

Josiane Cecília Darolt

EXPRESSÃO GÊNICA EM LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* L. Osbeck) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E À INFECÇÃO POR *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Coorientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Florianópolis, SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Darolt, Josiane Cecília

EXPRESSÃO GÊNICA EM LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* L. Osbeck) EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E À INFECÇÃO POR *Candidatus Liberibacter asiaticus*. / Josiane Cecília Darolt ; orientador, Robson Marcelo Di Piero ; coorientador, Nelson Arno Wulff. - Florianópolis, SC, 2016. 152 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Ácido jasmônico. 3. Ácido salicílico. 4. Hunglongbing (HLB). 5. Vias biossintéticas. I. Di Piero, Robson Marcelo. II. Wulff, Nelson Arno. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

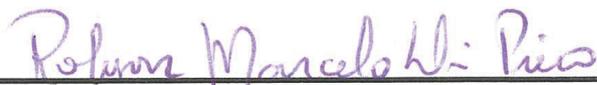
**Expressão gênica em laranja doce (*Citrus sinensis*
L. Osbeck) em resposta à aplicação de
Acibenzolar-S-Metílico e à infecção por
*Candidatus Liberibacter asiaticus***

por

Josiane Cecília Darolt

Dissertação julgada e aprovada em 28/03/2016, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Presidente - CCA/UFSC)



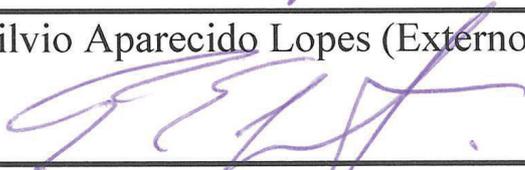
Dr.ª. Aline Cristina Velho (Interno – CCA/UFSC)



Prof.ª. Dr.ª. Ana Carolina Maisonnave Arisi (Interno – CCA/UFSC)



Dr. Silvio Aparecido Lopes (Externo - Fundecitrus/SP)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, março de 2016

Aos meus queridos pais

Florindo e Rosenilde.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela graça da vida, por sempre guiar e iluminar meu caminho.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos genéticos Vegetais. Agradeço também aos professores, em especial ao professor Maurício S. Reis pelos ensinamentos.

Aos meus dois orientadores, Robson Marcelo Di Piero e Nelson Arno Wulff, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos. Sigo evoluindo e aprendendo todos os dias com vocês!

Ao Fundecitrus pela oportunidade de desenvolvimento de minhas pesquisas na instituição. Também ao pessoal do laboratório do Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Laudecir, Juan, Elaine, Daniela, Sidnei, Deividson, Jean, Eder, Tatiane, Camila, Fabrício, Rosana, Tamiris, Gleison, Lourdes e Amanda, pela amizade e pela ajuda. Sem o apoio e a amizade de vocês não seria possível à realização desse trabalho!

Aos professores da FCAV/Unesp: Prof. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, por me disponibilizar espaço e auxílio em uma das etapas do trabalho e Prof. José Carlos Barbosa, por me auxiliar nas análises estatísticas dos resultados, muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora, Prof.^a Dra. Ana C. M. Arizi; Dra. Aline C. Velho e Dr. Silvio A. Lopes, por terem aceitado o convite e pelas excelentes contribuições, que com toda a certeza enriqueceram o trabalho final.

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia do CCA (LABFITOP), em especial a Maíra, Carol, Ricardo, Tarsis, Argus e Zamira, pela companhia, conselhos e amizade.

Às minhas irmãs Janaina, Jordana, Jaqueline, Danúbia, Hevilin e ao meu irmão Micael, por estarem comigo sempre, muito bom saber que posso contar com vocês!

Aos meus grandes amigos: Lurdinha, Janaina, Mileni, Rafael, Eduardo, Patrícia, Thuanny, pela companhia e conversas. Por tudo. Como sinto saudades de vocês!

Ao meu namorado Haroldo X. L. Volpe, você fez de mim uma pessoa melhor e tornou meus dias especiais! Respeito, amo e admiro muito você!

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês!

RESUMO

DAROLT, J.C. **Expressão gênica em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) em resposta à aplicação de Acibenzolar-S-metílico (ASM) e à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus***. Florianópolis, 2014. [Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - UFSC]

O Brasil é o maior produtor de laranja e maior exportador de suco de laranja do mundo. Problemas fitossanitários representam uma limitação à produtividade e longevidade dos pomares. Nos últimos anos, além do aumento da incidência de doenças existentes, novas surgiram, como o Huanglongbing (HLB) descrito pela primeira vez no Brasil em 2004. O HLB é a doença mais destrutiva dos citros, pois não existem variedades resistentes, provoca redução expressiva da produção e não existem métodos curativos. O manejo por meio da eliminação de plantas doentes e controle do psilídeo é possível, mas a efetividade é dependente da adoção dessas práticas de forma rigorosa, com abrangência regional. A utilização de indutores de resistência como medida adicional ao manejo é plausível, desde que sua eficácia seja comprovada. Em estudo prévio, foi demonstrado que o Acibenzolar S-metílico (ASM) reduziu o número de plantas cítricas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*. No entanto, os mecanismos de defesa envolvidos não foram elucidados. Diante do exposto, foi analisada a expressão de genes envolvidos na biossíntese dos ácidos jasmônico (AJ) e salicílico (AS) em plantas tratadas ou não com ASM e infectadas com *Ca. L. asiaticus*. Foram conduzidos três experimentos, sendo que no primeiro as plantas não foram inoculadas e realizou-se uma única aplicação do indutor. Nos demais foram feitas cinco aplicações do indutor e a inoculação de *Ca. L. asiaticus* foi por enxertia. A análise da expressão de genes envolvidos nas vias de AJ e AS foram realizadas em cinco momentos após o início do tratamento. A detecção de *Ca. L. asiaticus* na copa das plantas inoculadas, foi atrasada com a aplicação de ASM em relação ao tratamento sem indutor. Além disso, nas plantas tratadas com ASM houve aumento significativo da expressão dos genes carboxil-metil transferase do ácido jasmônico (JMT) e carboxil-metil transferase do ácido salicílico (BSMT1), responsáveis pela metilação do AJ e AS, respectivamente. Constatou-se que os genes isocorismato sintase (ICS), ácido salicílico glucosil-transferase 1 (SAGT1) e fenilalanina amônia-liase (PAL) são regulados positivamente na interação *Citrus-Ca. L. asiaticus*. Assim, aplicações foliares de ASM causaram efeito direto na expressão de genes

envolvidos na sinalização das respostas de defesa das plantas. Há necessidade de estudos adicionais da expressão genica nestas vias durante a interação *Citrus-Ca. L. asiaticus* e sobre quais mecanismos de defesa podem ser induzidos pela aplicação exógena de ASM em plantas de laranja doce.

Palavras chave: Ácido jasmônico; Ácido salicílico; Huanglongbing (HLB), Greening; Vias biossintéticas; Resistência sistêmica adquirida (RSA).

ABSTRACT

DAROLT, J. C. **Gene expression in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) in response to Acibenzolar-S-methyl (ASM) spray and to the infection by *Candidatus Liberibacter asiaticus***. Florianópolis, 2014. [Thesis – Graduation Program in Recursos Genéticos Vegetais - UFSC].

Brazil is the largest sweet orange producer and orange juice exporter in the world. Phytosanitary problems impose a limitation to orchard productivity and longevity. In the last years, besides the increase in the incidence of some diseases, new ones have arrived, such as Huanglongbing (HLB), found in Brazil in 2004. HLB is the most destructive citrus disease, since there is no resistance varieties, it causes expressive reduction in productivity and because there is no curative method. The management by eradication of diseased plants and psyllids control is possible, but the efficacy is dependent on the adoption of these practices in a rigorously way and with regional coverage. The use of resistance inductors as an additional tool is envisaged, but its efficacy in field assays is not proven. A previous study showed that acibenzolar S-methyl (ASM) reduced the number of citrus plants infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. However, the activation of defense mechanisms was not shown. To test the activation of defense pathways, we analyzed the expression of genes related to the biosynthesis of jasmonic and salicylic acid (JA and SA) in plants treated and non-treated with ASM and challenged with *Ca. L. asiaticus*. Three experiments were carried out: in the first one, the plants were sprayed once with ASM. In the other two, five sprays were performed and *Ca. L. asiaticus* was graft-inoculated. The expression of genes related to JA and SA pathways were performed in five periods after treatment. The *Ca. L. asiaticus* detection in the canopy of graft-inoculated plants was delayed by ASM sprays. Furthermore, plants treated with ASM significantly increased the expression of jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT) and benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase 1 (BSMT1) genes, responsible for JA and SA methylation, respectively. We also observed that the genes isochorismate synthase (ICS), salicylic acid glucosyltransferase 1 (SAGT1) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) are positively regulated in the *Citrus-Ca. L. asiaticus* interactions. Therefore, foliar sprays of ASM activated the expression of genes involved in the signaling pathways for defense responses. Further investigations in gene expression of SA and JA pathways during *Citrus-*

Ca. L. asiaticus interactions and about which defense mechanisms could be induced by ASM sprays in citrus plants should be addressed.

Keywords: Jasmonic acid; Salicylic acid, Huanglongbing (HLB); Greening; Biosynthetic pathways, Systemic acquired resistance (SAR).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Sintomas de HLB em plantas infectadas. Sintomas de mosqueado em ramos (A), em folhas (B) e assimetria em frutos de laranja doce (C)..... 38
- Figura 2- Diagrama esquemático do sistema imune das plantas. ETI: Imunidade desencadeada pelo efetor; PRR: receptores de reconhecimento padrão. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; NLR: Receptores ricos em leucina. MAMPs: Padrões moleculares associados a microorganismos; PTI: Imunidade desencadeada pelo reconhecimento do patógeno..... 43
- Figura 3- Modelo indicando as prováveis interações entre as vias de sinalização dos hormônios na interação planta-patógeno. ABA: ácido abscísico; AJ: ácido jasmônico ET: etileno; AS: ácido salicílico; GA: ácido giberélico; BL: Brassinosteróides 45
- Figura 4- Via proposta para a biossíntese do ácido salicílico (AS) através do isocorismato sintase (ICS) e via proposta de biossíntese de AS por meio da fenilalanina amônia liases (PAL). PL (PchB): Isocorismato piruvato-liase; BA2H: Ácido benzóico 2-hidroxilase; AS: Antranilato sintase; CM: Corismato mutase..... 48
- Figura 5- Representação esquemática da via de biossíntese do ácido jasmônico. 50
- Figura 6- Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (RT-qPCR) dos genes da lipoxigenase (LOX) (A), aleno óxido sintase (AOS) (B), aleno óxido ciclase (AOC) (C) e ácido jasmônico carboxil-metil transferase (JMT) (D), envolvidos na biossíntese de ácido jasmônico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$. Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 62
- Figura 7- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), dos genes isocorismato sintase 1 (ICS1) (A) e isocorismato sintase 2 (ICS2) (B), envolvidos na biossíntese de ácido salicílico, a partir

de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹. Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 63

Figura 8- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), dos genes da fenilalanina amônia-liase 2 (A),3 (B),4 (C) e 5 (D) (PAL2, PAL3, PAL4 e PAL5) envolvidos na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹. Médias seguidas por letras maiúscula indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 64

Figura 9- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), dos genes ácido benzóico/AS carboxil metil-transferase (BSMT1) e ácido salicílico glucosil-transferase 1 (SAGT1), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ no experimento preliminar (I). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 65

Figura 10- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da PR-Proteína 2 (PR-2), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹. Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 65

Figura 11- Parâmetros fisiológicos de plantas de *C. sinensis* tratadas com ASM- Acibenzolar-S-metílico (2,66 mg.mL⁻¹) ou água destilada (controle): taxa fotossintética (A), concentração intracelular de CO₂ (B), condutância estomática (C) e transpiração (D). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade 67

Figura 12- Desenho esquemático das atividades realizadas durante a condução dos experimentos I e II, ambos iniciados com a aplicação de (ASM). O produto foi aplicado nos dias -10, 21, 42 e 63, 84 no experimento I e -10, 10, 52, 74 e 94 no experimento II, em relação ao momento da enxertia (dia 0). Os tempos de coleta de material vegetal também estão indicados. 79

Figura 13- Estágio de desenvolvimento das folhas coletadas ao longo dos experimentos I e II. Folhas em estágio mais avançado de maturação (A) foram selecionadas para detecção da bactéria ao longo do tempo, enquanto folhas mais juvenis (B) foram coletadas para extração de RNA e análises de expressão gênica..... 82

Figura 14- Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da lipoxigenase (LOX), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 87

Figura 15- Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da aleno óxido sintase (AOS), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 88

Figura 16- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da aleno óxido ciclase (AOC), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo

tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 90

Figura 17- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene do ácido jasmônico carboxil-metil transferase (JMT), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 91

Figura 18- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene isocorismato sintase 1 (ICS1), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 93

Figura 19- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene isocorismato sintase 2 (ICS2), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 94

Figura 20- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da fenilalanina amônia-liase 1 (PAL1) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo

tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 96

Figura 21- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da fenilalanina amônia-liase 2 (PAL2) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 97

Figura 22- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da fenilalanina amônia-liase 3 (PAL3) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 98

Figura 23- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da fenilalanina amônia-liase 4 (PAL4) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 100

Figura 24- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da fenilalanina amônia-liase 5 (PAL5) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo

tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. 101

Figura 25- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene do ácido benzóico/AS carboxil metil-transferase (BSMT1) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 102

Figura 26- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene do ácido salicílico glucosil-transferase 1 (SAGT1), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 103

Figura 27- Desenvolvimento de plantas de laranjeira doce que receberam cinco pulverizações de Acibenzolar-S-metílico (ASM) ($2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$) com intervalos de 20 dias. As mesmas plantas aos 70 dias após o primeiro tratamento (D.A.A.) (A) e aos 150 D.A.A. após o tratamento, ou 80 dias após a finalização das aplicações de ASM (B). 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genes das vias biossintéticas dos ácidos salicílico e jasmônico, selecionados para análises de expressão. 58

Tabela 2- Porcentagem de enxertos viáveis e de borbulhas positivas para *Ca. L. asiaticus*, valores médios de Ct (*Cycle threshold*) e título bacteriano obtido antes da inoculação das borbulhas para transmissão de *Liberibacter* para as plantas testes dos experimentos I e II. 85

Tabela 3- Número total e de amostras positivas na qPCR para a presença de *Ca. Liberibacter asiaticus*, a partir de plantas tratadas ou não com ASM e inoculadas com a bactéria. Coletas realizadas aos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 180 e 321 dias após a enxertia (D.A.E.) *Las* + indica o número de plantas positivas para a bactéria e *Las* + ASM indica as plantas positivas para a bactéria e que receberam tratamento ao longo do tempo. 86

Tabela 4- Número médio de folhas, brotos e comprimento médio dos brotos por planta aos 125 dias após a enxertia (D.A.E.), nos experimentos I e II. ASM-Acibenzolar-S-metílico (2,66 mg.mL⁻¹). *Las*: *Ca. Liberibacter asiaticus*. 105

Tabela 5- Área foliar e teor de matéria seca total aos 150 dias após a enxertia (D.A.E.), nos experimentos I e II. ASM-Acibenzolar-S-metílico (2,66 mg.mL⁻¹). *Las*: *Ca. Liberibacter asiaticus*. 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AJ - Ácido jasmônico
AS - Ácido salicílico
ASM - Acibenzolar-S-metílico
cDNA - fita DNA complementar
Ct - do inglês '*Cycle threshold*', ou ciclo limiar
CO₂ - gás carbônico
D.A.A. - Dias após a aplicação
D.A.E. - Dias após a enxertia
DEPC - Dicarbonato de dietila ou pirocarbonato de dietila
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNases - Enzimas que degradam DNA
HLB - Huanglongbing ou greening
IRGA - do inglês "*Infrared Gas Analyser*", ou aparelho analisador de trocas gasosas por infravermelho
Las ou Ca. L. asiaticus - *Candidatus Liberibacter asiaticus*
qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RNA - Ácido ribonucleico
RT - qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativo com transcriptase reversa
RSA - do inglês '*Systemic Acquired Resistance*', ou Resistência sistêmica adquirida
Proteínas-PR - do inglês '*pathogenesis related*', ou Proteínas relacionadas à patogênese

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	31
1.1 OBJETIVOS.....	34
1.1.1 Objetivo geral.....	34
1.1.2 Objetivos específicos	34
1.1.3 Hipóteses.....	34
CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA	35
1.1 A citricultura no Brasil.....	35
1.2 Huanglongbing (HLB).....	35
1.2.1 Caracterização do agente etiológico da doença.....	36
1.2.2. Principais sintomas do HLB em plantas e frutos	37
1.2.3 Transmissão do HLB	39
1.2.4. Principais medidas adotadas para o controle da doença.....	40
1.3 A indução de resistência em plantas e o Acibenzolar-S-metílico (ASM).....	41
1.4 Ativação de respostas de defesa em plantas.....	42
1.5 Fitormônios e defesa vegetal	43
1.5.1 Via da biossíntese do ácido salicílico.....	46
1.5.2 Via de biossíntese do ácido jasmônico.....	49
1.6 PCR quantitativo	51
CAPÍTULO 2- ALTERAÇÕES MOLECULARES E FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE LARANJA DOCE (CITRUS SINENSIS (L.) OSBECK) PELO USO DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO.....	53
2.1 INTRODUÇÃO.....	53
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.2.1 Efeito do ASM na expressão de genes das vias do AS e do AJ	55
2.2.1.1 <i>Material vegetal, tratamento e coleta de amostras.....</i>	<i>55</i>
2.2.1.2 <i>Extração do RNA total e processamento das amostras</i>	<i>56</i>
2.2.1.3 <i>Escolha de genes reguladores das vias do AJ e AS</i>	<i>57</i>
2.2.1.4 <i>Análises de expressão gênica por RT-qPCR.....</i>	<i>60</i>
2.2.2 Efeito do ASM sobre parâmetros relacionados à fotossíntese	60
2.3 RESULTADOS	61
2.3.1 Expressão de genes das vias biossintéticas dos ácidos jasmônico e salicílico	61
2.3.2 Parâmetros relacionados à fotossíntese	66
2.4 DISCUSSÃO.....	67
2.4.1 Expressão de genes relacionados à biossíntese dos ácidos jasmônico e salicílico	67
2.4.2 Parâmetros relacionados à fotossíntese	71

CAPÍTULO 3- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE PLANTAS DE LARANJA DOCE (<i>C. SINENSIS</i> L. (OSBECK)) TRATADAS COM ASM E INOCULADAS COM <i>Ca. L. ASIATICUS</i>.	75
3.1 INTRODUÇÃO	75
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	77
3.2.1 Material vegetal e inoculação.....	77
3.2.2 Aplicações de ASM e coleta das amostras.	78
3.2.3 Viabilidade das borbulhas e título de <i>Ca. L. asiaticus</i>	79
3.2.3.1 <i>Extração de DNA do tecido vegetal</i>	79
3.2.3.2 <i>Título de <i>Ca. L. asiaticus</i> nas amostras de borbulhas através de PCR quantitativo (qPCR)</i>	80
3.2.4 Confirmação da infecção das plantas e seleção das plantas para análises de expressão gênica	81
3.2.4.1 <i>Extração do RNA total, tratamento das amostras com DNase e Síntese do cDNA</i>	82
3.2.4.2 <i>Escolha dos genes reguladores das vias do AJ e AS e dos genes de referência (housekeepings)</i>	83
3.2.4.3 <i>Análises de expressão gênica por RT-qPCR</i>	83
3.2.4.4 <i>Análises estatísticas</i>	83
3.2.5 Análises de parâmetros fenotípicos das plantas	83
3.2.5.1 <i>Contagem do número total de folhas e ramos</i>	83
3.2.5.2 <i>Análises de área foliar e matéria seca total das plantas</i>	83
3.2.5.3 <i>Análises estatísticas</i>	84
3.3 RESULTADOS	84
3.3.1 Enxertia das borbulhas e detecção de <i>Ca. L. asiaticus</i> ao longo do tempo.....	84
3.3.2 Expressão de genes relacionados à biossíntese do ácido jasmônico	86
3.3.3 Expressão de genes relacionados à biossíntese do ácido salicílico	91
3.3.3.1 <i>Via do Isocorismato sintase (ICS) na biossíntese do ácido salicílico</i>	91
3.3.3.2 <i>Vias da fenilalanina amônia liase (PAL) na biossíntese do ácido salicílico</i>	95
3.3.4 Parâmetros fenotípicos	104
3.4 DISCUSSÃO	106
3.4.1 Enxertia das borbulhas e detecção de <i>Ca. L. asiaticus</i> ao longo do tempo.....	106
3.4.2 Expressão de genes das vias de biossíntese do ácido jasmônico e salicílico.	109

3.4.2.1	<i>Via de biossíntese do ácido jasmônico</i>	109
3.4.2.2	<i>Vias de biossíntese do ácido salicílico</i>	113
3.4.2.2.1	<i>Via do isocorismato sintase (ICS) na biossíntese do ácido salicílico</i>	113
3.4.2.2.2	<i>Via da fenilalanina amônia liase (PAL) e modificações do ácido salicílico</i>	114
3.4.3	Parâmetros fisiológicos e fenotípicos das plantas	118
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
5	CONCLUSÕES	123
6	REFERÊNCIAS	125

APRESENTAÇÃO

A citricultura se destaca no cenário nacional como uma das mais importantes atividades agrícolas, elevando o país ao posto de maior produtor mundial de laranja, ocupando esta posição desde a década de 90, sendo que, a cada cinco copos de suco comercializados no mundo, três são produzidos no Brasil (CEPEA, 2002; NEVES et al., 2010).

O aumento na produção da cadeia citrícola nas últimas décadas e a consequente expansão e concentração da área produtora intensificaram problemas de ordem fitossanitária, principalmente devido ao aumento de doenças e pragas na cultura. Dentre estes, podem ser citadas doenças de importância como o cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) e a Clorose Variegada do Citrus-CVC (*Xylella fastidiosa*). Em 2004, foi observada a ocorrência de Huanglongbing (HLB) em plantas de citros no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004), aumentando o rol de ameaças ao citricultor.

O HLB, ou greening, está associado a bactérias Gram-negativas restritas aos vasos do floema, sendo considerada uma das mais importantes doenças dos citros na atualidade. Não existem variedades comerciais resistentes ao HLB (BOVÉ, 2006). Antes mesmo do relato da doença, o vetor responsável pela dispersão do HLB no campo, o psílideo *Diaphorina citri*, já estava presente no Brasil, pelo menos desde 1942 (LIMA, 1942, LOPES, 2006).

Dentre as medidas preconizadas, o plantio de mudas saudáveis, a inspeção constante nos pomares, a erradicação de plantas cítricas sintomáticas e o rigoroso controle do vetor têm contribuído para o controle da dispersão da doença (BOVÉ, 2006; BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Além dessas medidas, pomares abandonados ou altamente infestados, mantidos sem o controle da doença, devem ser erradicados, já que se tornam fontes de inóculo para pomares vizinhos em função da dispersão dos vetores (BELASQUE JUNIOR, 2009; BOINA et al., 2009).

Apesar dos diversos estudos conduzidos com o patossistema HLB (planta-patógeno-vetor-ambiente), muitos aspectos ainda necessitam ser esclarecidos. Sabe-se que a partir da infecção até o aparecimento de sintomas há um período de incubação, que é dependente de fatores como a idade das plantas, ambiente (temperatura principalmente), concentração da bactéria na fonte de inóculo, da espécie de *Ca. Liberibacter*, época do ano, entre outros (COLLETTA-FILHO et al., 2010; BASSANEZI et al., 2010; GASPAROTO et al., 2012). Até o momento não existem medidas curativas eficientes no controle do HLB (BOVÉ, 2006; TEIXEIRA et al., 2008; GOTTWALD, 2010). As principais medidas de controle adotadas

estão baseadas na renovação dos pomares com mudas sadias, no monitoramento e controle do vetor (*Diaphorina citri*), e na erradicação de plantas hospedeiras do inseto vetor e da bactéria (FUNDECITRUS, 2009).

Frente ao difícil manejo da doença, estudos sobre o potencial emprego de indutores de resistência em plantas como ferramentas no manejo do HLB estão sendo feitos. Isso ocorre, por exemplo, no estado da Flórida- Estados Unidos, onde 90% das áreas produtoras e 80% das plantas de citros apresentaram a doença em 2015 (SINGERMAN & USECHE, 2015; LI et al., 2016), e no estado de São Paulo- SP (AGNELLI, 2011).

Diversos trabalhos foram realizados demonstrando a possibilidade de se induzir resistência em plantas pela ativação dos mecanismos de defesa inatos (PASCHOLATI et al., 2008). Tal ativação pode se dar através de tratamento com indutores (WALTERS et al., 2005) de origem biótica ou abiótica (BONALDO et al., 2005; SMITH, 1996). Uma das opções comerciais disponíveis é o Acibenzolar-S-metílico (ASM), produto registrado comercialmente no Brasil com o nome de Bion[®] e recomendado no tratamento de mudas de citros para o controle da CVC (AGROFIT, 2016).

Sabe-se que o controle do desenvolvimento e de outros processos em plantas como os de defesa, são mediados por diferentes hormônios. Como estão presentes constitutivamente (DODDS & RATHJEN, 2010), alterações na quantidade e composição hormonal podem estar relacionadas à resposta ao ataque de patógenos (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007). A interação entre as vias de sinalização é um importante mecanismo na resposta de defesa de plantas contra patógenos. Estudos de transcriptoma na interação de plantas e patógenos têm revelado alterações significativas na expressão dos genes durante o processo de infecção e colonização, permitindo a identificação de genes responsivos das vias de defesa (FAN et al., 2011; ALBRECHT & BOWMAN, 2012). No entanto, pouco se sabe sobre a existência ou não de tais alterações no caso dos citros frente ao HLB (MARTINELLI et al., 2012).

Os ácidos jasmônico e salicílico são os principais hormônios envolvidos na sinalização das plantas e ativação da resistência sistêmica adquirida (RSA). O uso de elicitores abióticos como o ASM, pode induzir a expressão de genes relacionados à defesa, bem como de genes diretamente envolvidos na biossíntese desses hormônios (WILDERMUTH et al., 2001; CONRATH, 2006; CALDELARI et al., 2011; STENZEL et al., 2012; TOUNEKTI et al., 2013). Esses estudos

foram conduzidos com diferentes espécies, como pimentão (ROMERO et al., 2001) e tomate (COSTA, 2007). Além disso, AGNELLI (2011) mostrou que aplicações foliares de ASM reduzem a incidência de plantas cítricas infectadas com *Ca. L. asiaticus*.

Dada a ausência de dados para citros, o presente trabalho objetivou estudar a expressão de genes envolvidos nas vias de biossíntese do ácido jasmônico e do ácido salicílico em plantas de *Citrus sinensis* (L.) (Osbeck), tratadas com ASM, e também em plantas tratadas com ASM e infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*. O trabalho está dividido em três capítulos, que compreendem um teórico e outros dois experimentais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar o progresso da infecção de HLB e a expressão de genes das vias biossintéticas do ácido salicílico e do ácido jasmônico mediante técnicas de PCR quantitativo em tempo real e pela reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (qPCR e RT-qPCR), em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) tratadas com Acibenzolar-S-Metílico (ASM) e inoculadas via enxertia com *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o progresso da infecção de *Ca. L. asiaticus* em mudas de laranja doce através da qPCR.
- Avaliar o perfil de expressão de genes das vias biossintéticas do ácido jasmônico e do ácido salicílico por meio de RT-qPCR;
- Relacionar a expressão de genes das vias do ácido jasmônico e ácido salicílico com a resposta à colonização inicial e ao progresso da infecção de *Ca. L. asiaticus* em laranja doce;

1.1.3 Hipóteses

- A aplicação de ASM nas mudas de citros reduz e/ou retarda a infecção de *Ca. L. asiaticus*.
- ASM ativa a expressão de genes das vias do ácido jasmônico e/ou salicílico, resultando na produção de compostos que impedem ou atrasam a colonização da bactéria em plantas de laranja doce por *Ca. L. asiaticus*.

CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A CITRICULTURA NO BRASIL

Os gêneros *Citrus*, *Kunquats* e *Poncirus*, todos denominados citros, pertencem à família Rutaceae, são plantas nativas do continente asiático e cultivadas em uma ampla faixa ao redor do mundo, embora a concentração das áreas produtoras se dê nas regiões subtropicais (SCORA, 1975; SPIEGEL-ROY & GOLDSCHMIDT, 1996; DONADIO et al., 2005). No Brasil, as primeiras plantas foram introduzidas no início da colonização portuguesa, provavelmente no estado da Bahia. Contudo, pelas condições climáticas favoráveis para desenvolvimento e produção, a cultura se difundiu por todo o país (DONADIO et al., 2005; NEVES et al., 2010; LOPES et al., 2011).

As frutas e sucos cítricos são reconhecidos por conterem componentes importantes para a nutrição humana, como vitaminas e fibras (JAYAPRAKASHA & PATIL, 2007; COUTO & CANNIATTI-BRAZACA, 2010), sendo a bebida à base de frutas mais consumida no mundo, com 35% de participação em relação aos demais sucos (NEVES et al., 2010).

O Brasil é responsável por 53% da produção mundial de suco de laranja (CITRUSBR, 2014). Na região sudeste, atualmente a maior produtora de citros do país (IBGE, 2012), fatores como o desenvolvimento industrial para o processamento dos frutos, bem como a proximidade com os portos para embarque ao exterior e centros de pesquisa na cultura, contribuíram positivamente para o desenvolvimento da atividade e produção da cultura (CEPEA, 2002). Segundo dados da CONAB (2014), na safra 2013/ 2014 a área estimada de laranja plantada no estado de São Paulo foi de aproximadamente 530 mil hectares, sendo 497 mil hectares em produção. A safra estimada de laranja no cinturão paulista e triângulo mineiro na safra 2015/2016 é de aproximadamente 300 milhões de caixas de 40,8 kg (FUNDECITRUS, 2016).

Entretanto, com o aumento da concentração citrícola nessa região, houve também o aumento na incidência de pragas e doenças na cultura (NEVES et al., 2010). Dentre as doenças que acometem a cultura, destaca-se o HLB, ou greening, como a de maior importância (Da GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007).

1.2 HUANGLONGBING (HLB)

Não se sabe ao certo a origem desta doença, descrita pela primeira vez na China em 1919 (REINKING, 1919), a qual ficou conhecida por Huanglongbing (do chinês: “doença do ramo amarelo”) pelos sintomas característicos observados nas plantas afetadas. Além de HLB, essa doença recebeu ainda outros nomes como, por exemplo, *greening* (esverdeamento) na África do Sul, nome dado em função dos sintomas observados em frutos de ramos afetados (BOVÉ, 2006).

Somente em 1970, trabalhos de microscopia eletrônica identificaram as primeiras imagens de possíveis agentes associados à doença, acreditando-se tratar de um Mollicute (bactérias intracelulares sem parede celular). A identificação de um envoltório nas células presentes em tecidos infectados, de espessura aproximada de 25 nanômetros e a presença de uma camada de peptidoglicano, aliada a observações experimentais de que as plantas infectadas tiveram remissão de sintomas após tratamentos com antibióticos, comprovaram a associação de bactérias Gram-negativas com o HLB (LAFLÈCHE & BOVÉ, 1970; GARNIER et al., 1976; BOVÉ et al., 1980; GARNIER et al., 1984a; GARNIER et al., 1984b; GARNIER & BOVÉ, 1993).

A doença esteve restrita por décadas aos continentes asiático e africano, até ser relatada em países nas Américas do Sul e do Norte (BOVÉ, 2006). Em 2004 foi relatada na América do Sul, no município de Araraquara-São Paulo, Brasil e em 2005 na América do Norte, no estado da Flórida, EUA (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), colocando em risco a atividade citrícola comercial nestas duas regiões (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007).

1.2.1 Caracterização do agente etiológico da doença

O HLB tem como principais agentes etiológicos bactérias gram-negativas, restritas aos vasos do floema e pertencentes ao grupo das Alfa-proteobactérias (GARNIER et al., 1984b; COLLETA-FILHO et al., 2004; ACHOR et al., 2010). Esse grupo possui gêneros bem conhecidos e estudados, como por exemplo, a *Agrobacterium* spp. e organismos simbiotes, como o *Bradyrhizobium* spp. Organismos desse grupo vivem em associação íntima com a célula viva do hospedeiro eucariótico, e, em muitos casos, têm adquirido a capacidade de sobreviver e multiplicar em vetores Artrópodes (JAGOUEIX et al., 1994).

Ainda não há meio de cultura adequado para o crescimento da bactéria, impossibilitando a condução de estudos fisiológicos e morfológicos mais abrangentes e o cumprimento de todas as etapas dos postulados de Koch (JAGOUEIX et al., 1994; JAGOUEIX et al., 1996;

TEIXEIRA et al., 2005). A classificação do agente causal do HLB é realizada com base em comparações das sequências dos nucleotídeos do gene ribossomal 16S. Dessa forma, as bactérias foram então nomeadas *Candidatus Liberibacter*, e a doença nomeada Huanglongbing, ou greening (MURRAY & SCHLEIFER, 1994; JAGOUEIX et al., 1996).

