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

Transformação genética de tomate ‘Micro-Tom’ com o gene *enhanced disease susceptibility 5 (EDS5)* isolado de *Citrus sinensis*

Perla Novais de Oliveira

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

Piracicaba
2016

Perla Novais de Oliveira
Engenheira Agrônoma

Transformação genética de tomate ‘Micro-Tom’ com o gene *enhanced disease susceptibility 5(EDS5)* isolado de *Citrus sinensis*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

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

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

Piracicaba
2016

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

Oliveira, Perla Novais de

Transformação genética de tomate 'Micro-Tom' com o gene *enhanced disease susceptibility 5 (EDS5)* isolado de *Citrus sinensis* / Perla Novais de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
76 p. : il.

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

1. Citros 2. HLB 3. Resistência sistêmica adquirida 4. Planta modelo I. Título

CDD 634.31
O48t

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

Aos meus pais Deginaldo e Ednar, e minhas irmãs
Pâmela e Pábula pelo amor incondicional, carinho,
conselhos e incentivo recebido.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida, por ser meu amigo e me conceder força, coragem e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho pela orientação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada em mim.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Harakava pela disposição em sempre ajudar e ao conhecimento compartilhado para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio e a todos do laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, pela ajuda nos trabalhos com o tomate Micro-Tom.

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

Aos amigos Aline Silva, Erasnilson Camilo, Fábio Coutinho, Juliana Leles, Lígia Erpen, Maicon Javorski, Otávio Netto, Tatiana Tokairin, Thiago de Melo e Valiana Teodoro, pela amizade, incentivo e grande carinho comigo. Todos estão no meu coração.

As amigas Liliane Stipp e Nathália Ansante pelos momentos de aprendizagem e de descontração.

A equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas – ESALQ (Fabiana Quaggio, Filipi Rodrigues, Meire Bassan, e Murilo Chrispim) e do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Cena (Carolina Rossi, Eveline Tavano, Leonardo Soriano, Marcelo Correa, Renata Cruz, Tatiana Moraes) pela amizade, pelos momentos de alegria e auxílio para realização deste trabalho.

Aos Funcionários do Departamento de Produção Vegetal, por toda ajuda e cuidados prestados na manutenção das plantas na casa de vegetação.

À Maria Solizete Silva secretária do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas por toda ajuda e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todas do ‘Virginato’, por sempre se preocuparem comigo através de gestos e palavras, e pelos vários momentos de felicidade.

Aos meus amigos do grupo de canto da Paróquia São Judas Tadeu, por me acolherem e serem grandes companheiros.

Aos meus pais Deginaldo Alves de Oliveira e Ednar Novais de Oliveira, pelo amor, educação, apoio e incentivo nas minhas decisões e jornadas.

As minhas belas irmãs Pâmela de Oliveira e Pábula de Oliveira pelo amor, compreensão e confiança.

Aos meus grandes amigos Andréa Bastos e Jonathan Manhães, por todos os conselhos, ensinamentos, pelo carinho e pela amizade ao longo destes anos.

Aos meus familiares, tios e primos, pela confiança e orações.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Enquanto viveres, ninguém te poderá resistir; estarei contigo como estive com Moisés; não te deixarei nem te abandonarei. [...] Traze sempre na boca (as palavras) deste livro da lei; medita-o dia e noite, cuidando de fazer tudo o que nele está escrito; assim prosperarás em teus caminhos e serás bem-sucedido. Isto é uma ordem: sê firme e corajoso. Não te atemorizes, não tenhas medo, porque o Senhor está contigo em qualquer parte para onde fores.”

(Josué 1: 5, 8-9)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	135
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Aspectos gerais da citricultura.....	21
2.2 O huanglongbing	22
2.3 Transformação genética.....	25
2.4 Resistência sistêmica adquirida	27
2.5 Micro-Tom: Planta modelo	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Material vegetal	37
3.2 Construção gênica.....	38
3.3 Transformação genética de tomate Micro-Tom	38
3.3.1 Confirmação da transgenia	40
3.3.1.1 β -Glucuronidase (GUS).....	40
3.3.1.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	40
3.3.1.3 <i>Southern blot</i>	40
3.3.2 Seleção de linhagens segregantes resistentes a canamicina	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Transformação genética de tomate Micro-Tom	43
4.1.1 <i>Southern blot</i>	49
4.1.2 Avaliação de linhagens segregantes resistentes a canamicina.....	50
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXO	72

RESUMO

Transformação genética de tomate ‘Micro-Tom’ com o gene *enhanced disease susceptibility 5 (EDS5)* isolado de *Citrus sinensis*

Nos anos recentes, a atividade agrícola da citricultura vem enfrentando grandes problemas fitossanitários, principalmente, com relação à viabilidade econômica decorrente do controle das doenças. A bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. está associada ao HLB, a principal doença que limita a produção das plantas cítricas. Assim, muitos pesquisadores têm voltado suas atenções para estudarem e encontrarem genes-alvo na resposta do hospedeiro a este patógeno para utilização no melhoramento genético. Nesse sentido, métodos de transformação genética das plantas cítricas são essenciais, porém características inerentes à espécie limitam seu cultivo *in vitro* e requerem um maior tempo para crescimento e propagação. Com isso, torna-se importante o estudo em plantas modelo, principalmente, para seguir protocolos de validação de genes. De acordo com o exposto, o gene *EDS5* isolado de *Citrus sinensis*, associado ao mecanismo de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) foi superexpresso por meio da transformação genética em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Micro-Tom). Após o crescimento dos brotos regenerados, foram identificadas as plantas positivas por meio de análise de GUS e PCR. Linhagens transgênicas homozigotas foram obtidas com avaliação da resistência ao antibiótico canamicina.

Palavras-chave: Citros; HLB; Resistência sistêmica adquirida; Planta modelo

ABSTRACT

Genetic transformation of 'Micro-Tom' tomato with *enhanced disease susceptibility 5* gene (*EDS5*) isolated from *Citrus sinensis*

In the recent years, the agricultural activity of the citrus industry has been facing big phytosanitary problems, mainly with regard to economic viability arising from disease control. The bacterium *Candidatus Liberibacter* spp. is associated with HLB, the main disease that limits the production of citrus trees. Thus, many researchers have been returning their attentions to study and find target genes in the host response to this pathogen for use in the genetic improvement. In this way, methods of genetic transformation of citrus plants are essential, but the inherent characteristics of the species border your *in vitro* cultivation and require a longer time for growth and propagation. Therefore, it is important to study of model plants, mainly for genetic validation protocols. Thus, the *EDS5* gene isolated from *Citrus sinensis*, associated with Systemic Acquired Resistance mechanism (SAR) was overexpressed by genetic transformation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. Micro-Tom). After the growth of regenerated shoots, positive plants were identified by PCR and GUS analysis. Homozygous transgenic lines were obtained with evaluation of resistance to kanamycin.

Keywords: Citrus; HLB; Systemic acquired resistance; Model plant

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5*: gene *Cseds5*, dirigido pelo promotor UBI10; *nptII*: gene que confere resistência a canamicina; 35 S-P: promotor constitutivo CaMV35S; UBI10: Ubiquitina 10; OCS: terminador; *uidA*: gene repórter (GUS); NOS-T: terminador; LB: borda esquerda; LR: borda direita..... 38
- Figura 2 - Aspectos gerais das diferentes etapas dos experimentos de transformação genética de tomate Micro-Tom utilizando a construção gênica pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5*, via *Agrobacterium tumefaciens*. a) Plantas de MT cultivadas em ambiente protegido para colheita de sementes a serem utilizadas em experimentos de transformação genética; b) Plântulas germinadas *in vitro* utilizadas como fonte de explantes cotiledonares; c) Aspecto do explante inicial (segmento de cotilédone) com face abaxial para baixo; d) detalhe do broto regenerado em meio de cultura de seleção com canamicina; e) broto de MT enraizados *in vitro*; f) planta de MT transgênica aclimatizada..... 44
- Figura 3-Teste histoquímico de GUS em extremidades de folhas de plantas tomate Micro-Tom. a) resultado positivo do teste histoquímico de GUS; b) detalhe de nenhuma expressão do gene *uidA* após o teste histoquímico de GUS em plantas de controle negativo 46
- Figura 4 - Análise da PCR de plantas GUS⁺ de tomate Micro-Tom. a) e b) Plantas contendo a construção gênica pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5* = P1 a P16; c) Plantas controle contendo o vetor vazio pCAMBIA 2301 = V1 e V2. Marcador de 100 pb (Fermentas) = M; Controle positivo (Plasmídeo pCAMBIA 2301, contendo a construção gênica) = C+; Controle de reação para verificar possíveis contaminações, constituídos por água = H₂O; DNA de planta não transgênica = C-; Fragmento 466 pb correspondente ao gene *nptII* (seta)..... 47
- Figura 5 - Análises de *Southern blot* em plantas de tomate Micro-Tom. Controle positivo (produto de PCR que corresponde ao fragmento *nptII*) = C+; Controle negativo (DNA de planta não transformada digerido com *EcoRI*) = C-; DNA de plantas contendo a construção gênica pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5* digerido com *EcoRI*, apresentando 2 eventos de inserção em ambos transgenes= P4 e P6 ... 50
- Figura 6 - Seleção de linhagens segregantes homozigotas resistentes a canamicina de plantas de tomate Micro-Tom, em estufa. a) plântulas T₂ com 14 dias de idade

pulverizadas com 400 mg L⁻¹ de canamicina, durante 4 dias consecutivos. b)
planta clorótica (sensível a canamicina) após 6 dias da primeira pulverização;
c) plantas resistentes a canamicina selecionadas para serem utilizadas
futuramente para testes com patógenos..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Transformação genética de tomate Micro-Tom, a partir de cotilédones via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , estirpe EHA 105, contendo a construção gênica pCAMBIA2301/ UBI10:: <i>CsEDS5</i>	45
Tabela 2 - Transformação genética de tomate Micro-Tom, a partir de cotilédones via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , estirpe EHA 105, com o vetor pCAMBIA2301 sem gene de interesse.....	46

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* é originário do continente asiático e, atualmente, seu cultivo ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (DONADIO; MOURÃO-FILHO; MOREIRA, 2005). A maioria das espécies que apresentam importância comercial são as laranjas, limões, limas e tangerinas (LIU; HEYING; TANUMIHARD, 2012). Dados da FAO (2015), atualizados até 2013, mostram que, com mais de 135 milhões de toneladas por ano, as frutas cítricas são as mais produzidas em todo o mundo, sendo China, Brasil e Estados Unidos os países líderes mundiais na produção dessas frutas.

A citricultura é considerada uma das atividades mais importantes no agronegócio brasileiro. A área colhida está em torno de 802 mil hectares, com produção de mais de 19 milhões de toneladas de frutas cítricas (FAO, 2015). A produção está concentrada na região sudeste, com destaque para o Estado de São Paulo.

Apesar da importância econômica da citricultura para o país, esta cultura vem enfrentando grandes problemas fitossanitários, registrando quedas de produtividade devido à presença de diversas pragas e doenças. Entre as doenças mais expressivas, atualmente, cita-se o huanglongbing (HLB) que tem causado grande preocupação entre os citricultores, devido à sua severidade, rápida disseminação e dificuldade de controle (JOHNSON et al., 2014). No Brasil, os agentes associados ao HLB são bactérias gram-negativas restritas do floema, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*. A primeira espécie é dominante, enquanto a segunda tem uma incidência mais baixa (TEIXEIRA et al. 2010). Ambas as bactérias são transmitidas pelo psílídeo *Diaphorina citri* (MAFRA et al., 2013). No entanto, o HLB também pode ser transmitido por enxertia de tecidos infectados (LOPES et al., 2009).

Atualmente, nenhum método de controle foi identificado para o HLB (WANG; TRIVEDI, 2013). Como alternativa para diminuir os problemas fitossanitários na cultura, tem-se utilizado técnicas convencionais de melhoramento genético, com intuito de desenvolver cultivares resistentes ao HLB. Porém, em citros, esses métodos esbarram em uma série de fatores que envolvem a sua biologia reprodutiva, tais como alta heterozigose, apomixia e poliembrionia (MACHADO et al., 2005). Dessa maneira, a transformação genética permite a incorporação de genes de resistência em genótipos-elite sem que haja necessidade de hibridação (GAMBINO; GRIBALDO, 2012).

As plantas reagem a um ataque por microorganismos fitopatogênicos, tais como vírus, bactérias e fungos por meio de uma série de respostas de defesa induzidas, referidas como

resistência sistêmica adquirida (SAR). Esta resposta se dá pela interação gene-gene, em que o gene de avirulência do patógeno é reconhecido pelo gene de resistência da planta (NAWRATH et al., 2002; SERRANO et al., 2013), desencadeando uma defesa sistêmica da planta contra os patógenos através da liberação de ácido salicílico (SA) e subsequente expressão de proteínas de defesa relacionadas à patogênese (Pathogenesis Related – PR) (SUN et al., 2011) e fitoalexinas. Dentro do sistema SAR, Nawrath et al. (2002) observaram que após a exposição de plantas de *Arabidopsis thaliana* à inoculação com *Pseudomonas syringae*, ocorreu a transcrição do gene *EDS5*, que depende funcionalmente dos genes *EDS1*, *PAD4* e *NDRI*, acarretando no aumento de SA. Este fato foi corroborado por Ishihara et al. (2008), que, ao observarem a superexpressão do gene *EDS5* em *Arabidopsis thaliana*, relataram aumento da resistência das plantas ao vírus do mosaico de tabaco (estirpes CMV (Y) e CMV (B2)).

