primers* específicos para cada sequência. Em seguida, as amostras foram submetidas ao sequenciador (ABI 3730 – Applied Biosystem) e cobertura de sequenciamento analisada pelo pacote de ferramentas CLC Genomics Workbench 4.5 (<http://www.clcbio.com/corporate/about-clc-bio/>). Para finalizar, os fragmentos gerados pelos *primers* no sequenciamento foram alinhados pela ferramenta BlastN (ALTSCHUL et al., 1990) nas sequências originais de *C. sinensis* e *P. trifoliata*, ratificando os *amplicons*.

4.8 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para cada amostra biológica, três plantas para cada tratamento, foram feitas três replicatas técnicas na placa de RT-qPCR a fim de minimizar o desvio entre as amostras. Para a realização de RT-qPCR, o cDNA de cada amostra foi diluído na proporção de 1:50 e foram utilizados 3uL desta diluição. As reações foram realizadas de acordo com o fabricante do Fast SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems). A análise da curva de *melting* foi realizada ao final de 40 ciclos pela aquisição de fluorescência, enquanto a temperatura foi aumentada gradativamente de 65°C a 95°C. Um único pico após análise da curva de *melting* confirmou a especificidade dos *primers*.

A eficiência média dos *primers* foi estimada, para cada tratamento, utilizando o software Miner (ZHAO; FERNALD, 2005). Este software quantifica os resultados do RT-qPCR com base na cinética da amplificação por PCR individualmente para cada amostra, sem a necessidade de uma curva padrão e independentemente de qualquer julgamento subjetivo, permitindo o cálculo direto de eficiência e C_T (*cycle threshold*) de cada reação (ARTICO et al., 2010). A análise e normalização da expressão dos genes foi realizada no software GenEx (<http://www.biomcc.com/genex-software.html>) com base na eficiência e no valor médio de C_T das replicatas gerados pelo Miner para determinar a diferença de expressão entre os tratamentos, planta sadia, planta inoculada com CaLas e planta inoculada com CaLam. Para normalização, foi calculada, pelo software, a variação

quantitativa de expressão dos genes selecionados a partir das vias do etileno e jasmonato relativo aos dois genes normalizadores, *TIP41* e *GAPDH*. Este software permite corrigir o nível de expressão com base na eficiência de cada primer, compensar as diferenças entre corridas pela normalização com calibradores entre placas, e a normalização com genes *housekeeping* (SCHAEFER; JUNG, 2010). Os valores obtidos de *fold change* dos genes foram submetidos às análises de comparação de médias, teste T de Student com intervalo de confiança de 95%, comparando plantas saudas às plantas infectadas com CaLas e, posteriormente, planta sadia com planta infectada com CaLam, dentro de cada tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Observações das plantas inoculadas com bactérias CaLam e CaLas

As plantas, mantidas em casa-de-vegetação, foram inoculadas no dia 14/09/09 e observadas diariamente. A primeira coleta, 7 d.a.i., foi realizada no dia 21/09/09 para ambos os genótipos, assim como a coleta de 30 d.a.i., que aconteceu no dia 14/10/09. Entretanto, o aparecimento de sintomas nas plantas inoculadas com CaLam foi mais lento, 29 meses, do que o observado em CaLas, 9 meses. A divergência entre o período de latência e a manifestação de sintomas pode estar associada à concentração da bactéria nas borbulhas (ramos laterais) originais, a eficiência da inoculação por enxertia e também a propagação da bactéria no interior da planta (MAFRA et al., 2013).

Os sintomas apresentados pelas plantas de *C. sinensis* foi bem característico, com presença de mosqueado assimétrico, espessamento de nervuras e cloroses semelhantes às deficiências nutricionais (Figura 6), enquanto *P. trifolita* não apresentou qualquer sintoma característico da doença.

Figura 6 - Plantas de *C. sinensis* (A-B) e *Poncirus trifoliata* (C ,D e E) infectadas com *Ca. Liberibacter* sp. em estágio de sintoma. A. Ramos com sintomas semelhantes a deficiência nutricional. B. Folhas com sintomas típicos de mosqueado e espessamento de nervuras e setores cloróticos. C, D e E. Ramos sem manifestação de sintomas

5.2 Análises moleculares e do perfil transcricional

A qualidade do RNA total, extraído segundo a metodologia descrita no item 4.2, foi avaliada em gel desnaturante de agarose 1,2% aplicando-se 5 uL de cada amostra a ser analisada (Figura 7). Nota-se a integridade do RNA total (seta), que se manteve após o tratamento com DNase para remover a contaminação com DNA (dado não mostrado).

Figura 7 - Padrão eletroforético de RNA total em gel desnaturante de agarose 1,2%, plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata*; ps - planta sadia, pi - planta infectada; os números representam as réplicas biológicas

Os primers utilizados neste trabalho foram validados por PCR convencional em plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata*. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 2% (figura 8) e aqueles que apresentaram apenas uma única amplificação para os dois genótipos tiveram seus amplicons sequenciados. A partir desta avaliação o *primer* foi considerado apto para as análises ou não.

Figura 8 - Padrão eletroforético dos amplicons visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. L (marcador molecular de 1Kb, 1 (DNA), 2 (cDNA), 3 (H₂O), A – E (primers validados – amplificação única)

5.3 Jasmonato

5.3.1 Genes envolvidos na biossíntese e metabolismo de Jasmonato

A síntese de JA é iniciada a partir de ácido α -linolênico que é oxidado pela 13-Lipoxigenase (LOX), formando o ácido 13(S)-hidroperóxi-octadecatrienóico (13(S)-HPOT). Este é metabolizado pela enzima óxido aleno sintase (AOS) e convertido a (9S, 13S)-OPDA (12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 1) pela ação da enzima óxido aleno ciclase (AOC). O OPDA é reduzido a 3-oxo-2-(2'[Z]-

pentanil)-ciclopentano-1-ácido octanóico (OPC-8) através de OPDA redutase 3 (OPR3), culminando com a formação de JA (KOMBRINK, 2012). Desta via inicial de biossíntese, foram avaliadas as expressões dos genes *lipoxigenase 2* (*LOX2*) e *óxido aleno ciclase 3* (*AOC3*). O gene *LOX2* codifica uma lipoxigenase de cloroplasto necessária para o acúmulo de ácido jasmônico induzido por ferimento em *A. thaliana* (BELL et al., 1995; BANNENBERG et al., 2008). Em *C. sinensis*, encontramos 11 transcritos para este gene, com *e-value* igual a 0.0. O gene *AOC3* codifica uma óxido aleno ciclase, cujo produto é uma enzima que também está envolvida na biossíntese de ácido jamônico, e tem sua expressão aumentada em folhas senescentes (STENZEL et al., 2012). Em *Arabidopsis*, existem quatro genes que codificam esta enzima (STENZEL et al., 2003), e em *C. sinensis*, de acordo com as análises *in silico* realizadas, encontramos apenas uma sequência com *e-value* de $2.7e-81$.

Destes genes, os perfis de expressão que merecem destaque são os de plantas inoculadas com CaLas, com 30 d.a.i em *C. sinensis*, onde observou-se aumento da expressão de *LOX2* em relação às plantas saudas e aos demais tratamentos; e 30 d.a.i. e sintoma em *P. trifoliata*, que mostrou uma redução gradativa na expressão em plantas infectadas com CaLas quando comparadas com 7 d.a.i. e plantas saudas. As plantas infectadas com CaLam com 7 d.a.i. apresentaram um pequeno aumento de expressão deste gene em relação às plantas saudas (Figura 9A). O perfil de expressão do gene *AOC3* permaneceu inalterado entre os tratamentos em relação à planta controle (Figura 9B).