Atualmente, são conhecidas três espécies de *Liberibacter* associadas ao HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Las*), *Candidatus Liberibacter africanus* (*Laf*) e *Candidatus Liberibacter americanus* (*Lam*) (JAGOUEIX et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2005), nomes dados em função dos continentes onde as mesmas foram relatadas pela primeira vez (Ásia, África e América, respectivamente). Plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter africanus* demonstram sintomas menos severos da doença em relação à *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (BOVÉ, 2006).

As diferentes espécies de bactérias também apresentam diferentes graus de resistência à temperatura. *Ca. Liberibacter africanus* e *Ca. L. americanus* não resistem a temperaturas superiores a 32° C. Enquanto isso, *Ca. Liberibacter asiaticus* tem demonstrado maior tolerância a altas temperaturas (LOPES et al., 2009a).

Em 2007, plantas com sintomas de HLB foram encontradas nas cidades de Barretos e Colômbia, região norte do estado de São Paulo e constatou-se a presença de um novo agente associado à doença no Brasil, um fitoplasma do grupo 16Sr IX (TEIXEIRA et al., 2008b). Da mesma forma, na China foi relatada a presença de um fitoplasma do grupo 16Sr I (CHEN et al., 2009).

Desde o seu primeiro relato em 2004, o número de plantas contaminadas com HLB vem crescendo anualmente no estado de São Paulo (BELASQUE JUNIOR, 2009). No período de oito anos (2004 a 2012), o número de talhões com a doença subiu de 3,4%, para 64,1%. Em 2015, 17,89% das plantas produtoras de laranja no estado de São Paulo apresentavam sintomas da doença (FUNDECITRUS, 2015).

1.2.2. Principais sintomas do HLB em plantas e frutos

Os sintomas externos e visíveis da doença na planta estão relacionados ao colapso interno dos vasos do floema e obstrução do fluxo da seiva. Inicialmente são observados sintomas nas extremidades de um ou mais ramos (Figura 1A), que aumentam progressivamente e podem tomar toda a copa. Anatomicamente, são observados danos no floema da planta e acúmulo de amido (ACHOR et al., 2010; FOLIMONOVA & ACHOR, 2010). Nas folhas dos ramos afetados, observa-se o mosqueado

ou clorose assimétrica, sintoma característico e importante para a identificação da doença no campo (Figura 1B). O espessamento na nervura é outro sintoma observado em folhas mais velhas (1B). Sintomas de deficiências minerais, embora comuns, não são específicos ao HLB. Ocorre desfolha nos ramos sintomáticos e os frutos caem prematuramente, causando a redução da produtividade em até 100%, dependendo da proporção da copa afetada (BASSANEZI et al., 2006).

Os frutos presentes em ramos sintomáticos são em geral assimétricos e menores. Na parte interna dos frutos sintomáticos observa-se que o albedo é mais espesso, a columela escurecida e as sementes abortadas. Também são observadas diferenças na coloração dos gomos, indicando amadurecimento desuniforme (Figura 1C), e mudanças na qualidade e quantidade do suco, afetando tanto a produção de sucos quanto o consumo “*in natura*” (da GRAÇA, 1991; BOVÉ, 2006; BALDWIN et al., 2010; RAITHORE et al., 2015).

Figura 1- Sintomas de HLB em plantas infectadas. Sintomas de mosqueado em ramos (A), em folhas (B) e assimetria em frutos de laranja doce (C).



Fontes: www.fundecitrus.com.br e <http://www.agrodefesa.go.gov.br>.

A doença possui um período longo e variável de incubação nas plantas, ou seja, o período de tempo entre a transmissão para plantas saudáveis e o aparecimento dos primeiros sintomas visuais pode variar de meses a mais de um ano. Esse intervalo é dependente de fatores como época de infecção e o modo de transmissão da doença (vetor ou via enxertia), diferentes combinações entre copa e porta-enxerto e idade das plantas (LOPES & BASSANEZI, 2007).

O HLB não causa a morte das plantas infectadas, contudo, com o passar dos anos, elas se tornam debilitadas e improdutivas. Sua agressividade varia em função da idade média dos pomares. Os pomares adultos podem ficar inviáveis economicamente num período de sete a dez anos após o aparecimento da primeira planta sintomática se não forem adotados nenhum tipo de medida de controle (GOTTWALD et al., 2007).

No campo, a observação dos sintomas ocorre principalmente entre o outono e início do inverno, de acordo com a temperatura em que as mesmas se encontram (BOVÉ, 2006). Experimentalmente, observou-se que temperaturas mais altas (primavera e verão) podem reduzir a taxa de multiplicação da bactéria nos tecidos das plantas (LOPES et al., 2009b).

1.2.3 Transmissão do HLB

A bactéria pode ser disseminada pelo inseto vetor a longas distâncias de pomares infectados para pomares livres da doença, fator que dificulta o controle do HLB. Os principais vetores são o psíldeo *Diaphorina citri* (HLB asiático e americano) (CAPOOR et al., 1967; YAMAMOTO et al., 2006) e *Trioza erytreae* (HLB africano) (MCCLEAN & OBERHOLZER, 1965).

O vetor *D. citri* está distribuído em uma ampla região geográfica e já havia sido relatado no Brasil antes do aparecimento do HLB (LIMA, 1942). Trata-se de um pequeno inseto que mede em sua fase adulta, cerca de 2 mm de comprimento, possui coloração inicialmente marrom-claro, escurecendo quando mais velhos. Nas asas anteriores, que são transparentes, são observadas manchas pretas (YAMAMOTO et al., 2001). Esse inseto tem vida média de 2 a 3 meses, se exposto a condições adequadas de temperatura e fontes de alimento.

A relação de *Ca. Liberibacter* spp. com o vetor é persistente: uma vez que adquirida, a bactéria tem a capacidade de se multiplicar e permanecer no inseto pelo resto da vida (HUNG et al., 2004). Ninfas de quarto e quinto instar também são aptas a adquirir *Liberibacter* e transmiti-la para outras plantas quando adultos (XU et al., 1988).

Experimentalmente, a transmissão da bactéria também é feita por borbulhia de ramos sintomáticos, que são retirados de árvores afetadas pela doença. A eficiência da inoculação por enxertia irá depender da espécie de bactéria que está sendo inoculada (*Ca. L. asiaticus* é transmitida com maior eficiência em relação à *Ca. L. americanus*) (LOPES & FRARE, 2008; LOPES et al., 2009b; COLLETA-FILHO et al., 2010).

Ca. L. asiaticus é transmitida de maneira mais eficiente também pelo inseto vetor. Acredita-se que isso esteja relacionado com a taxa de multiplicação da bactéria dentro do hospedeiro, já que a bactéria *Ca. L. asiaticus* atinge maiores concentrações dentro da planta infectada em relação a *Ca. L. americanus* (LOPES et al., 2009b). Quando a transmissão é realizada por enxertia de ramos doentes, a detecção da doença nas plantas pode variar entre 4 e 8 meses (LOPES & FRARE, 2008).

1.2.4. Principais medidas adotadas para o controle da doença

Até o presente momento, não foram descobertas medidas curativas para o controle da doença, sendo que o mesmo é realizado por meio de medidas preventivas. Não existem variedades de copa ou porta-enxerto resistentes. Com o intuito de avaliar a resistência à *Ca. L. asiaticus*, em uma pesquisa na Flórida (EUA), foram testadas 30 variedades, observando-se que alguns genótipos são tolerantes, respondendo diferentemente ao patógeno. Entretanto, a resistência ao HLB não foi observada em nenhuma das variedades testadas (FOLIMONOVA et al., 2009).

A poda de ramos sintomáticos é ineficiente no manejo da doença, pois a bactéria é distribuída para toda a planta pelo fluxo da seiva, podendo ficar alojada em vários pontos da planta. Além disso, a distribuição da bactéria é irregular na planta (LOPES et al., 2007; ACHOR et al., 2010).

Recomenda-se na renovação dos pomares ou plantio de novas áreas, que sejam utilizadas mudas provenientes de viveiros telados. Além disso, é crucial o monitoramento e controle do vetor e a erradicação de plantas hospedeiras do inseto e da bactéria (FUNDECITRUS, 2009). Sabe-se que a infecção por HLB ocorre principalmente das bordas para dentro do pomar, evidenciando que a infecção primária ocorre por psilídeos vindos de pomares próximos ou de outros talhões em um mesmo pomar (BASSANEZI et al., 2005a e 2005b).

Como é mais difícil controlar a infecção oriunda de fora do pomar ou propriedade, recomenda-se que as medidas de controle da doença sejam aplicadas em escala regional. Recomenda-se também implantar novos pomares em áreas mais extensas diminuindo assim o “efeito de borda”, maior rigor na inspeção e erradicação das plantas sintomáticas, acordos para aplicações em conjunto de inseticidas para a maior eficiência no controle do inseto vetor (Alerta fitossanitário), e liberação de inimigos naturais do vetor (*Tamarixia radiata*) em pomares abandonados (BASSANEZI et al., 2010; BASSANEZI et al., 2013; LUO et al., 2015, FUNDECITRUS, 2015).

O monitoramento e a observação de sintomas e a confirmação por PCR foram muito úteis para acelerar a detecção do patógeno no campo (MARTINELLI et al., 2012). Entretanto, a bactéria está distribuída de forma irregular nas plantas infectadas (ACHOR et al., 2010), sendo essencial que seja realizada uma amostragem das folhas sintomáticas no

momento da coleta, minimizando a ocorrência de resultados falso-negativos (TEIXEIRA et al., 2008a).

1.3 A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS E O ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM).

A diferença de susceptibilidade e resistência em plantas pode ser resultado da variação entre a percepção da planta ao ataque e ativação dos mecanismos de defesa (FODOR et al., 1998). Para que isso aconteça, ocorre um reconhecimento inicial por parte da planta e emissão de sinais. Estes sinais irão ativar genes, resultando em reações de defesa (VAN LOON & STRIEN, 1999).

A sinalização nas plantas ocorre em três etapas: percepção e/ou reconhecimento do sinal, por receptores específicos ou inespecíficos; transdução deste sinal, a partir da transmissão para um sítio de ação específico da célula (via mensageiros secundários); e tradução do sinal e resposta celular específica, ocorrendo pela ativação dos genes que induzem a síntese de PR-Proteínas (CÔTÉ al., 1995).

O reconhecimento do patógeno ou de um elicitador é importante tanto em casos de resistência específica, como nos casos de indução de resistência (HEATH, 2001). O termo “elicitador” foi proposto primeiramente por KEEN (1975) para denominar moléculas indutoras de fitoalexinas liberadas por microrganismos (HAHN, 1996; PASCHOLATI et al., 2008). Atualmente, o termo elicitador se refere a qualquer molécula capaz de desencadear a ativação de um mecanismo de defesa vegetal. Dentre os elicitores de defesa em plantas, de origem abiótica, está incluído o Acibenzolar-S-metílico (CAVALCANTI et al., 2005). Trata-se de um composto sintético análogo ao ácido salicílico e tem função semelhante na via de transdução do sinal que leva à RSA (BAYSAL et al., 2003). O principal papel fisiológico atribuído ao ácido salicílico na planta é o de atuar como sinalizador, induzindo-a a expressar resistência contra o ataque de microrganismos (MARTINEZ et al., 2000). No Brasil, o ASM é um produto registrado como “ativador de plantas” com o nome comercial BION[®] 500 WG, sendo registrado para as culturas do algodão, batata, cacau (mudas), citros (mudas), feijão, melão e tomate (AGROFIT, 2016).

Vários trabalhos relatam o uso do ASM e a ativação dos mecanismos de defesa das plantas, como, por exemplo, em tomate (NASCIMENTO et al., 2008), café (GUZZO et al., 2001). DEKKERS et al. (2004) observaram que o ASM foi eficaz na redução no número de lesões causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em mudas de

Citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*). AGNELLI (2011) avaliou o potencial de diversos produtos e substâncias indutoras de resistência visando impedir a infecção da bactéria *Ca. L. asiaticus* em mudas de citros. Somente o ASM promoveu redução significativa do número de plantas diagnosticadas positivas para HLB, ao longo do tempo.

1.4 ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA EM PLANTAS

A compreensão das interações entre plantas e patógenos é essencial visto a importância da utilização de espécies vegetais na economia, e os danos que ataques de patógenos podem causar (BARBIERI & CARVALHO, 2001). De toda a diversidade de microrganismos presentes no ambiente, apenas algumas poucas dezenas têm a capacidade de causar doenças em plantas. Pressupõe-se que, portanto, a resistência às doenças em plantas é a regra e a susceptibilidade a exceção (AGRIOS, 2005; PASCHOLATTI & LEITE, 1995). Segundo FLOR (1971), a resistência da planta ao ataque de patógenos depende da presença de genes de resistência, ou genes *R*, enquanto que os patógenos atacam com elicitores, alguns deles codificados a partir de genes de avirulência (*avr*).

A ativação dos mecanismos de defesa das plantas ocorre em função de eventos e sinais, iniciados pelo reconhecimento do agente patogênico pela planta, em geral, em resposta a algum tipo de estresse, biótico ou abiótico (MOONS et al., 1997). Para que o hospedeiro seja capaz de impedir o desenvolvimento e multiplicação do patógeno, barreiras físicas e químicas estão diretamente envolvidas nesse processo. Plantas incapazes de reconhecer e evitar a invasão pelo patógeno de maneira eficiente são consideradas suscetíveis (CHISHOLM et al., 2006).

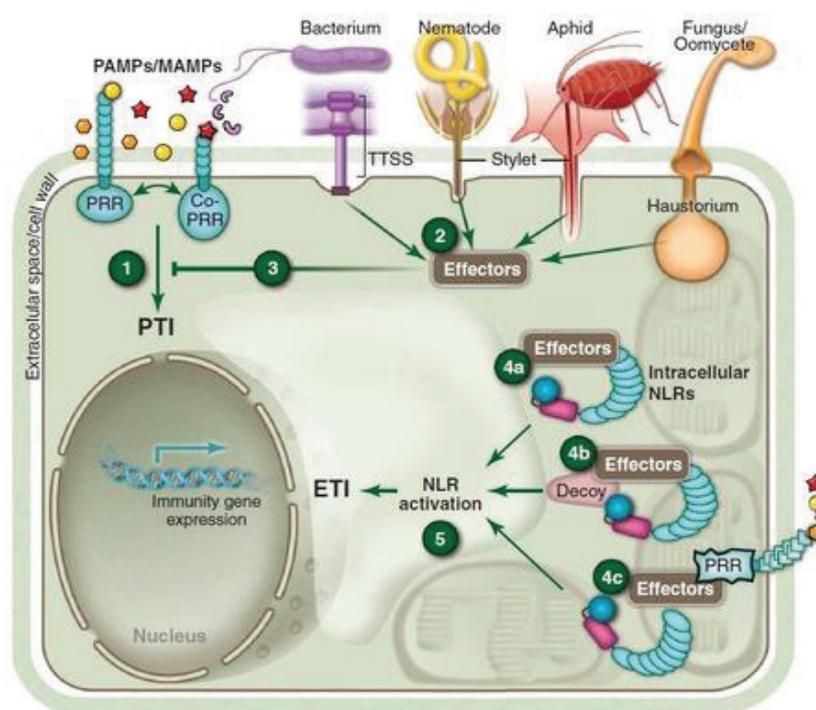
Inicialmente, a defesa é desencadeada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos/ microorganismos (“PAMPs e MAMPs”), ou é desencadeada pela resistência específica do hospedeiro, ou ETI (“*Effector-triggered immunity*”) (CUI et al., 2009; ROBERT-SEILANIANTZ et al., 2011). A defesa das plantas baseia-se na interação altamente específica entre efetores dos patógenos e produtos dos genes *R*, que reconhecem os genes de avirulência (*Avr*) do patógeno (Figura 2). Essa resistência é muito eficaz no bloqueio de muitas doenças, mas é superada por novas raças de patógenos (QUIRINO & BENT, 2003; BOLLER & FELIX, 2009).

Após a interação PAMP-PRR e o reconhecimento inicial, seja por estímulo biótico ou abiótico, ocorre uma cascata de sinalizações, em que os sinais são amplificados por mensageiros secundários como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e o etileno (ET), resultando na

ativação de fatores de transcrição de genes de defesa e na resistência sistêmica adquirida (RSA) ou resistência sistêmica induzida (RSI) (VAN LOON & STRIEN, 1999). Como esses fitormônios são fatores importantes na rota de sinalização, estão diretamente correlacionados com a ativação das respostas de defesa das plantas (GRANT & LAMB, 2006).

O uso de indutores de resistência em plantas leva a ativação da RSA. O Acibenzolar-S-Metílico (ASM) é uma molécula análoga ao AS que é amplamente utilizada, pois tem demonstrado ser um potente ativador da RSA (COLE, 1999; BAYSAL et al., 2003), atuando como um elicitador abiótico de respostas de defesa em plantas.

Figura 2- Diagrama esquemático do sistema imune das plantas. ETI: Imunidade desencadeada pelo efêtor; PRR: receptores de reconhecimento padrão. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; NLR: Receptores ricos em leucina. MAMPs: Padrões moleculares associados à microorganismos; PTI: Imunidade desencadeada pelo reconhecimento do patógeno.



Fonte: DANGL et al. (2013).

1.5 FITORMÔNIOS E DEFESA VEGETAL

Fitormônios são substâncias orgânicas que atuam e desempenham diferentes funções nas plantas como, por exemplo, o controle do desenvolvimento. Existem diversos estudos envolvendo os hormônios

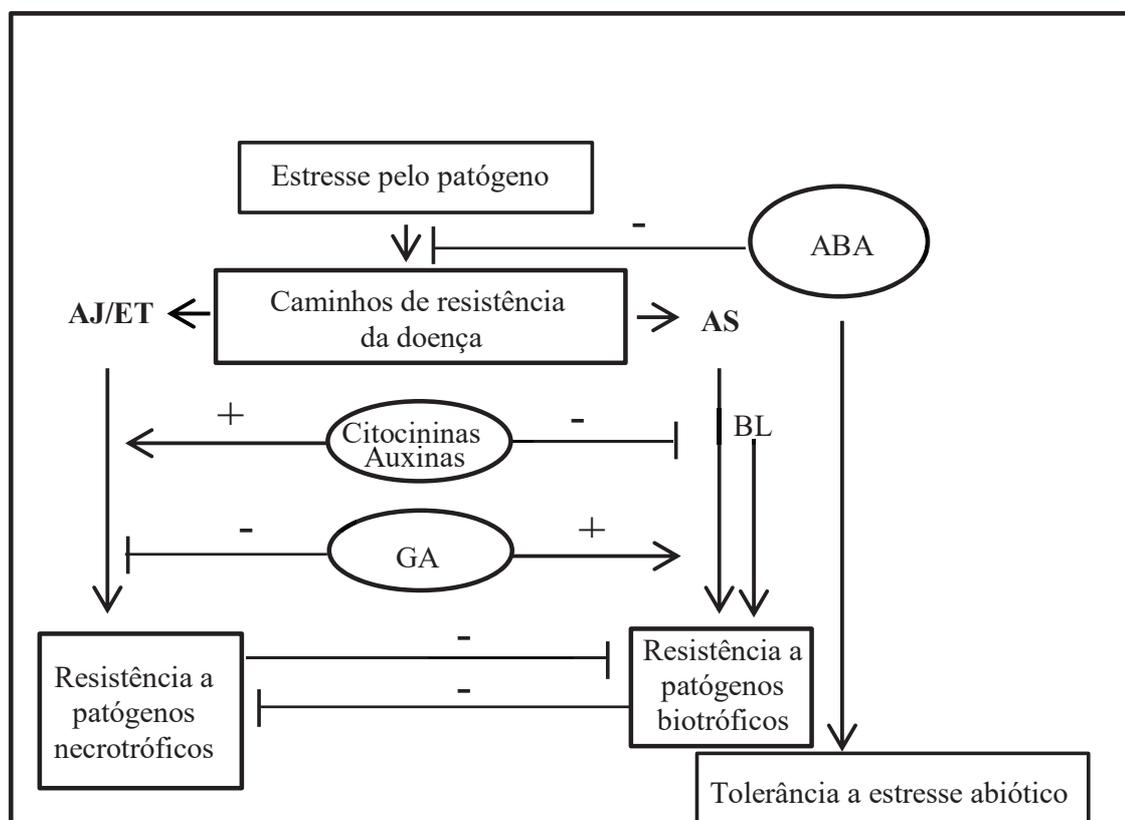
vegetais clássicos, como as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico. Posteriormente foram descritos outros compostos, dentre eles estão os ácidos jasmônico e salicílico (KERBAUY, 2004). Estes compostos estão envolvidos em processos cruciais relacionados ao desenvolvimento das plantas e frutos, sobrevivência e senescência. Além disso, estão relacionados às respostas de defesa diretas e indiretas, no metabolismo secundário (SEO et al., 2001), sendo que a quantidade e composição podem estar diretamente relacionadas à resposta ao ataque de patógenos ou herbivoria, e em função da estratégia de infecção dos patógenos (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007).

O papel dos jasmonatos (AJ), etilenos (ET) e ácido salicílico (AS) é considerado crucial na interação planta-patógeno (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007; ROBERT-SEILANIANZ et al., 2011). Estudos que envolvem ácido salicílico geralmente relacionam o aumento na biossíntese desse hormônio com a resistência a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, desencadeando rápidas reações na planta em resposta ao ataque de patógenos, como por exemplo, a reação de hipersensibilidade. Por outro lado, a maioria dos estudos que envolvem a biossíntese de jasmonatos e etilenos menciona a participação destes hormônios na resposta de defesa de plantas contra patógenos necrotróficos.

Segundo ROBERT-SEILANIANZ et al. (2007), o ácido abscísico (ABA) também pode agir como sinal positivo na defesa de plantas contra fungos necrotróficos (aqueles que se nutrem de células e tecidos mortos no hospedeiro) e promover acúmulo de AJ, mediando as vias de sinalização pelo AS e pelo AJ. Do mesmo modo, avaliando perfis de transcriptoma, ADIE et al. (2007) também sugeriram que o ABA atua como um importante regulador da biossíntese de AJ e da expressão de genes de defesa em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Já as auxinas e citocininas promovem, na maioria dos casos, maior suscetibilidade a patógenos biotróficos (aqueles que necessitam das células vivas no hospedeiro), pois induzem a via AJ/ET. Por outro lado, o ácido giberélico (GA), induz a via do AS. Os brassinoesteróides também podem promover a resistência a patógenos biotróficos, de forma independente de AS (Figura 3). Um estudo realizado por NASSEM et al. (2015) sugere que as citocininas também atuam sinergisticamente com o AS e promovem a defesa das plantas contra patógenos biotróficos, e de maneira recíproca o AS inibe as respostas de crescimento mediadas por citocininas.

Figura 3- Modelo indicando as prováveis interações entre as vias de sinalização dos hormônios na interação planta-patógeno. ABA: ácido abscísico; AJ: ácido jasmônico; ET: etileno; AS: ácido salicílico; GA: ácido giberélico; BL: Brassinosteróides



Fonte: Adaptado de ROBERT-SEILANIANTZ et al. (2007).

Na maioria dos casos, as vias de sinalização destes hormônios atuam de forma antagônica, ou seja, quando uma das vias é ativada em resposta à defesa da planta, a outra via é reprimida. No entanto, estes hormônios podem agir sinergisticamente na resposta de defesa (PIETERSE et al., 2009).

A interação entre as vias de sinalização pode ser um importante mecanismo na resposta das plantas ao ataque de patógenos, permitindo que sejam utilizados os mecanismos de defesa mais eficientes (PIETERSE et al., 2012). Evidências de sinergismos na interação entre estas duas vias já foram relatadas anteriormente (MUR et al., 2006), e sugerem que a sinalização de defesa é dependente da natureza do patógeno e seu grau de patogenicidade (JONES, 2006). Em *A. thaliana*, observou-se que existe relação entre os genes da biossíntese de AJ e outras vias de sinalização como etileno, auxinas, e ácido salicílico, sugerindo que podem ocorrer interferências e regulação positiva entre as diferentes vias de sinalização (SASAKI et al., 2001).

Por desempenhar papel importante no desenvolvimento, defesa e transdução de sinal, o desequilíbrio de hormônios vegetais como auxinas, citocininas, etileno, e ABA estão diretamente relacionados aos sintomas observados em plantas cítricas com HLB, tais como o florescimento precoce, deformidades em frutos e aborto de sementes (KIM et al., 2008).

1.5.1 Via da biossíntese do ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico sintetizado pelas plantas, contendo um anel aromático comportando um grupo hidroxila ou um derivado funcional (DEMPSEY et al., 2011). Sua biossíntese está ligada à rota dos fenilpropanóides, utilizando o ácido cinâmico como precursor (VAN LOON et al., 2006), e ocorre por duas vias derivadas do corismato (produto final da via do chiquimato): a via da fenilalanina amônia liase (PAL), no citoplasma, e a via do isocorismato (ICS) no cloroplasto (Figura 4) (DEMPSEY et al., 2011; TOUNEKTI et al., 2013). Trata-se de um hormônio extremamente importante, atuando em diversas funções regulatórias como desenvolvimento, interações com outros organismos e em resposta a estresse. Embora nenhuma destas vias biossintéticas tenha sido completamente definida, sabe-se que tanto a via do ICS e a via da PAL contribuem diretamente na síntese de AS (TOUNEKTI et al., 2013).

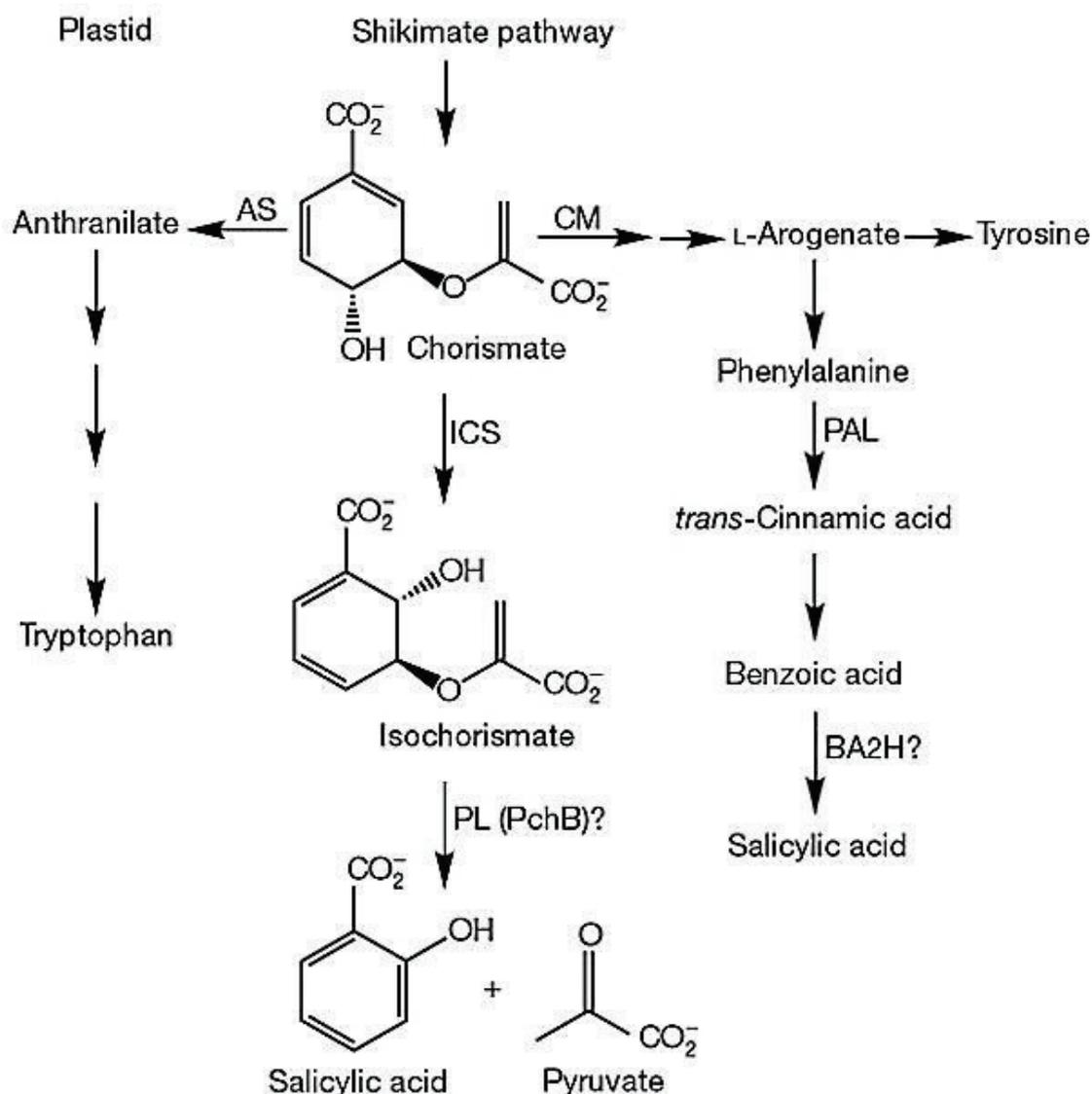
Segundo WILDERMUTH et al. (2001), o ácido salicílico sintetizado pela via do isocorismato é o principal responsável pelo fenômeno da RSA em plantas de *A. thaliana*, e DEMPSEY et al. (2011) sugerem que a via do isocorismato é a principal via de biossíntese AS em plantas. O início dessa via de biossíntese ocorre a partir desta enzima, a isocorismato sintase (ICS), que catalisa a síntese de corismato para isocorismato, posteriormente o isocorismato é convertido em AS pela isocorismato piruvato liase (PL) (WILDERMUTH et al., 2001; CHEN et al., 2009; TOUNEKTI et al., 2013).

A biossíntese do ácido salicílico a partir da L-fenilalanina, ocorre pela ação da enzima PAL, que converte o ácido *trans*-cinâmico a ácido benzóico e pode envolver a oxidação e síntese de substâncias intermediárias antes de formar o ácido benzóico. O ácido benzóico, através da enzima ácido benzóico-2-hidroxilase, é convertido em ácido salicílico, que pode ser conjugado à glicose pela ação da salicilato glucosil transferase, formando o ácido β -O-D glucosilalcílico (KERBAUY, 2004). A enzima fenilalanina amônia liase (PAL) também pode atuar como precursora de vários compostos fenólicos essenciais na resposta de defesa das plantas, sendo que em *A thaliana*, a PAL é uma enzima de

família multigênica (PAL1-PAL4) (CHANG et al., 2008). Esta enzima tem sido relacionada com a biossíntese de AS em diversas espécies, contudo, especificadamente para *A. thaliana* desempenha um papel mais indireto na biossíntese de AS.

Entre os sinalizadores químicos que indicam RSA, o AS é considerado um dos mais importantes, pelo fato de que pode induzir a síntese de proteínas PR. Em um trabalho utilizando plantas transgênicas de tabaco que expressavam o gene *nahG* de *Pseudomonas putida*, GAFFNEY et al. (1993) demonstraram que o AS é necessário para a indução da RSA. Esse gene é o responsável por codificar a enzima salicilato hidroxilase, responsável pela conversão do ácido salicílico em catecol, incapacitando as plantas de acumular AS, comprometendo a RSA. Somado a isto, observou-se que, com a aplicação exógena de AS e análogos funcionais levou a indução da expressão de genes PR (PARK et al., 2007).

Figura 4- Via proposta para a biossíntese do ácido salicílico (AS) através do isocorismato sintase (ICS) e via proposta de biossíntese de AS por meio da fenilalanina amônia liases (PAL). PL (PchB): Isocorismato piruvato-liase; BA2H: Ácido benzóico 2-hidroxilase; AS: Antranilato sintase; CM: Corismato mutase.



Fonte: WILDERMUTH et al. (2001).

O ácido salicílico pode sofrer uma série de modificações nas etapas finais de sua via de biossíntese. Sendo que pode ocorrer a sulfonatação, a hidroxilação, a glicosilação, a metilação e também sua conjugação com aminoácidos. Algumas dessas modificações permitem que grandes

quantidades de AS sejam armazenadas no vacúolo das plantas (DEMPSEY et al., 2011).

Na metilação, por exemplo, o AS é convertido a metil salicilato (Me-SA) por metil-transferases (DEMPSEY et al., 2011) e em *A. thaliana* esse processo é mediado pelo gene BA/SA carboxil metil-transferase 1 (BSMT1). Em condições normais, a expressão BSMT1 é mais elevada nas flores justamente para atrair polinizadores, já nas folhas, apresentará maiores níveis de expressão somente em resposta a fatores bióticos ou abióticos (CHEN et al., 2003). Esse consequente aumento implica em uma série de mudanças envolvendo aspectos de sinalização e defesa das plantas.

1.5.2 Via de biossíntese do ácido jasmônico

O ácido jasmônico (AJ) é um hormônio derivado do ácido linolênico. Em sua via biossintética, descrita inicialmente por VICK & ZIMMERMAN (1983), este hormônio pode assumir a forma ativa como jasmonato isoleucina (JA-Ile), ou sua forma volátil, o metil-jasmonato (Me-JA). Este hormônio foi isolado pela primeira vez de culturas de *Jasminum grandiflorum* L. em 1960. Pelo fato de ser um constituinte natural de plantas, observou-se que dependendo da sua concentração o AJ pode influenciar diretamente em processos como desenvolvimento, senescência e queda de folhas, bem como germinação de sementes, entre outros processos fisiológicos (SEMBDNER, 1993; CREELMAN & MULLET, 1995).