No entanto, para estudos relacionados à resposta dos genes de resistências dentro do genoma das plantas cítricas, existem algumas barreiras, pois, exigem um maior tempo para obtenção de plantas por transformação genética, assim como para propagação, e consequentemente para inoculação com o patógeno. Desta forma, torna-se importante o estudo em plantas modelo, principalmente, para seguir protocolos de validação de genes. O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Micro-Tom) proposto por Meissner et al. (1997) é considerado um modelo genético, devido a algumas características, tais como: porte reduzido; ciclo de vida curto (70 a 90 dias); elevada produção de frutos e sementes; e genoma sequenciado (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

De acordo com o exposto, o objetivo deste estudo foi a transformação genética de plantas modelo de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Micro-Tom) com o gene *EDS5*, isolado a partir de *Citrus sinensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da citricultura

Originário do continente asiático, o gênero *Citrus* pertencente à família Rutaceae, tribo Citreae e subtribo Citrinae (SWINGLE; REECE, 1967) predomina nas regiões subtropicais e tropicais do mundo, compreendidas entre os paralelos 40° N e 40° S, sendo que as principais regiões produtoras estão concentradas em latitudes superiores a 22° N e 22° S (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

Esse gênero é caracterizado por plantas perenes de porte médio, copa em formato esférico, ramos angulares e espinhos axilares, com folhas de tamanho médio com ápice pontiagudo e base arredondada, flores brancas de tamanho médio, solitárias ou em racimos, frutos tipo baga, de formato oval ou esférico e presença de vesículas de suco (LORENZI et al. 2006; QUEIROZ-VOLTAN; BLUMER, 2005). Como exemplos conhecidos de importância comercial, citam-se as cidras (*C. medica* L.), laranjas azedas (*C. aurantium* L.), laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), limas ácidas (*C. aurantifolia* Swing.), limas doces (*C. limettioides* Tan.), limões (*C. limon* Burm F.), pomelos (*C. paradisi* Macf.), tangerina comum (*C. reticulata* Blanco), tangerina ‘Cleopatra’ (*C. reshini* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), toranjas (*C. grandis* Osbeck), e outras espécies, incluindo híbridos naturais (CHAPOT, 1975; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; LIU; HEYING; TANUMIHARD, 2012).

Cultivados em mais de 140 países (XU et al., 2013), a produção total global relatada atualmente é de mais de 135 milhões de toneladas (FAO, 2015). Desde 2007, a China se tornou o maior produtor mundial de citros, com 33 milhões de toneladas em 2013 devido, principalmente, ao incremento na produção de tangerinas. Brasil e Estados Unidos surgem como segundo e terceiro maiores produtores de citros, com mais de 19 e 10 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2015).

As plantas cítricas no Brasil foram introduzidas pelos portugueses no início do século XVI, através das expedições colonizadoras. A partir dessa data, sua expansão pelo litoral norte foi rápida, e o cultivo se expandiu por todo o país devido às condições propícias para seu desenvolvimento (MOREIRA; MOREIRA, 1991). Atualmente, o cultivo de frutas cítricas é realizado em todas as regiões brasileiras.

A atividade agrícola da citricultura permite ao Brasil apresentar maiores níveis de competitividade global, se tornando o maior produtor mundial de laranjas doces e o maior

exportador de suco de laranja concentrado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2015). No Brasil, mais de 17 milhões de toneladas de laranjas foram produzidos em 2014, com o Estado de São Paulo contribuindo com 72 % da produção nacional, com mais de 12 milhões de toneladas (IBGE, 2015). Em relação ao suco concentrado, o Brasil é o maior produtor e exportador, sendo que, em 2013, produziu cerca de um milhão de toneladas de suco concentrado, totalizando 60% da produção mundial (FAO, 2015). Além do suco e comercialização de frutas in natura, existem subprodutos da indústria de suco como o farelo de polpa, o óleo essencial, o d-limoneno e o terpeno (NEVES et al., 2010). No que se refere às áreas destinadas para o plantio de laranja doce, o cultivo é registrado em todas as regiões em uma área estimada de mais 660 mil hectares, sendo que destes, cerca de 450 mil hectares (67%) somente no Estado de São Paulo (IBGE, 2015).

A cultura dos citros, mesmo com elevada importância econômica para o país em termos de geração de divisas, emprego e renda, vem enfrentando grandes problemas como o manejo fitossanitário inadequado, principalmente, pela falta de estratégias de controle mais efetivas e com relação à viabilidade econômica decorrente do controle das doenças, acarretando em redução de produtividade, aumento de custos ao produtor e redução da área plantada. (FUKUDA et al., 2010; MACHADO; CRISTOFANI-YALI; BASTIANEL, 2011). Entre as doenças mais expressivas, estão a tristeza causada pelo vírus da tristeza dos citros (CTV), o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp.citri, a clorose variegada do citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a gomose, causada por patógenos do gênero *Phytophthora*, e o *huanglongbing* (HLB) (MATTOS JÚNIOR et al., 2005), considerada a mais destrutiva doença das plantas cítricas nos últimos anos, associado à bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (NEVES et al., 2010).

2.2 O *huanglongbing*

Em 1919, o HLB foi relatado pela primeira vez na Ásia, ao sul da China (BOVÉ, 2006). Nas Américas, o HLB foi constatado em julho de 2004, na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo, Brasil (COLLETA FILHO et al., 2004) e, desde então, a disseminação da doença foi rápida, atingindo mais tarde o Estado da Flórida, EUA, em setembro de 2005 (NAVA et al., 2007).

HLB é considerada a doença mais destrutiva das plantas cítricas em todo o mundo. Com sua grande capacidade de disseminação, coloca em risco a sustentabilidade do agronegócio citrícola em diferentes países (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009; GONZALEZ;

CORCUERA, ETXEBERRI, 2012). De acordo com o FUNDECITRUS (2015), em 2014, só no Estado de São Paulo, 4,5 milhões de plantas de laranja foram erradicadas com sintomas da doença.

Os agentes associados ao HLB são bactérias gram-negativas, intracelulares restritas do floema, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter africanus* (BOVÉ, 2006; GOTTWALD, 2010). No Brasil, são encontradas as primeiras duas espécies, sendo que a primeira espécie é dominante, enquanto a segunda tem uma incidência mais baixa (TEIXEIRA et al., 2010). Essas bactérias foram classificadas como *Candidatus*, decorrente da dificuldade de se obter o patógeno em cultura pura e finalizar os postulados de Koch (DAVIS et al., 2008; SECHLER et al., 2009). Os vetores naturais deste patógeno são duas espécies de psíldeo de ampla distribuição, o psíldeo citrus asiático (*Diaphorina citri*) e do psíldeo citrus africano (*Trioza erytreae*) (KIM et al., 2009). No entanto, o HLB também pode ser transmitido por enxertia de tecidos infectados (LOPES et al., 2009).

Diaphorina citri está situado em áreas de citros em todo o mundo, sendo o principal vetor de HLB (HALBERT; NÚÑEZ, 2004). A espécie presente no Brasil, *D. citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) apresenta coloração cinza, manchas escuras nas asas, mede de 2 a 3 mm de comprimento e seu ciclo biológico varia de 15 a 40 dias, sendo que cada fêmea deposita aproximadamente 800 ovos (INOUE et al., 2009; PARRA et al., 2010). O psíldeo tem preferência por brotações novas. Ninfas infectadas podem transmitir o patógeno mesmo após a ecdise para a fase adulta (INOUE et al., 2009).

A colonização pela bactéria induz o aumento da expressão dos genes envolvidos com a síntese de proteína PP2 e calose. Esses produtos se depositam nas extremidades das células do floema, as placas de perfuração, e assim impedem o transporte de fotoassimilados para órgãos drenos, tais como flor, frutos, folhas jovens e sistema radicular. Com a interrupção do fluxo de fotoassimilados, ocorre o acúmulo de amido nos cloroplastos, o que danifica o aparato fotossintético, resultando na clorose localizada, o que caracteriza o mosqueamento das folhas (ACHOR et al., 2010; KIM et al., 2009). Ainda, os sintomas típicos de árvores infectadas incluem uma aparência amarelada pálida em geral, os brotos são raquíticos, e os ramos morrem gradualmente à medida que a doença progride. Os frutos são pequenos e desiguais, com má coloração e sementes abortadas (BASSANEZI; MONTESINO; STUCHI, 2009; BOVÉ, 2006; WANG; TRIVEDI, 2013).

Um agravante do HLB é que esses sintomas demoram a se manifestar, e podem ocorrer em conjunto, ou não, tornando difícil a identificação de plantas contaminadas (BOVÉ, 2006;

KIM et al., 2009). A confirmação da presença da bactéria em plantas sintomáticas além dos sintomas característicos pode ser realizada pelo uso de microscopia eletrônica (BOVÉ, 2006) ou por meio de técnicas moleculares, sendo o mais comum o uso da PCR (COLETTA FILHO; CARLOS, 2010) utilizando-se *primers* específicos de cada espécie de bactéria (JAGOUEIX; BOVE; GARNIER, 1994).

Alguns autores relatam a ocorrência de resposta diferencial de diversos genótipos quanto ao HLB. Folimonova et al. (2009) verificaram experimentalmente que laranja ‘Valência’ e pomelo ‘Duncan’ (*C. paradisi* MacFadyen) foram muito sensíveis à inoculação, manifestando de forma intensa os principais sintomas de HLB. No entanto, em plantas de trifoliata (*Poncirus trifoliata*), as bactérias associadas ao HLB se desenvolveram em seus tecidos, mas não ocorreu manifestação de sintomas (LARANJEIRA et al., 2005). Albrecht e Bowman (2011) comparando plantas de *P. trifoliata* e tangerina Cleópatra (*C. reticulata* Blanco) expressando sintomas de HLB, também verificaram uma tolerância de *P. trifoliata* e seus híbridos.

Uma vez infectadas, árvores maduras se tornam improdutivas e podem morrer por volta de cinco a oito anos. As árvores jovens podem morrer dentro de um a dois anos e, portanto, não podem sobreviver tempo suficiente para se tornarem produtivas (KNAPP et al., 2006). De acordo com Belasque Jr. et al. (2009), pomares em diferentes regiões do mundo podem se tornar economicamente inviáveis, 10 anos após detecção de plantas sintomáticas.

Atualmente, nenhum método de controle foi identificado para manejo do HLB (WANG; TRIVEDI, 2013). Portanto, as estratégias atuais de prevenção sugeridas para diminuição da infecção de HBL são detecção de árvores sintomáticas e sua remoção subsequente, produção de mudas livres de patógenos, controle de vetores via tratamentos de pesticidas químicos (BELASQUE Jr. et al., 2010; GRAFTON-CARDWELL; STELINSKI; STANSLY, 2013; HALL et al., 2013).

Devido à alta capacidade de infecção da doença, o difícil manejo do seu vetor, a ausência de resistência genética em espécies do gênero *Citrus* e os grandes custos no manejo do HLB, muitos pesquisadores têm voltado suas atenções para estudarem e encontrarem genes-alvo na resposta do hospedeiro aos patógenos para utilização no melhoramento genético (MOURÃO FILHO; STIPP; MENDES, 2010; ZHENG; ZHAO, 2013).

2.3 Transformação genética

A manipulação do genoma da planta por introdução externa de genes tornou-se ferramenta central em biologia vegetal (SHARMA et al., 2009). Nos últimos anos, os métodos de transformação genética foram aplicados em programas de melhoramento genético de citros e parecem ter grande potencial como alternativa aos métodos tradicionais, pois, permitem a incorporação de características selecionadas em um genótipo elite sem alterar a base genética, além de evitar a alta heterozigosidade e auto-incompatibilidade (LI et al., 2003).

A transformação genética pode ser realizada através do uso de estratégias por bombardeamento de partículas em células vivas, eletroporação de protoplastos e *Agrobacterium* (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998). Transformações mediadas por *Agrobacterium* apresentam diversas vantagens que incluem a conveniência na manipulação, alta eficiência de transformação, baixo número de cópias do fragmento de DNA a ser transferido para a planta (ZHENG et al., 2009).

Agrobacterium tumefaciens são bactérias de solo, gram-negativas, pertencentes à família das Rhizobiaceae, que causam a doença galha da coroa, caracterizada por um crescimento tumoral nos tecidos entre o tronco e as raízes das plantas (ZAMBRYSKI, 1998). Trata-se de um problema significativo em videiras, maçã, pêra, amêndoa, framboesa, nozes e castanheiras (MEHROTRA; GOYAL, 2012).

O início do processo de infecção de uma planta por *Agrobacterium* se dá quando a bactéria reconhece, especificamente, os compostos fenólicos exsudados de células danificadas, em decorrência de algum ferimento superficial em seu tecido (LACROIX; CITOVSKY, 2013). Esses compostos incluem acetoseringona, chalconas e derivados do ácido cinâmico (STACHEL et al., 1985).