Figura 9 - Perfil transcricional dos genes *LOX2* e *AOC3* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Como a infecção por CaLas é descrita como mais agressiva que a provocada por CaLam, o fato de se observar a indução da expressão de *LOX2* em plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLas (30 d.a.i) pode estar relacionado a este fato, pois nesta fase está acontecendo o estabelecimento da infecção na planta através do

fluxo de seiva pelos vasos recém formados do floema entre o porta-enxerto e o enxerto. É possível observar um discreto aumento na expressão nas plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLam, porém este não difere do apresentado pelas plantas saudas. Em *P. trifoliata*, pode-se observar um padrão de redução da expressão de *LOX2* nos dois tratamentos analisados em relação às plantas saudas, perfil que acontece em todos os genes avaliados para esta via, como será mostrado no decorrer deste trabalho.

Uma das formas derivadas do metabolismo do ácido jasmônico é o metil jasmonato (MEJA), que é catalisado pela enzima S-adenosyl-L-methyonina:jasmonic acid carboxyl methyl-transferase (*JMT*). Esta é uma forma volátil, que em *A. thaliana* é induzida por ferimento, resposta a patógeno ou por aplicação exógena de MEJA, e que possui função de sinalizador intra ou intercelular mediando a comunicação para respostas de defesa (SEO et al., 2001; SHAN et al., 2007; WU; BALDWIN, 2010). Por se tratar de uma enzima cuja expressão está atrelada ao acúmulo de seu substrato, a expressão do gene *JMT* foi selecionada como objeto deste estudo, com o valor de *e-value* de 8.2e-81. Na mineração no banco de dados do Phytozome, foi encontrada somente uma sequência para este gene.

Figura 10 - Perfil transcricional do gene *JMT* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Observa-se que somente as plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLas no estágio de aparecimento de sintomas apresenta aumento de expressão desse gene em relação à planta sadia. Como este gene está relacionado não somente à defesa, mas também à comunicação da planta entre si e suas células, o ligeiro aumento na expressão deste gene em plantas apresentando sintoma, infectadas com CaLas e CaLam (embora não haja diferença estatística significativa em relação à planta sadia), pode estar relacionado com a sinalização entre as plantas.

O mesmo perfil de expressão observado para os genes *upstream* da via do jasmonato, *LOX2* e *AOC3*, foi observado para este gene também. Embora os valores de expressão para plantas de *P. trifoliata* infectadas com CaLas sejam discretos em relação às plantas sadias, o perfil se manteve. Já em plantas infectadas com CaLam, os valores de expressão obtidos para este tratamento são bastante semelhantes ao longo da infecção e reduzidos pela metade quando comparados com os das plantas sadias. Conforme mencionado, esta enzima depende da presença do substrato para modular sua síntese, e com a redução da biossíntese de MEJA, era esperado encontrar uma redução na expressão deste gene.

5.3.2 Percepção e Sinalização da via de Jasmonato

Na sinalização por JA, as proteínas repressoras JAZ (Jasmonato-ZIM-DOMAIN) possuem papel central; quando na ausência de JA, essas proteínas se ligam ao fator de transcrição *MYC2* e inativam a sua expressão (PAUWELS; GOOSSENS, 2011). Entretanto, na presença de níveis aumentados de jasmonato isoleucina (JA-Ile) as proteínas JAZ interagem com a subunidade F-box *CO1* e são degradadas pelo proteossoma 26S (BARI; JONES, 2008; WANG et al., 2011; LYONS et al., 2013). A remoção das proteínas JAZ libera *MYC2* permitindo a transcrição do ativador da regulação da expressão dos genes de jasmonato, proporcionando uma resposta precoce da via, inclusive do próprio gene JA-Ile, sugerindo que acontece uma regulação negativa em ciclo na resposta de sinalização por JA (WANG et al., 2011).

O gene *MYC2* é um fator de transcrição 'basic-helix-loop-helix' (bHLH) que atua como um regulador mestre na via do jasmonato, coordenando as respostas de defesa antagonisticamente, determinando a resistência a pragas e patógenos. Este fator de transcrição é essencial na resistência sistêmica induzida por microrganismos simbiontes do solo e também é alvo dos agentes patogênicos na imunidade inata mediada por efetores nas raízes. O seu principal papel na defesa da planta talvez seja a regulação do crosstalk entre as vias de sinalização de jasmonato e de outros fitormônios como ácido abscísico, ácido salicílico, giberelina e auxina. Este gene também regula as interações entre jasmonato e a sinalização do fitocromo e relógio circadiano, formação de raízes laterais e adventícias, e o tempo de floração (ACOSTA; FARMER, 2010; KAZAN; MANNERS, 2012).

Figura 11 - Perfil transcricional dos genes JAZ2 e MYC2 em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Como se pôde observar nas plantas de *C. sinensis*, a expressão de JMT, gene que codifica enzima que atua na formação de MEJA, apresentou aumento somente no tratamento sintoma (Figura 10) e, considerando que, a expressão de JAZ2 está associada diretamente à ausência de jasmonato, espera-se que este

gene apresente uma redução na expressão nas plantas com sintomas de *C. sinensis* e uma maior expressão nas plantas 7 d.a.i., cujos níveis de expressão se apresentaram similares aos das plantas sadias. Observando a Figura 11A, nota-se que a expressão do gene *JAZ2* é maior em resposta a ambas as bactérias no tempo 7 d.a.i., quando comparada com as plantas sadias. Os demais tratamentos apresentaram uma pequena oscilação, entretanto os valores não diferem das plantas sadias. Em *P. trifoliata*, esperava-se que os tratamentos 30 d.a.i e sintoma apresentassem níveis de expressão de *JAZ2* maiores que os encontrados nas plantas sadias, uma vez que os valores de expressão de *JMT* nestes tratamentos são reduzidos, desencadeando a síntese de *JAZ2*, o que não ocorreu. O gene *MYC2* também não apresentou níveis de expressão significativos que pudessem ser avaliados como resposta das plantas à bactéria (Figura 11B).

5.4 Etileno

5.4.1 Biossíntese de Etileno

Presente em todos os organismos, a enzima S-adenosylmethionine synthetase (SAM1) atua como cofator em várias reações, sendo doadora de grupo metila para transmetilação de proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Em plantas, esta enzima é a molécula precursora na biossíntese do hormônio etileno, catalisando a reação de metionina em S-adenosilmetionina (PELEMAN et al., 1989). A S-adenosilmetionina serve de substrato para a ação da enzima ACC sintase, dando origem ao aminociclopropano-1-carboxílico que, por sua vez, é catalisado pela ACC oxidase, tendo como produto a formação do etileno (WU; BALDWIN, 2010). Em *A. thaliana*, esta enzima apresenta dois transcritos, enquanto em *C. sinensis* foram encontrados oito transcritos com e-value igual a 0.0.

Figura 12 - Perfil transcricional do gene *SAM1* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

O perfil transcricional apresentado por *SAM1* em *C. sinensis* não apresentou diferença estatística significativa em relação às plantas sadias; entretanto, pode-se notar um leve aumento da expressão desse gene com o passar do tempo no tratamento com CaLas. Em *P. trifoliata*, de maneira geral, a expressão desse gene apresentou clara redução em relação às plantas sadias para ambos os tratamentos, sendo essa tendência mais evidente no tratamento com CaLam.

5.4.2 Percepção e Sinalização da via de Etileno

A percepção de etileno ocorre por uma família de proteínas receptoras composta por cinco membros, *ERT1*, *ERS1*, *ETR2*, *ERS2* e *EIN4*, localizadas na membrana (ECKER, 1995; HUA et al., 1998). Em níveis basais de ET, os receptores de membrana suprimem a resposta de ET ativando o gene *downstream CTR1*, que atua como um regulador negativo de ET. O produto do *ETR1* é uma proteína semelhante às proteínas de transdução sensoriais em procariotos. Em *A. thaliana*, a mutação deste gene afetou a ligação e o metabolismo de outros hormônios, tais como auxina citocinina, ABA e ácido giberélico, e tornou a planta hipersensível à ação do etileno (QU; SCHALLER, 2004). Para esta planta, somente uma sequência

gênica dá origem ao seu produto, enquanto em *C. sinensis* foram encontrados 12 transcritos com *e-value* igual a 0.0.