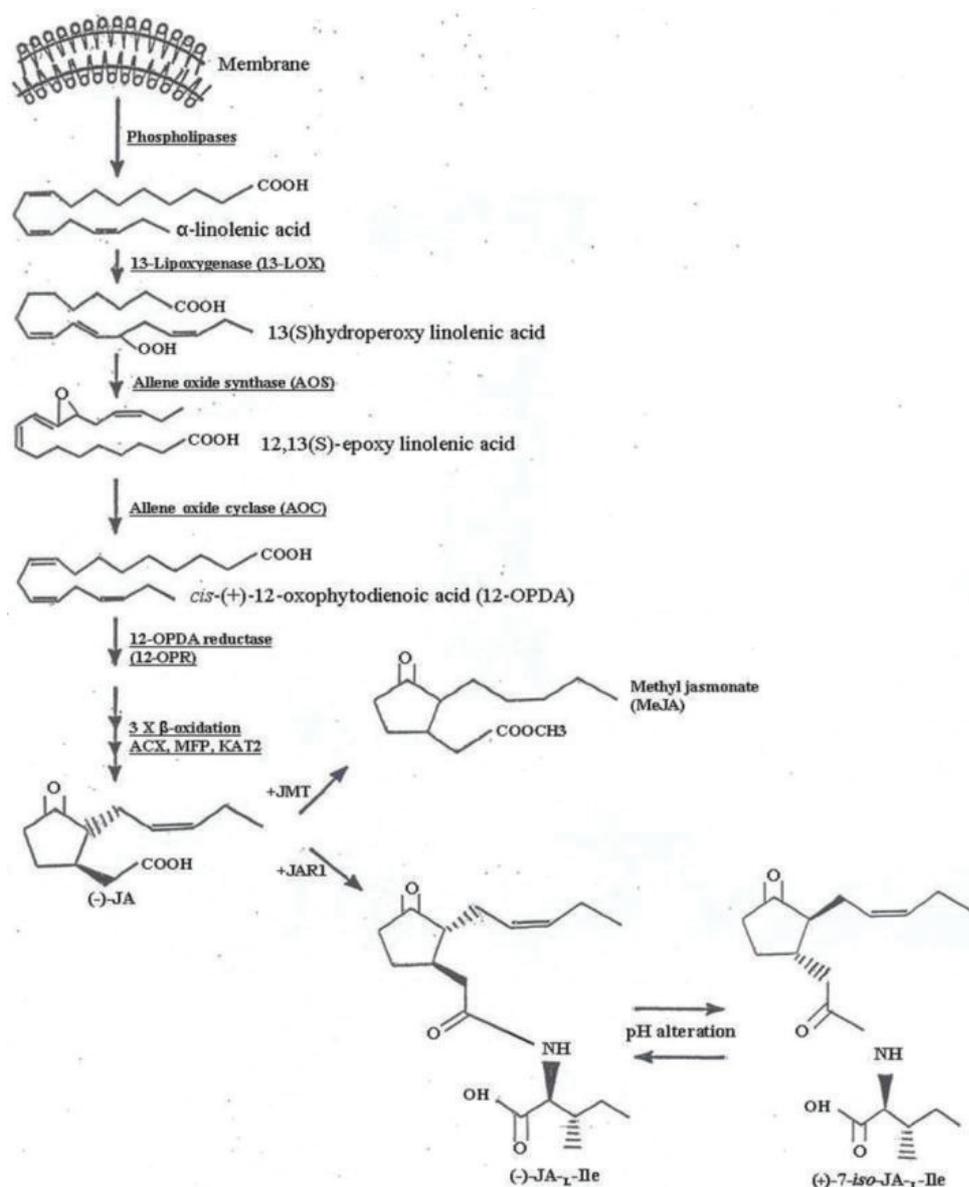
Jasmonatos são dependentes de lipoxigenase para o processo de oxidação do ácido α -linolênico e formação do ácido 13(S) hidroperoxi-octadecatrienóico; este é metabolizado pela enzima aleno óxido sintase (AOS) e convertido a 12-13(S) -ácido epoxilinoleico. Este composto quimicamente instável será oxidado pela enzima aleno óxido ciclase (AOC), convertendo-se a 12-oxo-*cis*-10,15-ácido fitodienóico (12-OPDA). Como precursor imediato de AJ, 12-OPDA é o último produto da via metabólica de biossíntese que ocorre no cloroplasto. Em seguida, nos peroxissomos da célula vegetal, essa molécula passa por três ciclos de β -oxidação, como passo final na biossíntese de AJ. Uma vez formado, o fitohormônio pode passar por diferentes conversões metabólicas. As reações catalisadas por metil-transferases (JMT) irão resultar na produção da forma volátil, o metil jasmonato (Me-JA) (Figura 5) (SEO et al., 2001; SCHALLER & STINTZI, 2009).

O AJ e subprodutos como o metil jasmonatos (Me-JA) possuem papel importante nas vias de sinalização molecular, levando à ativação de

genes de defesa e indução da expressão de genes que codificam proteínas específicas, como inibidores de proteases, proteínas relacionadas às respostas de defesa de plantas e na ativação da expressão gênica (FARMER & RYAN, 1990; CORTÊS, 2000; ROJO & SANCHEZ-SERRANO, 2003; KERBAUY, 2004).

Atualmente, os estudos da interação entre plantas e patógenos têm revelado alterações significativas na expressão de genes envolvidos na biossíntese de AJ durante o processo de infecção e colonização. Estudos de padrões globais de expressão têm contribuído para a identificação de genes envolvidos em diversas vias, incluindo as de respostas de defesa (FAN et al., 2011; ALBRECHT & BOWMAN, 2012).

Figura 5- Representação esquemática da via de biossíntese do ácido jasmônico.



Fonte: AVANCI et al. (2010).

1.6 PCR QUANTITATIVO

A reação de PCR quantitativo (qPCR) em tempo real representou um avanço na tecnologia da PCR (Polymerase Chain Reaction). Foi descrita pela primeira vez em 1993, sendo que, para detectar a fluorescência, HIGUCHI et al. (1993) acoplaram uma câmara de vídeo no termociclador para monitorar todos os ciclos da reação. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade, podendo detectar uma única cópia de um transcrito específico. Por sua alta sensibilidade e especificidade, além do fato de quantificar transcritos ao mesmo tempo em que ocorre a amplificação (método quantitativo), tornou-se uma ferramenta muito importante no estudo do HLB, auxiliando diretamente na diagnose de plantas infectadas com a bactéria. Uma das necessidades para o uso dessa técnica é o fato de que as bactérias causadoras da doença não estão presentes em grandes quantidades nos tecidos. Dessa forma, são utilizados oligonucleotídeos (*primers*) específicos, inclusive, distinguem as diferentes bactérias associadas ao HLB (JAGOUÉIX et al., 1996; LI et al., 2006).

A PCR também tem sido empregada na validação de dados obtidos por *microarray*, permitindo um maior detalhamento dos resultados (MARTINELLI et al., 2012). Além disso, a avaliação da expressão de um pequeno número de genes por RT-qPCR (reação de transcrição reversa, seguida de PCR quantitativo em tempo real) tornou-se uma ferramenta flexível e viável para estudos de expressão gênica e na avaliação de genes expressos em vias metabólicas (JINYUAN et al., 2001). Contudo, os resultados obtidos através desta técnica devem ser normalizados com um gene controle interno, cuja expressão não pode variar, independente do tratamento experimental aplicado (SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000; YANG et al., 2001).

CAPÍTULO 2- ALTERAÇÕES MOLECULARES E FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) PELO USO DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO.

2.1 INTRODUÇÃO

A citricultura do Brasil vem se destacando nas últimas décadas. O país ocupa o posto de maior produtor e exportador de laranjas do mundo. Segundo dados da safra 2015/16, divulgados pelo FUNDECITRUS (2016), a produção total de laranja no cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais foi de 300,65 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg.

Com a expansão da área plantada, bem como o adensamento dos pomares entre o centro-norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro, ocorreu o aumento na incidência de doenças e novos patógenos foram descritos. Dentre algumas doenças de importância, podem ser citadas a Clorose Variegada dos Citros (CVC) (ROSSETTI et al., 1990), a Morte Súbita dos Citros (MSC) (GIMENES FERNANDES & BASSANEZI, 2001) e o Huanglongbing (COLETTA FILHO et al., 2004), que são responsáveis pela erradicação de milhões de árvores e, conseqüentemente, por significativas perdas de produção. Contudo, o setor citrícola carece de medidas que além de aumentar a eficiência no controle de doenças, sejam também menos agressivas à saúde humana e ao ambiente. Dessa forma, a utilização de substâncias elicitoras de defesa de plantas como medidas adicionais tornam-se plausíveis, se utilizadas em conjunto com as medidas tradicionalmente empregadas.

Sabe-se que, quando expostas a microrganismos ou outras formas de estresses, as plantas podem ativar seus mecanismos de defesa. Esta ativação ocorre por meio de uma cascata de sinais e eventos que se iniciam no reconhecimento do agente indutor e culminam na ativação das barreiras estruturais e/ou bioquímicas. Essa forma de resistência é referida como resistência sistêmica adquirida (RSA) (STICHER et al., 1997; HUNT & RYALS, 1996) ou resistência sistêmica induzida (RSI) (PIETERSE & VAN LOON, 1999).

A RSA é estabelecida após um determinado período de tempo, sendo este fenômeno necessário para que ocorra a expressão de genes, acúmulo de PR-Proteínas e a indução sistêmica do AS (VERNOOIJ et al., 1994; PASCHOLATI et al., 2010). Além disso, o AS endógeno tem sido proposto como o sinalizador na RSA, baseando-se em várias evidências experimentais, como a cinética de acúmulo local e sistêmico e sua ação

protetora em plantas de *N. tabacum* e *A. thaliana* contra TMV (DELANEY et al., 1994; GAFFNEY et al., 1993; SUMMMERMATTER et al., 1995) e consequente ativação de vários genes que codificam para PR-Proteínas, tais como a PR2 (ZAREIE et al., 2002). Em algumas espécies, este fitormônio é sintetizado pela via das fenilalaninas amônia-liases (PAL). Outros trabalhos sugerem que mais de 90% do AS que é sintetizado nas plantas é dependente da via do isocorismato (CHEN et al., 2009), como ocorre em *A. thaliana* (WILDERMUTH et al., 2001; GARCION et al., 2008).

Por outro lado, a RSI não depende de AS. Está associada às vias do ácido jasmônico (AJ) e ao etileno (ET), e geralmente é estimulada em resposta a alguma situação de estresse causada por ferimentos ou pelo agente indutor (PIETERSE et al., 1998; PASCHOLATI et al., 2010). Além disso, este processo não envolve a síntese de PR-Proteínas (VAN LOON et al., 1998; PASCHOLATI et al., 2010). O AJ é derivado do ácido linolênico e enzimas como a lipoxigenase (LOX), a aleno óxido sintase (AOS) e a aleno óxido ciclase (AOC) estão envolvidas em sua síntese. Acredita-se que o AJ também atue como mediador da comunicação a longas distâncias, por meio de sinais voláteis de metil jasmonato (Me-JA).

Estes fitormônios participam de diversos processos fisiológicos, respondendo às situações de estresses ou de defesa (FARMER et al., 2003), também atuam como mensageiros secundários. Embora trabalhos argumentem que estas vias de biossíntese atuem de maneira antagônica (SPOEL et al., 2003), alguns genes envolvidos nas respostas de defesa requerem interações entre essas diferentes vias após o ataque de patógenos (BARI & JONES, 2009; CAMPBELL et al., 2003). Dessa forma, o antagonismo entre essas vias de sinalização de defesa pode não ser aplicado para todas as interações planta-patógeno. Além disso, a interligação entre essas vias pode maximizar a velocidade das respostas de defesa contra determinados patógenos (BECKERS & SPOEL, 2006).

Uma vez tendo sido observado que AS é um sinal endógeno para a ativação de RSA, houve um aumento da caracterização de produtos químicos sintéticos capazes de imitar AS na indução de RSA. Um desses é o produto comercial ASM (Acibenzolar-S-metílico) (AGROFIT, 2016). Contudo, são escassos estudos que relacionem a aplicação desses possíveis indutores de resistência com as implicações sobre a fisiologia das plantas. A perspectiva promissora do controle de doenças através da ativação de mecanismos de defesa inerentes das plantas pela utilização de agentes indutores de origem abiótica ou biótica têm estimulado pesquisas que visam o esclarecimento de aspectos bioquímicos, fisiológicos e

moleculares. A biossíntese do AS e do AJ, bem como muitos outros processos fisiológicos no qual esses fitormônios estão envolvidos e os efeitos causados pela aplicação exógena de indutores abióticos sobre a sinalização e ativação de respostas de defesa vem sendo amplamente estudados (WHITE, 1979; NAWRATH & MÉTRAUX, 1999).

Entretanto, em diversas espécies de plantas, incluindo-se a laranja doce, o uso de substâncias indutoras como é o caso do ASM, e as possíveis alterações causadas sobre a biossíntese desses mensageiros secundários e consequentes respostas de defesa ainda não estão totalmente esclarecidas. Neste sentido, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial do uso de ASM e as possíveis alterações fisiológicas, bem como as possíveis alterações transcricionais causadas em genes que são reguladores das vias biossintéticas do ácido salicílico (AS) e jasmônico (AJ) em plantas de laranja doce.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Efeito do ASM na expressão de genes das vias do AS e do AJ

2.2.1.1 Material vegetal, tratamento e coleta de amostras

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), localizado em Araraquara-SP e as análises moleculares no laboratório do Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento deste mesmo local e teve início em fevereiro de 2014. Foram utilizadas mudas de laranja doce da variedade ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), enxertadas sobre citrumelo Swingle (*Citrus paradise x Poncirus trifoliolata*), com idades entre 9 e 12 meses e mantidas em sacolas plásticas de 4L contendo substrato Plantmax[®]. Todas as mudas eram provenientes de viveiros telados comerciais, credenciados na Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo em que matrizes da copa haviam sido previamente inoculadas com a estirpe protetiva do *Citrus Tristeza Virus* (CTV).

Durante a montagem e condução dos experimentos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com ventilação forçada e resfriamento proveniente de cortina de papelão (Pad fan). A irrigação foi realizada três vezes por semana com um volume de aproximadamente 250 mL de água por planta. Além disso, foi realizada uma adubação semanal nas plantas através de fertirrigação com solução nutritiva contendo os seguintes fertilizantes (em g. L⁻¹ de água): Nitrato de cálcio, 0,9; Nitrato de potássio, 0,3; MAP, 0,07; Sulfato de magnésio, 0,26; Cobre-ácido

etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu), 0,01; Zinco-EDTA (14% Zn), 0,007; Manganês-EDTA (13% Mn), 0,005; Ácido Bórico, 0,0035; Molibdato de Amônio, 0,0003; Ferro- ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe), 0,05.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos e 12 repetições por tratamento. As plantas foram pulverizadas com água destilada ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM). Foram aplicados aproximadamente 15 mL por planta de ASM a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$, o equivalente a 40 mg por planta.

Foram avaliados dois tratamentos: a) controle, com plantas pulverizadas com água destilada, e b) plantas pulverizadas com ASM ($2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$). No tratamento b realizou-se uma única aplicação de ASM, as plantas foram pulverizadas com aproximadamente 15 mL de ASM a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$, o equivalente a 40 mg por planta. Após a pulverização das plantas com ASM, foram coletadas 3 folhas em estágios V4 e V5, de cada planta, aos 3, 6, 9, 13, 16 e 20 dias. No momento das coletas, as amostras foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido. Caso não fosse possível realizar a extração de RNA no mesmo dia da coleta, as amostras eram armazenadas em freezer -80°C até o momento de sua utilização. Foram coletadas amostras de todas as plantas e para extração de RNA e análise de expressão gênica, ao final, foram selecionadas quatro plantas de cada tratamento.

3.2.1.2 Extração do RNA total e processamento das amostras

A extração de RNA total foi feita pelo método do Trizol, a partir de 0,5 mg de tecido foliar. O tecido foi congelado em N_2 líquido e macerado até formar um pó fino. As amostras foram colocadas em tubos *falcon* de 50 mL e receberam 5 mL de Trizol. Após 5 minutos de descanso das amostras em gelo, foram adicionados 2 mL de clorofórmio: álcool: isoamílico (24:1). Após agitação em aparelho vórtex, as amostras descansaram por 3 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 8.000 rpm a 4°C , durante 30 minutos. Posteriormente foram recuperados 2 mL do sobrenadante da mistura, que foram transferidos para tubos *falcon* de 15 mL. Após centrifugação a 8.000 rpm , a 4°C , por 10 minutos, as amostras foram transferidas para tubos *falcon* de 15 mL e foram adicionados 1,5 mL do tampão de precipitação e 1,5 mL de isopropanol em cada amostra. As amostras descansaram por 10 minutos no gelo e foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 8.000 rpm . A parte líquida foi descartada e o RNA (*pellet*) lavado com etanol 70% (DEPC) por 10 minutos a 8.000 rpm . Repetiu-se o processo de lavagem e o RNA

foi seco ao ar. Por fim, o RNA foi ressuspensionado em 70 μL de água DEPC (1%). A quantificação da concentração do RNA total obtido foi mensurada em espectrofotômetro (NanoDrop 1000).

Após a quantificação das amostras em Nanodrop (NanoDrop 1000), as amostras de RNA foram diluídas para uma concentração final de 1000 ng/ μL . Em microtubos de 500 μL , foram adicionados 10 μL de amostra de RNA, 2 μL de tampão [10X], 2 μL de DNase e 6 μL de água DEPC [1%], totalizando 20 μL de reação. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C, e em seguida, foram adicionados 2 μL de “DNase Inactivation” reagente (Life®). Após 5 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 *rpm* por 1,5 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubos e as amostras foram armazenadas em freezer -80° C.

Para a síntese de cDNA, as amostras de RNA foram padronizadas para a concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, obtendo-se a mesma quantidade inicial de moléculas para a síntese de cDNA. No gelo, em microtubos plásticos livres de DNase, foram adicionados 5 μL de amostras de RNA, 1 μL dos primers N6 [10 mM] e Oligo dT (T18) [10 mM], 1 μL de dNTP's [5mM], completando-se o volume para 11 μL com água DEPC [1%]. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 min a 70 °C, e colocadas por 5 minutos no gelo. Após esse período, foram adicionados 0,6 μL de água DEPC [1%], 4 μL de tampão [5X], 2,4 μL de MgCl_2 [25 mM], 1 μL de “RNase out”, e, por fim, 1 μL da enzima “Improm II” (Promega®) As amostras foram então colocadas em termociclador (1 ciclo de 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora, 70°C por 15 minutos). Após a síntese do cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

2.2.1.3 Escolha de genes reguladores das vias do AJ e AS

Genes reguladores das vias dos ácidos salicílico (AS) e jasmônico (AJ) foram selecionados a partir de trabalhos de expressão gênica em laranja doce. Para normalização dos dados de expressão gênica, foram utilizados dois endógenos, o UPL7 e o GAPC2. Estes genes foram considerados estáveis, podendo ser utilizados como genes de referência em análises de normalização de experimentos envolvendo plantas de citros, de acordo com MAFRA et.al. (2012) (Tabela 1).

Tabela 1- Genes das vias biossintéticas dos ácidos salicílico e jasmônico, selecionados para análises de expressão.

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Nome	Referência
LOX	Fw: GCAACATTGCCACTGAAGATCCATC Rv: GTAGCTTGAATCTGGGAAGGGAAGG	Lipoxigenase	RODRIGUEZ et al., 2014.
AOS	Fw: GTTTCAGCTCGCTCCGTTAC Rv: TGGCAAATACGAGGTTGTGA	Aleno óxido ciclase	RODRIGUEZ et al., 2014
AOC	Fw: GAAGGGTGACCGGTTTGAAGC Rv: ACGGCCAAGTACGTGTCTTCG	Aleno óxido-ciclase.	RODRIGUEZ et al., 2014
JMT	Fw: TTGGTGGCAGAAGGGCGCAT Rv: CCGTGGCCAAGAGCTCCCAAA	Ácido jasmônico carboxil-metil transferase	COERINI, 2014.
ICS1	Fw: TGCTCGATTGGCGGCAGAC Rv: AGGCGTGCCTCTTCAGTCGGA	Isocorismato sintase 1	OLIVEIRA, 2013.
ICS2	Fw: CCAGCAGGCACTCCCTCCAA Rv: GGCAGCCGAGGGTCTCCTTT	Isocorismato sintase 2	OLIVEIRA, 2013.
PAL2	Fw: GGCTGCCATTGCCACGTCCT Rv: AGAGCACCGCCGTTCTTGTT	Fenilalanina amônia liase 2	OLIVEIRA, 2013.
PAL3	Fw: AACTGGACCGTGGCAGCGGA Rv: GACTCGCCGCCGAGCTTCAC	Fenilalanina amônia liase 3	OLIVEIRA, 2013.
PAL4	Fw: TCACCGCCGCGCCAATTCT Rv: GCGAGACCCTCCTTAGGCTGC	Fenilalanina amônia liase 4	OLIVEIRA, 2013.
PAL5	Fw: CTGACGATGGGGGTCAATGGGGA Rv: CGCTGCAGGGATCATCAGCGTA	Fenilalanina amônia liase 5	OLIVEIRA, 2013.
SAGT1	Fw: CCAAGCGCTAGATCACAA Rv: GGACGAGGATGACGAATCTC	Ácido salicílico glucosil transferase 1	OLIVEIRA, 2013.
BSMT1	Fw: GTTTAACGAGGCCGTTGATG Rv: TCGTCAAGGAACTGTCACG	Ácido benzóico/SA carboxil-metil transferase 1	OLIVEIRA, 2013.
PR2	Fw: TTCCACTGCCATCGAAACTG Rv: TGTAATCTTGTTTAAATGAGCCTCTTG	PR-Proteína 2	FRANCIS et al., 2009.

UPL7	Fw: CAAAGAAGTGCAGCGAGAGA Rv: TCAGGAACAGCAAAAGCAAG	Ubiquitin-protein ligase 7	MAFRA et.al., 2012
GAPC2	Fw: TCTTGCCTGCTTTGAATGGA Rv: TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase C2	MAFRA et.al., 2012

2.2.1.4 Análises de expressão gênica por RT-qPCR

Para a análise da expressão gênica, em todas as reações, foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento de cada período avaliado. Essas repetições foram analisadas em triplicata, como reação controle utilizou-se uma amostra sem cDNA (NTC). Os ensaios de RT-qPCR foram conduzidos no aparelho StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems). A reação foi constituída de 1,0 μL de cDNA, 14 μL de SYBR[®] Green Master Mix e de primers [100 mM]. Após cada reação de amplificação, foram analisadas as curvas de *melting*, para garantir a especificidade do fragmento amplificado.

A análise de expressão dos genes foi feita de acordo com LIVAK & SCHMITTGEN (2001), com base na eficiência do valor obtido de *Ct* (*Cycle Threshold*) do controle no primeiro tempo em relação às demais repetições ao longo do tempo. Os níveis de expressão foram estimados pela normalização com os dois genes de referência.

Os dados foram submetidos à verificação da homogeneidade das variâncias dos tratamentos e dados não homogêneos foram transformados ($\text{Log}(X+5)$). Quando o F-teste foi significativo, os valores obtidos foram submetidos ao teste de separação de médias, com intervalo de confiança de 95%. Fez-se a separação de médias por Tukey com o auxílio do *software* AGROESTAT[®].

2.2.2 Efeito do ASM sobre parâmetros relacionados à fotossíntese

As medidas de trocas gasosas foram feitas no Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV- UNESP (Jaboticabal-SP), entre os meses de novembro e dezembro de 2015. Foram utilizadas mudas de laranja doce ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), enxertadas sobre Citrumelo Swingle (*Citrus paradise x Poncirus trifoliolata*), com idades entre 9 e 12 meses e mantidas em sacolas plásticas de 4 litros contendo substrato Plantmax[®].

As plantas foram pulverizadas com água destilada ou ASM (2,66 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), totalizando 6 repetições por tratamento. Com o auxílio de um analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha- LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska-USA) operado em sistema aberto, foram realizadas quatro medições de parâmetros relacionadas à fotossíntese (1, 8, 14 e 19 dias após a pulverização das plantas com ASM): as taxas fotossintéticas (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , mol

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e as taxas de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Todas as medições foram feitas em condições naturais, no período matutino, no intervalo entre 08:00 e 11:00h, em folhas completamente expandidas e dispostas em posições semelhantes em relação às folhas de outras plantas e à incidência de radiação solar.

Os dados das leituras, obtidos entre os diferentes dias avaliados foram submetidos a análise de homogeneidade de variâncias e ao teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS

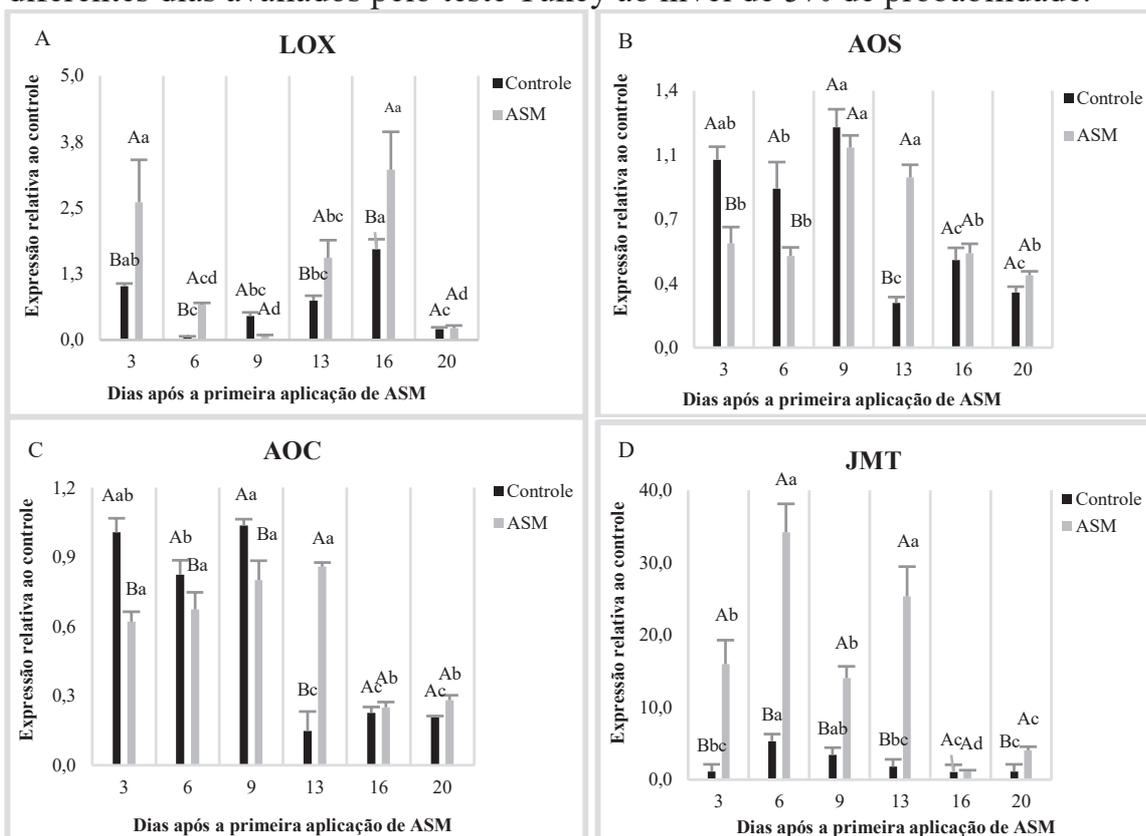
2.3.1 Expressão de genes das vias biossintéticas dos ácidos jasmônico e salicílico

Em relação aos genes envolvidos na biossíntese do AJ, a aplicação de ASM promoveu incremento nos níveis de expressão de lipoxigenase, aos 3, 6, 13 e 16 D.A.A. Maiores significâncias foram observadas aos 3 D.A.A. ($F=9,63$; $GL=1, 57$; $p=0,0030$) e aos 16 D.A.A. ($F=7,81$; $GL=1, 57$; $p=0,0071$) (Figura 6A).

ASM não promoveu aumento dos níveis de expressão de AOS, sendo que estes permaneceram inferiores ao controle nas duas primeiras avaliações. Valores superiores para um mesmo período de avaliação foram obtidos aos 13 D.A.A. ($F=46,13$; $GL=1, 93$; $p<0,0001$) (Figura 6B). O mesmo foi observado para AOC, onde níveis de expressão superiores foram obtidos somente aos 13 D.A.A. ($F=77,00$; $GL=1, 95$; $p<0,0001$) (Figura 6C).

Já a expressão de JMT foi induzida significativamente pela pulverização das plantas com ASM na maioria das avaliações, com exceção da realizada aos 16 D.A.A. Maiores níveis de expressão desse gene foram observados aos 6 D.A.A ($F=96,02$; $GL=1, 82$; $p<0,0001$) e aos 13 D.A.A ($F=115,48$; $GL=1, 82$; $p<0,0001$) (Figura 6D).

Figura 6- Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (RT-qPCR) dos genes da lipoxigenase (LOX) (A), aleno óxido sintase (AOS) (B), aleno óxido ciclase (AOC) (C) e ácido jasmônico carboxil-metil transferase (JMT) (D), envolvidos na biossíntese de ácido jasmônico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹. Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

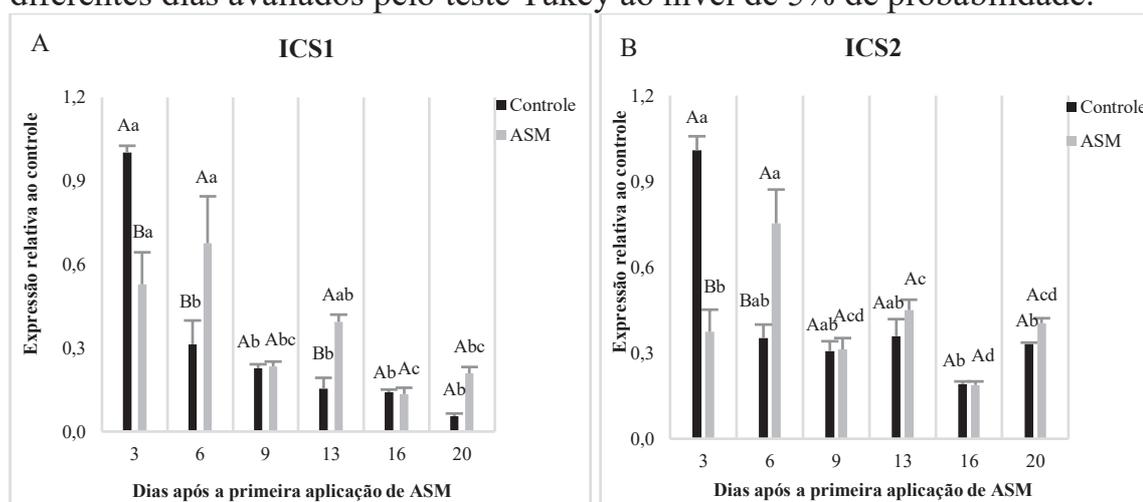


Dos genes envolvidos na biossíntese do AS, a aplicação de ASM não promoveu aumento nos níveis de expressão do ICS1. Ao longo do tempo não foram observados valores superiores aos obtidos para o controle aos 3 D.A.A ($F=24,97$; $GL=1, 95$; $p=0,0001$). Já para um mesmo período de avaliação, a expressão de ICS1 foi superior ao controle aos 6 ($F=14,18$; $GL=1, 95$; $p=0,0003$) e 13 D.A.A. ($F=7,37$; $GL=1, 95$; $p=0,0079$) (Figura 7A).

Também não foram observados níveis significativos de expressão do ICS2. Do mesmo modo que observado para ICS1, ao longo do tempo não foram observados valores superiores aos obtidos para o controle aos 3 D.A.A ($F=72,19$; $GL=1, 75$; $p<0,0001$). Quando avaliado o comportamento em um mesmo período de tempo, a expressão de ICS2

foi superior ao controle somente aos 6 ($F=28,71$; $GL=1, 75$; $p<0,0001$) (Figura 7B).