A capacidade da *Agrobacterium* em infectar plantas hospedeiras está associada à presença do plasmídeo Ti (“tumor inducing”). Os compostos fenólicos exsudados pela planta irão ativar genes que estão localizados em uma região do plasmídeo Ti, chamada de região de virulência (região *vir*) (ZAMBRYSKI, 1998). A região *vir* é composta pelo conjunto de genes responsáveis pela transferência de uma outra região do plasmídeo Ti da bactéria para o núcleo da célula vegetal, denominada T-DNA (do inglês transferred DNA) (BRASILEIRO; LACORTE, 2000). O T-DNA de *A. tumefaciens* contém uma série de genes conhecidos como oncogenes, que codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas), e genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas (aminoácidos ou carboidratos modificados) (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO,

2003). Após o processo de transferência do T-DNA, ele é integrado no genoma da planta, e passa ser expresso de forma estável (ROMEIRO et al., 2007).

Como resultado do processo infeccioso, as células transformadas pelo T-DNA, passam a se dividir sem controle devido à produção dos hormônios vegetais e com isso causam o tumor. Ao mesmo tempo produzem opinas que vão sendo utilizadas pela bactéria, formando um nicho extremamente favorável a *Agrobacterium* (BRASILEIRO; LACORTE, 2000).

A demonstração de que a formação da galha é devida à transferência da informação genética da bactéria para a célula vegetal acarretaram em pesquisas utilizando esse sistema natural na transformação genética de plantas.

Segundo Brasileiro e Lacorte (2000), a preparação de uma linhagem de *Agrobacterium* para ser utilizada como vetor na transformação de plantas inclui três etapas distintas. Em uma primeira etapa, é necessário obter as linhagens desarmadas. Para isso, os genes presentes no T-DNA, exceto as regiões flangeadoras, denominadas de bordas direitas e esquerdas, são eliminadas. Numa segunda etapa, é preciso construir um vetor contendo no seu T-DNA os genes de interesse. Por causa do seu tamanho, o plasmídeo Ti não pode ser manipulado diretamente. Desta forma, plasmídeos menores, denominados de vetores binários, contendo as extremidades do T-DNA, foram desenvolvidos especialmente para inserção de genes de interesse. Também são incluídos no vetor binário, genes marcadores de seleção, os quais conferem às células transformadas resistência a determinados agentes seletivos, tais como antibióticos, permitindo a seleção de células que contém o transgene (SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008). Um exemplo de gene de seleção é *nptII*, que codifica a enzima Neomicina Fosfotransferase tipo II (NPTII), conferindo resistência ao antibiótico canamicina (PEÑA et al., 2005). Somados aos genes de seleção, genes repórteres ou marcadores são também utilizados. Os genes repórteres permitem selecionar os brotos transformados dos demais, sendo que o mais utilizado é o gene *uidA* ou *gus*, que codifica a enzima β -Glucuronidase (GUS), que, ao ser expresso, é facilmente detectável por análise histoquímica com o X-GLUC (5-bromo-4cloro-3-idolil glucuronida) (CERVERA, 2005). Em uma última etapa, o vetor binário deverá ser transferido para a linhagem desarmada de *Agrobacterium*, o que pode ser feito por métodos de conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

Uma vez inserido o vetor binário na *Agrobacterium*, o sucesso na obtenção de plantas transgênicas envolve dois processos independentes: introdução do DNA de interesse no genoma da planta e a regeneração das células transgênicas em uma planta completa geneticamente transformada, por cultura de tecidos vegetais (SINGH; RAJAM, 2009).

As primeiras plantas transgênicas transformadas geneticamente via *Agrobacterium*, foram relatadas em 1983, em que plantas de tabaco ao expressarem o gene *nptII*, apresentaram resistência ao antibiótico canamicina (HERRERA-ESTRELLA et al., 1983). Posteriormente, foram introduzidos diversos genes que determinam alguma característica de interesse agrônomo, em diferentes espécies vegetais por transformação genética via *Agrobacterium* (GUIMARÃES; LACORTE; BRASILEIRO, 2003). Diversos grupos de pesquisa na área de biotecnologia de citros tentam obter plantas transgênicas resistentes a diferentes doenças, introduzindo diversos genes. Destacam-se aqueles que codificam proteínas relacionadas à patogênese; que estimulam o sistema de defesa das plantas; relacionados à resistência derivada do patógeno; que codificam moléculas elicitórias de respostas de defesa nas plantas ou de avirulência derivados do próprio patógeno; que codificam peptídeos antimicrobianos e genes do próprio genoma do patógeno (GER et al., 2001; MOURÃO FILHO; STIPP; MENDES, 2010).

São exemplos dessa estratégia plantas de *C. paradisi* e *C. sinensis* contendo o gene *NPR1* clonado de *Arabidopsis* para resistência ao cancro cítrico (ZHANG et al., 2010); plantas de laranjas ‘Newhall’ e ‘Jincheng’ expressando os genes que codificam os peptídeos antibacterianos shiva A e cecropina B, também apresentaram uma maior resistência à doença do cancro cítrico (HE et al., 2011); eventos transgênicos de laranja doce e *C. paradisi* Macf. cv. Duncan para resistência ao CTV, com diferentes construções gênicas pCTV-CP, pCTV-SC, pCTV-dsCP e CTV-Rdrp (CEVIK; LEE; NIBLETT, 2006; MUNIZ et al., 2012); plantas de laranja ‘Hamlin’ e ‘Valência’ transformadas com uma construção de um fragmento do gene da V-ATPase-A, visando controle de *D. citri* (SILVA, 2013); laranja ‘Pera’, ‘Natal’, ‘Hamlin’ e ‘Valência’ expressando o gene atacina A (*attA*), para resistência a *C. Liberibacter* spp. (OLIVEIRA, 2014; TAVANO, 2013).

2.4 Resistência sistêmica adquirida

A resistência de um hospedeiro a um patógeno (bactérias, fungos, vírus e nematóides) é definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um agente invasor em seus tecidos (SCHENK et al., 2000).

As plantas apresentam diversos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos, que atuam de maneira dinâmica e coordenada no momento e local apropriados e com a magnitude adequada (PASCHOLATI, 2011). Estes mecanismos incluem barreiras estruturais e bioquímicas que são divididos em pré-formados (defesas constitutivas ou passivas) e pós-

formados (defesas induzíveis ou ativas), sendo que os últimos é que se mostram de interesse dentro do fenômeno da indução de resistência (GUEST; BROWN, 1997). Os mecanismos estruturais atuam como barreiras físicas que impedem a entrada e a dispersão do agente invasor nos tecidos vegetais, enquanto os bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno, e estabelecem condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (FREEMAN; BEATTIE, 2008; HEMATY; CHERK; SOMERVILLE, 2009). Dentre os pré-formados estruturais, destacam-se presença de cutícula, formação de tricomas, modificações da forma dos estômatos e de fibra/vasos condutores, acúmulo de lignina, cálcio e silício na parede celular (HEATH, 2000; HEMATY; CHERK; SOMERVILLE, 2009). As barreiras bioquímicas incluem fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fitotoxinas, inibidores protéicos. Nos pós-formados estruturais pode ocorrer formação de papilas, halos, tiloses em vasos, acúmulo de minerais no sítio de infecção, formação de camadas de cortiça e deposição de gomas. Entre os mecanismos de defesa pós-formados bioquímicos, destacam-se as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PRPs, *Pathogenesis-Related proteins*), formação de espécies ativas de oxigênio (ROS) e resposta de hipersensibilidade (HR) (FRITIG; HEITZ; LEGRAND, 1998; PASCHOLATI, 2011).

A resistência induzida foi observada inicialmente em 1933 por Chester, o qual verificou que plantas suscetíveis podiam adquirir resistência contra doenças após uma infecção causada por patógenos ou com o tratamento com formas atenuadas de agentes patogênicos (LUCAS, 1999). A partir deste trabalho inicial, pesquisas com indução de resistência foram surgindo e se desenvolvendo pelo mundo, com as mais diversas culturas, como batata (CHERIF et al. 1992; YU et al., 1997), tomate (HALFELD-VIEIRA et al., 2006; ARAUJO; MENEZES, 2009) e trigo (FRANZENER et al., 2003). No Brasil, os primeiros estudos foram desenvolvidos com cafeeiros em 1970, contra *Hemileia vastatrix*, com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis* e uredosporos inativados de *H. vastatrix* (BONALDO et al., 2005).

Para a ativação dessas respostas induzidas de defesa em plantas, Campos et al. (2010) relataram que ocorrem três importantes fases, e que essas podem ser identificadas como: reconhecimento entre a planta e o patógeno, transdução de sinal e tradução de sinal. Na primeira fase ocorre a percepção de patógenos pelas plantas, que envolve o reconhecimento de um indutor por receptores celulares levando à iniciação de respostas de defesa (CAVALLARI, 2010). O indutor pode ser um patógeno avirulento, ou parte de um patógeno, como uma glicoproteína (COSTET et al., 1999; DURRANT; DONG, 2004). A fim de

explicar a interação e especificidade entre o hospedeiro e o patógeno, H. H. Flor em uma série de experimentos iniciados em 1942, propôs o modelo ‘gene a gene’, o qual postula que para cada gene do agente patogênico existe um gene de resistência correspondente na planta hospedeira (CAMARGO, 2011). Avanços na pesquisa sobre a interação planta-patógeno desde a hipótese de Flor têm permitido a realização de mecanismos co-evolucionários entre plantas e seus patógenos que envolvem muitas interações no nível molecular. Interações específicas são agora reconhecidas como sendo interações diretas ou indiretas entre genes de resistência codificados pelas plantas (*R*) e genes de avirulência codificados pelos patógenos (*AVr*) (HUTCHESON, 1998). Um exemplo desse tipo de interação *R/AVr* direta foi observada durante a infecção bacteriana demonstrada pela ligação entre a proteína quinase *Pto* de tomate e o indutor *AvrPto* de *Pseudomonas syringae* (TANG et al., 1996).

Após o reconhecimento genético entre a planta e o patógeno, a segunda fase da transdução de sinal se inicia, onde ocorre a transmissão, de forma direta ou indireta, deste sinal para o sítio de ação dentro da célula (RODRIGUES, 2011). Para isso, ocorre uma série de alterações. Silva (2002) cita o fluxo de íons através da membrana celular; alterações dos estados de fosforilação; rearranjo de estruturas intracelulares; produção de espécies reativas de oxigênio; e uma cascata de sinalizações via quinase. A amplificação desses sinais se dá por fitohormônios como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) resultando na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa e, subsequentemente, na resistência sistêmica adquirida (SAR - *Systemic Acquired Resistance*) que tem o SA como o principal sinalizador (MÉTRAUX, 2001) ou resistência sistêmica induzida (ISR – *Induced Systemic Resistance*) cujos principais sinalizadores são JA e ET (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

O fenômeno de resistência sistêmica adquirida (SAR) foi conceituado como sendo a ativação de um estado de resistência contra doenças, induzido sistemicamente em plantas pela infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001; KUC, 2001). Navarre e Mayo (2004) afirmam que com o estabelecimento da SAR, as plantas que resistem ao patógeno podem tornar-se resistentes, não somente à subsequente infecção do patógeno original, mas à infecção de uma variedade de outros patógenos.

A SAR foi bastante elucidada em plantas de fumo (SIEGRIST; OROBER; BUCHENAUER, 2000; VERNOOIJ et al., 1995; YASUDA et al., 2003) e *Arabidopsis* (CAO et al., 1994; LAWTON et al., 1995; DURRANT; DONG, 2004), e demonstrada também, em outras culturas, como batata, tomate, soja, milho, café e citrus (ANFOKA; BUCHENAUER,

1997; DUTT; BARTHE; GROSSER, 2010; GAUTAM; STEIN, 2011; GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; FU; GHABRIAL; KACHROO, 2009; YU et al., 1997).

O fitohormônio SA é um composto fenólico que desempenha um papel essencial nesta via de resposta de defesa (VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009). As infecções por patógenos biotróficos induzem níveis elevados de SA, que por sua vez, regulam positivamente a SAR. O nível endógeno de SA aumentou tanto localmente quanto sistemicamente em plantas de fumo, inoculadas com vírus (TMV), o que é consistente com o seu papel como sinalizador na SAR (SIEGRIST; OROBER; BUCHENAUER, 2000; YASUDA et al., 2003).

Plantas disfuncionais para a síntese de SA, ou vias de sinalização deficiente de SA apresentam, em geral, uma maior suscetibilidade à infecção patogênica biotróficas e hemibiotróficas (GLAZEBROOK, 2001). Em estudos com plantas transgênicas de tabaco que expressam o gene *NahG* de *Pseudomonas putida*, responsável pela codificação da enzima salicilato hidroxilase (converte SA em catecol), Gaffney et al. (1993) verificaram que as plantas transformadas foram incapazes de acumular SA, comprometendo a SAR. Em contraste, os mutantes com níveis elevados de SA, tais como *ACD* (*Accelerated Cell Death*) (RATE et al., 1999), *CPR* (*Constitutive Expressor of PR genes*) (CLARKE et al., 1998), e *SSI* (*Suppressor of Salicylate Insensitivity of Npr1-5*) (SHAH et al., 2001), exibem expressão constitutiva de genes SAR.