O produto do gene *ERS1* modula negativamente na sinalização do receptor de *ETR1* (HALL et al., 2000). *A. thaliana* possui uma sequência que codifica este gene, enquanto *C. sinensis* possui 12 transcritos (*e-value* 0.0). Assim como *ETR1*, plantas com o gene *EIN4* mutado também apresentam hipersensibilidade ao etileno, o que implica que estes genes têm funções na sinalização de etileno (LIU; WEN, 2012). Em *A. thaliana* são encontrados dois transcritos para *EIN4*, enquanto para *C. sinensis* foram encontrados quatro transcritos com *e-value* igual a 0.0 e sete transcritos com *e-values* entre $1.5e-141$ a $2.0e-101$.

Figura 13 - Perfil transcricional dos genes *ETR1*, *ERS1* e *EIN4* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

De um modo geral, o perfil transcricional dos receptores de etileno *ETR1*, *ERS1* e *EIN4* apresentaram redução na expressão ou permaneceram em seus níveis basais, independentemente do tratamento. Somente as plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLam no tratamento sintoma e as plantas infectadas com CaLas aos 7 d.a.i. tiveram seus valores de expressão aumentados para os genes *ERS1* e *EIN4*. Estes dados indicam que, ao menos para estes transcritos, não está ocorrendo a repressão da síntese de etileno nos tempos avaliados.

CTR1 consiste em uma proteína com domínio único de regulação N-terminal e um domínio C-terminal serina/treonina quinase, e, por isto, é semelhante à sequência da proteína quinase da família Raf, que lhe confere a função de uma proteína ativada por MPKKK. *Downstream* a *CTR1* está o regulador positivo da sinalização de ET, *EIN2* (ALONSO et al., 2003). Quando ocorre a ligação do ET aos seus receptores de membrana, a supressão de *CTR1* é atenuada favorecendo a ativação de um grupo diversificado de fatores de transcrição responsivos a ET que agem *downstream* de *EIN2*, incluindo *EIN3* e *EIL1* (WANG et al., 2002). As proteínas de ligação F-box *EBF1/2* regulam os níveis de *EIN3*; quando os níveis de ET são baixos *EBF1/2* reprimem *EIN3*. *EIN3* e *EIL1* são membros de uma família de fatores de transcrição multigênica e são importantes na indução de genes *downstream*

responsivos a ET, incluindo genes de defesa (WU; BALDWIN, 2010; GIMENEZ-IBANEZ; SOLANO, 2013).

Figura 14 - Perfil transcricional do gene *CTR1* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Há dois transcritos de *CTR1* em *A. thaliana*, e encontramos 10 transcritos em *C. sinensis* (*e-value* 0.0). Foi possível observar, em plantas de *P. trifoliata*, redução ou manutenção dos níveis basais de expressão dos receptores de etileno *ETR1*, *ERS1* e *EIN4*. Este padrão de expressão refletiu na expressão de *CTR1*, sendo que os valores para todos os tempos, independentemente da espécie de bactéria que infectou a planta, foram superiores aos obtidos nas plantas saudáveis.

Figura 15 - Perfil transcricional dos genes *EIN2*, *EIN3* e *EIL1* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Os fatores de transcrição *EIN2*, *EIN3* e *EIL1* são representados, em *A. thaliana*, por somente uma sequência nucleotídica cada. Em *C. sinensis*, este panorama muda, sendo que *EIN2* possui seis transcritos; *EIN3*, 15 transcritos e *EIL1*, nove transcritos (*e-value* 0.0 para todos). Nota-se que as plantas de *P. trifoliata* infectadas com CaLas no tempo sintoma apresentaram redução na expressão destes transcritos de fatores de transcrição. Para o gene *EIN2*, as plantas de *C. sinensis* nas mesmas condições também apresentaram redução na expressão.

5.5 Reguladores da transcrição sinalizada por Jasmonato e Etileno

5.5.1 Fatores de transcrição da família ERF

O gene ERF/AP2 constitui uma família de fatores de transcrição específicos de plantas que possuem importante papel na regulação de respostas a estresses abióticos. Os fatores de transcrição ERF compõem uma subfamília dentro do grupo ERF/AP2 e estão envolvidos em respostas de resistência nas plantas (GUTTERSON; REUBER, 2004).

Os hormônios vegetais ET e JA podem induzir a superexpressão dos fatores de transcrição ERF. Como a indução de ERF1 depende da interação sinérgica entre ET e JA, deduz-se que este seja o ponto de crosstalk entre estas vias hormonais (LORENZO et al., 2003; ONKOKESUNG et al., 2010, ZANDER et al., 2010).

A especificidade dos fatores de transcrição ERF em ativar ou reprimir genes específicos de resposta de defesa faz com que a planta economize energia, ajustando a sua resistência de acordo com o tipo de estresse biótico sofrido (BROEKAERT et al., 2006).

Figura 16 - Perfil transcricional dos genes *ERF1*, *ERF2* e *ERF/AP2* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Os genes ERF respondem de forma diferente, tanto em resposta ao etileno, como também a várias formas de estresse abiótico. Os genes *ERF1* e *ERF2* são induzidos por etileno 12 horas após o tratamento, e em *A. thaliana*, a resposta se dá em 2 horas. Sendo assim, estes genes podem ativar suas expressões mais tardiamente em resposta ao etileno (ZANDER et al., 2010). Entretanto, a respostas

dos genes ERF a estresses abióticos pode ocorrer muito mais rapidamente, não dependendo da via do etileno para sua ativação. Sendo assim, a expressão dos genes ERF parece ser controlada por uma via complexa, que pode ou não ser dependente do sinal de transdução de etileno (OHME-TAKAGI et al., 2000)

Pode-se observar que as expressões dos genes *ERF1* e *ERF2* foram aumentadas em plantas de *P. trifoliata* infectadas com CaLam no tempo sintomas. O mesmo pode-se observar para o gene *ERF2* em plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLas aos 30 d.a.i. O fator de transcrição *ERF/AP2* apresentou valores de expressão aumentados nas plantas de *C. sinensis* com 30 d.a.i., independentemente da espécie de bactéria que estava causando a infecção na planta.

5.5.2 Proteínas kinases ativadas por mitógenos - MAPkinases

MAPK são proteínas cuja função é coordenar respostas celulares a uma diversificada gama de estímulos como mitógenos, estresse osmótico e choque térmico. Estão envolvidas também na diferenciação, divisão, sobrevivência e morte celular, além disso, possuem papel importante na indução da expressão gênica (SUAREZ RODRIGUEZ et al., 2010).

Estudos com as plantas modelo *Nicotiana* spp. e *A. thaliana* evidenciaram importante papel das MAPK na sinalização das plantas a variados tipos de estresse, principalmente os bióticos (WU et al., 2007).

Trabalhando com *A. thaliana*, Takahashi e colaboradores (2007) constataram que *MKK3* e *MAPK6* ativadas por JA regulam negativamente *MYC2* que podem expressar ou reprimir genes de biossíntese de JA. Outra via de ativação da cascata de *MKK3/MAPK6* requerida é independente de *MYC2* fazendo com que *MKK3/MAPK6* exerça ação inibitória sobre *MYC2*.

Figura 17 - Perfil transcricional do gene *MAPK6* em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Nos tempos de tratamento propostos neste trabalho, o gene *MAPK6* apresentou diferença na expressão somente em plantas de *C. sinensis* com 30 d.a.i. para ambas as bactérias; para as demais, seu nível de expressão foi similar ao das plantas saudáveis. Como este gene é descrito como induzido por patógenos, biossíntese de etileno e estresses osmóticos e oxidativos, sugere-se que a resposta de expressão avaliada neste experimento seja pela presença do patógeno. Este gene apresenta 14 isoformas em *C. sinensis*.