Figura 7- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), dos genes isocorismato sintase 1 (ICS1) (A) e isocorismato sintase 2 (ICS2) (B), envolvidos na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$. Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



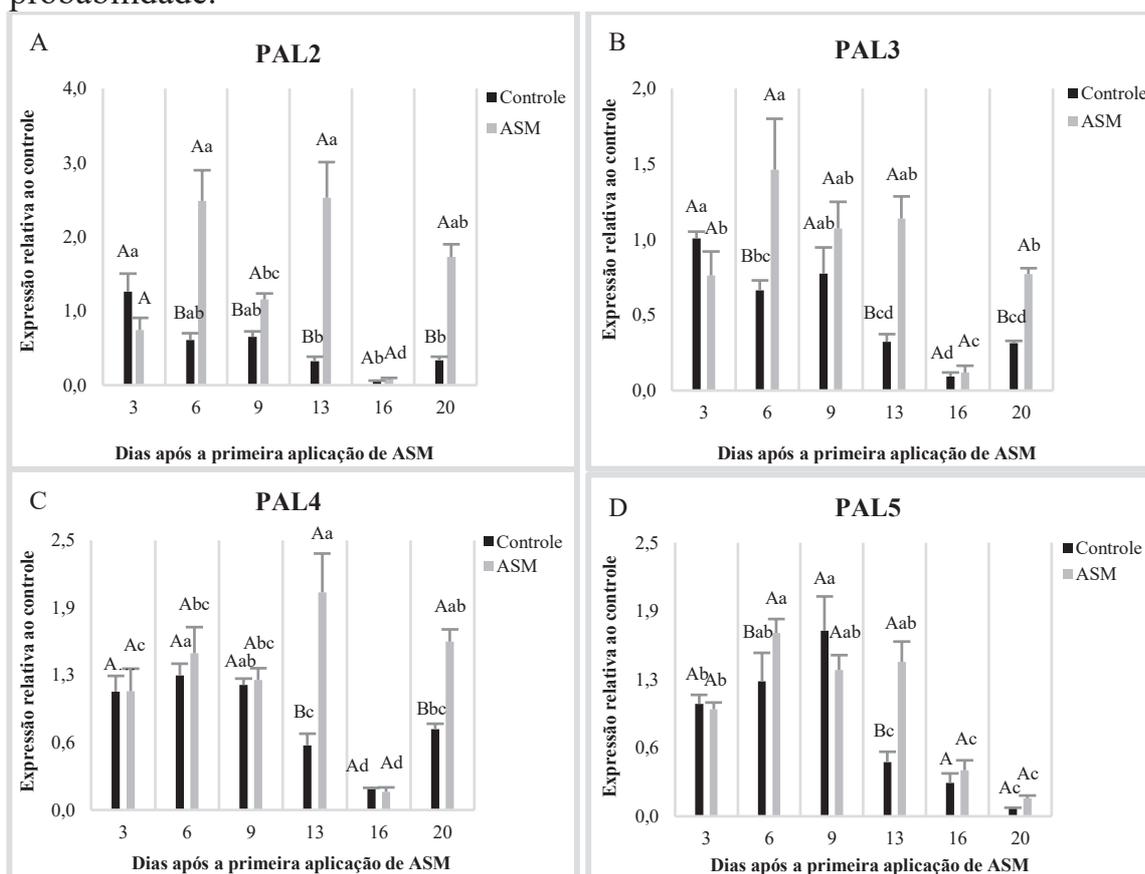
No caso dos genes da PAL em plantas tratadas com ASM, expressão do gene PAL2 foi superior ao controle aos 6 ($F=40,77$; $GL=1, 88$; $p<0,0001$), 9 ($F=3,98$; $GL=1, 88$; $p<0,0492$), 13 ($F=57,77$; $GL=1, 88$; $p<0,0001$) e 20 D.A.A. ($F=28,02$; $GL=1, 88$; $p<0,0001$) (Figura 8A).

PAL3 teve níveis de expressão superiores ao controle aos 6 ($F=14,28$; $GL=1, 52$; $p<0,0004$), 13 ($F=18,96$; $GL=1, 52$; $p<0,0001$) e 20 D.A.A. ($F=6,64$; $GL=1, 52$; $p=0,0129$) em plantas tratadas com ASM (Figura 8B).

PAL4 seguiu a mesma tendência observada para os genes PAL2 e PAL3. Sendo que, aumentos significativos na expressão de PAL4 foram observados aos 13 ($F=36,72$; $GL=1, 40$; $p<0,0001$) e 20 D.A.A. ($F=13,49$; $GL=1, 40$; $p=0,0007$) em plantas tratadas com ASM (Figura 8C).

Para PAL5, níveis significativos de expressão em relação ao controle foram observados aos 6 ($F=4,97$; $GL=1, 84$; $p=0,0007$) e 13 D.A.A. ($F=20,79$; $GL=1, 84$; $p<0,0001$) nas plantas tratadas com ASM (Figura 8D).

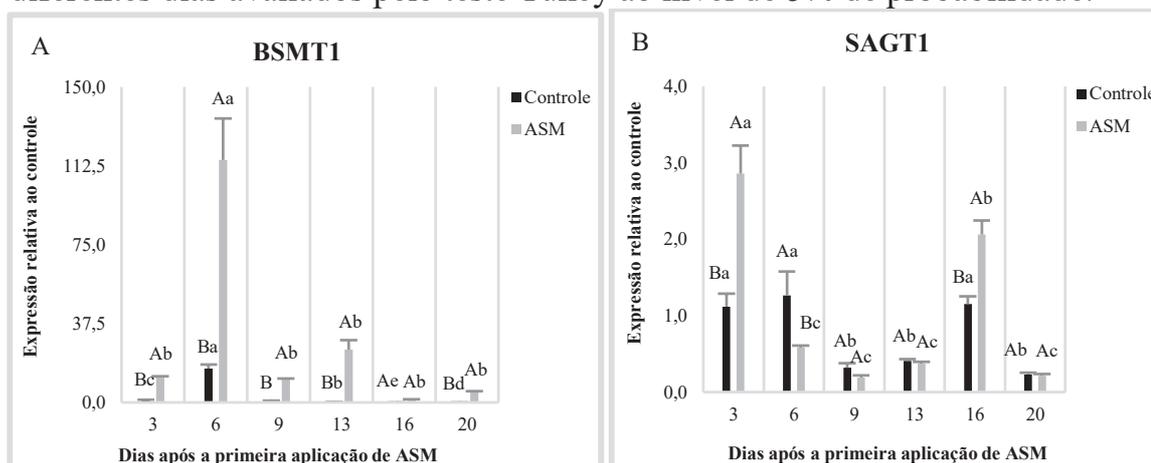
Figura 8- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), dos genes da fenilalanina amônia-liase 2 (A),3 (B),4 (C) e 5 (D) (PAL2, PAL3, PAL4 e PAL5) envolvidos na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$. Médias seguidas por letras maiúscula indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



A expressão do gene BSMT1, nas plantas tratadas com ASM foi superior ao controle ao longo da maioria das avaliações, com destaque para os 6 D.A.A. ($F=243,79$; $GL=1, 91$; $p<0,0001$), em que houve incremento significativo, sendo até 115 vezes superior ao controle (Figura 9A).

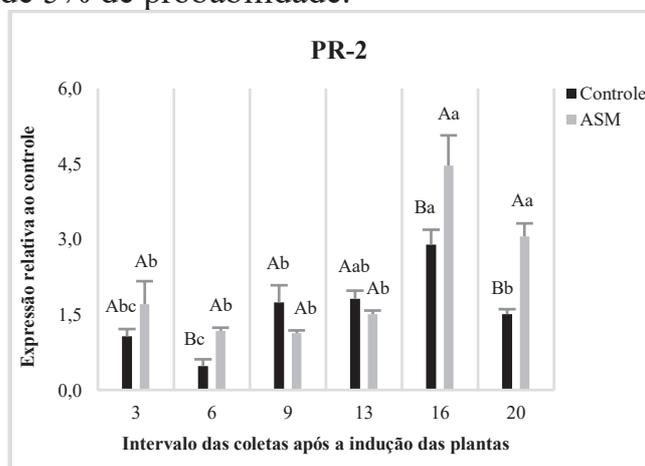
Com relação ao ácido salicílico glucosil-transferase (SAGT1), a expressão gênica foi significativamente maior em relação ao controle aos 3 ($F=52,94$; $GL=1, 94$; $p<0,0001$) e 16 D.A.A. ($F=16,53$; $GL=1, 94$; $p<0,0001$) em plantas tratadas com ASM (Figura 9B).

Figura 9- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), dos genes ácido benzóico/AS carboxil metil-transferase (BSMT1) e ácido salicílico glucosil-transferase 1 (SAGT1), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ no experimento preliminar (I). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



A expressão do gene PR2 foi alterada em função do tratamento com ASM, apresentando expressão significativamente maior em relação ao controle aos 6 ($F=5,90$; $GL=1, 91$; $p=0,0171$), 16 ($F: 11,64$; $GL=1, 91$; $P=0,0010$) e 20 D.A.A. ($F= 17,46$; $GL=1, 91$; $P<0,0001$) (Figura 10).

Figura 10- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da PR-Proteína 2 (PR-2), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



2.3.2 Parâmetros relacionados à fotossíntese

Menores taxas fotossintéticas foram obtidas em plantas tratadas com ASM em relação ao controle em todos os tempos analisados, sendo que aos 15 e 19 D.A.A. houve diferença estatisticamente significativa (Figura 11A).

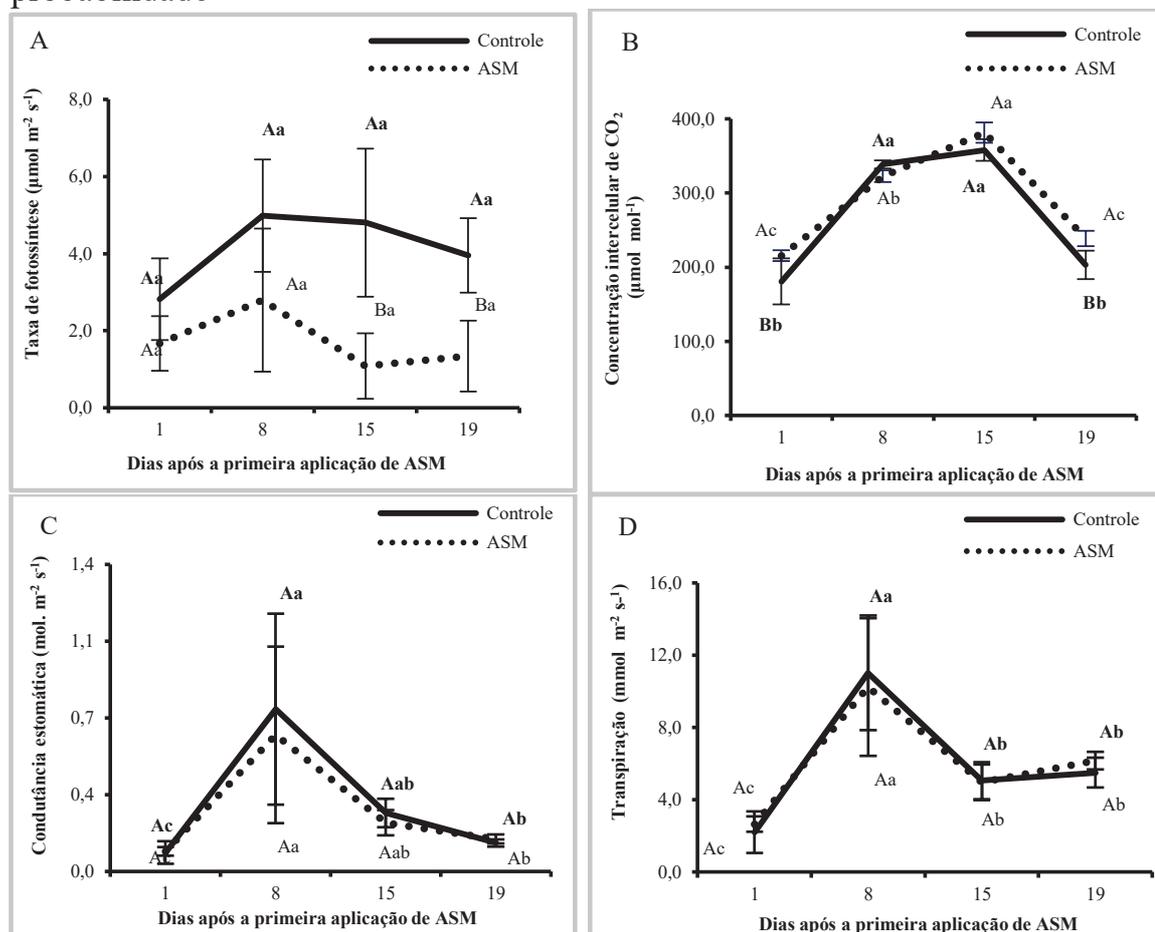
A concentração interna de CO₂ diferiu entre ASM e controle ao 1 D.A.A. e aos 19 D.A.A. onde foi maior para ASM. Ao longo do período avaliado as maiores taxas foram observadas aos 8 e 15 D.A.A. para os dois tratamentos (Figura 11B).

Não houve variação na condutância estomática entre plantas tratadas com ASM e plantas controle ao longo do período avaliado. As menores taxas foram obtidas ao 1 e as maiores aos 8 e 15 D.A.A. em todos os tratamentos (Figura 11C).

A taxa de transpiração seguiu a mesma tendência observada para condutância estomática. A transpiração foi similar nas plantas tratadas com ASM e água para os mesmos períodos de avaliação, sendo que a maior taxa foi obtida aos 8 D.A.A., se diferenciando dos demais dias avaliados (Figura 11D).

De maneira geral, os dados de taxa fotossintética obtidos foram inferiores nas plantas pulverizadas com o indutor, podendo-se inferir que houve influência da aplicação de ASM sobre este parâmetro. Entretanto, para os demais parâmetros avaliados, os resultados obtidos foram similares na maioria dos tempos avaliados, sendo comprovado pela sobreposição dos valores obtidos para as Figuras 11 B, C e D.

Figura 11- Parâmetros fisiológicos de plantas de *C. sinensis* tratadas com ASM-Acibenzolar-S-metílico ($2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$) ou água destilada (controle): taxa fotossintética (A), concentração intracelular de CO_2 (B), condutância estomática (C) e transpiração (D). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade



2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Expressão de genes relacionados à biossíntese dos ácidos jasmônico e salicílico

Ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) são fitormônios reguladores do desenvolvimento e das respostas das plantas. Esses metabólitos secundários também atuam como mediadores da sinalização móvel das respostas de defesa. Além disso, o acúmulo destes compostos nas plantas está relacionado ao estabelecimento da RSA e RSI em diferentes espécies (YALPANI et al., 1991; MAUCH-MANI & MÉTRAUX, 1998; BARI & JONES, 2009).

A aplicação exógena de ASM e seu potencial efeito na ativação da RSA tem sido amplamente estudado em diversas culturas, como na pimenta (BAYSAL et al., 2005), tomate (BAYSAL et al., 2003), no café (GUZZO et al., 2001) e em laranja (GRAHAM & MYERS, 2011). Muito embora estudos que analisam os efeitos da aplicação exógena de AS em plantas de citros estejam disponíveis (AGNELLI, 2011; GRAHAM & MYERS, 2011), são escassas as informações relativas às alterações no perfil de transcritos em plantas de laranja doce após pulverizações com ASM, um produto análogo ao AS e com registro comercial. Demonstramos que a aplicação foliar de ASM altera a expressão em genes chaves da regulação da produção e modificação dos ácidos salicílico e jasmônico.

Com relação aos genes envolvidos na biossíntese de AS, os níveis de expressão de ICS1 e de ICS2, após o tratamento com ASM, permaneceram praticamente inalterados, sem incrementos significativos, exceto aos 6 dias após indução. A expressão relativa de ICS1 e ICS2 foi baixa quando comparada aos demais genes. Assim como em *A. thaliana*, na laranjeira doce são conhecidos dois homólogos desse gene, o ICS1 e ICS2, constatou-se que a via biossintética de AS em *A. thaliana* é dependente do ICS, e principalmente do homólogo ICS1 (GARCION et al., 2008).

Aparentemente, tratamentos com ASM podem induzir a biossíntese de AS que é mediada por fenilalanina amônia-liase (PAL). Sugere-se isso pelo fato de que todos os genes da PAL que foram avaliados apresentaram, em algum momento, níveis de expressão significativamente maiores em relação ao controle após a pulverização das plantas. A expressão de genes da via de biossíntese do ácido trans-cinâmico mediada por PAL pode ser modulada pela aplicação de indutores de resistência. Tal observação foi constatada em uva (*Vitis vinifera*) tratada com AS, onde houve incremento da expressão de PAL e estabelecimento da RSA (WEN et al., 2005). Após aplicação de ASM em plantas de tomate, CAVALCANTI et al. (2006) também constataram que houve incremento na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase.

No presente estudo, observamos que após a aplicação de ASM, também houve alterações significativas dos níveis de expressão de SAGT1 e BSMT1. Essa diferença foi muito significativa para o BSMT1, principalmente aos seis dias após a aplicação do indutor, com o nível de expressão atingindo valores muito superiores ao observado no controle.

SAGT1 e BSMT1 são responsáveis pelas modificações de glicosilação e de metilação do AS, respectivamente, produzindo o éster glicosilado ou ácido salicílico glucosídeo e o metil salicilato (MeSA)

(LEE et al., 1995; DEMPSEY et al., 2011). Ambos os produtos exercem importante função no metabolismo de SA em plantas, uma vez que aumentos nos níveis de expressão desses genes são frequentemente correlacionadas ao aumento dos níveis de AS endógenos nas plantas (KOO et al., 2007; SONG et al., 2008). Em *A. thaliana* SONG (2006) constataram que SAGT1 é induzido tanto pela aplicação exógena de AS, quanto por infecções com agentes patogênicos e, nesse caso, sua maior expressão está diretamente envolvida com o acúmulo de AS durante o processo de defesa.

A resposta de defesa das plantas também pode ser desencadeada por meio da emissão de sinais voláteis. Tal fenômeno foi observado por LIU et al. (2011) em plantas de *N. tabacum* e de *A. thaliana* infectadas com TMV que superexpressavam Me-SA. O éster volátil do AS atuou como um sinalizador, além de mediar o estabelecimento da RSA e da consequente expressão de PR-Proteínas em plantas próximas às inoculadas (SHULAEV et al., 1997; PARK et al., 2007). Dessa forma, supõe-se que em laranja doce, o tratamento com ASM pode desencadear respostas de defesa em consequência de aumentos de níveis endógenos de AS, bem como pela emissão de sinais voláteis como o metil salicilato (Me-SA).

Houve incremento também da expressão de PR-2 em plantas tratadas com ASM, sendo mais um indício de que o ASM pode induzir a RSA em plantas de laranja doce. Esse gene promove a síntese de glucanases, enzimas capazes de degradar a parede celular de bactérias e fungos (MAUCH et al., 1988). Nesse contexto, LI et al. (2016) observaram indução da PR-2 após o tratamento com ASM e ácido β -aminobutírico (BABA) em laranjeira doce.

Como o estabelecimento da RSA pode estar associado ao aumento da biossíntese de AS e à expressão de genes relacionados à patogênese como PR-2, acredita-se que, a partir dos resultados obtidos, o ASM possa atuar como indutor da RSA em plantas de laranja doce. Por exemplo, WHITE (1979) e WARD et al. (1991) avaliaram plantas de *N. tabacum* e constataram que a aplicação exógena de AS reduziu o tamanho da lesão causada por TMV nas plantas. WHITE (1979) também observou que a aplicação exógena de AS induziu a resistência local ao TMV e o acúmulo de PR-Proteínas.

Em citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) tratado via *drench* com ASM, houve redução significativa da incidência de cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) e indução de forma consistente da expressão de PR-2 em plantas desafiadas com *X. c. citri*, confirmando o estabelecimento da RSA (FRANCIS et al., 2009).

COQUEIRO et al. (2015) avaliaram alterações transcricionais em laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) tratada com AS e observaram a indução da expressão de genes que participam da via de sinalização por AS, dentre eles a PR-2.

Por outro lado, muitos trabalhos têm demonstrado que, além do AS, o AJ é um fitormônio importante na regulação das respostas de defesa das plantas, principalmente contra o ataque por herbívoros (CHEONG et al., 2002; KESSLER et al., 2004). Dos genes aqui estudados que estão envolvidos na biossíntese desse fitormônio, observamos que os níveis de expressão do gene da lipoxigenase (LOX) foram induzidos em plantas tratadas com ASM. Sabe-se que a expressão desse gene é alterada por condições de estresse. BEN-HAYYIN et al. (2001) demonstraram que um homólogo deste gene foi altamente expresso em células tolerantes a condições de estresse salino, oriundas de calos de plantas de *C. sinensis*.

Após aplicações exógenas de ASM, somente houve incremento nos níveis de expressão de AOS e AOC de forma pontual, observada 13 dias após o tratamento indutor. Estes genes são responsáveis pelas etapas intermediárias na via de biossíntese de AJ no cloroplasto, resultando na produção de OPDA. Alterações nos níveis de expressão desses genes são frequentemente ocasionadas em resposta à invasão do agente patogênico ou estresses abióticos. Como consequência da elevação na expressão desses genes, são observados acúmulos dos níveis endógenos de AJ em plantas de tomate (HARMS et al., 1995) e *A. thaliana* (STENZEL et al., 2012).

A aplicação do indutor ASM nas plantas de laranja doce e o aumento dos níveis de expressão de LOX, AOS e AOC, mesmo que transitórios, podem fazer com que as plantas ativem seus mecanismos de defesa ao ataque por herbivoria. Sugere-se isso pelo fato de que em *N. attenuata* com o silenciamento da LOX, as plantas exibiram elevada susceptibilidade ao ataque de herbívoros (KESSLER et al., 2004).

O ASM induziu significativa expressão de transcritos da metil transferase do ácido jasmônico (JMT), que cataboliza a formação do jasmonato de metila, um derivativo volátil do JA. Tanto o AJ, quanto o seu metil éster, o Me-JA, são componentes importantes da via de sinalização que regula a expressão de genes de defesa. Plantas que expressam maiores níveis de genes da biossíntese de AJ, em geral são mais resistentes ao ataque de herbívoros. O Me-JA atua diretamente na comunicação interna da planta e com plantas vizinhas (CREELMAN & MULLET, 1995; SASAKI et al., 2001; AVANCI et al., 2010; CHEONG & CHOI, 2003).

Como os responsáveis pelos passos intermediários da via de biossíntese de AJ não foram induzidos em igual proporção observada para JMT, não se pode descartar também a possibilidade de haver outros genes responsáveis por esses passos da via de biossíntese de AJ que permaneçam ainda desconhecidos. Em *A. thaliana*, por exemplo, foram validados quatro genes que atuam como AOC (STENZEL et al., 2003).

De acordo com os dados obtidos, acredita-se que aplicações de ASM em plantas de laranja doce poderiam estar atuando benéficamente no sentido de estimular a resistência das plantas contra patógenos por meio de ambas as vias de biossíntese estudadas. Na via do AS, os genes PAL, SAGT1 e BSMT1, bem como a PR-2, foram induzidos significativamente após a pulverização das plantas. Além disso, na via mais responsiva aos danos causados por herbívoros ou por agentes abióticos, foram observados níveis significativos de expressão de LOX e JMT.

2.4.2 Parâmetros relacionados à fotossíntese

A eficiência no processo de absorção de água e nutrientes, produção fotossintética e o consumo de fotoassimilados são fatores que estão diretamente envolvidos no crescimento das plantas (MARENCO & LOPES, 2009). Vários trabalhos mostram alterações em parâmetros fisiológicos em plantas de citros, tais como taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração, quando submetidas a condições principalmente de estresse hídrico ou biótico e para diferentes combinações de copa e porta-enxerto (MACHADO et al., 1994; BRAKKE & ALLEN Jr., 1995; MEDINA et al., 1999). Contudo, não há estudos da relação dentre o uso de ASM e eventuais alterações fisiológicas que a administração desse produto possa causar nas plantas.

Constatou-se que, de uma maneira geral, a taxa fotossintética das plantas de laranja foi baixa ao longo do tempo, independente do tratamento, pois as médias obtidas foram menores de $6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e as médias observadas em plantas C_3 estão em torno de 15 e $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (MARENCO & LOPES, 2009). Porém, as taxas obtidas para ASM foram ainda menores em relação às observadas para o controle ao longo de todo o período avaliado, com diferenças significativas nas duas últimas avaliações (aos 15 e 19 D.A.A.). MACHADO et al. (1999) avaliaram laranjeiras 'Valência' com diferentes porta-enxerto e, mesmo sob condições de estresse hídrico, as taxas fotossintéticas médias obtidas foram maiores em relação às obtidas com o presente estudo.

Fatores externos e internos à planta influenciam as taxas médias de fotossíntese (ITO et al., 2003), como a disponibilidade de água, estresses abióticos, nutrição mineral, luminosidade, concentração de CO₂ do ar, idade das folhas (folhas em desenvolvimento ou em fase de senescência apresentam taxa de fotossíntese menor do que folhas maduras e completamente expandidas). Além disso, também existe influência inerente da variedade, combinação copa e porta-enxerto e do metabolismo fotossintético, que no caso de plantas cítricas é do tipo C₃ (SHARKEY, 1985).

É essencial que ocorram trocas gasosas entre as folhas das plantas com o ar, contudo essa troca deve ser regulada pela abertura e fechamento de estômatos para que haja uma condutância estomática que permita o fornecimento de substrato para as reações da planta. Sabe-se que os decréscimos da fotossíntese em citros são ocasionados primariamente pelo fechamento parcial dos estômatos (MAGALHÃES FILHO et al., 2009). Dessa maneira, a baixa condutância estomática obtida para as plantas ao longo de 20 dias pode explicar a taxa fotossintética baixa ao longo de todo o período avaliado.

Quedas significativas da condutância estomática das folhas causam limitações na fotossíntese, devido a menor disponibilidade de CO₂ para esse processo (MARENCO & LOPES, 2009). Dessa forma, os dados de leitura de taxa fotossintética e condutância estomática estão de acordo, uma vez que os maiores índices observados de fotossíntese coincidem com os maiores índices de condutância estomática.

As variações da concentração interna de CO₂ também estão diretamente relacionadas com a fotossíntese, pois a fotorrespiração reduz à medida que a relação CO₂/O₂ aumenta. Os índices de saturação para plantas C₃ são de 1000 μmol⁻¹ (MARENCO & LOPES, 2009). Ao longo das medições, todos os dados coletados estavam dentro deste índice.

A taxa de transpiração para plantas C₃ aumenta com o déficit de pressão de vapor (DPV). O fechamento parcial dos estômatos ocorre em momentos de alta temperatura e menor umidade relativa do ar, propiciando menor eficiência do uso da água pela planta (BRAKKE & ALLEN Jr., 1995; MEDINA et al., 1999). Dessa forma, a taxa de transpiração em plantas de citros é sazonal. MACHADO et al. (2002) observaram que em laranja ‘Valência’, nos meses mais quentes, aumentam-se as taxas de transpiração das plantas em relação aos meses mais amenos do ano.

De todos os parâmetros avaliados, observou-se que o tratamento com ASM influenciou na taxa fotossintética, o que pode gerar consequências negativas no crescimento das plantas. Acredita-se que tal

fenômeno também possa estar relacionado aos altos níveis de expressão observados para alguns dos genes de resistência estudados ao longo desse período. Provavelmente estas plantas demandaram maior custo energético associado à transcrição desses genes.

Alterações em parâmetros fisiológicos após o uso de ASM são relatadas em outras espécies. KUHN e PASCHOLATI (2010) constataram que o ASM induz resistência em feijão contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, mas que após tratamentos com esse produto pode ocorrer redução na biomassa total das plantas. Do ponto de vista evolucionário, as plantas mantêm os mecanismos de defesa latentes para economizar energia e/ou substrato. A ativação de mecanismos de defesa geralmente acarreta no desvio de recursos e isso pode acabar influenciando no desenvolvimento das plantas. Entretanto, espera-se que esse aumento de custo seja compensado pelos benefícios da resistência induzida nas plantas (HEIL, 2001; WALTERS et al., 2005).

CAPÍTULO 3- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE PLANTAS DE LARANJA DOCE (*C. sinensis* L. Osbeck) TRATADAS COM ASM E INOCULADAS COM *Ca. L asiaticus*.

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos três maiores produtores de frutas do mundo (SEAB, 2015). O cultivo de laranja no país se destaca tanto em produtividade, quanto em área plantada. Além disso, o suco de laranja produzido é quase que em sua totalidade destinado à exportação, tratando-se, portanto, de uma *commodity* agrícola. São Paulo ocupa o posto de maior estado produtor de laranja do país. Entretanto, com a forte concentração da área produtora, associado à migração do setor citrícola para o Centro-Sul do estado, observa-se maior incidência de pragas e doenças preocupantes para a cultura (NEVES et al., 2006).

Desde o seu primeiro relato na América do Sul e do Norte, nos anos de 2004 e 2005 (COLLETA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005; HALBERT, 2005), o Huanglongbing (HLB), uma doença causada por bactérias Gram-negativas restritas aos vasos do floema, vem ameaçando o futuro da citricultura nas duas principais regiões produtoras do mundo, São Paulo, no Brasil e a Flórida nos Estados Unidos.

A significativa redução da vida útil dos pomares afetados, bem como a necessidade de erradicação das árvores infectadas, somado à diminuição no rendimento em árvores afetadas faz do HLB a doença mais destrutiva e de maior importância para a citricultura no mundo (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007). Além disso, na maioria dos casos, o pomar se torna improdutivo e acaba sendo removido antes que se atinjam altas incidências da doença.

Sem a adoção de medidas para o controle da doença, em poucos anos, todas as plantas acabam sendo infectadas. O manejo do HLB é baseado na redução das fontes de inóculo, com a remoção de árvores infectadas, e no controle químico do inseto vetor, o psílídeos *D. citri* (GOTTWALD et al., 2007). Como não existem variedades cítricas comerciais resistentes à doença, todas as plantas no campo estão suscetíveis à infecção pela bactéria, havendo somente diferentes graus de tolerância e de manifestação dos sintomas (FOLIMONOVA et al., 2009; STOVER & McCOLLUM, 2011).

Além da dificuldade no controle da doença pelos citricultores, os custos de produção têm aumentado significativamente. Um dos desafios para citricultura atual tem sido a determinação de manejo eficiente, com baixo impacto ambiental. Muitas plantas respondem a infecção por

fungos, bactérias e vírus pela ativação de mecanismos de defesa em partes da planta que não foram necessariamente infectadas pelo patógeno, sendo essa resistência chamada de Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) (MARTINEZ et al., 2000)

A ativação dos mecanismos de defesa inerentes das plantas, também pode ser estimulada pela aplicação prévia de produtos bióticos ou abióticos, que não causem fitotoxicidade, e atuem como indutores de resistência em plantas (KESSMAN et al., 1994; MALAMY et al., 1996; COLE, 1999). Após o tratamento das plantas, pode ocorrer a ativação de genes que codificam uma série de PR-Proteínas e enzimas (RESENDE et al., 2000). Alguns trabalhos têm descrito a reação fisiológica das plantas infectadas em resposta ao ataque de agentes patogênicos (WARD et al., 1991).

O ASM é o primeiro produto que possui registro para utilização como ativador de defesa em plantas (KNIGHT et al., 1997; AGROFIT, 2016). Em plantas de tabaco, por exemplo, após a aplicação de ASM ocorreu a ativação da RSA e as plantas responderam tanto ao ataque de fungos (*Cercospora nicotiana*), quanto de bactérias (*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*; *Thanatephorus cucumeris*) (COLE, 1999). AGNELLI (2011) mostrou que esse produto tem potencial efeito sobre o HLB, uma vez que retarda a detecção do número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* ao longo do tempo em que plantas de laranja são tratadas. Entretanto, os mecanismos que são ativados pelas plantas em resposta à aplicação de ASM permanecem desconhecidos.

A identificação das vias de transdução de sinal que podem ser ativadas nas plantas durante a resposta ao ataque de um agente abiótico ou patogênico, pode ser útil na compreensão de susceptibilidade e resistência a doenças (MALAMY et al., 1990). Sabe-se que os mensageiros secundários estão envolvidos na regulação da sinalização das respostas de defesa de plantas tanto a fatores bióticos quanto abióticos e que o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ) são fitormônios que desempenham um papel importante neste sentido (KLESSIG & MALAMY, 1994; YANG et al., 1997; BECKERS & SPOEL, 2006).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial do ASM para o controle do HLB, bem como seu efeito sobre a expressão dos genes reguladores das vias de biossintéticas do ácido jasmônico e salicílico, em plantas de laranja doce, visando esclarecer quais são os mecanismos responsáveis pela sinalização das respostas de defesa.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal e inoculação

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), localizado em Araraquara-SP. As análises fenotípicas e moleculares no laboratório de Pesquisa & Diagnóstico do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento deste mesmo local.

Foram realizados dois experimentos e utilizadas mudas de laranja doce da variedade 'Hamlin' (*C. sinensis* (L.) Osbeck), enxertadas sobre citrumelo Swingle (*C. paradise x P. trifoliolata*), com idade entre 9 e 12 meses. As mudas foram mantidas em sacolas plásticas de 4L contendo o substrato Plantmax[®]. Todas as mudas foram provenientes de viveiros telados comerciais, credenciados na Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo. As matrizes da copa haviam sido previamente inoculadas com a estirpe protetiva do *Citrus Tristeza Virus* (CTV). O primeiro experimento foi iniciado em abril e o segundo em junho de 2015 (Tabela 1). Durante a montagem e condução dos experimentos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com ventilação forçada e resfriamento proveniente de cortina de papelão (pad fan).

A irrigação foi realizada três vezes por semana com um volume de aproximadamente 250 mL de água por planta. Semanalmente, as plantas foram irrigadas com uma solução nutritiva contendo os seguintes fertilizantes (em g. L⁻¹ de água): Nitrato de cálcio, 0,9; Nitrato de potássio, 0,3; MAP, 0,07; Sulfato de magnésio, 0,26; Cobre-ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (14,5% Cu), 0,01; Zinco-EDTA (14% Zn), 0,007; Manganês-EDTA (13% Mn), 0,005; Ácido Bórico, 0,0035; Molibdato de Amônio, 0,0003; Ferro- ácido dietileno diamino hidróxidofenilacético (EDDHA) (6% Fe), 0,05.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 12 repetições por tratamento. Os dois experimentos foram constituídos por quatro tratamentos, como segue abaixo:

- a- Controle (plantas pulverizadas com água destilada);
- b- Plantas pulverizadas com ASM (2,66 mg.mL⁻¹);
- c- Plantas pulverizadas com ASM (2,66 mg.mL⁻¹) e inoculadas com borbulhas de ramos sintomáticos (HLB) provenientes de plantas com a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Las*);

d- Plantas pulverizadas com água destilada e inoculadas com borbulhas de ramos sintomáticos (HLB) provenientes de plantas com a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Las*).