Estudos revelaram que as plantas utilizam principalmente duas vias enzimáticas distintas para sintetizar SA, a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a via isocorismato (IC) (DEMPSEY et al., 2011; VLOT; DEMPSEY; KLESSIG, 2009). Ambas as vias requerem primeiramente o corismato como metabolito principal, o qual é derivado da via do chiquimato. Tem sido demonstrado que a via de IC desempenha um papel central na imunidade relacionada com a biossíntese SA em *Arabidopsis thaliana*, enquanto a produção de SA catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL), parece ser uma via de menor importância quando as plantas estão sob estresse (CATINOT et al., 2008; WILDERMUTH et al., 2001; YAMASAKI, 2013). SA é sintetizado nos cloroplastos na via IC, a partir do corismato principalmente pelas enzimas isocorismato sintase (ICS1) codificados por *Sid2* e isocorismato liase de piruvato (IPL) (WILDERMUTH et al., 2001; FRAGNIÈRE et al., 2011). Foi demonstrado que as plantas que possuíam o gene *sid2* inativados apresentaram problemas na síntese SA e foram incapazes de ativar o SAR (WILDERMUTH et al., 2001).

Durante os anos mais recentes, os genes que atuam na via de sinalização de SA têm sido identificados, entre eles, *EDS1* (*Enhanced Disease Susceptibility 1*), *PAD4* (*PhytoAlexin Deficient 4*) e *EDS5* (*Enhanced Disease Susceptibility 5*) que codificam proteínas que

contribuem para a produção SA (FALK et al., 1999; NAWRATH et al., 2002; ZHOU et al., 1998). Estudos sugerem que logo a partir do reconhecimento de genes AVr por genes R citoplasmáticos, *EDS1* é provavelmente ativado (WIRTHMUELLER et al., 2007), que recruta *PAD4* para conduzir o amplificação da resposta de defesa (FEYS et al., 2001; SHAH, 2003). A sinalização seguida prossegue através de *Sid1* (análogo ao *EDS5*) (NAWRATH et al., 2002) e *Sid2* (isocorismato sintase), levando a acumulação de SA.

EDS5 / SID1 localizado na membrana do cloroplasto codifica uma proteína da família MATE (*multidrug and toxin extrusion*) que está envolvido no transporte de SA através das membranas para o citoplasma, regulando assim, a acumulação de SA (NAWRATH et al., 2002; SERRANO et al., 2013; YAMASAKI et al. 2013). Em *Arabidopsis*, Nawrath et al. (2002), após a inoculação com *Pseudomonas syringae*, observaram aumento da expressão de *EDS5* 2 horas após a inoculação e que permaneceu induzida por 2 dias. Ishihara et al., (2008) ao superexpressarem o gene *EDS5* em *Arabidopsis thaliana*, verificaram, aumento da resistência das plantas ao vírus do mosaico de tabaco, estirpe CMV (Y) e CMV (B2). Além disso, a mutação de *EDS5* bloqueou o acúmulo de SA e demonstrou reduzida expressão de PR-1, tornando as plantas de *Arabidopsis* mais sensíveis a infecção por agentes patogênicos (NAWRATH; MÉTRAUX, 1999). Esta redução do acúmulo de SA em mutantes *EDS5* pode ser explicada segundo Serrano et al. (2013) por um possível mecanismo de *feedback* autoinibitório ainda em estudo, em que na ausência da proteína transportadora, o SA acumula-se no cloroplasto e inativa sua própria biossíntese por um feedback negativo.

Em resposta a acumulação de SA, inicia-se a fase de tradução do sinal, que consiste na conversão do sinal em respostas celulares específicas (CÔTÉ et al., 1995), como por exemplo, a ativação do gene *NPRI* (Nonexpressor of Pathogenesis-related genes) que codifica as PRPs, e a expressão de enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas (CAO et al., 1997; FRITIG; HEITZ; LEGRAND, 1998).

As PRP-s (*Pathogen Related Proteins*) ou *Proteínas Relacionadas à Patogênese* foram primeiramente descritas no início da década de 70, por Van Loon e Van Kammen (1970), como macromoléculas envolvidas em resistência induzida, tendo fumo-TMV como patossistema-modelo. Nesse estudo, verificaram que as PRP-s não foram detectadas em folhas saudáveis, mas tinham sua atividade induzida em folhas inoculadas com o vírus (LIU; LI; SHEN, 1995).

Hoje, tem-se conhecimento de que as PRP-s são produzidas por muitas plantas, sendo detectadas em várias espécies vegetais, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (DERCKEL, et al., 1999; IRITI; FAORO, 2003; JONGEDIJK et al., 1995; LIU; LI; SHEN,

1995; YI; HWANG, 1996). Foram localizadas nos espaços intercelulares, vacúolo, parede celular, na epiderme de folhas, mesófilos, células-guarda de estômato, tricomas glandulares, idioblastos, vasos condutores e em zonas de abscisão (LOON et al., 1997; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

As PRP-s exibem uma diversidade de mecanismos de ação contra os patógenos. Esses mecanismos, conforme Edreva (2005) são baseados em função das capacidades de hidrólise, permeabilização de membranas, inibição de proteinase, toxicidade direta e sinalização no processo de defesa ou inibição. As PRP-s foram agrupadas em 17 famílias as quais estão numeradas de acordo com a ordem na qual foram descobertas (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; GORJANOVIC, 2009). As mais comumente investigadas são PR-1, PR-2, PR-3 e PR-5 (ROMEIRO, 2000).

As β -1,3-glucanases (PR- 2) e as quitinases (PR-3, PR-4, PR8 e PR-11) possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos (LOON; STRIEN, 1999). As β -1,3-glucanases apresentam a capacidade de hidrolisar polímero de β -1,3-glucana, enquanto que as quitinases são proteínas que hidrolisam polímeros de quitina. A diferença existente entre as classes de quitinases é a especificidade para com o substrato que atuam, bem como suas propriedades físico-químicas (KASPRZEWSKA, 2003).

Em estudo realizado por Cordero, Raventós e San Segundo (1994), ao avaliarem a expressão de β -1,3-glucanases e quitinases em tecidos de plantas de milho inoculadas com *Fusarium moniliforme*, verificaram uma indução coordenada da expressão de uma isoforma de β -1,3-glucanase e três isoformas de quitinases. Segundo Toyota (2011), as β -1,3-glucanases e quitinases agem de forma conjunta. Após a infecção do patógeno no hospedeiro, os espaços intercelulares do hospedeiro começam secretar β -1,3-glucanases que começam a degradar o tecido da parede celular do patógeno. Os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como exoelicitores, induzindo a síntese de grande quantidade de quitinases e β -1,3-glucanases que são acumuladas nos vacúolos. Ao penetrarem no interior da célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação de grande quantidade dessas enzimas, reprimindo a ação dos patógenos.

As peroxidases são outra importante classe de proteínas relacionadas à patogênese, pertencentes à família PR-9. São glicoproteínas secretadas no apoplasto que têm a função básica de catalisar a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina (HIRAGA et al., 2001). Essas enzimas também participam da oxidação de compostos fenólicos acumulados em resposta à infecção e na geração de espécies reativas de oxigênio e oxirredução de vários substratos,

usando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (KAWAOKA et al., 2003; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI 2008). Labanca (2002) relatou aumento na atividade de peroxidases no patossistema pepino (*C. lagenarium*), utilizando a levedura *S. cerevisiae* como agente indutor. Way et al. (2001) verificaram que plantas de fumo transgênicas que expressavam o gene que codificava uma peroxidase foram mais resistentes a infecções por *P. parasítica* var. *nicotianae* e *Cercospora nicotianae*.

Como visto, além de PRP-s, as plantas também produzem fitoalexinas em resposta ao ataque de patógenos. As fitoalexinas são metabólitos secundários, de baixa massa molecular, provenientes do metabolismo secundário de planta, que são capazes de impedir ou reduzir a atividade de bactérias, fungos, nematóides, plantas e animais (SILVA, 2006). Foram determinadas mais de trezentos e cinquenta tipos diferentes de estruturas químicas de fitoalexinas, em mais de 31 famílias de vegetais superiores, como benzofurano, cumarina, dihidrofenantreno, diterpeno, flavonóide, furanoacetileno, isocumarina, isoflavonóide, pterocarpano, sesquiterpeno, stilbeno e triterpeno (PASCHOLATI, 2011).

As fitoalexinas são ausentes em tecidos sadios e se acumulam após a infecção por fungos e bactérias (KUC, 1995; SMITH, 1996). De forma geral, o modo de ação das fitoalexinas sobre os agentes patogênicos incluem a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e perda de eletrólitos e inibição enzimática patogênica (SMITH, 1996).

2.5 Micro-Tom: Planta modelo

As plantas modelo são de grande importância para os estudos fisiológicos e genéticos, pois permitem o entendimento dos processos biológicos, a determinação da função gênica e a prova de conceito e análise de genes, visando o melhoramento genético nas espécies alvo (FERRARI, 2012). Meinke et al. (1998) afirmaram que existe uma correlação positiva entre a resposta observada em plantas modelos e a espécie alvo em diversos aspectos.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. e tabaco (*Nicotiana tabacum*) têm servido como plantas modelo para pesquisas básicas, sendo os principais organismos para estudos de processos biológicos fundamentais em plantas (RANJAN; ICHIHASHI; SINHA, 2012; SIERRO et al., 2014). Porém, o tomate tem se tornado uma espécie de excelência tanto para pesquisas básicas quanto aplicadas em plantas (RANJAN; ICHIHASHI; SINHA, 2012).

O uso de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* P.Miller) como planta modelo (MONTEIRO et al., 2012) possui vantagens em relação ao uso de *Arabidopsis* e tabaco, a

exemplo a diversidade de metabólitos secundários, tecidos que facilitam análises bioquímicas, padrão morfogênético, combinado com um genoma relativamente compacto (950 Mb), distribuído em 12 cromossomos, coleções ricas de germoplasma e protocolos de transformação eficientes (CAMPOS et al., 2010; LIMA et al., 2004; PRATT et al., 1997). No entanto, o elevado porte das plantas e o longo ciclo de vida surgem como desvantagens em relação ao uso de *A. thaliana* e tabaco.

Desse modo, no final da década de 90, o tomateiro Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. Micro-Tom), desenvolvido para fins ornamentais, foi proposto como modelo genético (MEISSNER et al., 1997; SCOTT; HARBAUGH, 1989), por apresentar várias características, tais como: ciclo de vida curto, podendo produzir de três a quatro gerações por ano, porte reduzido com cerca de 8 cm de altura, capacidade de crescimento em altas densidades (SUN et al., 2006) e ter seu genoma sequenciado (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

A utilização de tomateiro Micro-Tom (MT) como uma planta modelo acelera a caracterização de plantas transgênicas superando obstáculos encontrados nas características biológicas de espécies perenes arbóreas, que possuem um maior tempo requerido para crescimento e propagação (SCOTTON, 2012). Como exemplo, podem ser citadas as plantas cítricas, que segundo Meissner et al. (1997), além de serem plantas perenes, apresentam frutos tipo baga, assim como o tomate. Sendo assim, o MT mostra-se um aliado nos estudos de processos de desenvolvimento vegetal, transformação genética e nas interações planta-patógeno (ARIE et al., 2007; DAN et al., 2006; QIU et al., 2007).

MT é suscetível a uma ampla gama de patógenos, pelo menos a duas espécies de bactérias (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Ralstonia solanacearum*), quatro fungos (*Athelia rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*), e três vírus (*Cucumber mosaic virus* – CMV, *Tomato aspermy virus* – TAV e *Tomato mosaic virus* – ToMV) (ARIE et al., 2007). Portanto, MT tem demonstrado ser um excelente sistema modelo para estudar a resistência de plantas (DAN et al., 2006).

Chen et al. (2009) obtiveram plantas transgênicas de MT, via *Agrobacterium*, contendo os genes de quitinase do arroz (*CHI*) e defensina da alfafa (*alfAFP*) e avaliaram as plantas quanto à resistência em *B. cinera*. Verificaram que as linhagens transgênicas apresentaram maior resistência ao patógeno do que as plantas não transgênicas, e os níveis de resistência foram relacionados com os níveis de expressão do transgene. Scotton (2012), ao estudar plantas transgênicas de tomateiro MT contendo o gene *Bax-inhibitor-1* inoculadas com *M. perniciosus*, verificou redução no número de plantas sintomáticas. O mesmo foi

observado quando as plantas foram inoculadas com os fungos necrotróficos *B. cinerea*, *S. sclerotium*, *S. rolfsii*, sendo que as plantas transgênicas inoculadas apresentaram contenção dos sintomas em 40% da área de infectada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas localizado no Departamento de Produção Vegetal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, São Paulo.

3.1 Material vegetal

Para os experimentos de transformação genética de plantas modelo, foram utilizados tomateiros *Solanum lycopersicum* (cultivar ‘Micro-Tom’). As sementes foram fornecidas pelo Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, do Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal da ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

As plantas de tomate Micro-Tom foram cultivadas em vasos de 0,5 L contendo substrato comercial Multiplant 1075 (terra do paraíso) autoclavado, em ambiente protegido para a colheita dos frutos. As sementes foram coletadas de frutos maduros, juntamente com a polpa e foram mantidas durante 12 horas sob fermentação, em um béquer contendo água e fermento biológico liofilizado (*Saccharomyces cerevisiae*, Fermix, São Paulo), para facilitar a retirada da mucilagem das sementes. Posteriormente, as sementes foram lavadas em água corrente, secas ao ar livre, e colocadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas sob refrigeração, a 10°C.