5.6 Proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas - PR)

O estresse biótico e abiótico leva à formação de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR), que são excelentes marcadores moleculares para expressão de resistência em plantas. Podem ser acumuladas de forma local ou sistêmica, algumas possuem expressão constitutiva e outras são induzidas. São distribuídas em 17 grupos, da PR-1 à PR-17, de acordo com suas propriedades bioquímicas e fisiológicas (BAI et al., 2013).

A atividade antifúngica e antibacteriana de algumas proteínas PR como as quitinases, glucanases e proteínas que se ligam à quitina induzem a degradação da

parede celular de micro-organismos, inibindo o seu desenvolvimento (ZAREIE et al., 2002).

A PR-4 é uma dessas quitinases com função antifúngica, induzida por patógeno ou ferimento, é ativada tanto pela via de sinalização por ácido salicílico como ácido jasmônico (BAI et al., 2013).

Figura 18 - Perfil transcricional do gene PR4 em resposta à infecção pelas bactérias CaLas e CaLam em *C. sinensis* e *P. trifoliata*, respectivamente

Mafra e colaboradores (2013), analisando as alterações causadas por CaLam em plantas de *C. sinensis* ao nível transcricional, observaram que o gene *PR-4* foi induzido mais de dez vezes em relação às plantas saudáveis. Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, este perfil de expressão pode ser visualizado nas plantas de *C. sinensis* com sintomas, independente da bactéria que a infecta, diferentemente de *P. trifoliata*, cuja expressão se mostrou reprimida em todos os tempos para as plantas infectadas com CaLam, sugerindo que *P. trifoliata* possa ativar outra proteína PR em resposta à infecção.

5.7 *Crosstalk* entre as vias hormonais

Os hormônios vegetais na maioria das vezes atuam em conjunto para uma resposta de defesa mais específica e eficiente. O *crosstalk* entre JA e ET com frequência ocorre sinergisticamente e em resposta a patógenos necrotróficos (BROEKAERT et al., 2006).

Os fatores de transcrição MYC e ERF estão associados à via da sinalização por JA em *Arabidopsis*, MYC está relacionado com respostas a ferimentos e à herbivoria, enquanto os fatores de transcrição ERF estão relacionados às respostas de defesa a patógenos necrotróficos (BERROCAL-LOBO et al., 2002; LORENZO et al., 2003, 2004; DOMBRECHT et al., 2007). As vias de JA e ET regulam sinergisticamente os fatores de transcrição ERF, mas os fatores de transcrição MYC são normalmente regulados antagonicamente (LORENZO; SOLANO, 2005).

Estudos recentes demonstraram que proteínas JAZ interagem diretamente com fatores de transcrição responsivos ao ET, *EIN3* e *EIL1*, reprimindo-os através do recrutamento do co-repressor transcricional *HDA19* (HISTONE DEACETYLASE19). Na presença do ET, *EIN3* e *EIL1* têm sua expressão restabelecida e a presença de JA libera estes fatores de transcrição da repressão, permitindo a plena atividade destes (ZHOU et al., 2005).

Essa repressão causada pelas proteínas JAZ, impedindo que *EIN3* e *EIL1* liguem-se ao DNA, evidencia a interação em nível transcricional entre as vias de ET e JA, resultando na ativação sinérgica de *ERF1* e seus genes-alvo *downstream* (ZHU et al., 2011).

Os fatores de transcrição *EIN3* e *EIL1* são sabidamente repressores do gene *SID2* (SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2) que codifica para uma isocorismato sintase (ISOCHORISMATE SYNTHASE – ICS), importante enzima da biossíntese de ácido salicílico (SA). Possivelmente, as proteínas repressoras JAZ interajam no *crosstalk* antagônico entre JA e SA, pois ao reprimir *EIN3* e *EIL1* o gene *SID2* é expresso, induzindo a biossíntese de SA (CHEN et al., 2009).

Assim, aparentemente, a infecção causada pelas bactérias CaLas e CaLam em plantas cítricas e gêneros afins causa um forte desequilíbrio no *crosstalk* entre as vias hormonais sinalizadas por SA, JA e ET. Fato este que pôde ser observado entre os dados aqui obtidos e os dados obtidos por outros autores.

Com um trabalho complementar a este, Oliveira (2013), analisou a via sinalizada por SA em plantas de *C. sinensis* e *P. trifoliata* infectadas com CaLas ou CaLam não identificando níveis significativos de expressão gênica para esta via que, indicassem a sua ativação na infecção por estas bactérias em resposta de resistência ao HLB.

Kim e colaboradores (2009), analisando as alterações na expressão gênica de plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLas através da tecnologia de microarranjos, encontraram 19 genes relacionados a hormônios vegetais. Os genes da via de etileno, *ERF1* e *ERF2* foram *up-regulated* enquanto que os genes envolvidos na via de jasmonato não foram significativamente expressos. Este estudo sugeriu que um desequilíbrio hormonal possa contribuir para o desenvolvimento de sintomas característicos da doença, como florescimento precoce, deformação e folhas e frutos e abortamento de sementes e que a via de jasmonato não está influenciando as respostas do hospedeiro à infecção.

Plantas de *C. sinensis* infectadas com CaLam foram analisadas por Mafrá et al., (2013), através da técnica de microarranjos e foi observado que genes da via de JA como, *LOX2*, *AOC3*, *JMT* e *JAZ2* apresentaram expressão gênica diferencial em relação às plantas controle não inoculadas. Os genes de biossíntese e metabolismo de JA, *LOX2* e *JMT*, respectivamente, foram superexpressos em relação ao controle não inoculado. Os fatores de transcrição *ERF-AP2*, *ERF1* e *ERF-B4*, que fazem parte do *crosstalk* com a via sinalizada por ET, exibiram expressão algumas vezes maiores que o controle. Estes resultados propõem a ativação tardia das vias de JA e ET, não sendo mais possível respostas de defesa eficientes. Os dados obtidos por este grupo divergem dos dados aqui obtidos, que sugerem que o antagonismo entre estas vias hormonais impedem que a planta responda à infecção ativando genes de respostas de resistência.

Martinelli e colaboradores (2013) analisando folhas e frutos de citros infectados com CaLas a fim de avaliar as variações metabólicas ocasionadas pela presença da bactéria, observaram que o gene *JMT*, responsável pela formação de MEJA, foi induzido em folhas jovens, mas em frutos maduros essa expressão foi menor. Não houve diferenças significativas na transcrição dos genes *SCF^{COI}*, *JAZ*, *MYC2*, *ERF1*, apesar de em todos os tecidos analisados, especialmente em frutos maduros, vários genes de defesa responsivos a JA terem sido aparentemente regulados pela presença da bactéria. A interação do HLB com as vias hormonais

não está elucidada, segundo estes autores possivelmente a regulação positiva de genes de biossíntese de JA possa estar perturbando a resposta de SA, considerando que esta via é ativada para defesa de patógenos biotróficos, o que poderia explicar a infecção crônica causada pela bactéria. No presente trabalho estes genes também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, concordando com a ideia de que as bactérias *Ca. Liberibacter* causam um estado de perturbação na planta o qual a impede de coordenar as vias hormonais para respostas de defesa.

Na avaliação de expressão gênica de plantas de *C. sinensis* em resposta à infecção por CaLas comparadas com plantas sadias não infectadas não houve indução significativa de genes relacionados com a defesa em estágio precoce da doença, 5-9 semanas após a inoculação; no entanto, os genes *ERF1* e *JMT* apresentaram indução menor que três vezes e uma endoquitinase básica geralmente associada ao JA e à resistência sistêmica dependente de ET foi reprimida neste estágio da doença, sugerindo que a planta é incapaz de suprimir o patógeno, resultando numa interação compatível. No estágio mais tardio da doença, onde os sintomas apresentados são mais evidentes, a *LOX2* obteve uma indução com níveis significativos (ALBRECHT; BOWMAN, 2008). Neste trabalho foi possível também perceber que as vias de defesa hormonais sinalizadas por jasmonato e etileno são alteradas durante a infecção, mas, essas expressões geralmente não são significativas a ponto de gerar resistência na planta.