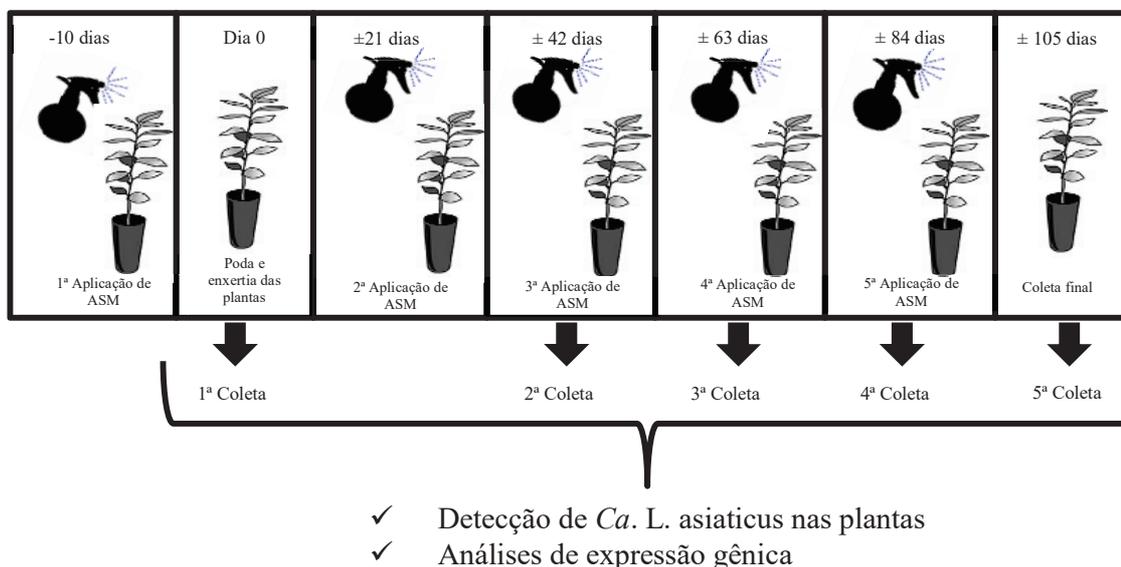
A inoculação da bactéria (tratamentos c e d dos dois experimentos) foi feita pelo método de enxertia com borbulhão (borbulhia), como descrito por LOPES & FRARE (2008). Inicialmente foi feito um corte longitudinal no caule das mudas inoculadas, a cerca de um palmo da junção do porta-enxerto com a copa. Em seguida, um segmento com cerca de 4-5 cm foi removido de ramos sintomáticos (inóculo) e afixado com fita plástica transparente (fítio) na região onde havia sido feito o corte da muda. Todos os ramos com sintomas de HLB (*Ca. L. asiaticus*) utilizados na inoculação das plantas foram coletados de plantas infectadas e sintomáticas mantidas em casa de vegetação. Nas plantas utilizadas como controle (tratamentos a e b), foram feitos os mesmos procedimentos das plantas onde houve a inoculação da bactéria, no entanto, foram usadas borbulhas de plantas sadias mantidas em casa de vegetação.

3.2.2 Aplicações de ASM e coleta das amostras.

Foram feitas cinco aplicações periódicas de ASM via foliar (nos tratamentos b e d), em cada experimento, sendo utilizados aproximadamente 15 mL da suspensão do produto a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$, o equivalente a 40 mg por planta. O produto utilizado possui registro comercial com o nome Bion[®] 500 WG, e seu ingrediente ativo é o Acibenzolar-S-metílico ou ASM.

A primeira aplicação de ASM foi realizada 10 dias antes da enxertia das plantas. No dia em que foi realizada a enxertia das plantas, foi feita a primeira coleta de material vegetal. Neste mesmo dia foi realizada uma poda em todas as plantas, com intuito de estimular a emissão de brotações jovens, já que em tecidos mais jovens o processo de extração do RNA é facilitado. Após a enxertia, periodicamente foram feitas quatro coletas de material vegetal seguidas de quatro novas aplicações de ASM, a cada 21 dias aproximadamente. O esquema geral da condução dos experimentos é mostrado na figura 12.

Figura 12- Desenho esquemático das atividades realizadas durante a condução dos experimentos I e II, ambos iniciados com a aplicação de (ASM). O produto foi aplicado nos dias -10, 21, 42 e 63, 84 no experimento I e -10, 10, 52, 74 e 94 no experimento II, em relação ao momento da enxertia (dia 0). Os tempos de coleta de material vegetal também estão indicados.



A amostragem das plantas foi constituída por folhas que seriam utilizadas para a extração de DNA seguida de detecção de *Ca. L. asiaticus* ao longo do tempo e de folhas que seriam utilizadas na extração de RNA seguidas das análises da expressão dos genes de interesse.

3.2.3 Viabilidade das borbulhas e título de *Ca. L. asiaticus*.

No momento da enxertia, de cada ramo utilizado para a inoculação das plantas, dos tratamentos c e d, foram coletadas amostras de tecidos de cada borbulha inoculada e estas foram submetidas à extração de DNA e análise de qPCR para detectar e quantificar o título bacteriano de *Ca. L. asiaticus*. Quarenta dias após a enxertia foi avaliada a taxa de borbulhas viáveis. As plantas enxertadas com borbulhas de material vegetal que não apresentaram reação positiva para *Las* na qPCR e também aquelas plantas em que foi observado que as borbulhas estavam secas aos 40 dias após a enxertia, não foram selecionadas para as etapas seguintes do trabalho.

3.2.3.1 Extração de DNA do tecido vegetal

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980), modificado por TEIXEIRA et al. (2005). Em bolsas plásticas (BAG's), contendo 0,5 g de material vegetal (pecíolo e

nervura central) picado, foram adicionados 3,0 mL do tampão CTAB (Tris-HCl 1M-pH 8, NaCl 1,4M, EDTA 20mM), contendo β -mercaptoetanol a 0,2% e, com o auxílio de um equipamento Homex, as amostras foram maceradas. Em seguida, 1,5 mL do macerado foi recolhido e transferido para microtubos plásticos de 2,0 mL. Após 30 minutos de incubação em banho-maria a 65°C, as amostras foram centrifugadas a 13.000 *rpm* por 5 minutos e um volume de 900 μ L do sobrenadante foi recuperado, transferido para um novo microtubo de 2,0 mL, onde foram adicionados 900 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico [24:1]. As amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos e centrifugadas a 13.000 *rpm* durante 5 minutos, e 800 μ L do sobrenadante foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. O DNA foi então precipitado pela adição de 0,6 vezes o volume de isopropanol (480 μ L), homogeneizado levemente pela inversão dos tubos e mantido a -4°C por no mínimo 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 *rpm* durante 20 minutos para formação do precipitado (*pellet*), em seguida foram lavadas duas vezes com 0,9 mL de etanol 70%, e centrifugadas a 13.000 *rpm* por 10 min. O resíduo de álcool foi removido em “*speed-vacuum*” por 6 min e as amostras de DNA ressuspensas em 50 μ L de água Milli-Q autoclavada e armazenadas a -20°C para análises posteriores.

3.2.3.2 Título de *Ca. L. asiaticus* nas amostras de borbulhas através de PCR quantitativo (qPCR).

Para os ensaios de qPCR, o DNA (extraído conforme item 3.2.3.1) foi previamente diluído em água Milli-Q autoclavada para uma concentração final de 100 ng/ μ L.

Nas reações de qPCR, foi utilizado um Kit TaqMan qPCR Master Mix (Ambion[®]) baseada em sequencias específicas da 16S rDNA de *Ca. L. asiaticus*. As quantidades utilizadas para cada reação estão descritas a seguir: 6,0 μ L Master mix [1x], 0,6 μ L de cada um dos *primers* de *Ca. L. asiaticus* HLBas- *forward* (5' GTCGAGCGCGTATGCAA-TACG 3') [0,5 μ M] e HLBr- *reverse* (5' CTACCTTTTTCTACGGGATAACGC 3') [0,5 μ M], 0,48 μ L da sonda HLBp (5' AGACGGGTGAGTAACGCG 3') [0,2 μ M], 3,32 μ L de água ultrapura e 1 μ L do DNA genômico, totalizando 12 μ L de reação (LI et al., 2006).

Para amplificação do DNA, o programa utilizado consistiu na desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 45 segundos nas fases de anelamento e extensão (LI et al., 2006). Foram utilizados controles negativos (amostras sem o DNA da bactéria) e controles positivos (DNA

genômico de amostras positivas para *Ca. L. asiaticus*). Para a amplificação via qPCR foi utilizado o aparelho StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems) do Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico do Fundecitrus.

A análise dos resultados obtidos foi feita no software do aparelho StepOne Plus (StepOne 2.3). Sendo que o ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold (Ct)*, ponto que permite estimativa da quantidade de fluorescência de cada amostra.

Para a quantificação do título médio de *Ca. L. asiaticus* das borbulhas em cada tratamento, os valores de *Ct* obtidos da amplificação da região 16S do rRNA ribossomal, foram convertidos para o valor logaritmo do número de colônias por grama de tecido do material avaliado, determinada pela equação $y = -0,2998x + 11,042$ ($R^2=0.9981$), onde y é o valor obtido em logaritmo e x o valor de *Ct* obtido na qPCR. Fez-se em seguida o teste t para amostras independentes ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas conforme descrito por LOPES et al. (2013).

A distribuição da contagem de amostras positivas entre os tratamentos ao longo do período de amostragem, nos experimentos I e II, foi comparada por meio do teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov para duas amostras independentes (MASSEY et al., 1951; SIEGEL, 1957).

3.2.4 Confirmação da infecção das plantas e seleção das plantas para análises de expressão gênica

Para verificar a eficiência da transmissão da bactéria *Ca. L. asiaticus*, e para avaliar a taxa de multiplicação das bactérias nas plantas, a partir da enxertia (dia 0) foram realizadas periodicamente cinco coletas de material vegetal das plantas enxertadas.

De cada planta enxertada foram coletadas três folhas fisiologicamente maduras (Figura 13A), que eram identificadas e posteriormente lavadas e secas com papel toalha. Das três folhas coletadas de cada planta, foram picados o pecíolo e a nervura principal e utilizou-se 0,5 g deste material para a extração do DNA, da mesma forma descrita para a extração do DNA das borbulhas (Item 3.2.3.1).

Após a extração do DNA, foi feito o qPCR das amostras (conforme o item 3.2.3.2). Assim sendo, após confirmar que a enxertia transmitiu com sucesso a bactéria (nos tratamentos c e d), foram selecionadas as

plantas comprovadamente infectadas para serem utilizadas nas etapas posteriores do trabalho, ou seja, para as análises de expressão gênica.

O esquema de coleta de amostras de material vegetal das plantas para a análise da expressão gênica obedeceu aos mesmos intervalos de tempo descritos para a confirmação da presença de *Ca. L. asiaticus*. Sendo que para a extração do RNA foi feita a coleta de material vegetal de todas as plantas ao longo dos experimentos, no entanto, para as análises de expressão de genes das vias do AJ e AS foram selecionadas quatro plantas em cada tratamento (dos tratamentos a, b, c e d), observando o detalhe de que, nos tratamentos c e d, foram selecionadas as amostras onde se confirmou a presença da bactéria.

No momento das coletas, três folhas juvenis de cada planta (Figura 13B) foram selecionadas para a extração de RNA, e estas amostras eram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório. Caso não fosse possível realizar a extração de RNA no mesmo dia da coleta, as amostras eram armazenadas em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

Figura 13- Estágio de desenvolvimento das folhas coletadas ao longo dos experimentos I e II. Folhas em estágio mais avançado de maturação (A) foram selecionadas para detecção da bactéria ao longo do tempo, enquanto folhas mais juvenis (B) foram coletadas para extração de RNA e análises de expressão gênica.



3.2.4.1 Extração do RNA total, tratamento das amostras com DNase e Síntese do cDNA.

A extração de RNA total, tratamentos com DNases e síntese de cDNA foram feitas conforme a metodologia descrita no capítulo 1 para extração de RNA.

3.2.4.2 Escolha dos genes reguladores das vias do AJ e AS e dos genes de referência (housekeepings)

Os genes reguladores das vias do ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) em laranjeira doce foram selecionados a partir de trabalhos de expressão genica. Para normalização dos dados de expressão gênica, foram utilizados dois endógenos UPL7 e o GAPC2 (MAFRA et.al., 2012) (Tabela 1, capítulo 1).

3.2.4.3 Análises de expressão gênica por RT-qPCR

Para a análise da expressão gênica, em todas as reações, foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento em cada período avaliado.

A análise de expressão segue a metodologia descrita no capítulo 1.

3.2.4.4 Análises estatísticas

Foram comparadas plantas sadias versus plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus*, plantas sadias versus plantas tratadas com ASM, e por fim, plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus* versus plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus* e tratadas com ASM, dentro de cada período de avaliação, e o comportamento da expressão de cada gene ao longo do tempo. A metodologia utilizada é a mesma descrita para análises estatísticas no capítulo 1.

3.2.5 Análises de parâmetros fenotípicos das plantas

3.2.5.1 Contagem do número total de folhas e ramos

Aos 125 dias após a enxertia (D.A.E.) foi realizada a contagem do número total de folhas dos experimentos I e II. Em seguida, fez-se a contagem do número total de ramos formados a partir da área onde foi realizada a poda no início do experimento (dia 0, ou dia da enxertia).

3.2.5.2 Análises de área foliar e matéria seca total das plantas

Aos 150 dias após a enxertia das plantas (D.A.E.) foi realizada a avaliação da área foliar total dos experimentos I e II. Para tal, todas as folhas foram destacadas das plantas e em seguida foram digitalizadas em *scanner* convencional com 200 dpi e as imagens salvas em formato BMP.

A quantificação da área foliar total foi feita observando-se o contraste das imagens com o auxílio do software ImageJ- Image Processing and Analysis in Java (Bethesda-EUA). Os dados obtidos foram expressos em área média por tratamento (cm²).

Após a digitalização das imagens, as folhas foram acondicionadas em embalagens de papel e pesadas (peso fresco), após foram colocadas em estufa regulada a $\pm 65^{\circ}$ C, permanecendo até observar-se que o peso das amostras era constante (peso seco). O cálculo da matéria seca total foi feito pela perda de umidade das amostras ((Peso final*100) / Peso inicial das amostras).

3.2.5.3 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à verificação da homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Posteriormente, com os dados homogêneos, realizou-se a análise de variância e o respectivo F-teste (5%). Quando o F-teste foi significativo fez-se o teste de separação de médias de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do *software* ASSISTAT®.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Enxertia das borbulhas e detecção de *Ca. L. asiaticus* ao longo do tempo

Os resultados obtidos por qPCR confirmaram que 100% das amostras de borbulhões estavam infectadas por *Ca. L. asiaticus*. O título bacteriano estava entre 4,02 e 5,66 (valores elevados no *Log* base 10) presente nos tecidos inoculados no experimento I (Tabela 2). Entretanto, no experimento II as plantas do tratamento ‘*Las* + ASM’ foram inoculadas com borbulhas com menor título bacteriano em relação ao tratamento ‘*Las*’.

A porcentagem de plantas com borbulhas viáveis 40 dias D.A.E. foi de 91,67% no experimento I, enquanto no experimento II, 100% das borbulhas estavam viáveis (Tabela 2).

Tabela 2- Porcentagem de enxertos viáveis e de borbulhas positivas para *Ca. L. asiaticus*, valores médios de Ct (*Cycle threshold*) e título bacteriano obtido antes da inoculação das borbulhas para transmissão de *Liberibacter* para as plantas testes dos experimentos I e II.

Experimentos	Tratamentos	Enxertos Viáveis (%)	Borbulhas + qPCR (%)	Valor médio (Ct)	Valor médio (Log)
I	<i>Las</i>	91,67 (11/12)	100	22,45±1,91 A	5,58±0,72 A
	<i>Las</i> + ASM	91,67 (11/12)	100	22,72±2,39 A	5,66±0,57 A
II	<i>Las</i>	100 (12/12)	100	23,10±1,81 b	5,46±0,54 b
	<i>Las</i> + ASM	100 (12/12)	100	27,92±2,71 a	4,02±0,81 a

Médias seguidas por letras maiúsculas (experimento I) e minúsculas (experimento II) iguais não diferem significativamente entre si pelo teste t para amostras independentes ao nível de 5% de probabilidade (n= 12).

No experimento I, foram observadas alterações significativas entre os tratamentos com e sem ASM para o número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus*. A detecção da primeira planta com *Ca. L. asiaticus* foi aos 40 D.A.E., para o controle positivo (*Las*) e aos 150 D.A.E. para o tratamento em que foi aplicado ASM. Entre os 40 e 150 D.A.E., o tratamento com ASM proporcionou a redução na detecção de *Ca. L. asiaticus* (Tabela 3). Aos 150 D.A.E. não foram observadas diferenças no número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* e aos 321 D.A.E. todas foram positivas para *Ca. L. asiaticus*. A distribuição da presença de plantas *Las*-positivas entre os dois tratamentos foi estatisticamente a um nível de significância de 10% (teste K-S= 1,336; p= 0,0562).

No experimento II, a detecção das primeiras plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus* ocorreu aos 60 D.A.E. nos tratamentos inoculado com *Las*. Em plantas tratadas com ASM, não foram observadas plantas positivas para presença da bactéria até os 150 D.A.E.; contudo, com a ausência de novas aplicações de ASM, *Las* foi detectada em todas as plantas aos 180 D.A.E. (Tabela 3). Neste caso, a distribuição da presença de plantas *Las*-positivas entre os dois tratamentos foi estatisticamente significativa ao nível de 5% (teste K-S= 1,604; p= 0,0117).

As plantas com reação positiva para a presença de *Ca. L. asiaticus* (*Las*) dos experimentos I e II foram selecionadas para a extração de RNA total e avaliação da expressão gênica nas vias sinalizadoras do ácido

jasmônico e salicílico. Quatro plantas de cada tratamento foram avaliadas no próximo item, sendo que nos tratamentos com borbulhas infectadas com *Las*, as plantas selecionadas foram as primeiras diagnosticadas como *Las* + na qPCR.

Tabela 3- Número total e de amostras positivas na qPCR para a presença de *Ca. Liberibacter asiaticus*, a partir de plantas tratadas ou não com ASM e inoculadas com a bactéria. Coletas realizadas aos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 180 e 321 dias após a enxertia (D.A.E.) '*Las* +' indica o número de plantas positivas para a bactéria e '*Las* + ASM' indica as plantas positivas para a bactéria e que receberam tratamento ao longo do tempo.

Coletas	Experimento I		Experimento II		Nº Total de Plantas por tratamento
	<i>Las</i> + ASM	<i>Las</i>	<i>Las</i> + ASM	<i>Las</i>	
1ª (± 0 dias)	0/12	0/12	0/12	0/12	12
2ª (± 20 dias)	0/12	0/12	0/12	0/12	12
3ª (± 40 dias)	0/12	1/12	0/12	0/12	12
4ª (± 60 dias)	0/12	1/12	0/12	2/12	12
5ª (± 100 dias)	0/12	2/12	0/12	4/12	12
6ª (± 150 dias)	3/12	3/12	0/12	7/12	12
7ª (± 180 dias)	ND	ND	12/12	12/12	12
8ª (± 321 dias)	12/12	11/12	ND	ND	12

ND= não determinado.

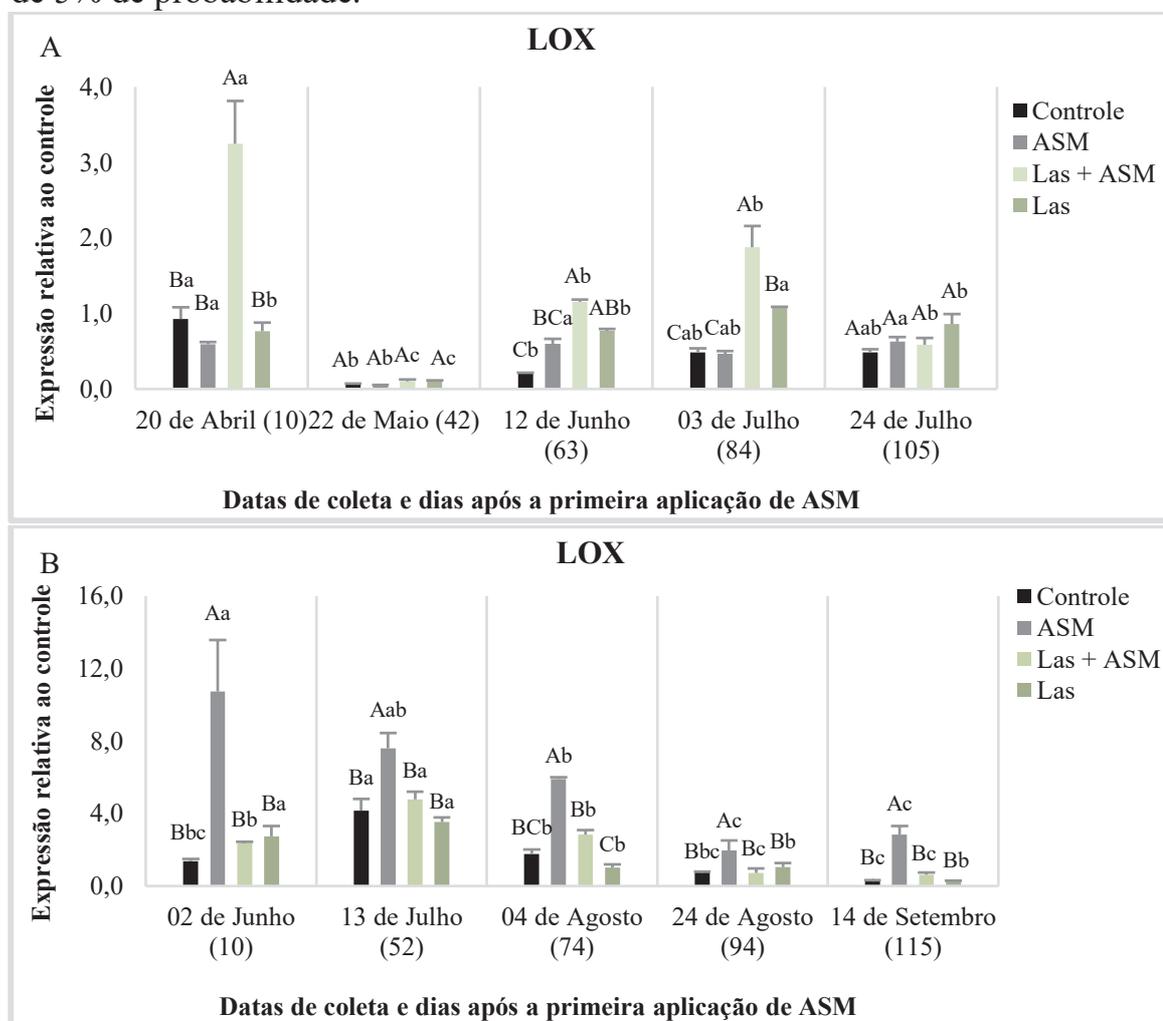
3.3.2 Expressão de genes relacionados à biossíntese do ácido jasmônico

Plantas que receberam pulverizações periódicas de ASM, no experimento I, tiveram níveis de expressão de LOX similares ao controle. (Figura 14A). Entretanto, o mesmo tratamento no experimento II induziu níveis de expressão superior ao controle em todos os tempos avaliados. Ao longo do período avaliado, os níveis de expressão de LOX foram decrescentes (Experimento II, Figura 14B).

No experimento I as plantas inoculadas via borbulhia com a bactéria e tratadas com ASM, os níveis de expressão de LOX foram

superiores ao controle aos 10 (F=48,24; GL=3, 197; p<0,0001), 63 (F=8,49; GL=3, 197; p<0,0001) e 84 D.A.A. (F=19,48; GL=3, 197; p<0,0001) (Figura 14A). Por outro lado, no experimento II os tratamentos em que as plantas foram inoculadas ('Las' e 'Las + ASM') mantiveram níveis de expressão semelhantes ou até mesmo inferiores em relação ao tratamento com ASM ao longo das avaliações (Figura 14B).

Figura 14- Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da lipoxigenase (LOX), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

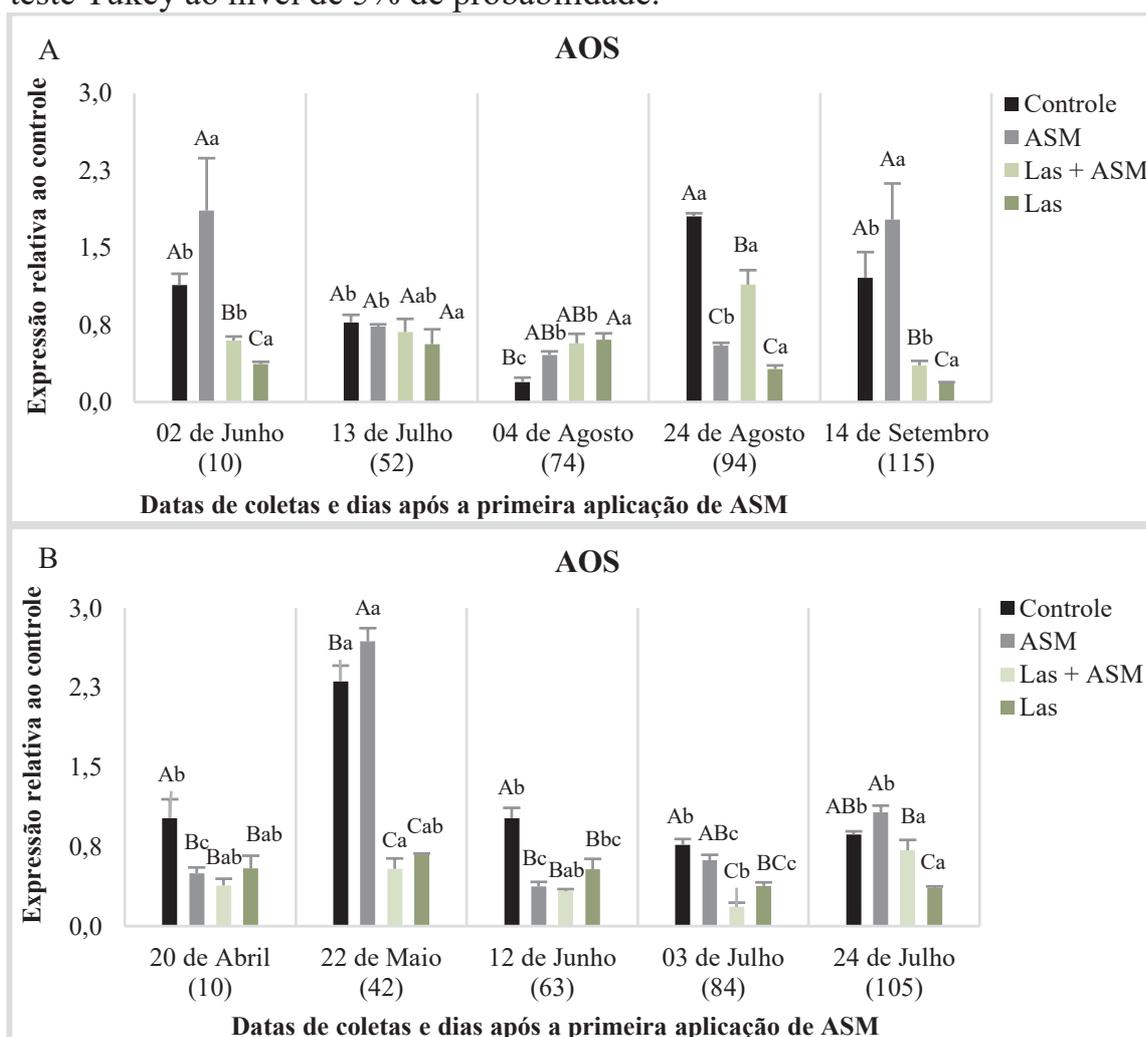


A presença de *Ca. Liberibacter asiaticus* regulou negativamente a expressão de AOS. Nos experimentos I e II, para os tratamentos 'Las + ASM' e 'Las', a expressão de AOS foi igual ou inferior ao controle, com

exceção aos 74 D.A.A. ($F=2,81$; $GL=3, 218$; $p=0,0405$) no experimento II (Figura 15B).

Para as plantas tratadas com ASM nos experimentos I (Figura 15A) e II (Figura 15B), os níveis de expressão de AOS foram iguais ou até mesmo inferiores ao controle na maioria das avaliações realizadas ao longo do tempo, com exceção aos 42 D.A.A. ($F=150,31$; $GL=3, 219$; $p<0,0001$) do experimento I, que neste caso foram superiores (Figura 15A).

Figura 15- Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da aleno óxido sintase (AOS), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, a partir de plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

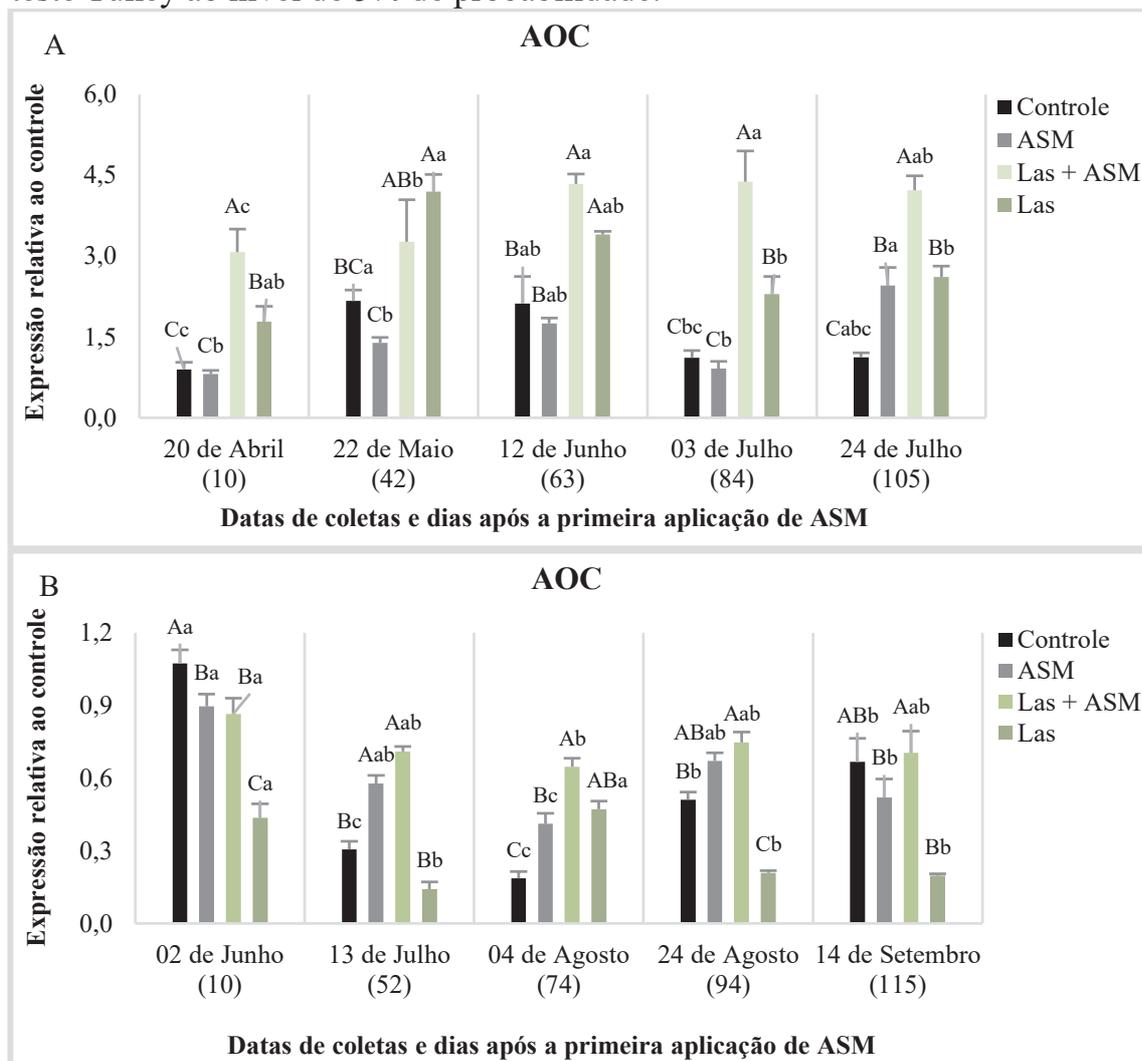


Plantas tratadas com ASM no experimento I exibiram aumentos significativos nos níveis de expressão de AOC somente aos 105 D.A.A. ($F=15,30$; $GL=3, 213$; $p<0,0001$), enquanto que, nas demais avaliações os níveis de expressão observados para este tratamento foram iguais ou inferiores ao controle (Figura 16A).

No experimento II, os níveis de expressão de AOC em plantas tratadas com ASM foram superiores ao controle para um mesmo período avaliado aos 52 D.A.A. ($F=32,21$; $GL=3, 216$; $P<0,0001$), 74 D.A.A. ($F=17,52$; $GL=3, 216$; $p<0,0001$) e aos 94 D.A.A. ($F=27,28$; $GL=3, 218$; $p<0,0001$) (Figura 16B).