Para utilização, as sementes de MT foram esterilizadas à superfície por agitação em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo), água 30% (v/v) e duas gotas de detergente comercial, por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes em água esterilizada. As sementes foram germinadas em frascos contendo meio de cultura MS (Anexo A) Murashige e Skoog (1962), com a metade da concentração e 15 g L⁻¹ de sacarose.

Foram incubadas aproximadamente 40 sementes por frasco contendo 30 mL de meio de cultura. As culturas foram seladas com filme de cloreto de polivinila (PVC) e incubadas a 25 ± 1°C no escuro, durante quatro dias, seguido por quatro dias sob 16 h de fotoperíodo em sala de crescimento.

3.2 Construção gênica

A construção gênica utilizada contém o gene *EDS5* (*Enhanced Disease Susceptibility 5*) e foi elaborada pelo grupo da Dra. Juliana de Freitas Astúa (EMBRAPA/Mandioca e Fruticultura). O gene *EDS5* foi identificado no banco de dados USDOE-JGI (phytozome.net) e clonado a partir de *Citrus sinensis*. O gene *EDS5* possui 1647 pb e foi clonado no vetor pCAMBIA 2301 (Figura 1). Posteriormente, esse vetor binário foi inserido na estirpe EHA 105 *Agrobacterium tumefaciens* para utilização em experimentos de transformação genética.

Figura 1- Representação esquemática do vetor de expressão pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5*: gene *Cseds5*, dirigido pelo promotor UBI10; *nptII*: gene que confere resistência a canamicina; 35 S-P: promotor constitutivo CaMV35S; UBI10: Ubiquitina 10; OCS: terminador; *uidA*: gene repórter (GUS); NOS-T: terminador; LB: borda esquerda; LR: borda direita

3.3 Transformação genética de tomate Micro-Tom

A metodologia para a transformação genética utilizada foi conforme o protocolo descrito por Pino et al. (2010). As colônias de *A. tumefaciens*, estirpe EHA 105, contendo o plasmídeo pCAMBIA 2301 com o gene *EDS5* foram cultivadas em placas de Petri contendo meio YEP sólido (Anexo A), acrescido dos antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (50 mg L^{-1}), no período de 3 dias, a 27°C , no escuro. Em seguida, três colônias de *A. tumefaciens* selecionadas foram cultivadas individualmente em erlenmeyers de 250 ml, com 50 ml de meio YEP líquido (Anexo A), mais antibióticos canamicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (50 mg L^{-1}), permanecendo sob agitação, a 28°C , no escuro, por aproximadamente 12 horas. Após o crescimento, foi realizada a diluição, em que a suspensão bacteriana foi transferida para tubos (Falcon®, 50 ml) e centrifugada a 4.000 rpm, a 15°C , por 15 minutos. Em seguida, o precipitado formado foi ressuspenso em meio MS líquido (Anexo A), até a concentração a OD 600 nm, entre 0,2 e 0,3, para ser utilizada na transformação genética.

Para a transformação genética, foram utilizados cotilédones dos tomateiros germinados a partir de oito dias após a semeadura. Os cotilédones foram divididos transversalmente em duas ou três peças, retirando-se as extremidades distais. Os explantes foram acondicionados com face abaxial para baixo em placas de Petri com meio de cultura RIM [meio MS (Anexo A) com 0,4 mM de ANA] e 100 mg L⁻¹ de acetoseringona e pH ajustado para 5.8. Em seguida, acrescentaram-se 50 µL⁻¹ de acetoseringona na suspensão bacteriana de *Agrobacterium*, e após 10 minutos, foi colocada sobre cada explante uma gota da suspensão. Após a suspensão bacteriana ser retirada por pipetagem, os cotilédones foram secos em folhas de papel de filtro autoclavadas. As placas foram seladas com filme de PVC e os explantes foram co-cultivados por 2 dias a 25 ± 1 °C no escuro.

Após os dois dias de cultivo, os explantes foram transferidos para placas de Petri com o meio SIM [meio MS (Anexo A) com 5 mM de BAP], suplementado com 200 mg L⁻¹ de timetin e 100 mg L⁻¹ de canamicina. Essas placas permaneceram sob fotoperíodo de 16 horas, a 25 ± 1 °C por três semanas.

Após este período, os brotos que apresentaram de 2 a 4 mm foram transferidos para frascos contendo 30 ml de meio MS (Anexo A) sem adição de regulador vegetal e suplementado com 100 mg L⁻¹ de canamicina e 300 mg L⁻¹ de timentin por três semanas para facilitar o enraizamento. Posteriormente, os brotos foram ainda transferidos para meio MS, acrescido de 100 mg L⁻¹ de canamicina, 300 mg L⁻¹ de timentin e 0,4 mM de ANA, durante 3 semanas até serem enraizados. Os brotos que não enraizaram foram transferidos para novos meios, até o enraizamento.

Os explantes que enraizaram foram transferidos para vasos de polipropileno de 500 mL, contendo uma mistura de 2:1 (Multiplant 1075 - terra do paraíso e vermiculita média) autoclavado. Esses vasos foram cobertos por um saco plástico umedecido em seu interior para manutenção de alta umidade relativa. O processo de aclimatização iniciou-se após uma semana do transplantio, e consistiu na remoção da cobertura plástica por um período aproximado de 15 minutos, ou até ser observada murcha das folhas. Este processo foi repetido todos os dias, por aproximadamente 15 dias. A cada dia, o período em que as plantas ficaram sem cobertura plástica foi aumentado gradualmente até não apresentarem murchamento das folhas após 8 horas. Posteriormente, as plantas aclimatizadas foram transferidas para casa de vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas. Semanalmente as plantas foram adubadas com 1g L⁻¹ de Peters® (30-10-10).

3.3.1 Confirmação da transgenia

A identificação de plantas de MT transformadas foi feita pelo teste β -Glucuronidase (GUS) e por análise de reação em cadeia polimerase (PCR). A confirmação da integração do DNA exógeno foi realizada por *Southern blot*.

3.3.1.1 β -Glucuronidase (GUS)

O teste histoquímico de GUS foi realizado segundo a metodologia apresentada por Brasileiro e Carneiro (1998). Segmentos de tecido foliar, com aproximadamente 5 mm de tamanho, foram coletados e inoculados em solução de X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronida), a 37 °C, em ausência de luz, por 16 h. Após este período, o material foi lavado com álcool etílico 70 % para interromper a reação e retirada da clorofila, facilitando a visualização da presença da coloração azul no tecido vegetal.

3.3.1.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A extração de DNA foi realizada pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), em folhas recém lançadas das plantas de MT. As análises de PCR foram feitas utilizando o kit “GoTaq® Green Master Mix” e os *primers*: *nptII*-F (5’GCCGAGAAAGTATCCATCAT 3’) e *nptII* -R (5’AGAAGAACTCGTCAAGAAGGC 3’). A reação de PCR foi realizada em termociclador utilizando-se vários ciclos para detecção da construção de interesse (1 ciclo de 94°C por três minutos para a primeira desnaturação, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e um ciclo final de 72°C por sete minutos).

Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos à separação em gel de eletroforese, amplificando as amostras em gel de agarose 1%, tampão TBE (0,5%), a uma voltagem de 35 V por 15 minutos e posteriormente a 70 V por 20 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo e, posteriormente, foram visualizados e fotografados em luz ultravioleta, com o auxílio do programa EDAS 120 (Kodak, Rochester, NY, USA).

3.3.1.3 *Southern blot*

Para esta análise, folhas recém expandidas coletadas das plantas mantidas em casa de vegetação foram utilizadas. O DNA foi extraído a partir de 1,4 g de folhas jovens maceradas

com ajuda do cadinho e pistilo, utilizando nitrogênio líquido. O macerado foi submetido à extração de DNA conforme Dellaporta, Wood e Hicks (1983).

Para o controle positivo e sonda foi realizada uma reação de PCR utilizando o Kit e os primers do *nptII* do plasmídeo isolado. Posteriormente, foi feita uma eletroforese e em seguida, o produto da PCR foi purificado utilizando-se o Kit “QIAEX II Gel Extraction Kit”. Após a purificação, o DNA obtido foi quantificado por fluorimetria, utilizando-se o aparelho Qubit™ Fluorometer (Invitrogen, EUA) e o reagente QuantiT™ dsDNA BR assay kit, conforme instruções do fabricante, e diluído para 0,1 ng/μL e 10 ng/μL em água miliQ estéril, a serem utilizados como controle positivo e sonda, respectivamente.

O DNA total das amostras foi quantificado conforme descrito acima. O DNA quantificado foi submetido à reação de clivagem utilizando a enzima *EcoRI*, por 16 horas, a 37 °C. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de amônio e álcool absoluto, ressuspendido em água MiliQ e, então, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, a 24 volts, por 16 horas. Ao final da separação dos fragmentos por meio da eletroforese, o gel foi submetido à lavagem em tampões apropriados de acordo com o protocolo de Southern blot (SOUTHERN, 1975, 2006) e, em seguida, transferido para membrana Amersham Hybond™-N⁺, por 16 horas e, posteriormente, fixado por 2 horas, a 80 °C.

Logo após, a membrana foi pré-hibridizada por 30 minutos (60 °C). A marcação da sonda de um fragmento de DNA foi realizada com fosfatase alcalina, utilizando-se o kit específico “Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and detection System” (GE Healthcare, Suécia) e a hibridização foi realizada a 60°C em forno de hibridização (Amersham Biosciences), por 16 h, com a sonda do gene obtida por PCR. A reação de detecção foi realizada com o “Amersham Gene Images CDP-Star detection Module” (GE Healthcare, Suécia), conforme as orientações do fabricante.

O excesso do agente de detecção foi removido por evaporação, e a membrana, envolvida em filme plástico, foi colocada no cassete de revelação (Amersham Lifescience) em contato com uma chapa fotográfica por 1 hora. A revelação do filme foi realizada em solução reveladora por 5 minutos. Após lavagem em água, o filme foi mantido por 15 minutos em solução fixadora.

3.3.2 Seleção de linhagens segregantes resistentes a canamicina

As sementes das plantas de MT transformadas foram germinadas em pequenas bandejas de germinação com células (8,5 cm de comprimento x 6,5 centímetros de largura x 6 cm de altura) contendo substrato 2:1 (Muitiplant 1075 (terra do paraíso e vermiculita média) autoclavado. As bandejas permaneceram em casa de vegetação certificada para o cultivo de plantas transgênicas.

As plantas transgênicas produzidas *in vitro* e aclimatizadas (T_0) foram autofecundadas para produção de sementes (T_1). As plantas foram selecionadas, borrifando-se solução de 400 mg L⁻¹ de canamicina (WEIDE; KOORNNEEF; ZABEL, 1989), durante quatro dias consecutivos, com observação de plantas cloróticas (não resistentes) no quinto dia. As sementes das plantas T_1 que apresentaram resistência a canamicina foram plantadas (T_2) e selecionadas novamente, a fim de selecionar as linhagens homozigotas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação genética de tomate Micro-Tom

Foram realizados 41 experimentos a partir do protocolo de transformação genética, via *Agrobacterium tumefaciens* contendo a construção gênica pCAMBIA 2301/UBI10::*CsEDS5*, utilizando explantes cotiledonares de plantas germinadas *in vitro* (Figura 5). O número de explantes responsivos foi avaliado após três semanas de cultivo *in vitro*. Nesses experimentos de transformação genética, do total de explantes inoculados com a suspensão bacteriana, 3,9% foram responsivos (Tabela 1). Para obtenção de plantas controle foram transformados cotilédones com o vetor vazio de pCAMBIA 2301, obtendo-se 2,3% brotos regenerados do total de explantes introduzidos (Tabela 2).

Para determinar prováveis gemas transformadas, a expressão da proteína repórter foi analisada através da coloração histoquímica de GUS (Figura 6). Segundo Jefferson (1987), quando presente a enzima β -glucuronidase, o substrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β - D- glucuronídeo cicloexil amina) é clivado, sendo que o produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel, de cor azul. Tecidos de folhas jovens dos brotos regenerados em meio de 100 mg L⁻¹ de canamicina transformados com a construção gênica pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5* foram utilizados, sendo que 0,21% apresentaram atividade de GUS do total avaliado (Tabela 1). Para os explantes transformados com o vetor vazio de pCAMBIA2301 obtiveram-se duas plantas com atividade de GUS (Tabela 2).

Vale ressaltar que o nível de expressão de GUS observado em diferentes eventos de transformação não foi uniforme, dados não mostrados. Em algumas plantas, a coloração azulada apareceu após 16 h incubação, enquanto outras apareceram dentro de 1-2 h de incubação durante o ensaio histoquímico de GUS. Esta variação na expressão do transgene em plantas de MT pode ser atribuída ao número de cópias inseridas do transgene e silenciamento gênico (KHUONG et al., 2013).