Numa análise comparativa entre transcriptoma e proteoma de *C. sinensis* infectado com CaLas, uma lipoxigenase foi diferencialmente expressa, significativamente induzida, indicando a produção de substâncias antimicrobianas, tais como ácido linoleico, ácido α -linolênico ou JA, que são compostos envolvidos com a defesa das plantas. Os dados obtidos desta análise sugerem que respostas de defesa são ativadas ao menos na fase final da infecção por CaLas (FAN et al., 2011). Esses dados contrariam os resultados obtidos neste experimento, mas, a quantidade de isoformas deste gene presentes em citros poderia explicar essa divergência. No presente trabalho foi analisada apenas uma isoforma do gene *LOX2* e esta foi selecionada com base na similaridade entre citros e *Arabidopsis*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apurados neste trabalho evidenciaram que as bactérias *Ca. Liberibacter* spp. causam alterações no perfil de expressão de genes das vias sinalizadas por etileno e jasmonato.

Perfis de expressão distintos são observados em cada estágio da infecção, o que sugere que a planta faz várias tentativas de se defender, ativando alguns genes das vias sinalizadas por etileno e jasmonato.

No entanto, assim como anteriormente apresentado para a via do ácido salicílico, também não foi possível comprovar a importância das vias de etileno e jasmonato na resposta diferencial de genótipos suscetível e resistente/ tolerante de citros ao HLB.

REFERÊNCIAS

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, JR, M.E. Ethylene and plant biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, cap. 5, p. 120-181, 1992.
- ACHOR, D.S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Citrus Affected with *Huanglongbing* Disease. **Plant Pathology Journal**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 56-64, 2010.
- ACOSTA, I.F.; FARMER, E.E. Jasmonates. In: The Arabidopsis book. **American Society of Plant Biologists**, Lancaster, v. 8, p. 1-13, 2010.
- ADIE, B.; CHICO, J.M.; RUBIO-SOMOZA, I.; SOLANO, R. Modulation of plant defenses by ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, n. 2, p. 160-177, jun. 2007.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing *Huanglongbing* in Florida. **Plant Science**, Limerick, v. 175, n. 3, p. 291-306, 2008.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to *huanglongbing*. **HortScience**, Alexandria, v. 46, n. 1, p. 16-22, Jan. 2011.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, Clare, v.185/186, p. 118-130, Out. 2012.
- ALONSO, J.M.; STEPANOVA, A.N.; SOLANO, R.; WISMAN, E.; FERRARI, S.; AUSUBEL, F.M.; ECKER, J.R. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Hanover, v. 100, n. 5, p. 2992-2997, Dec. 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- ARAÚJO, G.S. **Mudanças nas relações contratuais na citricultura: um estudo de caso.** 2006. 206p. Dissertação (Engenharia de produção) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- ARITUA, V.; ACHOR, D.; GMITTER, F.G.; ALBRIGO, G.; WANG, N. Transcriptional and Microscopic Analyses of Citrus Stem and Root Responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* Infection. **PloS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73742, Sept. 2013.

ARTICO, S.; NARDELI, S.M.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-SA, M.F.; ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, Chichester, v. 10, n. 49, p. 1-12, Mar. 2010.

AUBERT, B. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citricultura in Ásia and África. **Proceedings of the International Society of Soil Science - Citriculture**. Wageningen, Holanda, p. 817-820, 1992.

AUBERT, B. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwaiama (Homoptera: Psylloidea) the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Paris, v. 42, n. 3, p. 149-162, 1987.

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

AUBERT, B.; GARNIER, M.; GUILLAUMIN, D.; HERBAGYANDONO, B.; SETIOBUDI, L.; NURHADI, F. Greening, a serious threat for the citrus productions of the Indonesian Archipelago: Future prospects of integrated control. **Fruits**, Paris, v. 40, p. 549-563, 1985.

BAI, S.; DONG, C.; LI, B.; DAI, H. A PR-4 gene identified from *Malus domestica* is involved in the defense responses against *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 62 p. 23-32, Nov. 2012.

BALLARÉ, C.L. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 249-257, may. 2011.

BANNENBERG, G.; MARTÍNEZ, M.; HAMBERG, M.; CASTRESANA, C. Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Lipids**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 85-95, Feb. 2009.

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

BARNA, B.; FODOR, J.; HARRACH, B. D.; POGÁNY, M.; KIRÁLY, Z. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 59, p. 37-43, Oct. 2012.

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

BELASQUE JUNIOR, J.; BARBOSA, J.C.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição do *Huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.1-9, 2010.

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

BELL, E.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 19, p. 8675-8679, 1995.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 23-32, jan. 2002.

BORGES, A.C.G.; COSTA, V.M.H.M. A evolução do agronegócio citrícola paulista e o perfil da intervenção do estado. **Revista Uniara**, Araraquara, v. 17, n. 18, p. 101-123, 2006.

BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; CRISTOFANI-YALI, M.; MALOSSO, A.; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, p. 85-91, 2010.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 99-109, 1999.

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

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

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

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

BOVÉ, J.M.; TEIXEIRA, D.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD S.; SAILLARD, C.; BASSANEZI, R.B.; LOPES, S.A.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J. Several *Liberibacter* and *Phytoplasma* species are individually associated with HLB. In: THE INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON *HUANGLONGBING*, 2008. Orlando. **Proceedings...** Orlando, 2008. p.152-155

BOYD, L.A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D.M.; LEACH, J.E.; LEUNG, H. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, London, v. 29, n. 4, p. 233-240, Apr. 2013.

BROEKAERT, W.F.; DELAURÉ, S.L.; DE BOLLE, M.F.; CAMMUE, B.P. The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 393-416, Mar. 2006.

BU, Q.; JIANG, H.; LI, C.B.; ZHAI, Q.; ZHANG, J.; WU, X.; LI, C. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. **Cell Research**, New York, v. 18, n. 7, p. 756-767, Apr. 2008.

CARAZZOLLE, M.F.; FORMIGHIERI, E.F.; DIGIAMPIETRI, L.A.; ARAUJO, M. R.; COSTA, G.G.; PEREIRA, G.A. Gene projects: A genome Web tool for ongoing mining and annotation applied to CitEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3 Suppl, p. 1030-1036, 2007.

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

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; FUTCH, D.B.; SHILTS, T.; FOLIMONOVA, S.Y.; REYES-DE-CORCUERA, J.I. GC–MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus huanglongbing. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 53, p. 69-76, Apr. 2012.

CHEN, Y.F.; GAO, Z.; KERRIS III, R.J.; WANG, W.; BINDER, B.M.; SCHALLER, G.E. Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. e8640, Jan. 2010.

CHRISTIANSEN, M.W.; HOLM, P.B.; GREGERSEN, P.L. Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. **BMC Research Notes**, Chichester, v. 4, n. 1, p. 302, Aug. 2011.

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

COLLETA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D. ; POMPEU JÚNIOR, J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of *huanglongbing* '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1.382-1.383, Dec. 2004.

CONG, Q.; KINCH, L.N.; KIM, B.H.; GRISHIN, N.V. Predictive sequence analysis of the *Candidatus* Liberibacter asiaticus proteome. **PloS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e41071, Jul. 2012.

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

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

CRISTINA, M.S.; PETERSEN, M.; MUNDY, J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 621-649, Feb. 2010.

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

DA GRAÇA, J.V. Biology, history and world status of *huanglongbing*. Memorias del Taller Internacional sobre el *Huanglongbing* y el Psílido asiático de los cítricos. **Hermosillo**, Sonora. México, p. 1-7, 2008.

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

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

DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.R.; VAN POECKE, R.M.; VAN PELT, J.A.; POZO, M.J.; MUELLER, M.J.; PIETERSE, C.M. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 9, p. 923-937, Sept. 2005.