Ao longo das avaliações para o experimento I, as plantas inoculadas com a bactéria (*Las* e *Las + ASM*) apresentaram níveis de expressão de AOC significativamente maiores em relação ao controle em todos os tempos avaliados (Figura 16A). Já no experimento II as plantas responderam menos à inoculação, sendo que esses tratamentos (*Las* e *ASM+ Las*), os níveis de expressão se mantiveram inferiores ao obtido no experimento I para AOC, além disso, houve diferença em relação ao controle somente aos 74 ($F=17,52$; $GL=3, 216$; $p<0,0001$) e 94 D.A.A. ($F=27,28$; $GL=3, 216$; $p<0,0001$) (Figura 16B).

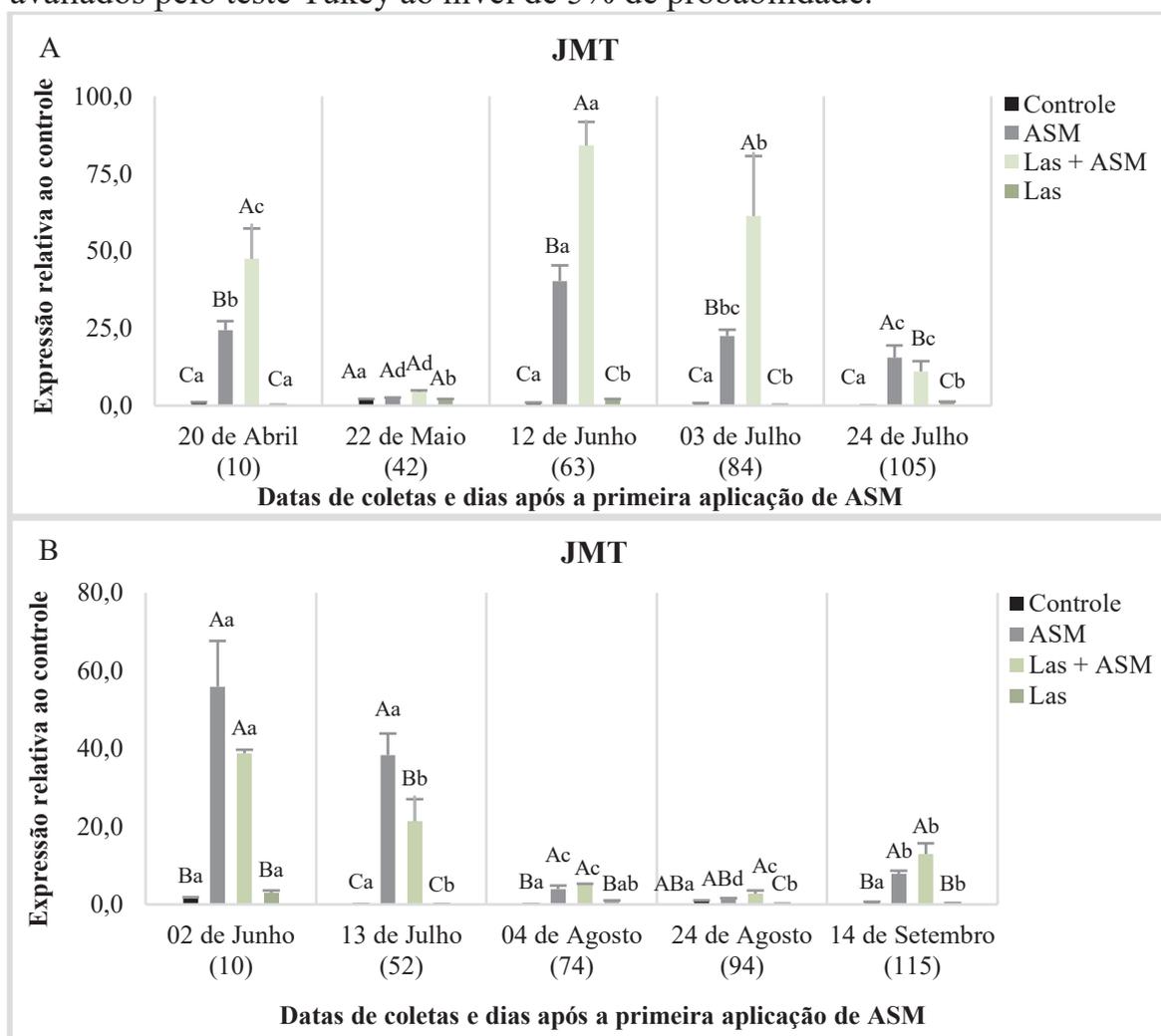
Figura 16- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da aleno óxido ciclase (AOC), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Embora não tenha sido observado o mesmo padrão para a expressão de JMT ao longo das avaliações para os tratamentos com ASM, nos experimentos I e II (Figuras 17A e B, respectivamente), sua aplicação aumentou significativamente a expressão de JMT para a maioria dos tempos avaliados nos experimentos I e II.

A inoculação da bactéria não promoveu alterações significativas na expressão de JMT nos tempos avaliados, em ambos os experimentos (Figuras 17A e 17B).

Figura 17- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene do ácido jasmônico carboxil-metil transferase (JMT), envolvido na biossíntese de ácido jasmônico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactéria (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



3.3.3 Expressão de genes relacionados à biossíntese do ácido salicílico

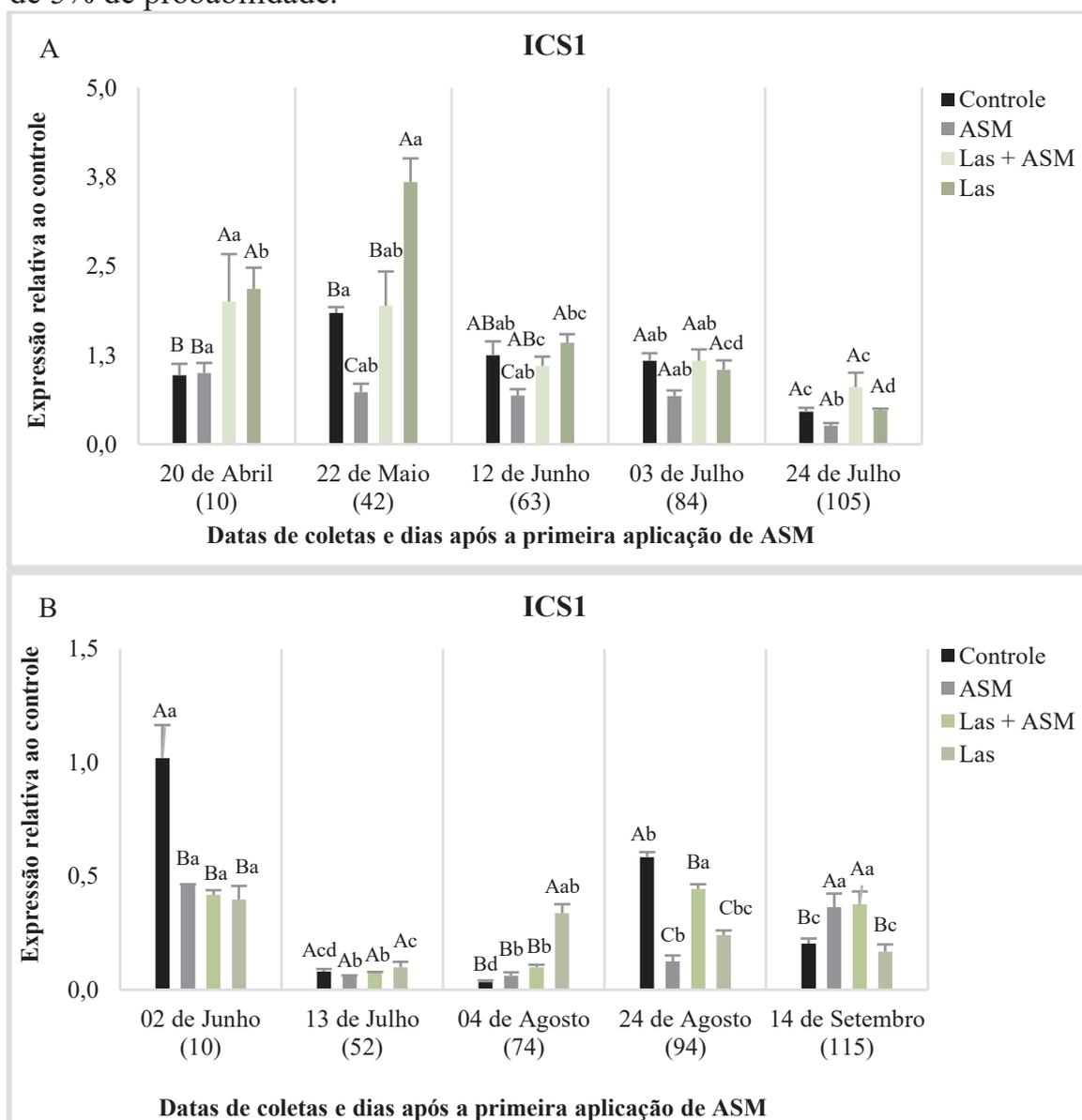
3.3.3.1 Via do Isocorismato sintase (ICS) na biossíntese do ácido salicílico

Nos experimentos I (Figura 18A) a aplicação de ASM não promoveu alterações significativas na expressão de ICS1, o mesmo foi observado no experimento II. Sendo que, em muitas das avaliações foram observados níveis inferiores aos obtidos no controle, com exceção aos

115 D.A.A. do experimento II ($F=8,98$; $GL=3, 207$; $p<0,0001$) (Figura 18B).

No experimento I, plantas inoculadas (*Las* e *Las* + ASM) tiveram níveis significativamente maiores de expressão de ICS1 em relação ao controle aos 10 ($F=11,19$; $GL=3, 214$; $P<0,0001$) e aos 42 D.A.A. ($F=37,18$; $GL=3, 214$; $P<0,0001$) (Figura 18A). No experimento II, a inoculação da bactéria não promoveu aumento significativo na expressão de ICS1, observou-se inclusive diminuição na expressão em plantas inoculadas aos 10 ($F=57,99$; $GL=3, 207$; $P<0,0001$) e 94 D.A.A. ($F=31,78$; $GL=3, 207$; $P<0,0001$) (Figura 18B). Entretanto, aos 74 D.A.A. ($F=15,31$; $GL=3, 207$; $p<0,0001$) houve aumento de expressão em plantas inoculadas com *Ca. L. asiaticus*.

Figura 18- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene isocorismato sintase 1 (ICS1), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

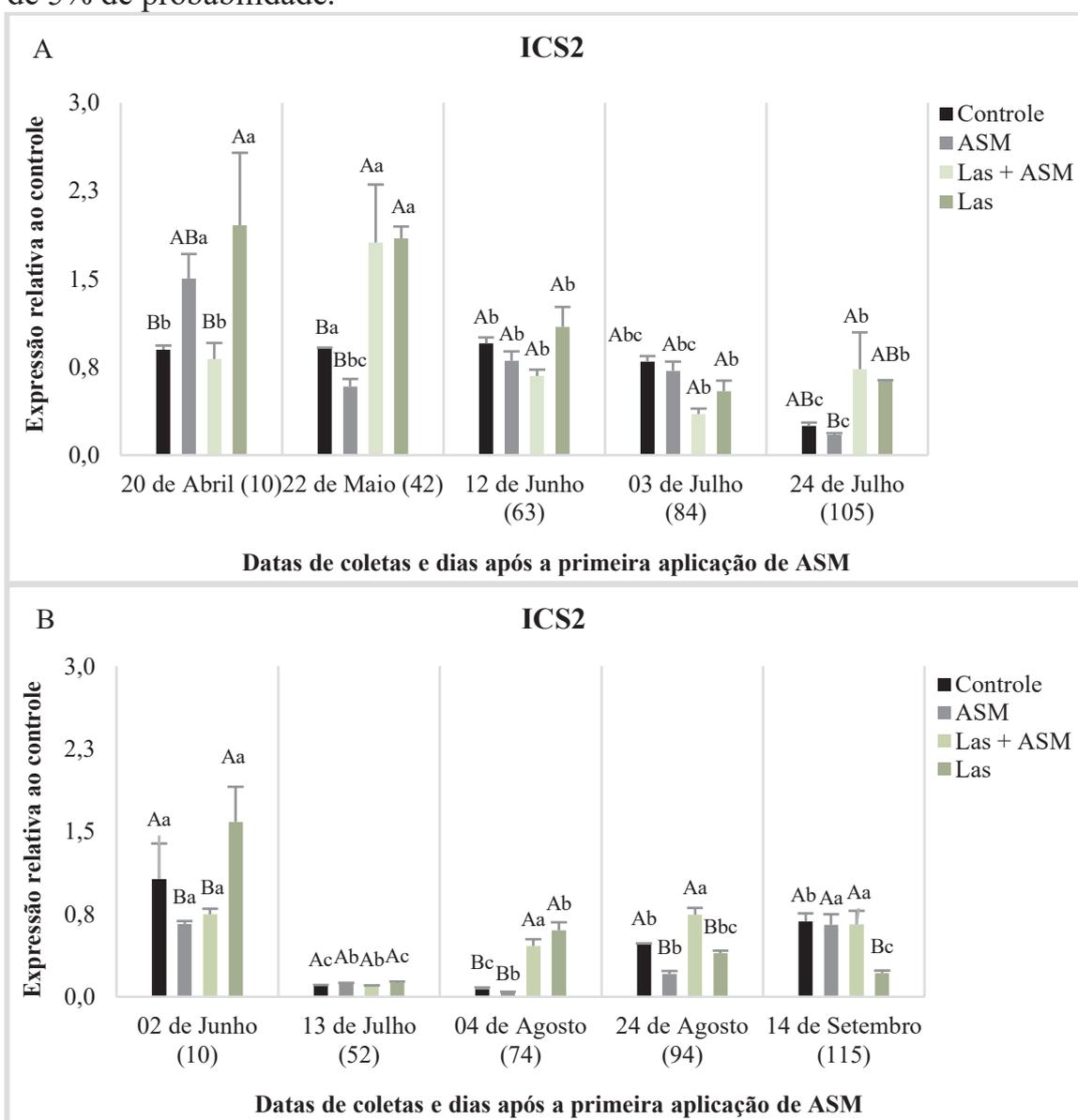


De maneira geral, nos experimentos I e II a expressão de ICS2 nos tratamentos com ASM permaneceu igual, e até mesmo inferior ao controle (Figuras 19 A e B).

No experimento I, plantas inoculadas com a bactéria (*Las* e *Las* + ASM) tiveram os maiores níveis de expressão de ICS2 em relação ao controle aos 42 (F=14,67; GL=3, 206; p<0,0001) e 105 D.A.A. (F=3,38;

GL=3, 206; $p=0,0193$) (Figura 19A). No experimento II, os níveis de expressão foram significativamente maiores para ‘*Las*’ e ‘*Las* + ASM’ somente aos 74 D.A.A. ($F=13,07$; GL=3, 214; $p<0,0001$). Nas demais avaliações não foram observadas alterações significativas entre esses tratamentos e as plantas controle (Figura 19B).

Figura 19- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene isocorismato sintase 2 (ICS2), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metilico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



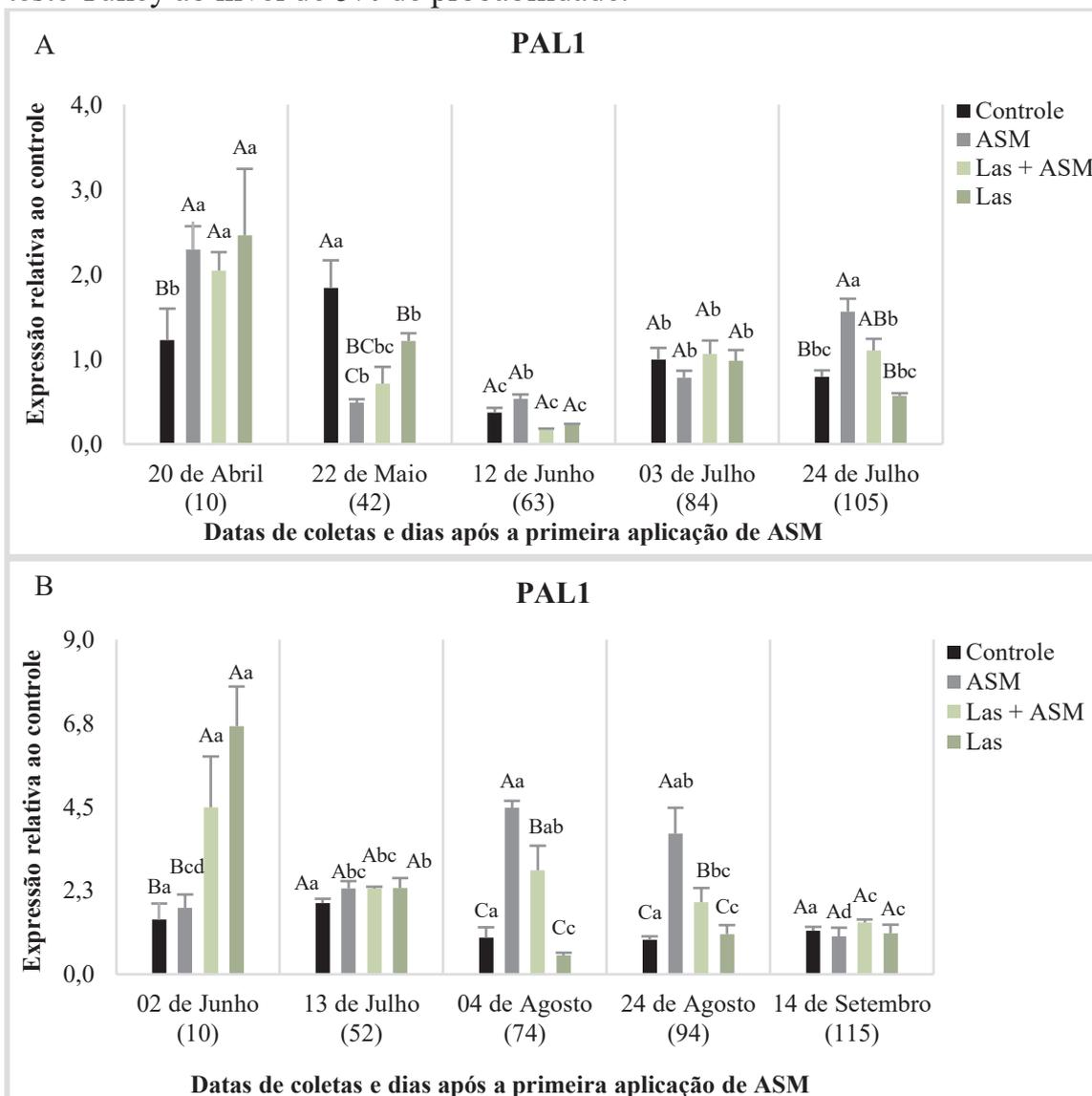
3.3.3.2 Vias da fenilalanina amônia liase (PAL) na biossíntese do ácido salicílico

No decorrer do experimento I, em plantas tratadas com ASM, a expressão de fenilalanina amônia-liase 1 (PAL1) foi similar ao controle, com exceção aos 10 (F=7,68; GL=3, 219; P<0,0001) e 105 D.A.A. (F=5,15; GL=3, 219; p=0,0018), em que foram observados níveis de expressão superiores (Figuras 20A).

No experimento II, com exceção aos 74 D.A.A. (F=27,27; GL=3, 214; p<0,0001) e 94 D.A.A. (F=13,10; GL=3, 219; p<0,0001) onde ocorreu aumento significativo na expressão de PAL1, os níveis de expressão foram similares ao controle (Figuras 20B).

Em plantas inoculadas com borbulhas infectivas ('*Las*' e '*Las* + ASM') do experimento I, a expressão de PAL1 foi superior em relação ao controle aos 10 D.A.A. (F=7,68; GL=3, 219; p<0,0001) (Figura 20A). O mesmo foi observado no experimento II (Figura 20B). Nas demais avaliações, os níveis de expressão de PAL1 para '*Las*' e '*Las* + ASM' foram similares ao controle.

Figura 20- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da fenilalanina amônia-liase 1 (PAL1) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



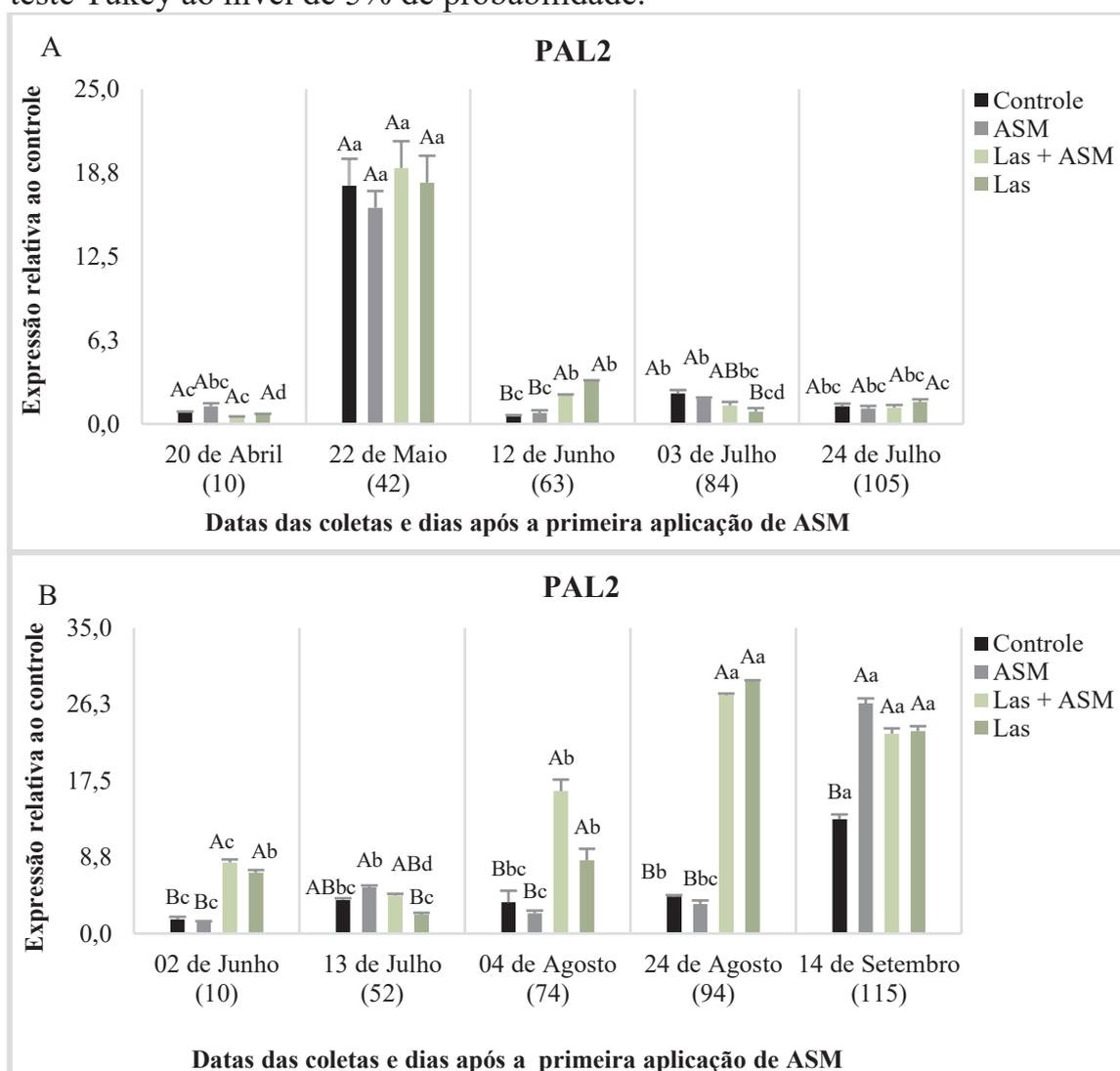
No decorrer dos experimentos I e II (Figuras 21 A e B, respectivamente) a expressão de PAL2 para plantas tratadas com ASM foi similar ao controle. Com exceção aos 115 D.A.A. ($F=8,75$; $GL=3$, 210 ; $p<0,0001$), no experimento II, onde os níveis de expressão foram estatisticamente superiores ao controle.

Para os tratamentos '*Las*' e '*Las + ASM*' no experimento I, aos 63 D.A.A. ($F=20,19$; $GL=3$, 217 ; $p<0,0001$) houve expressão

significativamente maior para PAL2 em relação ao controle (Figuras 10A). Nas demais avaliações, os níveis de expressão foram similares ao controle.

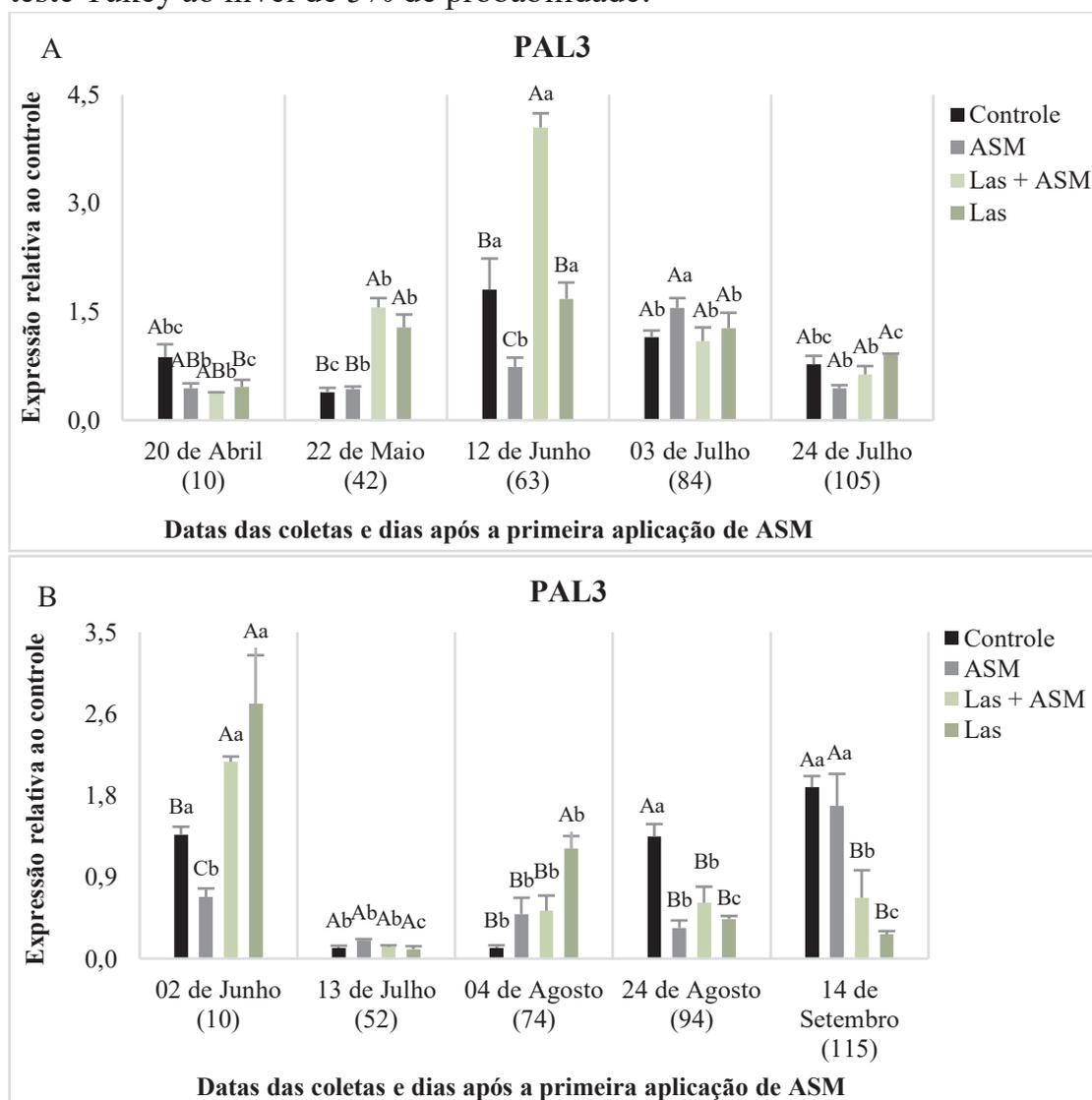
Já no experimento II, as plantas inoculadas responderam mais em relação à expressão de PAL2, uma vez que para a maioria das avaliações os níveis de expressão desse gene foram superiores ao controle, com exceção aos 52 D.A.A. ($F=3,75$; $GL=3, 210$; $p=0,0118$).

Figura 21- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR) do gene da fenilalanina amônia-liase 2 (PAL2) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Aplicações de ASM nas plantas não incrementaram a expressão de PAL3 nos experimentos I e II (Figuras 22A e B, respectivamente), permaneceu similar ou inferior ao controle em todas as avaliações.

Figura 22- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da fenilalanina amônia-liase 3 (PAL3) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Em tratamentos onde houve inoculação das plantas (*Las* e *Las + ASM*), foram observadas alterações na expressão de PAL3. No experimento I (Figura 21A), houve aumento significativo na expressão

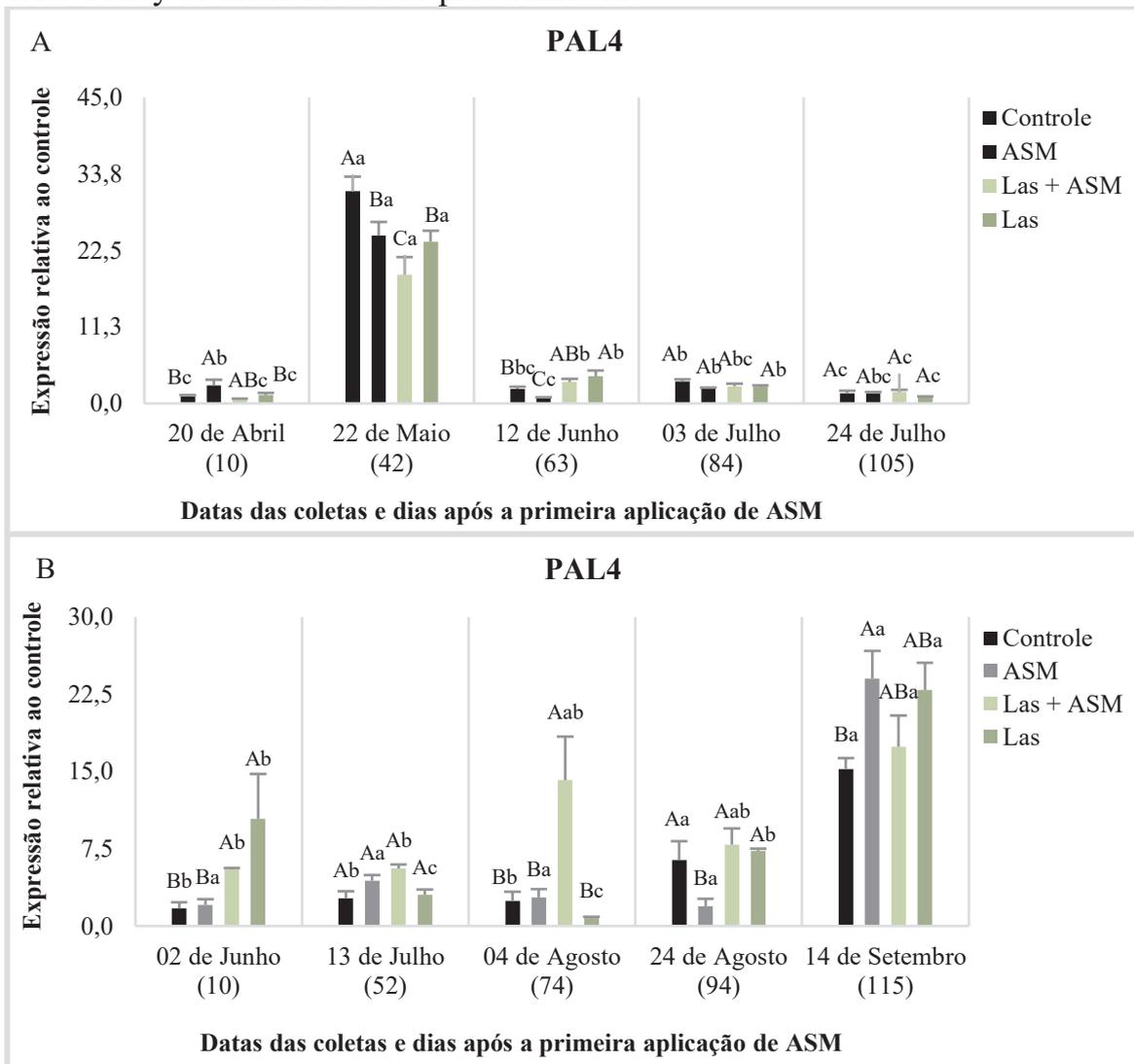
desse gene entre os 42 (F=20,27; GL=3, 219; p<0,0001) e 63 D.A.A. (F=72,63; GL=3, 219; p<0,0001).

No experimento II, maiores níveis de expressão do gene PAL3 nas plantas inoculadas com a bactéria (tratamentos '*Las*' e '*Las* + ASM') foram obtidos aos 10 D.A.A. (F=30,27; GL=3, 212; P<0,0001) e 74 D.A.A. (F=9,39; GL=3, 212; P<0,0001) (Figura 21B). Nas demais avaliações, os níveis de expressão foram similares e até mesmo inferiores ao obtido controle, para os mesmos períodos de tempo.