Figura 2 - Aspectos gerais das diferentes etapas dos experimentos de transformação genética de tomate Micro-Tom utilizando a construção gênica pCAMBIA2301/ UBI10::CsEDS5, via *Agrobacterium tumefaciens*. a) Plantas de MT cultivadas em ambiente protegido para colheita de sementes a serem utilizadas em experimentos de transformação genética; b) Plântulas germinadas *in vitro* utilizadas como fonte de explantes cotiledonares; c) Aspecto do explante inicial (segmento de cotilédono) com face abaxial para baixo; d) detalhe do broto regenerado em meio de cultura de seleção com canamicina; e) broto de MT enraizados *in vitro*; f) planta de MT transgênica aclimatizada

Tabela 1 - Transformação genética de tomate Micro-Tom, a partir de cotilédones via *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 105, contendo a construção gênica pCAMBIA2301/ UBI10::CsEDS5

Experimentos	Explantos introduzidos	Explantos responsivos*/ Avaliados	GUS ⁺	Plantas Aclimatizadas PCR ⁺	Eficiência de transformação (%)**
1	680	68/55	12	0	1,76%
3	491	10/06	03	0	0,61%
4	412	18/17	0	0	0
5	560	24/23	02	01	0,35%
6	402	09/08	0	0	0
7	469	16/13	0	0	0
8	505	08/07	0	0	0
9	422	14/14	0	0	0
10	463	18/12	0	0	0
11	502	06/04	0	0	0
12	630	13/12	0	0	0
13	683	14/11	0	0	0
14	406	06/05	01	0	0,25%
15	318	15/13	02	01	0,63%
16	472	39/37	02	02	0,42%
17	395	08/06	0	0	0
18	672	06/06	0	0	0
19	439	07/07	0	0	0
20	540	18/17	0	0	0
21	603	10/08	0	0	0
22	375	08/08	0	0	0
23	390	16/05	0	0	0
24	415	32/17	04	03	0,96%
25	423	39/25	02	0	0,47%
26	406	40/31	03	03	0,73%
27	430	11/06	02	02	0,46%
28	400	15/13	0	0	0
29	400	18/12	0	0	0
30	400	13/08	0	0	0
31	400	08/06	01	0	0,25%
32	400	11/09	0	0	0
33	400	19/13	0	0	0
34	400	16/11	0	0	0
35	400	18/14	0	0	0
36	400	07/07	02	02	0,5%
37	400	73/22	02	02	0,5%
38	400	14/11	0	0	0
39	400	10/06	1	0	0,25%
40	400	06/04	0	0	0
41	400	14/11	1	0	0,25%
TOTAL	18535	741/520	40	16	0,2%

*Explantos regenerados em meio de seleção

**Porcentagem do número de plantas GUS positivas em relação ao número total de explantes introduzidos

Tabela 2 - Transformação genética de tomate Micro-Tom, a partir de cotilédones via *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 105, com o vetor pCAMBIA2301 sem gene de interesse

Experimentos	Explantos introduzidos	Explantos responsivos*/ Avaliados	GUS ⁺	Plantas Aclimatizadas PCR ⁺	Eficiência de transformação (%)**
1	100	02/02	0	0	0
3	120	06/05	0	0	0
4	100	02/01	1	1	1%
5	100	00/00	0	0	0
6	137	03/03	1	1	0,73%
TOTAL	537	13/11	2	2	0,37%

*Explantos regenerados em meio de seleção

**Porcentagem do número de plantas GUS positivas em relação ao número total de explantes introduzidos

Figura 3-Teste histoquímico de GUS em extremidades de folhas de plantas tomate Micro-Tom. a) resultado positivo do teste histoquímico de GUS; b) detalhe de nenhuma expressão do gene *uidA* após o teste histoquímico de GUS em plantas de controle negativo

Das plantas GUS^+ aclimatizadas contendo a construção pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5*, 16 plantas foram PCR positivas, isto é, continham o fragmento de 466 pb, correspondente ao gene *nptII* (Figura 7). As duas plantas GUS^+ transformadas com o vetor vazio aclimatizadas também foram PCR positivas.

Figura 4 - Análise da PCR de plantas GUS^+ de tomate Micro-Tom. a) e b) Plantas contendo a construção gênica pCAMBIA2301/UBI10::*CsEDS5* = P1 a P16; c) Plantas controle contendo o vetor vazio pCAMBIA 2301 = V1 e V2. Marcador de 100 pb (Fermentas) = M; Controle positivo (Plasmídeo pCAMBIA 2301, contendo a construção gênica) = C+; Controle de reação para verificar possíveis contaminações, constituídos por água = H₂O; DNA de planta não transgênica = C-; Fragmento 466 pb correspondente ao gene *nptII* (seta)

Não foram aclimatizadas todas as plantas GUS^+ . Isso se deve ao fato principalmente pelos brotos serem perdidos por contaminação, não enraizamento e morte durante aclimatização. Segundo Khuong et al. (2013) a frequência de enraizamento para plantas de tomate é baixa, porém ao analisarem diferentes concentrações de IBA e AIA na formação de raízes *in vitro* em plantas de MT, verificaram que o uso de 1mg L⁻¹ de IBA no meio de enraizamento, promoveu a formação de raízes mais fortes, obtendo elevada frequência de enraizamento, e quando essas plantas foram aclimatizadas, foi observado um crescimento imediato. Para a formação de raízes nas plantas de tomate MT GUS^+ contendo o gene *EDS5* foi utilizado no meio de enraizamento 0,4 mM de ANA. Desta forma, a concentração de auxina utilizada neste trabalho pode não ter sido o suficiente para promover a indução do enraizamento dos brotos regenerados.

A eficiência de transformação foi obtida pelo cálculo da porcentagem de gemas GUS positivas em relação ao número total de explantes utilizados nos experimentos de transformação genética (Tabela 1).

De acordo com Attílio (2013), a eficiência de transformação quando calculada através de análise de PCR, só é realizada em plantas aclimatizadas, e como grandes números de brotos não sobrevivem à enxertia, a eficiência de transformação acaba sendo baixa. Porém, neste estudo, mesmo considerando as plantas GUS⁺ a eficiência de transformação foi bastante baixa, com uma média de 0,20%, considerando-se todos os experimentos realizados (Tabela 1).

Pozueta-Romero et al. (2001), ao trabalharem com tomate cv. Ailsa Craig também obtiveram frequência de transformação baixa, de apenas 1,4%. Guo et al. (2012) obtiveram uma eficiência de transformação de 3,9% para plantas de tomate Micro-Tom PCR⁺ selecionadas por higromicina em relação ao número total de explantes introduzidos. Contudo, em outros trabalhos, altas eficiências de transformação genética foram relatadas em tomate Micro-Tom, variando de 19% a 56% (DAN et al., 2006; CRUZ-MENDIVIL et al., 2011; PARK et al., 2003; PINO, et al. 2010; QIU et al., 2007; SUN et al., 2006).

Conforme Madhulatha (2007) e Bhatia et al. (2004), a eficiência de transformação de tomate depende de muitos fatores tais como o genótipo, tipo de explante e a sua idade, composição do meio (reguladores de crescimento, fonte de carbono, minerais e vitaminas), condições ambientais (irradiação, fotoperíodo, e temperatura) e estirpe de *Agrobacterium* utilizada. Chetty et al. (2013) ao avaliarem a eficiência de transformação de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom via *Agrobacterium tumefaciens* com quatro diferentes estirpes, AGL1, EHA105, GV3101, e MP90, verificaram que a maior taxa de transformação (65%) foi obtida com a estirpe de *Agrobacterium* GV3101, seguido de EHA105 (40%), AGL1 (35%), e MP90 (15%), considerando o número total de plantas transgênicas (PCR⁺) pelo número total de explantes inoculados. No entanto, a EHA 105 foi mais eficiente do que GV3101 na transferência de únicas inserções de *nptII* e *uidA* no genoma de transgenes de tomate MT. Assim, esses autores concluíram que a estirpe EHA105 é ideal para trabalhos em genômica funcional e aplicações biotecnológicas em tomate.

Guo et al. (2012) relataram que, para Micro-Tom, vários fatores têm afetado a frequência de transformação, tais como: taxa de contaminação, taxa de necrose, mortalidade e a taxa de escurecimento da superfície cortada.

Ainda, a baixa eficiência de transformação obtida foi devido ao crescimento de brotos não transformados. A porcentagem de escapes, ou seja, plantas não transformadas que

passaram pelo processo de transformação genética e que sobreviveram na presença do antibiótico de seleção, foi muito alta (superior a 90%), demonstrando que o sistema de seleção utilizado não foi eficiente. Esses números levaram à realização de maiores quantidades de experimentos, com maior número de explantes introduzidos do que o previsto.

Alguns autores comumente relatam altos índices de escapes em sistemas de transformação genética de diversas espécies, que são justificados por: 1) uma proteção da ação do agente de seleção que as células transformadas exercem sobre as não transformadas (DOMÍNGUEZ et al., 2004); 2) alta eficiência de regeneração de brotos, em oposição à baixa transformação mediada por *A. tumefaciens*; 3) contaminação de *Agrobacterium*, em que pequeno número de bactérias sobreviventes inativam a canamicina presente no meio de cultura, protegendo assim as células da planta contra a infecção (MOORE; JACANO; NEIDIGH, 1992).

4.1.1 Southern blot

As plantas de tomate Micro-Tom aclimatizadas e PCR positivas foram analisadas por *Southern blot* para confirmar a integração do transgene, bem como determinar o número de cópias inseridas no genoma das plantas obtidas. A integração do transgene foi verificada somente em duas plantas de tomate Micro-Tom (P4 e P6) das 16 avaliadas. Devido às dificuldades encontradas nesta análise e as plantas de Micro-Tom senescerem rapidamente, e consequentemente diminuir a qualidade do seu DNA, não foi possível realizar uma segunda tentativa de análise para caracterizar o material coletado anteriormente.

Para os eventos de transformação P4 e P6 através das hibridizações, foi possível estimar duas cópias inseridas para ambos transgenes (Figura 8). Chen et al. (2009) ao analisarem a integração dos genes de resistência *CHI* e *alfAFP* no genoma das plantas de MT, verificaram uma variação de um a três eventos de inserção em análises de *Southern blot*. Este mesmo número observado coincide com o resultado de outros trabalhos de transformação de tomate utilizando *Agrobacterium* (MEISSNER et al., 1997; SUN et al., 2006; OKABE et al., 2011; CHETTY et al., 2013).

Conforme Butaye et al. (2005), uma variação considerável da expressão do transgene é frequentemente observada dentro das populações de plantas transgênicas transformadas com a mesma construção genética. Com base nestas condições, é importante selecionar as plantas que contêm apenas uma única inserção no transgene. Essas plantas transgênicas com uma única cópia do transgene são menos propensas para o mecanismo de defesa de silenciamento

do que as plantas com múltiplas cópias do transgene. Por conseguinte, o seu padrão de segregação é fundamental e também as plantas homozigóticas podem ser facilmente obtidas nestas condições (TЕНEA; CUCU, 2006).

Amostra de DNA de planta não transformada, utilizadas como controle negativo, não hibridizou com a sonda utilizada nas análises realizadas.

Figura 5 - Análises de *Southern blot* em plantas de tomate Micro-Tom. Controle positivo (produto de PCR que corresponde ao fragmento *nptII*) = C+; Controle negativo (DNA de planta não transformada digerido com *EcoRI*) = C-; DNA de plantas contendo a construção gênica pCAMBIA2301/UBI10::CsEDS5 digerido com *EcoRI*, apresentando 2 eventos de inserção em ambos transgenes= P4 e P6

4.1.2 Avaliação de linhagens segregantes resistentes a canamicina

As 16 plantas transgênicas com o gene *EDS5* e 2 plantas transformadas com o vetor pCAMBIA2301 sem o gene de interesse de tomate Micro-Tom aclimatizadas (T_0) foram autofecundadas e produziram sementes T_1 . Para facilitar o rastreamento de linhagens segregantes homozigotas resistentes a canamicina de plantas transformadas de MT, foram pulverizados 400 mg L^{-1} de canamicina, durante 4 dias consecutivos (Figura 9a) em plantas T_1 . Após a aplicação de canamicina foi possível observar o aparecimento de manchas cloróticas nas folhas de plantas não transgênicas (Figura 9b) e nenhuma mancha nas folhas de plantas transformadas (Figura 9c), o que indica que as plantas que contêm o T-DNA inserido,

conseguiu expressar a resistência completa ao antibiótico e na ausência do T-DNA não houve resistência. Todos os eventos de transformação avaliados apresentaram plantas resistentes a canamicina.

As plantas que não apresentaram nenhum sintoma da aplicação de canamicina foram transferidas para vasos e cultivadas para produção de sementes T₂. Posteriormente, foi realizada uma segunda avaliação com canamicina, definindo as linhagens homozigotas das plantas P1, P9, P10, P11 e P14, ou seja, linhagens que apresentaram todas as plantas resistentes ao antibiótico. As progênes das plantas P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P12, P13 e P15, apresentaram segregação da resistência ao antibiótico, não sendo possível a seleção de linhagens homozigotas.