DERKSEN, H.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Signaling cross-talk in plant disease resistance. **Plant Science**, Clare, v. 207, p. 79-87, Jun. 2013.

DEVOTO, A.; TURNER, J. G. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. **Annals of Botany**, London v. 92, n. 3, p. 329-337, jul. 2003.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews - Genetics**, London, v. 11, n. 8, p. 539-548, Aug. 2010.

DOES, D. van der; LEON-REYES, A.; KOORNNEEF, A.; VAN VERK, M.C.; RODENBURG, N.; PAUWELS, L.; PIETERSE, C.M. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCF^{COI1}-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 2, p. 744-761, Feb. 2013.

DOMBRECHT, B.; XUE, G.P.; SPRAGUE, S.J.; KIRKEGAARD, J.A.; ROSS, J.J.; REID, J.B.; KAZAN, K. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 7, p. 2225-2245, 2007.

DONADIO, L.C.; MOURÃO F.A.A.F.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J.; PIO, R.M.; POMPEU Jr., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo;FUNDAG, 2005. p.3-18.

DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D.G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; GOTTWALD, T. Complete genome sequence of citrus *huanglongbing* bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 8, p. 1011-1020, Aug. 2009.

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

ECKER, J.R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, Washington, DC, v. 268, n. 5211, p. 667-675, May. 1995.

EMBRAPA. Considerações sobre a produção de laranja no Estado de São Paulo. Cruz das Almas. 22p. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Citricultura/35RO/35%C2%AA%20RO_%20Citricultura_Embrapa%20parte%203.pdf>. acesso em: 18 dez. 2013.

ESASHI, Y. Ethylene and seed germination. In: MATTOO, A.K.; SUTTLE, J.C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.133-157.

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

FAO. FAO Statistical Yearbook 2013 - World food and agriculture. (F. and A. O. of U. Nations, Ed.) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 02 dez 2013.

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

FOLIMONOVA, S.Y.; ACHOR, Diann S. Early events of citrus greening (*Huanglongbing*) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 9, p. 949-958, Sept. 2010.

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

FORCAT, S.; BENNETT, M.H.; MANSFIELD, J.W.; GRANT, M.R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA, and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, Chichester, v. 4, n. 16, p. 1-8, Jun. 2008.

GARCIA-BRUGGER, A.; LAMOTTE, O.; VANDELLE, E.; BOURQUE, S.; LECOURIEUX, D.; POINSSOT, B.; PUGIN, A. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 7, p. 711-724, Jul. 2006.

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

GIMENEZ-IBANEZ, S.; SOLANO, R. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. **Frontiers in Plant Science**, cidade, v. 4, n. 72, p. 1-11, Apr. 2013.

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

GOODSTEIN, D.M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R.D.; FAZO, J.; ROKHSAR, D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. D1, p. D1178-D1186, 2012.

GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.

GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, St. Paul, v. 6, 2007.

GOTTWALD, T. R.; IREY, M. S.; GAST, T.; PARNELL, S. R.; TAYLOR, E. L.; HILF, M. E. Spatio-temporal Analysis of an HLB Epidemic in Florida and Implications for Spread. In: **Proceedings, 17 th Conference IOCV, Insect-Transmitted Prokaryotes**, Riverside, p. 84-97, may, 2010.

GURURANI, M.A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C.P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S.K.; PARK, S.W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 78, p. 51-65, Apr. 2012.

GUTTERSON, N.; REUBER, T. L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 465-471, ago. 2004.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.; RAMADUGU, C.; LEE, R.F. Incidence of *Huanglongbing*-Associated '*Candidatus Liberibacter Asiaticus*' in *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*) Collected from Plants for Sale in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, n. 3, p. 617-624, Sept. 2012.

HALBERT, S.E.; MANJUNATH, K.L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: *Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 330-353, Sept. 2004.

HALL, A.E.; FINDELL, J.L.; SCHALLER, G.E.; SISLER, E.C.; BLEECKER, A.B. Ethylene perception by the *ERS1* protein in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 123, n. 4, p. 1449-1458, Jan. 2000.

HARTMANN, H. Hartmann & Kester's - Plant Propagation: Principles and Practices (8th). 2001. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:HARTMANN+AND+KESTER'+S+PLANT+PROPAGATION+-+Principles+and+Practice#0>. Acesso em: 23 set 2013.

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

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA, M.; PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, Gembloux, v. 16, n. 2, p. 257-268, Jun. 2012.

HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 271-290, Sept. 1989.

HUA, J.; SAKAI, H.; NOURIZADEH, S.; CHEN, Q.G.; BLEECKER, A.B.; ECKER, J. R.; MEYEROWITZ, E.M. *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 8, p. 1321-1332, Aug. 1998.

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

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, n. 16, p. 323-329, 2006.

KADER, A.A. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. **HortScience**, Alexandria, v. 20, p.54-57, 1985.

KATSIR, L.; CHUNG, H. S.; KOO, A. J.; HOWE, G. A. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 4, p. 428-435, Aug. 2008.

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

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 283-307, 1993.

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

KOCH, T.; KRUMM, T.; JUNG, V.; ENGELBERTH, J.; BOLAND, W. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. **Plant Physiology**, Washington, v. 121, n. 1, p. 153-162, Sept.1999.

KOMBRINK, E. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. **Planta**, Switzerland, v. 236, n. 5, p. 1351-1366, Jun. 2012.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C.M.J. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 3, p. 839-844, Mar. 2008.

KUMAGAI, L.B.; LeVESQUE, C.S.; BLOMQUIST, C.L.; MADISHETTY, K.; GUO, Y.; WOODS, P.W.; ROONEY-LATHAM, S.; RASCOE, J.; GALLINDO, T.; SCHNABEL, D.; POLEK, M. First Report of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Associated with *Citrus Huanglongbing* in California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 2, p. 283-283, Feb.. 2013.

KUNTA, M.; da GRAÇA, J.V.; MALIK, N.S.; LOUZADA, E.S.; SÉTAMOU, M. Quantitative Distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the Aerial Parts of the *Huanglongbing*-infected *Citrus* Trees in Texas. **HortScience**, Alexandria, v. 49, n. 1, p. 65-68, Jan. 2014.

LAMESCH, P.; BERARDINI, T.Z.; LI, D.; SWARBRECK, D.; WILKS, C.; SASIDHARAN, R.; HUALA, E. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. D1, p. D1202-D1210, 2012.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA FILHO; H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU, JR., J. (Org.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, p.509-564, 2005.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAM, H.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v.23, n.21, p.2947–2948, 2007.

LEE, H.A. The relation of stocks to mottled leaf of citrus trees. **Philippine Journal of Science**, Manila, v. 18, p. 85-95, 1921.

LEON-REYES, A.; DOES, D. van der; DE LANGE, E.S.; DELKER, C.; WASTERACK, C.; VAN WEES, S.C.; PIETERSE, C.M. Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. **Planta**, New York, v. 232, n. 6, p. 1423-1432, Nov. 2010.

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

LI, W.; LI, D.; TWIEG, E.; HARTUNG, J.S.; LEVY, L. Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 6, p. 854-861, Jun. 2008.

LIN, H.; CHEN, C.; DODDAPANENI, H.; DUAN, Y.; CIVEROLO, E.L.; BAI, X.; ZHAO, X. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus *Huanglongbing*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 17-25, Apr. 2010.

LIU, Q.; WEN, C.K. *Arabidopsis ETR1* and *ERS1* differentially repress the ethylene response in combination with other ethylene receptor genes. **Plant Physiology**, Washington, v. 158, n. 3, p. 1193-1207, Jan. 2012.

LORENZO, O.; CHICO, J.M.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 7, p. 1938-1950, Jul. 2004.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 1, p. 165-178, Jan. 2003.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.8, p.532-540, 2005.