Para os experimentos I e II (Figuras 23A e B, respectivamente), a expressão de PAL4 em plantas tratadas com ASM permaneceu similar ao controle na maioria dos períodos avaliados, com exceção aos 10 D.A.A. (F=5,42; GL=3, 210; p=0,0013) no experimento I, e 115 D.A.A. (F=3,70; GL=3, 208; p=0,0127) do experimento II, onde os níveis de expressão foram superiores ao observado no controle nos mesmos períodos de avaliação.

Nos tratamentos '*Las*' e '*Las* + ASM' do experimento I foi observada maior expressão de PAL4 somente aos 63 D.A.A. (F=12,34; GL=3, 210; p<0,0001). No experimento II, observou-se maior expressão deste mesmo gene para os tratamentos '*Las*' e '*Las* + ASM' em relação ao controle aos 10 (F=11,81; GL=3, 208; p<0,0001) e aos 74 D.A.A. (F=19,67; GL=3, 208; p<0,0001) (Figura 23B).

Figura 23- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da fenilalanina amônia-liase 4 (PAL4) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



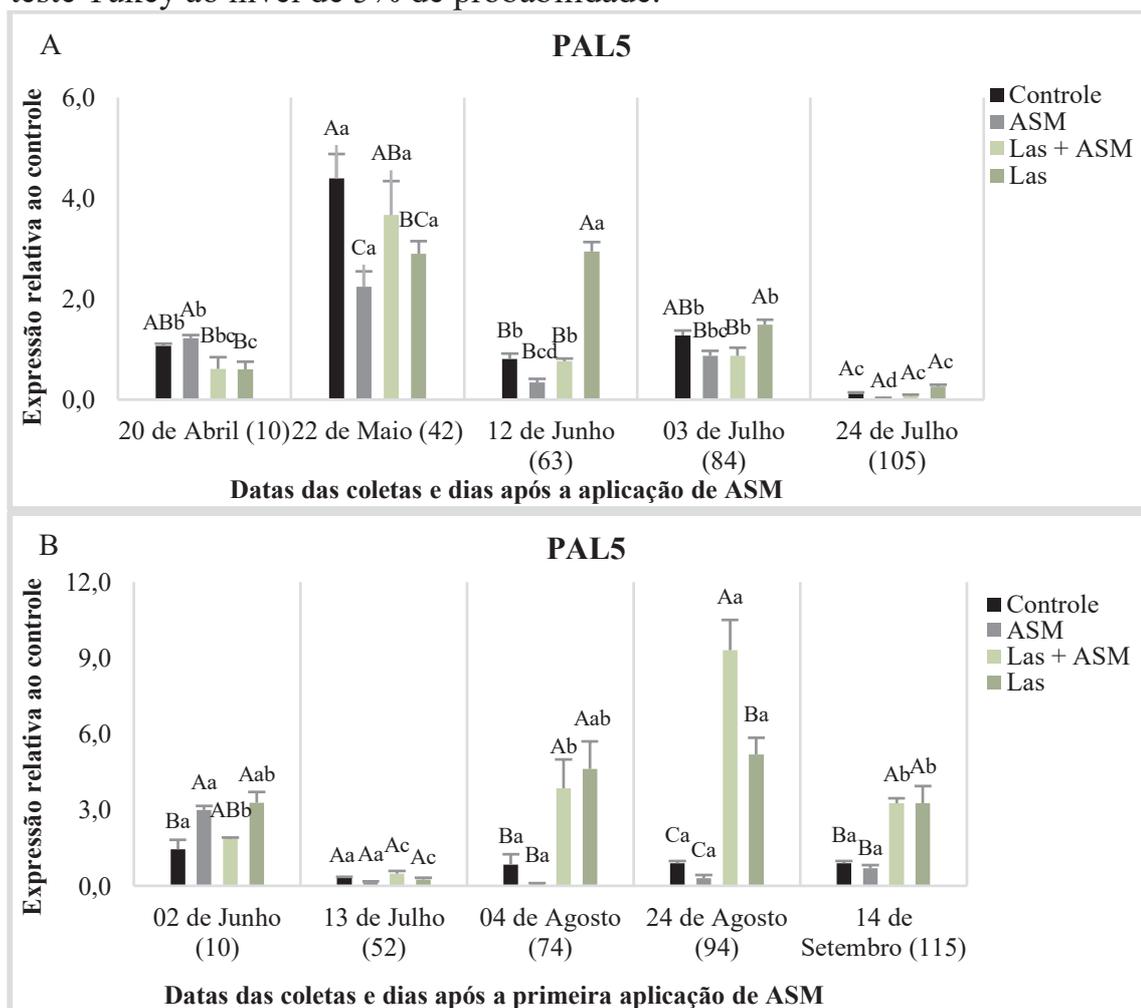
Nos experimentos I e II, a expressão de PAL5 em plantas tratadas com ASM foi similar ao controle para a maioria das avaliações, com exceção aos 10 D.A.A. ($F=11,81$; $GL=3, 208$; $p=0,0001$) do experimento II (Figuras 24A e B).

Com relação às plantas inoculadas do experimento I, para os tratamentos “*Las*” a expressão de PAL5 foi significativa e maior em relação ao controle aos 63 D.A.A. ($F=4,33$ $GL=3, 214$; $p=0,0055$). Nas

plantas do tratamento “*Las* + ASM” não foram observados níveis de expressão superiores ao controle (Figura 24A).

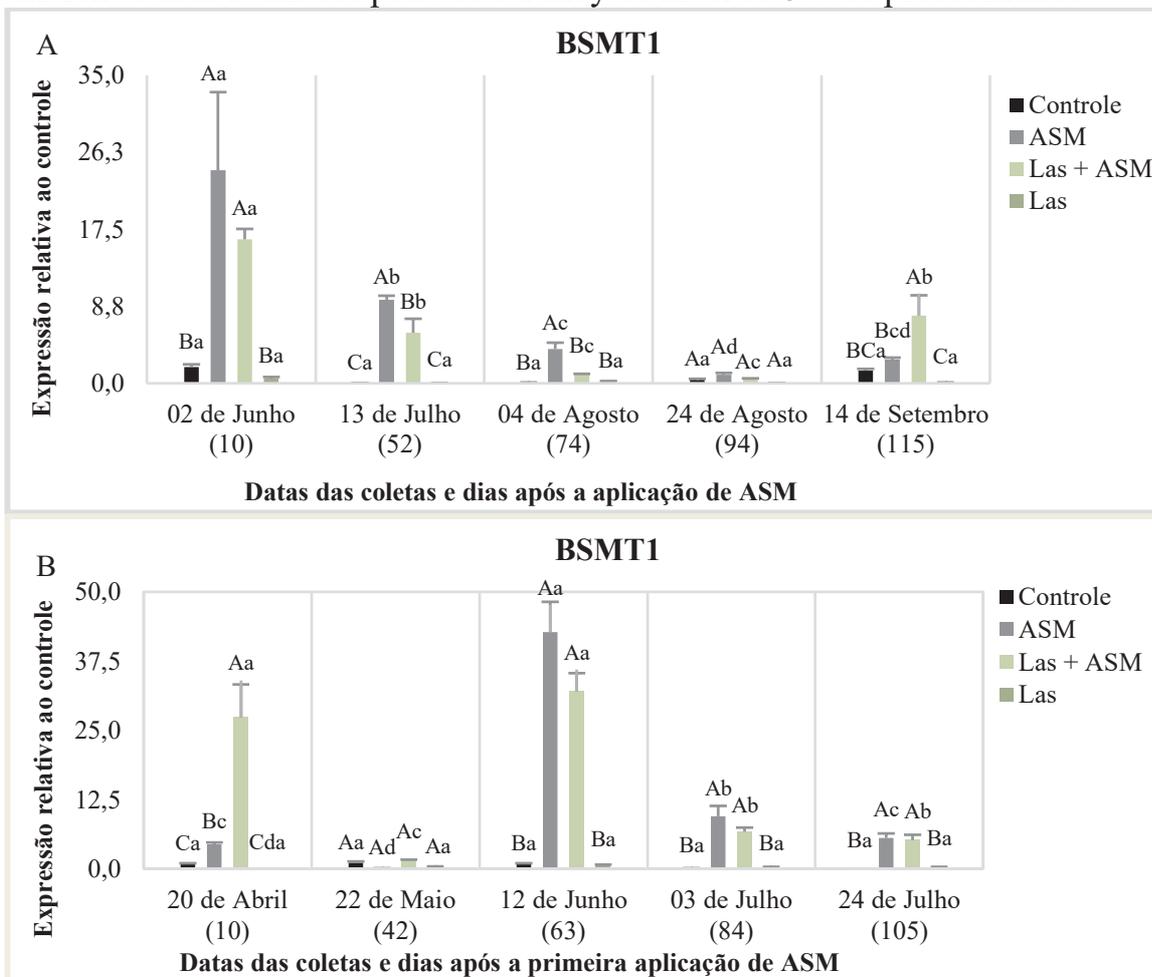
No experimento II, quando comparado com o experimento anterior (Experimento I) a expressão de PAL5 foi maior. Neste caso, os tratamentos que diferiram do controle foram aqueles onde havia a presença da bactéria, os tratamentos ‘*Las*’ e ‘*Las* + ASM’, sendo que estes foram superiores ao controle aos 74 (F=29,79; GL=3, 198; p<0,0001), 94 (F=79,58; GL=3, 198; p<0,0001) e 115 D.A.A. (F=15,38; GL=3, 198; p<0,0001) (Figura 24B).

Figura 24- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene da fenilalanina amônia-liase 5 (PAL5) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a 2,66 mg.mL⁻¹ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Nos experimentos I e II (Figuras 25A e B) o tratamento com ASM promoveu níveis de expressão do gene BMST1 superiores aos 63 D.A.A. ($F=257,28$; $GL=3, 210$; $p<0,0001$) e aos 10 D.A.A. ($F=82,98$; $GL=3, 198$; $p<0,0001$) em relação aos tratamentos controle e às plantas inoculadas com *Ca. L asiaticus* nos experimentos I e II, respectivamente. Ademais, houve indução da expressão nos tratamentos com ASM aos 84 e 105 D.A.A. (Experimento I) e 52, 74 e 115 D.A.A. (Experimento II).

Figura 25- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene do ácido benzóico/AS carboxil metil-transferase (BSMT1) envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metílico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

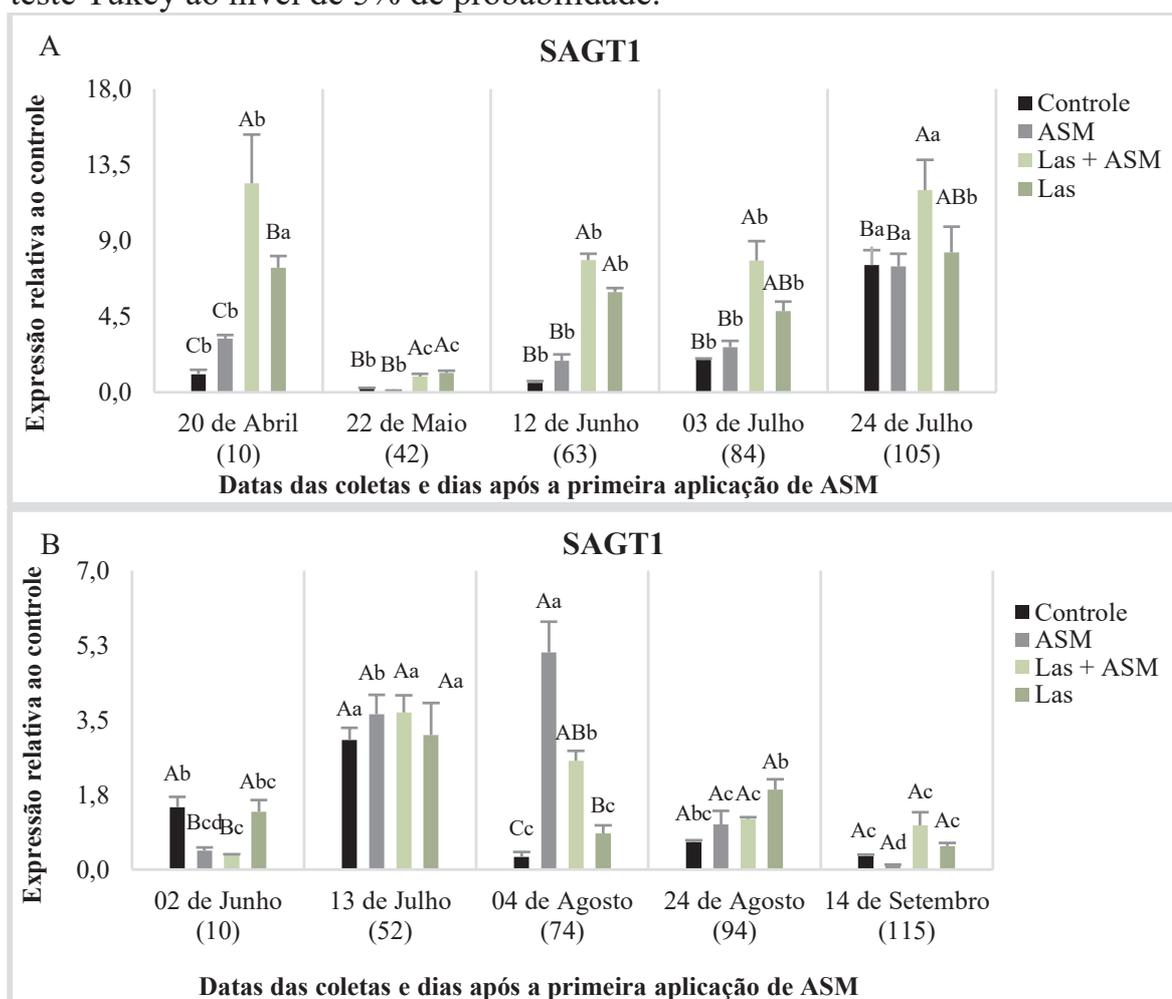


Em plantas inoculadas com *Ca. L asiaticus*, não foram observadas alterações na expressão do gene BSMT1 nos experimentos I e II (Figuras 25A e 25B). Mesmo não tendo sido observado o mesmo padrão de

expressão de BSMT1 ao longo do tempo entre os dois experimentos, é notável o efeito da aplicação do ASM neste gene.

Com relação ao SAGT1, o tratamento com ASM somente induziu a presença de transcritos em um dos períodos analisados, aos 74 D.A.A. ($F=57,77$; $GL=3, 219$; $p<0,0001$) no experimento II, nos demais períodos não foram observadas alterações significativas nos dois experimentos (Figuras 26A e B, respectivamente).

Figura 26- Análise da expressão gênica relativa, por PCR quantitativo (RT-qPCR), do gene do ácido salicílico glucosil-transferase 1 (SAGT1), envolvido na biossíntese de ácido salicílico, em plantas tratadas com água destilada (controle) ou com Acibenzolar-S-metilico (ASM) a $2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ e inoculadas ou não com a bactérias (*Las*) nos experimentos I (A) e II (B). Médias seguidas por letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, e minúsculas para o mesmo tratamento entre os diferentes dias avaliados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



A inoculação das plantas com *Liberibacter* ('*Las*' e '*Las + ASM*') promoveu o aumento na expressão do gene SAGT1 entre os 10 e 105

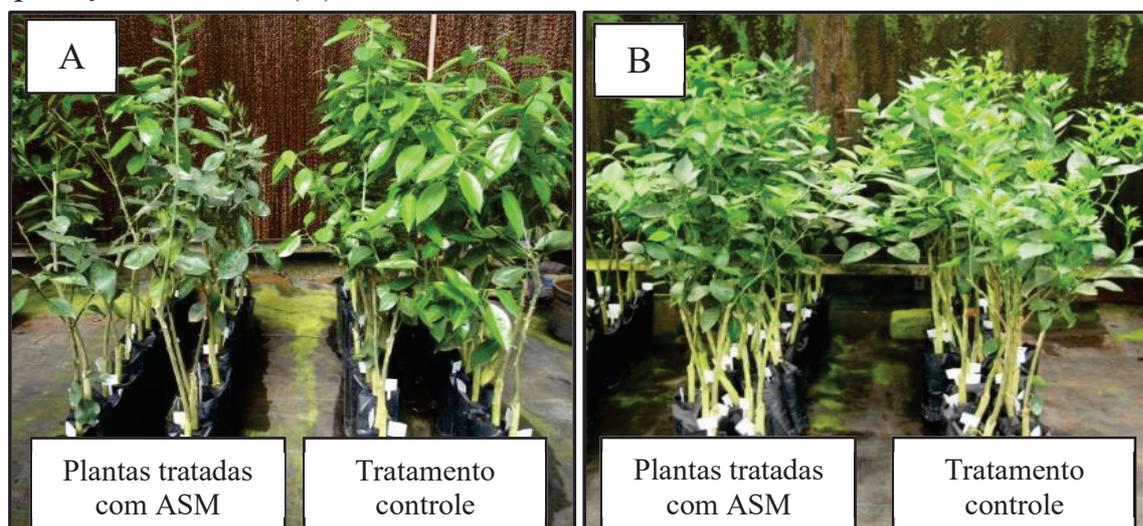
D.A.A. (Experimento I, Figura 26A), sendo significativamente maior em relação às plantas controle para um mesmo tempo aos 10 D.A.A. ($F=39,46$; $GL=3, 219$; $p<0,0001$), aos 63 D.A.A. ($F=37,33$ $GL=3, 219$; $p<0,0001$) e aos 84 D.A.A. ($F=16,91$; $GL=3, 219$; $p<0,0001$). Por outro lado, a inoculação das plantas no experimento II, não promoveu o mesmo incremento de SAGT1. Expressão significativa em relação ao controle nos tratamentos ‘*Las*’ e ‘*Las + ASM*’ foi observada somente aos 74 D.A.A. ($F=57,77$; $GL=3, 219$; $p<0,0001$), nas demais avaliações os níveis permaneceram próximos ao observado para o tratamento controle (Figura 26B).

3.3.4 Parâmetros fenotípicos

Ao longo da condução dos experimentos, as plantas foram tratadas com ASM a cada 21 dias aproximadamente, totalizando cinco aplicações. As plantas tratadas com ASM no experimento I apresentaram menor brotação e crescimento mais lento em relação às plantas controle (tratadas com água), sendo que isso foi observado no período compreendido entre os -10 D.A.A. e 70 D.A.A., período no qual estavam sendo feitas aplicações do produto (Figura 27A).

Após cessar as aplicações de ASM, ou seja, no período compreendido entre os 71 e 150 D.A.A. as plantas tratadas com o indutor e com água voltaram a apresentar tamanhos similares por meio de observação visual (Figura 27B).

Figura 27- Desenvolvimento de plantas de laranjeira doce que receberam cinco pulverizações de Acibenzolar-S-metílico (ASM) ($2,66 \text{ mg.mL}^{-1}$) com intervalos de 20 dias. As mesmas plantas aos 70 dias após o primeiro tratamento (D.A.A.) (A) e aos 150 D.A.A. após o tratamento, ou 80 dias após a finalização das aplicações de ASM (B).



O número médio e o comprimento dos brotos foram similares entre todos os tratamentos para o experimento I e II. Entretanto, no experimento I observou-se que o número de folhas foi significativamente menor em relação ao controle nos tratamentos com as plantas infectadas ('*Las*' e '*ASM + Las*') aos 125 dias após a enxertia das plantas (D.A.E.). No experimento II, o número de folhas não diferiu significativamente entre tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4- Número médio de folhas, brotos e comprimento médio dos brotos por planta aos 125 dias após a enxertia (D.A.E.), nos experimentos I e II. ASM-Acibenzolar-S-metílico (2,66 mg.mL⁻¹). *Las*: *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Tratamentos	Experimento I			Experimento II		
	Nº folhas	Nº de brotos	Comp. Médio	Nº folhas	Nº de brotos	Comp. Médio
Controle	28,5±7,8 A	2,1±0,7 A	30,5±11,7 A	38,2±19,1 A	4,5±1,2 A	25,2±13,8 A
ASM	27,6±12,9 A	1,7±0,9 A	23,3±7,7 A	33,4±13,5 A	4,1±1,5 A	28,4±9,3 A
ASM + <i>Las</i>	11,8±6,6 B	3,4±1,5 A	26,8±9,3 A	41,9±23,6 A	6,5±3,2 A	17,2±10,4 A
<i>Las</i>	13,1±5,9 B	2,3±1,1 A	25,5±9,9 A	36,3±12,1 A	4,9±2,2 A	20,6±10,9 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o teor de matéria seca total, avaliado aos 150 D.A.E., não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. A área foliar total das plantas também foi similar entre os tratamentos nos experimentos I e II (Tabela 5), embora o menor número de folhas (Tabela 4, Experimento I) tenha produzido menor matéria seca (Tabela 5, Experimento I), mesmo que sem significância estatística.

Tabela 5- Área foliar e teor de matéria seca total aos 150 dias após a enxertia (D.A.E.), nos experimentos I e II. ASM-Acibenzolar-S-metílico (2,66 mg.mL⁻¹). *Las*: *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Tratamentos	Experimento I		Experimento II	
	Área foliar	Matéria seca	Área foliar	Matéria seca
Controle	1037,3±217,3 A	22,3±6,9 A	1103,4±432,7 A	46,0±25,6 A
ASM	1657,8±645,3 A	21,0±1,8 A	1127,3±158,5 A	68,9±15,8 A
ASM + <i>Las</i>	1343,8±220,3 A	18,3±1,3 A	1534,5±583,3 A	58,8±17,3 A
<i>Las</i>	1343,8±383,6 A	18,3±2,1 A	1897,3±911,4 A	68,1±3,6 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Enxertia das borbulhas e detecção de *Ca. L. asiaticus* ao longo do tempo

A dificuldade de isolamento e cultivo do agente causal do HLB em meio de cultura (DAVIS et al., 2008) é um fator limitante nos estudos de etiologia e controle da doença. No entanto, a inoculação via enxertia de borbulhas infectadas tem se mostrado bastante eficiente na transmissão da doença (LOPES & FRARE, 2008; COLETTA-FILHO et al., 2010). No presente trabalho, a taxa de borbulhas viáveis aos 40 dias após a enxertia (D.A.E.) foi satisfatória e a eficiência na transmissão da bactéria foi alta, haja vista que todas as plantas onde as borbulhas estavam viáveis foram positivas para *Ca. L. asiaticus* aos 180 e 321 D.A.E. nos experimentos I e II, respectivamente.

Até o presente momento ainda não foram descobertas medidas curativas para o controle do HLB (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). O ASM, um composto análogo ao ácido salicílico, vem sendo amplamente estudado no controle de doenças bacterianas em diferentes culturas (BAYSAL et al., 2003). Diversos trabalhos relataram o ASM como um eficiente elicitador de respostas de defesa nas culturas do pimentão (ROMERO et al., 2001) e do tomate (COSTA, 2007). Corroborando com os dados obtidos no presente estudo, AGNELLI (2011) mostrou que

aplicações foliares de ASM reduzem a incidência de plantas cítricas infectadas com *Ca. L. asiaticus*.

Nos experimentos I e II, observou-se diferença significativa para o número de plantas positivas para a presença de *Ca. L. asiaticus* nos tratamentos com ASM. Mesmo que ao final dos períodos de avaliação, o número de plantas detectadas com *Ca. L. asiaticus* tenha sido o mesmo para os tratamentos com e sem ASM, o momento em que ocorre a detecção entre os tratamentos é atrasado após o tratamento com ASM em relação ao controle. Dessa forma, pode-se inferir que a aplicação de ASM “retardou” a detecção das plantas positivas. Com base nesses resultados, sugere-se que a ação do ASM pode causar um efeito bacteriostático sobre *Ca. L. asiaticus* nas plantas tratadas. Este efeito, entretanto, não tem durabilidade suficientemente longa para evitar a subsequente colonização de *Ca. L. asiaticus* na copa das plantas enxertadas com o passar do tempo.

A redução no número de plantas positivas para a bactéria no tratamento ‘*Las* + ASM’ no experimento II também pode estar associado ao título bacteriano das borbulhas enxertadas, haja vista que esse foi o tratamento cujo título observado foi significativamente menor em relação aos demais tratamentos onde houve inoculação com borbulhas de plantas infectadas com *Ca. L. asiaticus*. Além do longo e variável período de incubação da bactéria da planta, sua distribuição nos tecidos é irregular (TEIXEIRA et al., 2008a; LI et al., 2009). Esses fatores acabam dificultando a enxertia de quantidades homogêneas de bactéria nas plantas. Em um estudo com plantas de citros inoculadas por enxertia, ACHOR et al. (2010) avaliaram anatomicamente em qual fase da doença o vetor *D. citri* teria maior sucesso na aquisição da bactéria. Os autores observaram que a maioria das células bacterianas presentes em tecidos de ramos sintomáticos mais velhos não estavam mais viáveis. Dessa forma, pode-se inferir que, como a extração de DNA não seleciona somente as bactérias vivas, mesmo que se obtenha o mesmo título bacteriano nas borbulhas enxertadas, não se pode garantir que a enxertia das plantas seja feita de maneira completamente homogênea (TRIVEDI et al., 2009).

Além da enxertia com borbulhas infectadas com *Ca. L. asiaticus* e tratamentos curativos, o uso de ASM deveria também ser testado de maneira preventiva em plantas inoculadas pelo inseto vetor. Sugere-se isso pelo fato de que utilizando borbulhas com *Ca. L. asiaticus*, há uma fonte contínua de *Ca. L. asiaticus*, podendo esse fator estar interferindo na resposta de defesa das plantas, bem como nos efeitos dos tratamentos com ASM. Uma alternativa a este aspecto pode ser a inoculação através da enxertia de folhas, pois representam um tecido diferenciado e com viabilidade menor do que borbulhões (HILF & LEWIS, 2016).

A poda drástica de plantas aparentemente favorece a colonização de novos tecidos. Sugere-se isso pelo fato que após a realização da poda da copa aos 150 D.A.E. das plantas do experimento II, observou-se que o número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* aos 180 D.A.E. foi de 100%. AGNELLI (2011) também mostrou que a poda drástica favorece a infecção dos novos ramos. Pesquisas mostram que anteriormente ao aparecimento de sintomas visuais de HLB na copa das plantas, o sistema radicular já está drasticamente afetado (GRAHAM et al., 2013; JONHSON et al., 2014). Experimentos de campo com poda dos ramos de plantas infectadas mostraram que essa prática favorece o surgimento de ramos novos com sintomas e com *Liberibacter*, ocorrendo a redução da percentagem de árvores que permaneceram assintomáticos após a poda (LOPES et al., 2007).

JONHSON et al. (2014) avaliaram a movimentação sistêmica e a colonização de *Ca. L. asiaticus* em laranjeira ‘Hamlin’ enxertada sobre ‘Citrumelo Swingle’ e inoculada via enxertia com borbulhas infectivas. Os autores constataram que na maioria das árvores a doença foi detectada primeiramente nas raízes das plantas. Foi observada também uma alta correlação entre a presença da bactéria nas raízes com a colonização da copa após a poda drástica, indicando que a raiz atua como um reservatório, onde ocorre inicialmente a multiplicação da bactéria para posteriormente ocorrer a colonização dos demais tecidos/órgãos das plantas.

Apesar de se constatar a presença da bactéria em plantas nos primeiros dois meses após a enxertia nos experimentos I e II, não foram observadas plantas sintomáticas no período de avaliação definido (311 e 270 D.A.E., respectivamente). Como há um período longo e variável de incubação da bactéria após a infecção inicial, os sintomas visíveis de HLB são observados somente alguns meses após a infecção das plantas. O período entre a infecção das plantas e o aparecimento dos sintomas é variável, levando de seis meses a um ano para que seja possível a detecção visual (BOVÉ, 2006; FOLIMONOVA & ACHOR, 2010).

Como as plantas do experimento II foram podadas e nos novos ramos que se desenvolveram a bactéria foi detectada, acredita-se que a maturidade das folhas antes da poda tenha prevenido o surgimento dos sintomas típicos do HLB, e que, com a poda e com o maior fluxo de seiva para esses ramos em função do crescimento, que a bactéria tenha acompanhado esse fluxo e sua detecção tenha sido favorecida.

Além disso, as temperaturas médias da casa de vegetação em associação com as altas doses de adubação recebidas semanalmente pelas

plantas, podem também ter contribuído no retardamento do aparecimento de sintomas.

3.4.2 Expressão de genes das vias de biossíntese do ácido jasmônico e salicílico.

Sabe-se que o uso de elicitores em plantas, como o acibenzolar-S-metílico (ASM), pode melhorar a resistência contra o ataque de patógenos. Além disso, experimentos anteriores mostraram que a aplicação de ASM em plantas de laranja doce conseguiu retardar a detecção de *Ca. L. asiaticus* na copa de plantas de nove meses de idade, inoculadas via enxertia (AGNELLI, 2011). No entanto, não são compreendidos quais são os mecanismos de resistência ou sinalização que estão envolvidos nesse processo.

O ácido jasmônico (AJ), bem como o ácido salicílico (AS), são compostos fenólicos constitutivos nas plantas. Sua biossíntese e importância na sinalização de respostas de defesa já são bem caracterizadas. A biossíntese de AS pode culminar na expressão de genes que promovem a resistência sistêmica adquirida (RSA) (MAUCH-MANI & MÉTRAUX, 1998). Em um estudo de quantificação dos fitormônios em tecidos foliares, a laranja doce apresentou maior conteúdo de AJ (54 ng/g tecido fresco) e de OPDA (85 ng/g tecido fresco) do que de AS (29 ng/g tecido fresco) (TRAPP et al., 2014).

A aplicação exógena de ASM (Acibenzolar-S metílico) pode induzir resistência sistêmica adquirida (RSA), e o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) em plantas de tabaco contra doenças bacterianas e fúngicas (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; *Thanatephorus cucumeri*; *Cercospora nicotianae*) (COLE, 1999), contra doenças bacterianas em citros (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (FRANCIS et al., 2009; GRAHAM & MYERS, 2011) e em diversas outras culturas. No Brasil, ASM possui registro comercial para o tratamento de doenças bacterianas em diversas culturas como, algodão e tomate (AGROFIT, 2016).

3.4.2.1 Via de biossíntese do ácido jasmônico

A biossíntese de jasmonatos é iniciada a partir do ácido α -linolênico, que é um composto abundante no cloroplasto das células vegetais. A lipoxigenase (13-LOX ou LOX) está diretamente envolvida e atua na conversão de ácido α -linolênico em 13 (S)-hidroperóxi-octadecatrienóico no plastídio das células (MULLER, 1997; STENZEL

et al., 2012). As lipoxigenases são fundamentais na etapa inicial de biossíntese de AJ, e seu envolvimento em respostas de defesa é relatado em plantas de batata contra o ataque de agentes patogênicos (KOLOMIETS et al., 2000). Em *A. thaliana* são conhecidos quatro 13-LOX (LOX2, LOX3, LOX4 e LOX6) (CALDELARI et al., 2011).

Em plantas inoculadas com *Ca. L. asiaticus*, a expressão de LOX foi alterada em função da presença da bactéria, especialmente no experimento I. No experimento II os níveis de expressão de LOX se mantiveram muito próximos aos do controle na maioria das avaliações. De acordo com estes resultados, há indícios de que no experimento II a evolução da infecção por *Ca. L. asiaticus*, inclusive, tenha reduzido a expressão de LOX, uma vez que para a maior parte das avaliações, tratamentos compostos somente pela inoculação da bactéria foram inferiores aos compostos pela bactéria mais o ASM.

Alguns trabalhos mostram que a inoculação com a bactéria altera a expressão de LOX, contudo, em momentos diferentes após a infecção. COERINI (2014) estudou plantas de citros inoculadas com *Ca. L. asiaticus* e observou aumento significativo na expressão de LOX2 aos 30 dias após a enxertia das plantas. ALBRECHT & BOWMAN (2008) avaliaram plantas de laranja doce 17 semanas após a inoculação das plantas pela técnica do *microarray*, e observaram alterações no perfil de diversos transcritos e entre eles, de transcritos de LOX2, que neste período estavam sendo induzidos na presença da bactéria.

Em plantas pulverizadas com ASM no experimento I, os níveis de expressão se mantiveram muito próximos aos observados no controle. Já no experimento II, aparente o tratamento com ASM induziu a expressão de LOX. Pelas discrepâncias observadas na expressão LOX entre os resultados dos experimentos I e II, haveria necessidade de experimentos adicionais, assim seria possível inferir se em plantas de laranja doce, é a inoculação da bactéria ou a pulverização das plantas com ASM que causa alterações na expressão desse gene.

O segundo passo na biossíntese do ácido jasmônico é mediado pela enzima aleno óxido sintase (AOS) que metaboliza 13 (S) -hidroperóxi-octadecatrienóico nos plastídios das células, convertendo-o para o ácido 12,13-epoxi-linolénico (óxido de aleno) (MULLER, 1997). Para o patossistema *Citrus* x HLB, das dez avaliações realizadas, somente em uma delas os níveis de expressão de AOS em plantas tratadas com ASM foram superiores aos obtidos para o controle no mesmo período de tempo avaliado. A expressão de AOS em plantas tratadas com ASM, de uma maneira geral, foi inferior ao observado no controle, para os experimentos I e II. Esses resultados sugerem que, possivelmente a regulação negativa

na expressão desse gene esteja relacionada especificamente à infecção por *Ca. L. asiaticus* e aos mecanismos de patogenicidade da bactéria em suprimir as respostas de defesa desencadeadas pelas plantas durante a colonização inicial. Esta redução na expressão de AOS causada por *Ca. L. asiaticus* em plantas de citros pode estar prejudicando a biossíntese deste fitormônio e as sinalizações de respostas de defesa das plantas que são mediadas por essa via.