Figura 6 - Seleção de linhagens segregantes homozigotas resistentes a canamicina de plantas de tomate Micro-Tom, em estufa. a) plântulas T₂ com 14 dias de idade pulverizadas com 400 mg L⁻¹ de canamicina, durante 4 dias consecutivos. b) planta clorótica (sensível a canamicina) após 6 dias da primeira pulverização; c) plantas resistentes a canamicina selecionadas para serem utilizadas futuramente para testes com patógenos

As sementes de linhagens homozigotas selecionadas foram colocadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas sob refrigeração de 10°C. Em trabalhos futuros essas plantas de tomate Micro-tom deverão ser analisadas quanto a expressão funcional de *EDS5*, através da resistência a pinta bacteriana, com a inoculação de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* para posterior produção de plantas transgênicas potencialmente úteis de *Citrus sinensis* resistentes a HLB.

5 CONCLUSÕES

Foram obtidas 16 plantas transgênicas de tomate Micro-Tom, contendo o gene *EDS5*, e a integração do gene *EDS5* no genoma das plantas transgênicas foi confirmada em duas plantas, pela análise de *Southern blot*.

REFERÊNCIAS

- ACHOR, D.S.; EXTEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in *citrus* affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**, Oxford, v. 9, p. 56-64, 2010.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to huanglongbing. **HortScience**, Alexandria, v.46, n. 1, p. 16-22, 2011.
- ANDRADE, G.M.; SARTORETTO, L.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.
- ANFOKA, G.; BUCHENAUER, H. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 2, 1997, p. 85-101, 1997.
- ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.
- ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M.; TERAOKA, T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 24, p. 135-147, 2007.
- ATTÍLIO, L.B. **Transformação genética de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene *D4E1* dirigido pelos promotores *CaMV35S* ou *AtPP2***. 2013. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2013.
- BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; STUCHI, E.S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, p. 565-572, 2009.
- BELASQUEJR., J.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; BASSANESI, R.B.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J.M. Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, p. 53-64, 2010.
- BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R.B.; BARBOSA, J.C.; GIMENES FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P.T.; LOPES, S.A.; MACHADO, M.A.; LEITE Jr., R.P.; AYRES, A.J.; 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, p. 137-145, 2009.
- BHATIA, P.; ASHWATH, N.; SENARATNA, T.; MIDMORE, D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, p. 1-21, 2004.
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI,

S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

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

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 12-15, 2000.

BRASILEIRO, M.C.A.; CARNEIRO, C.T.V. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 92p.

BUTAYE, K.M.J.; CAMMUE, B.P.A.; DELAURE, S.L.; BOLLE, M.F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 16, p. 79-91, 2005.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronomia Ceres, 2011. v. 1, p. 119-132.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signalling & Behaviour**, Georgetown, v. 5, p. 267-270, 2010.

CAO, H.; BOWLING, S.A.; GORDON, A.S.; DONG, X. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 11, p. 1583-1592, 1994.

CAO, H.; GLAZEBROOK, J.; CLARKE, J.D.; VOLKO, S.; DONG, X. The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. **Cell**, Cambridge, v. 88, p. 57-63, 1997.

CATINOT, J.; BUCHALA, A.; ABOU-MANSOUR, E.; METRAUX, J.P. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorogenic acid in *Nicotiana benthamiana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 582, p. 473-478, 2008.

CAVALLARI, C.F.B. **Identificação e caracterização de promotores de genes de café (*Coffea arabica*)**. 2010. 358 p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

CERVERA, M. Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. In: PEÑA, L. **Transgenic plants: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2005. p. 203-214.

CERVERA, M.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. **Tree Physiology**, Oxford, v. 28, p. 55-66, 2008.

CEVIK, B.V.; LEE, R.; NIBLETT, C.L. Genetic transformation of citrus paradise with antisense and untranslatable RNA-dependent RNA polymerase genes of citrus tristeza clostero virus. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, Ankara, v. 30, p. 173–182, 2006.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLINGER, E. **Citrus**: Basle: Ciba-Geigy, 1975. p. 14-20.

CHETTY, V.J.; CEBALLOS, N.; GARCIA, D.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; LOPEZ, W.; OROZCO-CÁRDENAS, M.L. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 239-247, 2013.

CHEN, S.C.; LIU, A.R.; WANG, F.H.; AHAMMED, G.J. Combined overexpression of chitinase and defensin genes in transgenic tomato enhances resistance to *Botrytis cinera*. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 8, p. 5182-5288, 2009.

CHERIF, M.; BENHAMOU, N.; MENZIES, J.G.; BELANDER, R.R. Silicon induced resistance in cucumber plants against. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 411-425, 1992.

CLARKE, J.D.; LIU, Y.; KLESSIG, D.F.; DONG, X. Uncoupling *PR* gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis *cp6-1* mutant. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 557–569, 1998.

COLETTA FILHO, H.D.; CARLOS, E.F. Ferramentas para diagnóstico de huanglongbing e detecção de agentes associados: dos sintomas aos ensaios de laboratório. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p. 129-143, 2010.

COLETTA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JUNIOR J.; MACHADO, M.A.; AMARAL, A.M.; MULLER, G.W. First report of the causal agent of huanglongbing (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’) in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1382-1382, 2004.

CORDERO, M.J.; RAVENTÓS, D.; SAN SEGUNDO, B. Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 7, n. 1, p. 23-31, 1994.

COSTET, L.; CORDELIER, S.; DOREY, S.; BAILLIEUL, F.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, p. 655-662, 1999.

CÔTÉ, F.; CHEOG, J.J.; ALBA, R.; HAHN, M.G. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, p.401-410, 1995.

CRUZ-MENDIVIL, A.; RIVERA-LOPEZ, J.; GERMAN-BAEZ, L.J.; LOPEZ-MEYER, M.; HERNANDEZ-VERDUGO, S.; LOPEZ-VALENZUELA, J.A.; REYES-MORENO, C.; VALDEZ-ORTIZ, A. A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic

transformation of Tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. **HortScience**, Alexandria, v. 46, p. 1660–1665, 2011.

DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C. L. MicroTom: a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 432–441, 2006.

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.

DAVIS, M.J.; MONDAL, S.N.; CHEN, H.; ROGERS, M.E.; BRLANSKY, R.H. Cocultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with action bacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Disease**, Dordrecht, v. 92, p. 1547–1550, 2008.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, p.19–20, 1983.

DEMPSEY, D.A.; VLOT, A.C.; WILDERMUTH, M.C.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. **The Arabidopsis Book**, Danvers, v. 9, p. 1–24, 2011.

DERCKEL, J.P.; BAILLIEUL, F.; MANTEAU, S.; AUDRAN, J.C.; HAYE, B.; LAMBERT, B.; LEGENDRE, L. Differential induction of grapevine defences by two strains of *Botrytis cinerea*. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 89, n. 3, p. 197–203, 1999.

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

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; FUNDAG, 2005. cap. 1, p. 3–18.

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

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

DUTT, M.; BARTHE, G.; GROSSER, J.W. Systemic acquired resistance (SAR) in citrus: genetic transformation with SAR genes to combat Huanglongbing and canker. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 11., 2010, Orlando. **Proceedings...** p. 289–294. Disponível em: [http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/faculty/dutt/pdfs/Systemic_acquired_resistance_\(SAR\)_in_citrus.pdf](http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/faculty/dutt/pdfs/Systemic_acquired_resistance_(SAR)_in_citrus.pdf). Acesso em: 10 mar. 2015.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, Sofia, v. 31, n. 1/2, p. 105–124, 2005.

FALK, A.; FEYS, B.J.; FROST, L.N.; JONES, J.D.G.; DANIELS, M.J.; PARKER, J.E. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 6, p. 3292-3297, 1999.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 01 mar. 2015.

FERRARI, I.F. **Caracterização de promotores de expressão específica de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) em sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L).** 2012. 94 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

FEYS, B.J.; MOISAN, L.J.; NEWMAN, M.A.; PARKER, J.E. Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signalling proteins, EDS1 and PAD4. **EMBO Journal**, Oxford, v. 20, p. 5400–5411, 2001.

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

FRAGNIÈRE, C.; SERRANO, M.; ABOU-MANSOUR, E.; MÉTRAUX, J.P.; L'HARIDON F. Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 585, n. 2, p. 1847-1852, 2011.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

FREEMAN, B.C.; BEATTIE, G.A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**. 2008. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx>> Acesso em: 17 mar. 2015. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01

FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 10, p. 16-22, 1998.

FU, D.Q.; GHABRIAL, S.; KACHROO, A. *GmRAR1* and *GmSGT1* are required for basal, *R* gene-mediated and systemic acquired resistance in soybean. **Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 1, p. 86-95, 2009.

FUKUDA, L.A.; FRANCO, D.; FACIO, S.L.; LIMA NETO, R.S. Sustentabilidade econômica da citricultura perante o *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p. 107-114, 2010.

FUNDECITRUS. Disponível em:<<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/relatorios-de-produtores-mostram-queda-na-erradicacao-de-plantas-com-greening-hlb/296>>. Acesso em: 04 jun. 2015.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 261, p. 754-756, 1993.

GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges. **Transgenic Research**, London, v. 21, p.1163–1181, 2012.

GAUTAM, P.; STEIN, J. Induction of systemic acquired resistance to *Puccinia sorghi* in corn. **International Journal of Plant Pathology**, Kuala Lumpur, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2011.

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

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 4, n. 4, p. 301-308, 2001.

GONZALEZ, P.; CORCUERA, R.J.; ETXEBERRI, E.D. Characterization of leaf starch from HLB-affected and unaffected-girdled citrus trees. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 79, p. 71-78, 2012.

GORJANOVIC, S. A review: biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 115, n. 4, p. 334–360, 2009.

GOTTWALD, T.R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 119-139, 2010.

GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STELINSKI, L.L.; STANSLY, P.A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 413-432, 2013.

GUEST, D., BROWN, J.F. Plant defences against pathogens. In: BROWN, J.F., OGLE, H.J. (Ed.). **Plant pathogens and plant diseases**. Armidale: Rockvale Publ., 1997. p. 263-286.

GUIMARÃES, C.S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, p. 167-178, 2003.

GUO, M.; ZHANG, Y.L.; MENG, Z.J.; JIANG, J. Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation de Micro-Tom tomatoes. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 661-667, 2012.

GUZZO, S.D.; HAKAKA, R.; TSAI, S.M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625–638, 2009.

HALBERT, S.E.; NÚÑEZ, C.A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* kuwayama (Rhynchota: psyllidae) in the Caribbean basin. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 3, p. 401-402, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRAJR., J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by autochthonous phylloplane residente *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p.1247-1252, 2006.

HALL, D.G.; RICHARDSON, M.L.; AMMAR, E.D.; HALBERT, S.E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 146, p. 207-223, 2013.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.1-6, 2001.

HE, Y.; CHEN, S.; PENG, A.; ZOU, X.; XU, L.; LEI, T.; LIU, X.; YAO, L. Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (Shiva A and Cecropin B) via a novel *Agrobacterium-mediated* transformation of mature axillary buds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 99-107, 2011.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 3, p. 315-319, 2000.

HEMATY, K.; CHERK, C.; SOMERVILLE, S. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 12, p. 406-413, 2009.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J.; Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a ti-plasmid derived vector. **Nature**, London, v. 303, p. 209-213, 1983.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, London, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defenses in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 59-90, 1998

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus* Liberibacter asiaticus by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 155, p. 29-36, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201501.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2015.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BHT) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003.

ISHIHARA, T.; SEKINE, K.T.; HASE, S.; KANAYAMA, Y.; SEO, S.; OHASHI, Y.; KUSANO, T.; SHIBATA, D.; SHAH, J.; TAKAHASHI, H. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* *EDS5* gene enhances resistance to viruses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 54, p. 481-495, 2008.

JAGOUEIX, S.; BOVE, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha-subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 44, n. 3, p. 379-386, 1994.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 5, p. 387-405, 1987.

JOHNSON, E.G.; WU, J.; BRIGHT, D.B.; GRAHAM, J.H. Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected tress prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 290-298, 2014.

JONGEDIJK, E.; TIGELAR, H.; ROEKEL, J.S.C.; BRESS-VLOEMANS, S.A.B.; DEKKER, I.; ELZEN, P.J.M.; CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.S. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 173-180, 1995.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases: regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, p. 809-824, 2003.

KAWAOKA, A.; MATSUNAGA, E.; ENDO, S.; KONDO, S.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A.; EBINUMA, H. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 3, p. 1177-1185, 2003.

KHUONG, T.T.H.; CRÉTÉ, P.; ROBAGLIA, C.; CAFFARRI, S. Optimisation of tomato Micro-Tom regeneration and selection on glufosinate/ Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, p. 1441-1454, 2013.

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

KNAPP, J.L., HALBERT, S.; LEE, R.; HOY, M.; CLARK, R.; KESINGER, M. **The Asian citrus psyllid and citrus greening disease**. Florida: IPM, University of Florida, 2006. Disponível em: <<http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/citrus/acpsyllid.shtml>>. Acesso em: 05 mar 2015.

KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plant. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 275-297, 1995.