LÜ, B.B.; LI, X.J.; SUN, W.W.; LI, L.; GAO, R.; ZHU, Q.; DONG, H.S. AtMYB44 regulates resistance to the green peach aphid and diamondback moth by activating *EIN2*-affected defences in *Arabidopsis*. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 15, n. 5, p. 841-850, Sept. 2013.

LYONS, R.; MANNERS, J.M.; KAZAN, K. Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 815-827, Mar. 2013.

MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. "Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com Clorose Variegada dos Citros." **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.

MACHADO, M.A.; LOCALI-FABRIS, E.C.; COLETTA-FILHO, H.D. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do *Huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.25-35, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, J.M.; CLARK, D.P. Bacteria: Gram-positive and other bacteria. In: _____ (Org.). **Brock**: Biology of microorganisms. 12th ed. Pearson Education, San Francisco, p. 65-73, 2007.

MAFRA, V.; KUBO, K.S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R.M.; BOAVA, L.P.; MACHADO, M.A. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31263, Feb. 2012.

MAFRA, V.; MARTINS, P.K.; FRANCISCO, C.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 247, Apr, 2013.

MARTINELLI, F.; REAGAN, R.L.; URATSU, S.L.; PHU, M.L.; ALBRECHT, U.; ZHAO, W.; DANDEKAR, A.M. Gene regulatory networks elucidating Huanglongbing disease mechanisms. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74256, 2013.

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

MASSARI, C.A.; BELASQUE JR, 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.

MATA, A.P.; GUEDES, C.A.B.; BARRADAS, C.A.A.; CARVALHO, C.H.M. de; ALMEIDA, C.R.G. de; ANDREAZZI, M.A.R. de; SILVA FILHO, V.L. da. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Agrícola, p. 76, set. 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201209.pdf>. Acesso em: 24 nov 2013.

McCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. **South African Journal of Agricultural Science**, Pretoria, v. 8, n. 1, p. 297-298, 1965a.

McCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. Greening disease of the sweet orange: evidence that it is caused by a transmissible virus. **South African Journal of Agricultural Science**, Pretoria, v. 8, n. 1, p. 253-275, 1965b.

McCLEAN, A.P.D.; SCHWARZ, R.E. Greening of blotchy-mottle disease of citrus. **Phytopathologica**, Pretoria, South Africa, v. 2, n.3, p. 177-194, 1970.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 431-450, Feb.. 2012.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU, JR., J. (Org.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.567-604.

MUR, L.A.; PRATS, E.; PIERRE, S.; HALL, M.A.; HEBELSTRUP, K. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defence pathways. **Frontiers of Plant Science**, New Haven, v. 4, n. 215, p. 1-7, Jun. 2013.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. Markestrat, Ribeirão Preto, 137p. 2010.

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

NWUGO, C.C.; DUAN, Y.; LIN, H. Study on *Citrus* Response to *Huanglongbing* Highlights a Down-Regulation of Defense-Related Proteins in Lemon Plants Upon 'Ca. Liberibacter asiaticus' Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e67442, Jun. 2013.

OHME-TAKAGI, M.; SUZUKI, K.; SHINSHI, H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 41, n. 11, p. 1187-1192, Nov. 2000.

OLIVEIRA, T.S. **Expressão de genes da via do ácido salicílico em resposta à infecção por *Candidatus Liberibacter* spp, agente do *Huanglongbing* dos citros**. 2013, 104 p. Dissertação (Genética vegetal e melhoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ONKOKESUNG, N.; BALDWIN, I.T.; GÁLIS, I. The role of jasmonic acid and ethylene crosstalk in direct defense of *Nicotiana attenuata* plants against chewing herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, n. 10, p. 1305-1307, Oct.. 2010.

PARANÁ (estado). SEAB–Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento/DERAL-Departamento de Economia Rural. Fruticultura - Análise da Conjuntura Agropecuária, safra 2012/13, dez. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf>. Acesso em: 12 dez 2013.

PAUWELS, L.; GOOSSENS, A. The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 9, p. 3089-3100, Sept. 2011.

PELEMAN, J.; BOERJAN, W.; ENGLER, G.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J.; ALLIOTTE, T.; INZÉ, D. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. **The Plant Cell**, Rockville, v. 1, n. 1, p. 81-93, Jan. 1989.

PENNINCKX, I.A.; THOMMA, B.P.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.P.; BROEKAERT, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v.10, p. 2103–2113, 1998.

PEREIRA, F.M.V.; MILORI, D.M.B.P.; VENÂNCIO, A.L.; RUSSO, M.S.T.; MARTINS, P.K.; FREITAS-ASTÚA, J. Evaluations of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy and chemometric tools. **Talanta**, London, v. 83, p. 351-356, 2010.

PIETERSE, C.M.; DOES, D. van der; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S.C. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 489-521, May. 2012.

PIETERSE, C.M.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, A.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 277-319, 2005.

PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.12 n.12, p. 564-569, Dec. 2007.

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

PINTO, M.S.T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E.A.G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre v. 9, n. 2, p. 241-248, Apr-Jun. 2011.

QU, X.; SCHALLER, G.E. Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor *ETR1*. **Plant Physiology**, Washington, v. 136, n. 2, p. 2961-2970, Oct. 2004.

RAMOS FILHO, L.O. **O papel da pesquisa científica e tecnológica no desenvolvimento da Citricultura paulista**: análise histórica da situação do Instituto Agrônomo de Campinas (1920-1960). 1999. 123p. Dissertação (Política Científica e Tecnológica) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

REINKING, O.A. diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agriculturist**, Los Banos, v. 8, n. 4, p. 109-134, Nov. 1919.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, Apr. 2003.

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Spring Harbor, New York, v.1, cap. 7, p. 7.1-7.94, 2001. 2001.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 5, p. 301-307, Apr. 2009.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defence responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.11655–11660, 2000.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P.C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 451-482, Feb. 2012.

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, P.; THAVEECHAI, N.; POSTINIKOVA, E. Cultivation of '*Candidatus* L. Africanus' and '*Candidatus* L. Americanus' associated with *Huanglongbing*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 480-486, May. 2009.

SEO, H.S.; SONG, J.T.; CHEONG, J.J.; LEE, Y.H.; LEE, Y.W.; HWANG, I.; DO CHOI, Y. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Hanover, v. 98, n. 8, p. 4788-4793, Apr. 2001.

SLISZ, A.M.; BREKSA III, A.P.; MISHCHUK, D.O.; MCCOLLUM, G.; SLUPSKY, C. M. Metabolomic Analysis of *Citrus* Infection by '*Candidatus* Liberibacter' Reveals Insight into Pathogenicity. **Journal of Proteome Research**, Washington v. 11, n. 8, p. 4223-4230, Jun. 2012.

STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; PITZSCHKE, A.; MIERSCH, O.; ZIEGLER, J.; WASTERNAK, C. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato—amplification in wound signalling. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 577-589, Feb. 2003.

STENZEL, I.; OTTO, M.; DELKER, C.; KIRMSE, N.; SCHMIDT, D.; MIERSCH, O.; WASTERNAK, C. *ALLENE OXIDE CYCLASE* (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue-and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 17, p. 6125-6138, Oct. 2012.

SUN, L.; ZHANG, H.; LI, D.; HUANG, L.; HONG, Y.; DING, X. S.; SONG, F. Functions of rice NAC transcriptional factors, ONAC122 and ONAC131, in defense responses against *Magnaporthe grisea*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 81, n. 1/2, p. 41-56, Jan.2013.

TAKAHASHI, F.; YOSHIDA, R.; ICHIMURA, K.; MIZOGUCHI, T.; SEO, S.; YONEZAWA, M.; SHINOZAKI, K. The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 3, p. 805-818, Mar. 2007.

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

THALER, J.S.; HUMPHREY, P.T.; WHITEMAN, N.K. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 260-270, 2012.

THOMMA, B.P.; PENNINGCKX, I.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Immunology**, London, v.13, p. 63-68, 2001.

TOORAWA, P. **La maladie du *huanglongbing* (greening) des agrumes a L'île Maurice. Detection de *Candidatus Liberobacter asiaticum* et *Candidatus Liberobacter africanum* dans les agrumes et les insectes vecteurs.** 1998. 186p. Doctoral Thesis, L'University de Bordeaux, 1998.

TROCCOLI, I.R.; ALTAF, J.G. Indústria Brasileira de Suco de Laranja: Posicionamento dos Atores-Chave no Processo de Cocriação de Valor. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 3, n. 3, p. 233-250, 2010.

TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. suppl 1, p. S153-S164, May. 2002.

TYLER, H.L.; ROESCH, L.F.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O.; TRIPLETT, E.W. Confirmation of the sequence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in *Huanglongbing*-infected citrus phloem using a metagenomic approach. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 12, p. 1624-1634, Dec. 2009.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.40, n.15, p.e115, 2012.

VAN DER DOES, D.; LEON-REYES, A.; KOORNNEEF, A.; VAN VERK, M.C.; RODENBURG, N.; PAUWELS, L.; PIETERSE, C.M. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCF^{COI1}-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 2, p. 744-761, Feb.2013.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 4, p. 184-191, Apr. 2006.

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

WANG, K.L.C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, Rockville , v. 14, n. suppl 1, p. S131-S151, May. 2002.

WANG, Y.; LIU, G.; YAN, X.; WEI, Z.; XU, Z. MeJA-inducible expression of the heterologous JAZ2 promoter from *Arabidopsis* in *Populus trichocarpa* protoplasts. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 2, n. 118, p. 69-74, 2011.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annali di Botanica**, Roma, v.100, p.681–697, 2007.

WU, J.; BALDWIN, I. T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 44, p. 1-24, Jul. 2010.

WU, J.; HETTENHAUSEN, C.; MELDAU, S.; BALDWIN, I. T. Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 3, p. 1096-1122, Mar. 2007.

XIA, N.; ZHANG, G.; LIU, X. Y.; DENG, L.; CAI, G. L.; ZHANG, Y.; KANG, Z. S. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht v. 37, n. 8, p. 3703-3712, Mar. 2010.

YAMAMOTO, P.T.; TEIXEIRA, D.C.; MARTINS, E.C.; SANTOS, M.A.; FELIPPE, M.R.; GARBIM, L.F.; UEHARA-CARMO, A.; SOUSA, M.C.; BOVÉ, J.M. Detection of *Candidatus Liberibacter americanus* and *asiaticus* in *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera; Psyllidae). In: Huanglongbing Greening Workshop International, 2006, Ribeirão Preto. Proceedings of the Huanglongbing Greening Workshop International, v. 1. p. 87-87, 2006.

YAN, Y.; BORREGO, E.; KOLOMIETS, M.V. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress response. **Lipid Metabolism**, Amsterdam, p. 393-442, 2013.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 155-189, 1984.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, Chichester, v.13, p.134, 2012.

ZANDER, M.; LA CAMERA, S.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J.P.; GATZ, C. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 200-210, Jan. 2010.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, Oct. 2002.

ZHANG, P.J.; BROEKGAARDEN, C.; ZHENG, S.J.; SNOEREN, T.A.; LOON, J.J.; GOLS, R.; DICKE, M. Jasmonate and ethylene signaling mediate whitefly-induced interference with indirect plant defense in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Malden, v. 197, N. 4, p. 1291-1299, Jan. 2013.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 12, n. 8, p. 1047-1064, Oct. 2005.

ZHENG, Z.; ZHAO, Y. Transcriptome comparison and gene coexpression network analysis provide a systems view of citrus response to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. **BMC genomics**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 27, Jan. 2013.

ZHOU, C.; ZHANG, L.; DUAN, J.; MIKI, B.; WU, K. HISTONE DEACETYLASE 19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 4, p. 1196-1204, Mar. 2005.

ZHOU, C.; ZHANG, L.; DUAN, J.; MIKI, B.; WUA, K. HISTONE DEACETYLASE 19 Is Involved in Jasmonic Acid and Ethylene Signaling of Pathogen Response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p.1196-1204, Apr. 2005.

ZHU, X.; WANG, A.; ZHU, S.; ZHANG, L. Expression of *ACO1*, *ERS1* and *ERF1* genes in harvested bananas in relation to heat-induced defense against *Colletotrichum musae*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 14, p. 1634-1640, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Sequência dos primers testados neste estudo (via de Etileno)

Primer Code	Primer Sequence		Amplicon (pb)
	Forward	Reverse	
<i>CTR1</i>	TGTAACCACTTTTCGGCATAGA	GACAGATTAGCCTCCATAAGCAA	95
<i>EBF1</i>	CAAAGCTCTTCGCTTTATCTGG	ACCTGCTTCTGCTCAAATCTCT	187
<i>EIL1</i>	GGTCTGATTTTCATGTTAATGAAGTG	TTTTGACCGTCTTCTGGAACTC	201
<i>EIN2</i>	AGCCAGCAACGGTGCATGGTT	GGAGCTGGTGACTCCCGCTG	100
<i>EIN3</i>	TCGAAATCAGCAGCCAGAGCAGC	CCCCCTTCATAACACCTACGCCT	86
<i>EIN4</i>	GCAAGAGGGTCTTTGGAGTGTA	AAGTAAAGGAGCTCGAGGGGTAT	105
<i>ERF1</i>	ACTAATAGCAGAAGCCACACCGGA	AGCCAAACCCTAATCCCATGCCTA	198
<i>ERF2</i>	AAGGTGGCTGCCTTGGCGTC	CCACTCGCGCCACTTGTCCA	79
<i>ERF B4</i>	AGTAATTGGCACCCTACCACCGA	TCTAATTTTCGGCTGCCCATTTGCC	190
<i>ERF/AP2</i>	TGTCATCAGCGAGTTCCAAGTCCA	ACCCATCCAACCTGTTAGGGCATCA	178
<i>ERS1</i>	CACTCACTGTTCTTCTGCCAAT	AGGTAAAGCAGGATATTAAGCACAG	107
<i>ETR1</i>	ACACCAGGTGGTCTTCATGGACGTT	TGGCCTTTCATGACGCCTCG	100
<i>SAM1</i>	GGCTTCTGGGCTTGCCCGTC	GTGTCCACAAACACAGACAGCGGT	84

ANEXO B – Sequência dos primers testados neste estudo (via do Jasmonato)

<i>Primer Code</i>	<i>Primer Sequence</i>		<i>Amplicon (pb)</i>
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>AOC3</i>	TCTTCAACAAACCCAGCAGCCAAC	TCTTCAACAAACCCAGCAGCCAAC	178
<i>COI1</i>	ACTTTAGGAGGATGATTGTCAGG	GTGAAGAAGCCCATCAGTAGAGAA	123
<i>JAZ2</i>	ATGCAATTAGCAAGCAACGGGAGC	TTTGATCGAGGAGGAACCGAGCAA	191
<i>LOX2</i>	GCCATGCCTTTTCGTCCAGTTCAAT	TTTGAGAGGAAGCCTCCCACAGTT	175
<i>MYC2</i>	CCTACTTCGAGAGGGAGTACTGAA	TTCAGGTTCAACCCTGCTACTATC	168
<i>JMT</i>	TTGGTGGCAGAAGGGCGCAT	CCGTGGCCAAGAGCTCCCAA	100
<i>MAPK6</i>	CGGTTTCGGGTGATCATACT	CAGCACACACAATACCATAAGC	155
<i>MKK4</i>	CGTTTGCGGTGGGGAGGCAA	GCCACCTGCTATGCGGGTCT	147
<i>NAC-019</i>	AAACCAGTGTCAGCAACAAGTG	AGGTAAAGACTCGAGCACATCATC	102
<i>PR4</i>	GGCCCTGTTGGACCTCGTGG	CCGTTGCTTGAGCTCCTGTCCC	82