_____. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 7-12, 2001.

- LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae***: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- LACROIX, B.; CITOVSKEY, V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v.57, p. 467-481, 2013.
- LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. p. 3-18.
- LAWTON, K.; WEYMANN, K.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; UKNES, S.; RYALS, J. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 863-870, 1995.
- LI, D.D.; SHI, W.; DENG, X.X. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet Orange (*Citrus sinensis*) containing the *Pta29-barnase* gene. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, p. 1209-1215, 2003.
- LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle and improved *in vitro* shoot regeneration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, n. 4, p. 753-757, 2004.
- LIU, R.; LI, H.F.; SHEN, C.W.F. Detection of pathogenesis related proteins in cotton plants. **Physiological and Molecular Plant pathology**, London, v. 47, p. 357-363, 1995.
- LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v. 11, n. 6, p. 530-545, 2012.
- LOON, L.C. van. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.
- LOON, L. C. van; STRIEN, E. A. van. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.
- LOON, L.C. van; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.
- LOPES, S.A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G.F.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; TEIXEIRA, D.C.; FERNANDES, N.G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo *in natura***. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672 p.

LUCAS, J.A. Plant immunization: from myth to SAR. **Pesticide Science**, Oxford, v. 55, p. 193-196, 1999.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 158-172, 2011.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D. PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. cap. 9, p. 221-227.

MADHULATHA, P.; PANDEY, R.; HAZARIKA, P.; RAJAM, M.V.; High transformation frequency in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tomato by using polyamines and maltose in shoot regeneration medium. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New Delhi, v. 13, p. 191-198, 2007.

MAFRA, V.; MARTINS, P.K.; FRANCISCO, C.S.; ALVES, R.M. ASTÚA, J.F.; MACHADO, M.A. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics**, London, v.12, p. 14-24, 2013.

MATTOS JUNIOR; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, 2005. 929 p.

MEINKE, D.W.; CHERRY, J.L.; DEAN, C.; ROUNSLEY, S.D.; KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. **Science**, Washington, v. 282, p. 662-665, 1998.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYYATUY, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v.12, p.1465-1472, 1997.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. *Agrobacterium*-mediated gene transfer in plants and biosafety considerations. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Malden, v.168, p.1953–1975, 2012.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001.

MOORE, G.A.; JACANO, C.C.; NEIDIGH, J.L. *Agrobacterium*–mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 5/6, p. 238-242, 1992.

MONTEIRO, C.C.; ROLÃO, M.B.; FRANCO, M.R.; PETERS, L.P.; CIA, M.C.; CAPALDI, F.R.; CARVALHO, R.F.; GRATÃO, P.L.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES,

L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Biochemical and histological characterization of tomato mutants. **Anais Academia Brasileira Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 573-585, 2012.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. Perspectivas da produção e utilização de transgênicos para o controle do *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n.1, p. 91-100, 2010.

MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 1-21.

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.; FREITAS JUNIOR, W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with *Citrus tristeza virus* (CTV) derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 162-166, 2012.

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

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

NAVARRE, D.A.; MAYO, D. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signalling in potato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, p. 179-188, 2004.

NAWRATH, C.; HECK, S.; PARINTHAWONG, N.; METRAUX, J. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signalling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. **Plant Cell**, Rockville, v.14, n. 1, p. 275-286, 2002.

NAWRATH, C., MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid induction deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. **Plant Cell**, Rockville, v.11, p. 1393-1404, 1999.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat – CitrusBR, 2010. 138 p.

OKABE, Y.; ASAMIZU, E.; SAITO, T.; MATSUKURA, C.; ARIIZUMI, T.; BRÈS, C.; ROTHAN, C.; MIZOGUCHI, T.; EZURA, H. Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant Libraries. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 52, n. 11, p. 1994-2005, 2011.

OLIVEIRA, C.R. de. **Transformação genética de laranjas ‘Pera’ e ‘Natal’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com o gene atacina A (*attA*), dirigido por promotores preferencialmente expressos no floema, para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.** 2014. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

- PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao *Huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.
- PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotype independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1253-1257, 2003.
- PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo. Agronomia Ceres, 2011.v. 1, p. 593-636.
- PEÑA, L. Transgenic plants: methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 286, p. 176-187, 2005.
- PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; SCOTTON, D. C.; BORGO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. The Rgl allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, n. 7, 2010.
- POZUETA-ROMERO, J.; HOULNÉ, G.; CAÑAS, L.; SCHANTZ, R.; CHAMARRO, J. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 67, p. 173-180, 2001.
- PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M.; KELMENSEN, P.M.; LAZAROVA, G. ; KUBOTA, T.; ALBA, R.M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 20, p. 672-677, 1997.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; BLUMER, S. Morfologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; FUNDAG, 2005. p. 106-122.
- QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 172-175, 2007.
- RANJAN, A.; ICHIHASHI, Y.; SINHA, N.R. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome Biology**, London, v. 13, p. 1-8, 2012.
- RATE, D.N.; CUENCA, J.V.; BOWMAN, G.R.; GUTTMAN, D.S.; GREENBERG, J.T. The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signalling pathway in controlling cell death, defense, and cell growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1695-1708, 1999.
- RODRIGUES, C.M. **Expressão diferencial de genes em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) e em tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) em resposta à infecção por *Xylella fastidiosa***. 2011. 140 p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2011.

ROMEIRO, R.S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 177-184, 2000.

ROMEIRO, R.S.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Tumorigênese em plantas causadas por espécies de *Agrobacterium*. **Summa phytopathologica**, Jaboticabal, v.33, n.1, p. 9-15, 2007.

SARTORETTO, L.M.; SALDANHA, C.W.; CORDER, M.P.M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

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

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Org.). **Interação planta-patógeno**: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SCOTT, J.; HARBAUGH, B. Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Stations**, Gainesville, v. 370, p. 1-6, 1989.

SCOTTON, D.C. **Genômica funcional da interação cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) x *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2012. 147 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

SERRANO, M.; WANG, B.; ARYAL, B.; GARCION, C.; ABOU-MANSOUR, E.; HECK, S.; GEISLER, M.; MAUCH, F.; NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J.P. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter *EDS5*. **Plant Physiology**, Washington, v.162, p.1815-1821, 2013.

SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion Plant Biology**, Saint Louis, v. 6, p. 365-371, 2003.

SHAH, J.; KACHROO, P.; NANDI, A.; KLESSIG, D.F. A recessive mutation in the *Arabidopsis* *SSI2* gene confers SA- and NPR1-independent expression of *PR* genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 563-574, 2001.

SHARMA, M.K.; SOLANKE, A.U.; JANI, D.; SINGH, Y.; SHARMA, A.K. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. **Journal of Bioscience**, Karnataka, v. 34, n. 3, p. 423-433, 2009.

SIEGRIST, J.; OROBER, M.; BUCHENAUER, H. β -aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, p. 95-106, 2000.

SIERRO, N.; BATTEY N.D, J.; OUADI, S.; BAKAHER, N.; BOVET, L.; WILLING, A.; GOEPFERT, S.; PEITSCH, M.C.; IVANOV, N.V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, New York, v.5,p. 1-9, 2014.

SILVA, L.H.C.P. **Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-s-metil contra doenças em tomateiro**. 2002. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

SILVA, R.A. da. **Comportamento do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) aos indutores de resistência à seca**. 2006. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SILVA, T.L. da. **Transformação genética de laranja doce com uma construção gênica do tipo *hairpin* de um fragmento do gene da V-ATPase-A de *Diaphorina citri* Kuwayama**. 2013. 83 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SINGH, S.; RAJAM, M.V. Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Palo Alto, v. 15, p. 3-22, 2009.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. **New Phytologist**, Cambridge, v. 132, n. 1, p. 1-45, 1996.

SOUTHERN, E. Detection of specific among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

_____. Southern blotting. **Nature**, London, v. 1, n. 2, p. 518-525, 2006.

STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSK, P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature** London, v. 318, p. 624-629, 1985.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for micro-tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 426-431, 2006.

SUN, X.; GILROY, E.M.; CHINI, A.; NURMBERG, P.L.; HEIN, I.; LACOMME, C.; BIRCH, P.R.J.; HUSSAIN, A.; WOOK YUN, B.; LOAKE, G. J. *ADS1* encodes a MATE

transporter that negatively regulates plant disease resistance. **New Phytologist**, Cambridge, v.192, p.471-482, 2011.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.

TANG, X.; FREDERICK, R.D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D.A.; JIA, Y.; MARTIN, G.B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of Avr Pto and the Pto kinase. **Science**, Washington, v. 274, p. 2060-2063, 1996.

TAVANO, E.C.R. **Transformação genética de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para resistência a *Candidatus Liberibacter* spp.** 2013. 86 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

TEIXEIRA, D.C.; WULF, N.A.; LOPES, S.A.; YAMAMOTO, P.T.; MIRANDA, M.P.; SPÓSIO, M.B.; BELASQUE JR. J.; BASSANEZI, R.B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p. 115-128, 2010.

TENEA, G.; CUCU, N. The influence of T-DNA copy numbers on gene expression in primary transformants *Atropa belladonna* plants. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 11, n. 2, p. 2661-2667, 2006.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, London, v. 485, p. 635-641, 2012.

TOYOTA, M. **Indutores de resistência e os eventos bioquímicos de defesa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix*.** 2011. 94 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

VAN LOON, L.C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". **Virology**, New York, v. 40, p. 199-211, 1970.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p.135-162, 2006.

VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; AHL GOY, P.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 228-234, 1995.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 177-206, 2009.

WANG, N.; TRIVEDI, P. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 7, p. 652-665, 2013.

WAY, H.M.; KAZAN, K.; GOULTER, K.C.; BIRCH, R.G.; MANNERS, J.M. Expression of the Shpx2 peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, n. 4, p. 223-232, 2001.

WEIDE, R.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P. A simple, non-destructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 78, p. 169-172, 1989.

WILDERMUTH, M.C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, London, v. 414, p. 562-571, 2001.

WIRTHMUELLER, L.; ZHANG, Y.; JONES, J.D.G.; PARKER, J.E. Nuclear accumulation of the Arabidopsis immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. **Current Biology**, London, v. 17, p. 2023-2029, 2007.

XU, M.; LIANG, M.; CHEN, J.; XIA, Y.; ZHENG, Z.; ZHU, Q.; DENG, X. Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 137, p. 283-293, 2013.

YAMASAKI, K.; MOTOMURA, Y.; YAGI, Y.; NOMURA, H.; KIKUCHI, S.; NAKAI, M.; SHIINA, T. Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Plant Signalling & Behaviour**, New York, v. 8, n. 4, p. 37-41, 2013.

YASUDA, M.; NISHIOKA, H.; NAKASHITA, H.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIDA, S. Pyrazolecarboxylic acid derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, Sofia, v. 67, n. 12, p. 2614-2620, 2003.

YI, S.Y.; HWANG, B.K. Differential induction and accumulation of β -1,3glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, p. 179-192, 1996.

YU, D.; LIU, Y.; FAN, B.; KLESSIG, D.F.; CHEN, Z. Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato. **Plant Physiology**, Washington, v. 115, p. 343-349, 1997.

ZAMBRYSKI, P.C. Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 1-30, 1998.

ZHANG, X.D.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIC, V.; TRIPLETT, E.W.; MOU, Z.L. Over-expression of the Arabidopsis *NPRI* gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 128, p. 91-100, 2010.

ZHENG, Y.; HE, X.W.; YING, Y.H.; LU, J.F.; GELVIN, S.B.; SHOU, H.X. Expression of the *Arabidopsis thaliana* histone gene *AtHTA1* enhances rice transformation efficiency. **Molecular Plant**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 832-837, 2009.

ZHENG, Z.L.; ZHAO, Y. Transcriptome comparison and gene coexpression network analysis provide a systems view of citrus response to '*Candidatus liberibacter asiaticus*' infection. **BMC Genomics**, London, v. 16, p. 14-27, 2013.

ZHOU, N.; TOOTLE, T.L.; TSUI, F.; KLESSIG, D.F.; GLAZEBROOK, J. PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 6, p. 1021-1030, 1998.

ANEXO

Anexo A
Meios de cultura

Soluções estoque do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962; PINO et al., 2010)

MS Macronutrientes estoque	mg. L⁻¹
KO ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
K ₂ HPO ₄	120
 MS Micronutrientes estoque	 mg.L⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2
 MS Ferro estoque	 mg.L⁻¹
Na ₂ EDTA	745
FeSO ₄ .7H ₂ O	557
 MS Vitaminas estoque	 mg.L⁻¹
Ácido nicotínico	1,0
Mio-Inositol	100
Piridoxina HCl	1,0
Tiamina	10

MS Cálcio estoque	mg.L⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	22,0

MS

MS Macronutrientes estoque	20 mL.L ⁻¹
MS Micronutrientes estoque	10 mL.L ⁻¹
MS Vitaminas estoque	10 mL.L ⁻¹
MS Cálcio estoque	20 mL.L ⁻¹
MS Ferro estoque	10 mL.L ⁻¹
Sacarose	30 g.L ⁻¹

Observação: O meio de cultura MS teve o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar o Phytigel, e autoclavado por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg/cm²). Meio MS sólido: adição de 2g.L⁻¹.

YEP	g.L⁻¹
Peptona	5,0
Extrato de Levedura	10
NaCl	5,0

Observação: O meio de cultura YEP teve o pH ajustado para 7,0 antes de adicionar o ágar, e autoclavado por 20 minutos (121°C e 1,0 Kg/cm²). Meio Yep sólido: adição de 15g.L⁻¹.