PARK et al. (2002), avaliando a importância de AOS na biossíntese de AJ, compararam plantas de *A. thaliana* selvagens com mutantes que não expressavam constitutivamente esse gene. Após a realização de ferimentos mecânicos nas folhas em ambas as plantas, os níveis de AJ aumentaram entre 50 e 100% nas plantas selvagens em relação às mutantes. Além disso, a cinética de indução após o ferimento das folhas foi alterada significativamente nas plantas mutantes. Outro estudo mostrou que plantas de batata superexpressando o gene AOS, também possuíam AJ em níveis 12 vezes maiores em relação a plantas não transformadas (HARMS et al., 1995).

A aplicação de ASM aparentemente não altera a expressão de AOC, pois para a maioria dos tempos avaliados os níveis de expressão deste gene em plantas pulverizadas com este produto permaneceu igual ou levemente superior ao observado no tratamento controle. A eno óxido ciclase (AOC) é a enzima responsável pela conversão de aleno óxido sintase para cis- (+) -OPDA. Essa enzima é considerada crucial na biossíntese de AJ, pois seu produto atua como substrato do (+) -7-iso-JA, precursor da forma ativa de AJ nas plantas. Em *A. thaliana* são conhecidos quatro transcritos funcionais para esse gene (AOC1 a AOC4), que ocorrem nos plastídios da célula e estão envolvidos em processos do crescimento e desenvolvimento de botões florais e senescência de *Arabidopsis* (STENZEL et al., 2012).

A expressão de AOC em plantas de laranja doce inoculadas com *Ca. L. asiaticus* foi significativamente maior no experimento I, ao longo de todas as avaliações. Esses resultados indicam que as plantas ativaram a via do ácido jasmônico em resposta à colonização da bactéria no experimento I.

A resposta de defesa de plantas cítricas pode ser variável no que diz respeito à expressão desse gene e a colonização por *Ca. L. asiaticus*. Além disso, outros genes homólogos também podem estar envolvidos na expressão de AOC. Em um estudo realizado por COERINI (2014), foi avaliada a expressão do homólogo AOC3 em plantas de citros inoculadas com *Ca. L. asiaticus* aos 7 e 30 dias após a inoculação e em plantas sintomáticas, mas nesse caso não foram observadas alterações

significativas na expressão desse gene. Do mesmo modo que observado nos experimentos I e II em relação à expressão LOX, há necessidade de maiores investigações em relação à expressão de AOC, assim seria possível inferir qual é o principal fator que causa alterações na expressão desse gene em plantas de laranja doce.

A ácido carboxil metil transferase, (JMT), é uma enzima que atua na produção do metil jasmonato (Me-JA), um derivado do ácido jasmônico. Esse composto volátil possui função sinalizadora intra e intercelular nas plantas, mediando o processo de desenvolvimento e de respostas de defesa nas plantas ao ataque de patógenos e herbívoros e na sinalização do ataque de patógenos e ativação de mecanismos de defesa (FARMER & RYAN, 1990; FARMER & RYAN, 1992; SEO et al., 2001; CHEONG & CHOI, 2003).

Em plantas tratadas com ASM houve indução significativa da expressão de transcritos do gene JMT, sendo que isso ocorreu em todos os períodos de tempo avaliados nos experimentos I e II. SEO et al. (2001) observaram que plantas transgênicas de *A. thaliana* que superexpressavam JMT apresentaram elevada resistência a *B. cinerea* em relação às plantas do tipo selvagem indicando ser uma enzima chave na regulação das respostas de defesa mediadas por jasmonatos.

Experimentalmente, é comprovado que aplicações exógenas de ácido jasmônico ou ácido salicílico em plantas podem induzir rapidamente a expressão de transcritos da via biossintética do ácido jasmônico. RODRÍGUEZ et al. (2014) mostraram que a aplicação exógena de AJ induziu a expressão de AOS e conferiu resistência em frutos de *Citrus clementina* a *Penicillium expansum*. A expressão de JMT também é alterada mediante a aplicação exógena de metil jasmonato ou por injúrias mecânicas causadas por insetos e patógenos de acordo com FARMER & RYAN, (1990). Para o patossistema *Citrus* x HLB, AGNELLI (2011) observou efeito na infecção de *Ca. L. asiaticus* após a aplicação exógena de ácido jasmônico [1 mM] ou metil jasmonato [2 mM]. Entretanto, observou-se que poucos são os estudos que envolvem as implicações de aplicações exógenas de ASM em plantas de citros e sobre os efeitos causados na expressão de genes na via do AJ. Verificou-se que em plantas inoculadas via enxertia com *Ca. L. asiaticus*, houve alterações pontuais na expressão de JMT. Esses resultados poderiam ser diferentes se tivessem sido realizados com plantas já sintomáticas para HLB, como observado por COERINI (2014), onde somente em plantas de citros que já exibiam sintomas de HLB houve incremento na expressão desse gene.

De maneira geral, dos genes envolvidos na biossíntese de ácido jasmônico e que foram estudados em plantas cítricas enxertadas com borbulhas infectivas, os genes LOX e AOC foram induzidos em plantas positivas para HLB somente no experimento I. Já o gene AOS foi reprimido. De maneira similar, o estudo envolvendo a expressão de genes de laranja pela técnica do *microarray* para o patossistema *Citrus* x *Liberibacter*, em plantas de laranja 'Valência' por 19 semanas após inoculação com *Ca. L. asiaticus* mostrou que a infecção da bactéria pode reprimir os transcritos que codificam a tradução de sinais que são tipicamente induzidos na via dos jasmonatos (ALBRECHT & BOWMAN, 2008).

A elevada expressão de JMT em plantas tratadas com ASM indica que sua aplicação exógena poderia atuar diretamente no processo de comunicação entre plantas por aleloquímicos voláteis. Assim, pode ser que o pool endógeno de ácido jasmônico esteja sendo preferencialmente convertido em metil jasmonato mediante a aplicação do indutor ASM.

3.4.2.2 Vias de biossíntese do ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) é um composto fenólico comum em muitas plantas, presente constitutivamente. Um importante papel fisiológico atribuído ao ácido salicílico é o de atuar como uma molécula sinalizadora. Tal fato é evidenciado pelo acúmulo de AS em plantas submetidas a condições adversas, como ataque de fitopatógenos ou pela indução por elicitores abióticos (MARTINEZ et al., 2000).

Em 1979, observou-se pela primeira vez que a aplicação exógena de AS (Aspirina[®]) em plantas de tabaco, reduziu o número de lesões causadas por *Tobacco mosaic virus* (TMV) em mais de 90%. Além disso, houve acúmulo de PR-proteínas e estabelecimento da RSA (WHITE, 1979). Outros estudos também relataram esse fato (GAFFNEY et al., 1993; DEMPSEY et al., 2011).

A biossíntese do ácido salicílico pode ocorrer por duas vias derivadas do corismato (produto final da via do chiquimato): a via do ácido isochorísmico (ICS) no cloroplasto da célula e a via da fenilalanina amônia-liase (PAL), no citoplasma (DEMPSEY et al., 2011; STENZEL et al., 2012; TOUNEKTI et al., 2013).

3.4.2.2.1 Via do isocorismato sintase (ICS) na biossíntese do ácido salicílico

Foram observados maiores níveis de expressão de ICS1 e ICS2 anteriormente à detecção de *Ca. L. asiaticus* na copa, no experimento I. Já no experimento II, a inoculação com a bactéria parece não ter ativado com a mesma intensidade essa via de biossíntese. Como a bactéria possui um longo e variável período de latência, acredita-se que os que níveis de expressão desses genes sejam variáveis até o período onde há título suficiente de bactéria para expressão dos sintomas. Entretanto, OLIVEIRA (2013) avaliou a expressão de ICS1 em plantas de citros inoculadas com *Ca. L. asiaticus* e não observou alterações significativas aos 0 e 30 D.A.E. e nas plantas exibindo sintomas de HLB.

Em *A. thaliana*, genes homólogos de ICS (ICS1 e ICS2) foram avaliados após aplicação exógena de AS nas plantas. Nesse caso, o gene ICS1 foi fundamental para a indução da RSA e para a síntese de compostos de defesa das plantas, sendo responsável por 90% da biossíntese do ácido salicílico associado a RSA (WILDERMUTH et al., 2001).

Buscando esclarecer se a biossíntese de AS em *N. benthamiana* é derivada e dependente de ICS, como descrito para *A. thaliana* (WILDERMUTH et al., 2001), CATINOT et al. (2008) silenciaram o gene ICS em plantas de *N. benthamiana* e inocularam com *Pseudomonas syringae*, observando que não houve acúmulo de AS nas plantas onde o gene ICS havia sido silenciado.

Não há estudos sobre a relação de aplicação de ASM e expressão de ICS, tornando o nosso estudo pioneiro. Contudo não foram observadas alterações na expressão de ICS1 e ICS2 O mesmo não foi observado para os experimentos I e II.

3.4.2.2.2 Via da fenilalanina amônia liase (PAL) e modificações do ácido salicílico

Na maioria das plantas, a biossíntese do ácido salicílico é dependente da biossíntese de fenilalanina. A expressão de PAL pode ser induzida em plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos. Além disso, esta enzima possui papel fundamental no desenvolvimento das plantas (OHL et al., 1990; CHEN et al., 2009; LAFUENTE et al., 2003). Mesmo que aparentemente contribua com menos de 10% do total na biossíntese de ácido salicílico, estudos sugerem que expressão de PAL é importante para a mediação das respostas de defesa desencadeadas por patógenos e na ativação da RSA (CHEN et al., 2009).

PALLAS et al. (1996) estudaram plantas de *N. tabacum* infectadas com TMV e que não expressavam fenilalanina amônia-liase 2 (PAL2) e

constataram que além de atuar na biossíntese de AS, essas enzimas são extremamente importantes na percepção e sinalização da RSA. Além disso, ELKIND et al. (1990) observaram que plantas transgênicas de tabaco com supressão da expressão de PAL apresentavam uma série de modificações fenotípicas, como alterações em forma e textura das folhas, menor lignificação do xilema e desenvolvimento, indicando que a perturbação da PAL reflete diretamente na morfologia, pigmentação e nos sinais dependentes da biossíntese de fenilpropanóides.

Verificou-se que os perfis de expressão foram distintos entre os experimentos I e II para todos os genes PAL (PAL1, PAL2, PAL3, PAL4 e PAL5). No experimento II, plantas inoculadas com *Ca. L. asiaticus* tiveram maiores níveis de expressão de PAL2 e PAL5 em relação ao controle para a maioria das avaliações realizadas. Já no experimento I, com poucas exceções, os níveis de expressão dos genes PAL, seguiram perfis de expressão próximos aos observados nas plantas controle. Isso sugere que as plantas do experimento II mostraram maior reação à colonização por *Ca. L. asiaticus*. Diferentemente do observado no presente estudo, OLIVEIRA (2013) observou maiores níveis de expressão desses genes em plantas de laranja doce (*C. sinensis*) inoculadas com *Ca. L. asiaticus* no período correspondente aos 0 e 30 D.A.E. Além disso, em plantas sintomáticas, os níveis de expressão desses genes foram reduzidos. Essa redução foi atribuída ao lento processo de colonização da bactéria somada à resposta inicial de defesa das plantas. ALBRECHT & BOWMAN (2012) observaram pela técnica do *microarray* em 'Cleópatra' mandarin (*C. reticulata*) que vários transcritos de genes relacionados à patogênese foram expressos em plantas suscetíveis ao HLB, como a PAL.

Dessa forma, acredita-se que as plantas não permaneceram passivas à invasão da bactéria. A diferença entre a resistência ou susceptibilidade, pode estar associada à velocidade e magnitude com que a defesa basal das plantas é expressa. Em alguns casos de interação planta-patógeno ocorre o reconhecimento da invasão do patógeno pelo hospedeiro, mas a resposta de defesa das plantas não ocorre com a rapidez necessária para conter a infecção (MALAMY & KLESSIG, 1992; YANG et al., 1997; JONES & DANGL, 2006). Outros trabalhos também demonstraram que os patógenos podem ser virulentos por conseguirem “burlar” os mecanismos de defesa das plantas. CUI et al. (2005) observaram que uma estirpe virulenta de *Pseudomonas syringae* pode induzir a susceptibilidade em plantas de *A. thaliana*, pois essa bactéria tem a capacidade de produzir coronatina (COR) e imitar a função estrutural do AJ, regulando o *cross talk* entre as vias do AS e AJ nessas

plantas e a susceptibilidade a insetos (herbívoros). Além disso, vários fatores podem influenciar na expressão de PAL, dentre eles ferimentos, invasão e colonização por patógenos, condições de luminosidade às quais as plantas estão submetidas e aplicação exógena de produtos como o AS (WEN et al., 2005).

De uma maneira geral, a aplicação de ASM não incrementou a expressão de PAL nos experimentos I e II com a mesma significância observada nos tratamentos onde houve inoculação da bactéria. Diferentemente do observado para PAL em citros, aplicações exógenas de ácido salicílico induziram resistência contra *Fusarium oxysporum* e aumento nos níveis de expressão de fenilalanina amônia-liase em tomateiro (JENDOUBI et al., 2015). Além disso, esses baixos níveis de expressão de PAL observados em plantas pulverizadas com ASM também pode ter relação com o período no qual as amostras eram coletadas para as análises.

A expressão da glicosil-transferase do ácido salicílico (SAGT1) foi alterada pela presença de *Ca. L. asiaticus* e, em menor escala pela indução com ASM, ficando isso mais evidente no experimento I. Acredita-se que a expressão de SAGT1 pode estar diretamente envolvida com a ativação e regulação dos mecanismos de defesa das plantas. Sugere-se isso pelo fato de que OLIVEIRA (2013) também avaliou a expressão de SAGT1 no patossistema *Citrus* x *Liberibacter*. O autor observou que as alterações mais significativas na expressão desse gene ocorrem principalmente em plantas cítricas que já apresentam visualmente sintomas de HLB. Resultados similares são relatados por MANN et al. (2012). Entretanto, no presente trabalho, não foram avaliadas plantas em estágios mais avançados de infecção e que já exibiam sintomas visuais.

Ácido salicílico carboxil metil transferase (BSMT1) é uma enzima que modifica o AS. É responsável pela formação do metil salicilato (Me-SA) e atua na sinalização das plantas na RSA a patógenos invasores e na comunicação entre as plantas pela emissão de sinais voláteis (PARK et al., 2007; MANN et al., 2012). Normalmente, em plantas saudáveis, esse gene é observado a nível constitutivo e em baixas concentrações, entretanto, fatores abióticos como a temperatura, por exemplo, podem afetar diretamente a síntese e emissão desse volátil.

SHULAEV et al. (1997) mostraram que o Me-SA não é detectado em plantas de tabaco inoculadas com TMV e submetidas a temperaturas de 32° C. Enquanto isso, em plantas que estavam expostas a temperaturas médias de 24° C, a produção de Me-SA alcançou 283 ng/hora nas plantas, e permaneceu em níveis elevados até 60 horas após a inoculação.

Diferentes condições de luminosidade também podem influenciar na expressão e acúmulo de Me-SA (LIU et al., 2010).

Alguns trabalhos disponíveis sobre BSMT1 demonstram que podem ocorrer variações nas reações das plantas em relação à expressão desse gene e nas respostas de defesa. Por exemplo, SONG et al. (2009) observaram em plantas de *A. thaliana* que mutantes que não expressavam BSMT1 tinham nível reduzido de emissão de Me-SA e que isso estava diretamente relacionado ao acúmulo de AS nos tecidos, além disso observaram que após a inoculação das plantas com *P. syringae*, houve incremento significativo na expressão do gene BSMT1. Ao contrário, KOO et al. (2007) avaliaram plantas transgênicas de *A. thaliana* que superexpressavam BSMT1, e constataram que essas plantas possuíam Me-SA constitutivamente e em quantidades suficientes para o envio do sinal volátil, entretanto essas plantas eram mais susceptíveis à *P. syringae* em relação às plantas do tipo selvagem. Uma das justificativas seria o fato de que a conversão de AS para o seu volátil Me-SA e consequentes perdas por emissão reduzem os níveis de AS na planta. Estas mesmas plantas quando pulverizaram com AS obtiveram níveis ainda elevados de emissão desse volátil.

Nas plantas onde houve aplicação de ASM, o gene BSMT1 foi altamente induzido, entretanto, os níveis de expressão variaram no decorrer do tempo para os experimentos I e II. Acredita-se que outros fatores, além da aplicação de ASM, possam estar associados a essas variações. Além disso, um aspecto que merece maiores investigações é o fato de que alguns trabalhos sugerem que a maior preferência de *D. citri* por plantas de citros com HLB em relação às sadias tem relação com compostos químicos emitidos pelas plantas, como o Me-SA (MANN et al., 2012; SIGNORETTI 2014). Nesse aspecto, a emissão desse volátil pode até mesmo facilitar a dispersão da doença no campo uma vez que o vetor acaba sendo atraído pelos voláteis emitidos em plantas infectadas com a bactéria. Para confirmar essa hipótese levantada, da suspeita de que plantas tratadas com ASM seriam mais atrativas ao vetor do HLB, seriam necessários testes complementares, como os de emissão de voláteis por plantas de citros após o tratamento das plantas com esse produto, bem como testes de preferência de insetos.

Como os precursores responsáveis pela biossíntese desse produto final (Me-SA) não foram induzidos em igual proporção em plantas tratadas com ASM, acredita-se que além dos genes estudados neste trabalho, pode haver outras rotas e outros precursores envolvidos na biossíntese, sinalização e resposta de defesa das plantas.

É marcante a expressão dos genes carboxi-metil transferase do ácido jasmônico (JMT) e carboxi-metil transferase do ácido salicílico (BSMT1) em função da aplicação foliar de ASM. Curiosamente, maiores níveis de expressão para esses dois genes foram observados nos mesmos períodos de tempo avaliado, nas plantas do experimento I e II. KOO et al. (2007) avaliaram a expressão desses genes em *A. thaliana*, observaram que com a pulverizações das plantas com as mesmas concentrações de AS e Me-JA ambas as vias, do AS e AJ, foram altamente reprimidas, e os autores relacionaram essa repressão ao antagonismo entre as duas vias. Em plantas de laranja doce, sugere-se que com a aplicação de ASM não ocorra antagonismo entre essas duas vias, pois tanto JMT, quanto BSMT1 foram altamente induzidos.

Os genes JMT e BSMT1 são responsáveis pela metilação do ácido jasmônico e do ácido salicílico, respectivamente, e este conjunto de modificações na interação laranja doce com *Ca. L. asiaticus*, deve ser um ponto melhor analisado para se descobrir quais mecanismos de defesa podem ser induzidos pelo ASM em citros, durante a prevenção da colonização pela bactéria uma vez que tratamentos com esse produto são capazes de retardar a detecção da bactéria nas plantas. A glicolisação do ácido salicílico, estimulada pela presença de *Ca. L. asiaticus*, pode ser um mecanismo de evitar a função sinalizadora de AS evitando, desta maneira, a ativação de respostas de defesa. A aplicação de ASM pode reverter este quadro através de sua metilação. Há indícios que as Liberibacters evoluíram mecanismos para evitar a sua percepção pelas células vegetais e a consequente ativação de mecanismos de defesa (WULFF et al., 2014; JAIN et al., 2015).

3.4.3 Parâmetros fisiológicos e fenotípicos das plantas

Durante a condução dos experimentos, observou-se que plantas tratadas com ASM estavam desenvolvendo-se mais lentamente em relação às plantas que não haviam recebido esse produto. AGNELLI (2011) não relatou mudanças no padrão de crescimento das plantas utilizadas, que eram mudas de laranja doce com aproximadamente nove meses de idade (Pera enxertada sobre Cravo) ou algum efeito de fitotoxicidade, embora a concentração de ASM tenha sido equivalente ao nosso trabalho.

Sabe-se que a eficácia da aplicação exógena de agentes abióticos na ativação das respostas de defesa, ou possíveis reações de fitotoxicidade de plantas, ocorre em uma margem muito estreita de dosagem do produto (KESSMANN et al., 1994a; KESSMANN et al., 1994b). Além do fato de

que as mudas utilizadas no presente trabalho possuíam diferente combinação de copa e porta enxerto ('Hamlin' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), enxertadas sobre Citrumelo Swingle (*Citrus paradise x Poncirus trifoliolata*)). Esse menor desenvolvimento pode estar associado ao período em que os experimentos foram iniciados, uma vez que o primeiro teve início em abril e o segundo em junho, o clima predominante na realização do experimento I, pode também de alguma forma ter afetado o desenvolvimento das plantas. Muito embora as plantas recuperaram-se com o tempo, e o mesmo não tenha sido observado com a mesma intensidade no experimento II.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A periodicidade das avaliações, bem como a homogeneidade das amostras, são fatores que podem estar relacionados às diferenças observadas na expressão dos genes avaliados. Além disso, as variações também podem estar relacionadas ao fato de que a ativação de mecanismos de defesa em plantas tratadas com produtos potencialmente indutores bióticos ou abióticos, geralmente ocorrer em períodos mais próximos ao tratamento (BAYSAL, 2005; MANDAL et al., 2008). Dessa forma, acredita-se que a realização de coletas mais próximas à aplicação do tratamento indutor poderiam auxiliar na compreensão mais concisa das alterações na expressão gênica causadas em plantas de citros. Entretanto, a lenta colonização pela bactéria em conjunto com o lento crescimento das plantas são fatores que dificultam esse tipo de experimento.

Além disso, experimentos com a inoculação com a bactéria pelo inseto vetor também deveriam ser considerados. Como a transmissão da doença no campo ocorre pelo vetor *D. citri* e experimentos em casa de vegetação são realizados via borbulhia, essas diferentes condições provavelmente afetam o desenvolvimento da doença nas plantas, bem como a eficiência do tratamento com ASM.

Plantas tratadas com ASM apresentaram redução no desenvolvimento, fato contrastante ao relatado em outros trabalhos onde o ASM fora aplicado em outras combinações copa e porta enxerto. Dessa maneira, supõe-se que a combinação copa e porta enxerto pode exibir maior ou menor sensibilidade ao produto, fazendo-se necessárias maiores investigações sobre os efeitos desse produto para outras combinações comerciais. Além disso, o aumento na expressão de vários genes de defesa das rotas do AJ e AS em plantas que receberam esse tratamento deve implicar em maior gasto energético e contribuir com um menor crescimento vegetativo, conforme o observado nas plantas de laranja doce durante o período em que o produto foi aplicado por várias vezes.

De todas as alterações observadas, os genes JMT e BSMT1 foram altamente induzidos em função da aplicação de ASM, estes são responsáveis pela metilação dos ácidos jasmônico e salicílico, respectivamente. Sugere-se que esse conjunto de modificações pode estar associado ao retardamento da detecção de plantas com HLB ao longo da condução dos experimentos I e II. Dessa maneira, estas alterações observadas para esses dois genes merecem maior investigação.

5 CONCLUSÕES

ASM retardou a detecção de *Ca. L. asiaticus* na copa das plantas de citros.

Aplicações periódicas de ASM diminuíram o crescimento das plantas de laranja doce, o qual foi revertido após cessar as aplicações.

ASM induziu a expressão de transcritos da metil transferase do ácido jasmonico (JMT) e da metil transferase do ácido salicílico (BSMT1) em plantas de laranjeira, alterando o metabolismo de defesa das plantas.

Os genes isocorismato sintase (ICS), ácido salicílico glucosil-transferase (SAGT1) e as fenilalaninas amônia-liases (PAL) (via do AS) foram regulados positivamente em plantas inoculadas com *Ca. L. asiaticus*, indicando que a planta não permaneceu passiva à colonização da bactéria.

6 REFERÊNCIAS

ACHOR, D. S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S.Y.; CHUNG, K.R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical Symptom Observations in Citrus Affected with Huanglongbing Disease. *Journal of Plant Pathology*, v. 9, n. 2, p. 56-64, 2010.

ADIE, B. PÉREZ-PÉREZ, J.; PÉREZ-PÉREZ, M. M.; GODOY, M.; SÁCHEZ-SERRANO, J. J.; SCHMELZ, E.A.; SOLANO, R. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 19, p. 1665-1681, 2007.

AGNELLI, A. R. **Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) - Araraquara/ SP, 2011.

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. San Diego: **Elsevier Academic Press**. 5º edição; p.922. 2005.

AGROFIT- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

ALBRECHT, U.; BOWMAN K. D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science*, v. 175, p. 291-306, 2008.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science*, v.186, p. 118-130, 2012.

AVANCI, N. C.; LUCHE, D. D.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMA, M. H. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 484-505, 2010.

BALDWIN, E.; PLOTTO, E.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, J.; IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, G. Effect of *Liberibacter* Infection (Huanglongbing Disease) of Citrus on Orange Fruit Physiology

and Fruit/Fruit Juice Quality: Chemical and Physical Analyses. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 1247-1262, 2010.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. *Rev. Bras. de Agrociências*, v.7 n. 2, p. 79-83, 2001.

BARI, R.; JONES J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.*, v. 69, p.473-488, 2009.

BASSANEZI, R. B.; BUSATO, L. A.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. **Spatial distribution of Huanglongbing symptomatic trees in citrus groves in São Paulo, Brazil.** In: Proceedings 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Florida, Orlando, 2005a.

BASSANEZI, R. B.; BUSATO, L. A.; BERGAMIN FILHO, A., AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. **Preliminary spatial pattern analysis of huanglongbing in São Paulo, Brazil.** In: Hilf ME, Duran-Vila N & Rocha-Peña MA (Eds.) Proceedings 16th Conf. Intern. Organization Citrus Virol., Univ. California, Riverside, p. 341-355, 2005b.

BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A., BELASQUE JÚNIOR, J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology*, Cordeirópolis. v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; BUSATO, L. A.; STUCHI, E. S. **Damages caused by Huanglongbing in sweet orange yield and quality in São Paulo.** In: Proceedings of the Huanglongbing- Greening International Workshop. Ribeirão Preto-SP, p. 39, 2006.

BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P. T.; GOTTWALD, T. R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease*, v. 97, p.789-796, 2013.

BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in

tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, p.747-753, 2003.

BAYSAL, O.; TURGUT, C.; MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2005.

BECKERS, G. J. M.; SPOEL, S. H. Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. **Plant Biol.**, v. 8, p. 1-10, 2006.

BELASQUE JUNIOR, J. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical plant pathology**, v. 34, n. 3, p. 137-145, 2009.

BELASQUE JUNIOR, J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Controle do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis-SP, v. 31, n. 1, p. 53-64, 2010.

BEN-HAYYIN, G.; GUETA-DAHAN, Y.; KRETCHMER, O. A.; WEICHERT, H.; FEUSSNER, I. Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells os *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Planta**, v. 212, p. 367-375, 2001.

BOINA, D. R.; MEYER, W. L.; ONAGBOLA, E. O; STELINSKI L. L. Quantifying dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 4, p. 1250-1258, 2009.

BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*- mediated transformation. **Cell**, v. 125, p. 749-760, 2009.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. **Indução da resistência: Noções básicas e perspectivas**. In: CAVALCANTI, L. S.; 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, p. 11-28, 2005.

BRAKKE, M.; ALLEN JR., L. H. Gas Exchange of Citrus Seedlings at Different Temperatures, Vapor-pressure Deficits, and Soil Water Contents. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 120, n. 3, p. 497-504, 1995.

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

BOVÉ, J. M.; BONNET, P.; GARNIER, M.; AUBERT, B. **Penicillin and tetracycline treatments of greening disease- affected citrus plants in the glasshouse and bacterial nature of the procaryote associated with greening**. In: Proc. 8th Conf. IOVC, Riverside, p. 91-102, 1980.

CALDELARI, D., WANG, G., FARMER, E., DONG, X. Arabidopsis *lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. **Plant Molecular Biology**, v. 75, p. 25-33, 2011.

CAMPBELL, E. J.; SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; IRIS A. M. A. P.; ANDERSON, J. P.; MACCLEAN, D. J; CAMMUE, B. P. A.; EBERT, P. R.; MANNERS, J. M. Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclareol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 133, 2003.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 572-576, 1967.

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

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, 263 p., 2005.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; COSTA, J. C. B.; SOUZA, R. M. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do

tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatol. Bras.**, v. 31, n. 4, 2006.

CEPEA- Cadeia Agroindustrial de Citros. 2002. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/citros>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

CHANG, A.; LIM, M. H.; LEE, S. W., ROBB, E. J.; NAZAR, R. N. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, Highly redundant but strongly underutilized. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 33591-33601, 2008.

CHEN, F.; D'AURIA, J. C.; THOLL, D.; ROSS, J. R.; GERSHENZON, J.; NOEL, J. P.; PICHERSKY, E. An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defence. **The Plant Journal**, v. 36, p. 577-588, 2003.

CHEN, Z.; ZHENG, Z.; HUANG, J.; LAI, Z.; FAN, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 6, p. 493-496, 2009.

CHEONG, J.-J.; CHOI, Y. D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **TRENDS in Genetics**, v. 19, n. 7, 2003.

CHEONG, Y. H.; CHANG, H. S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 129, 2002.

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell.**, v. 124, p. 803-814. 2006.

CITRUSRBR- Associação Brasileira dos exportadores de sucos cítricos. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

COERINI, L. F. **Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas de citros às bactérias *Candidatus Liberibacter spp.*, causadoras do Huanglongbing**. 2014, 100 p. il. Dissertação (Mestrado em ciências). Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' - ESALQ/ USP, 2014.

COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection*, v. 18, p. 267-273, 1999.

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

COLETTA-FILHO, H. D.; CARLOS, E. F.; ALVES, K. C. S.; PEREIRA, M. A. R.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. In planta multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.*, v. 126, p. 53-60, 2010.

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

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira- Laranja: Safra 2013/2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 1 ago.2014.

CONRATH, U. Systemic Acquired Resistance (Review). *Plant Signaling & Behavior*, v.1, n. 4, p. 179-184, 2006.

COQUEIRO, D. S. O.; DE SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; KISHI, L. T.; MACHADO, M. A. Transcriptional profile of sweet Orange in response to chitosan and salicylic acid. *BCM Genomics*, 2015.

CORTÊS, H. P. **Introdução aos hormônios Vegetais**. EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 180 p., 2000.

COSTA, V. C. **Avaliação de Acibenzolar-S-Metil, extrato cítrico e fermentado bacteriano no controle da murcha bacteriana (*Rasltonia solenacearum*) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Dissertação de mestrado. Marechal Cândido Rondon- PR, 2007.

CÔTÉ, F.; CHEOG, J. J.; ALBA, R.; HAHN, M. G. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 401-10, 1995.

COUTO, M. A. L. & CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. Campinas, SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, p. 15-19, 2010.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4114 - 4119, 1995.

CUI, J.; BAHRAMI, A. K.; PRINGLE, E.- G.; HERNANDEZ-GUZMAN, G. BENDER, C. L.; PIERCE, N. E.; AUSUBE, F. M. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores, **PNAS**, v. 10, n. 5, p. 1791-1796, 2005.

CUI, H.; XIANG, T.; ZHOU, J. M. Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. **Cell Microbiol.**, v.11, n. 10, p. 1453-1461, 2009.

da GRAÇA, J. V. Citrus greening disease. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 29, p. 109-136, 1991.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, p. 746-751, 2013.

DAVIS, M. J.; MONDAL, S. N.; CHEN, H.; ROGERS, M. E.; BRLANSKY, R. H. Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with actinobacteria from citrus with huanglongbing. **Plant Disease**, v. 92, p. 1547-1550, 2008.

DELANEY, T. P.; UKNES, S.; VERNOOIJ, B; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, D.; GAFFNEY, T.; GUT-RELLA, M.; KESSMANN, H.; WARD, E.; RYALS, J. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, v. 266, p. 1247-1249. 1994.

DEKKERS, M. G. H.; GRAHAN, J. H.; BURNS, J. K.; CUBERO, J.; COLBURN, G. C. Evaluation of chemical inducers and PR protein

reporters for induced systemic resistance to citrus bacterial diseases. **Phytopathology**, 2004.

DEMPSEY, D. M. A.; VLOT, A. C.; WILDERMUTH, M. C.; KLESSIG, D. F. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. **The Arabidopsis Book**, 2011.

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

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 JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas- SP. Instituto Agronômico e Fundag, p. 1-18, 2005.

ELKIND, Y.; EDWARDS, R.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S. A.; RIBAK, O.; DIXON, R. A.; LAMB, J. C. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 9057-9061, 1990.

FAN, J.; CHEN, C.; YU, Q.; BRLANSKY, R. H.; LI, Z. G.; GMITTER, J. R. Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analyses of sweet orange infected by "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". **Physiologia Plantarum**, 2011.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 7713-7716, 1990.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. **The Plant Cell**, v. 4, p. 129-134, 1992.

FARMER, E. E., ALMÉRAS, E.; KRISHNAMURTHY, V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 372-378, 2003.

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

FODOR, J.; JOZSA, A.; KIRALY, Z. Systemic acquired disease resistance in plants. **Novenyvedelem**, v. 34, p. 117-126, 1998.

FOLIMONOVA, S. Y.; ACHOR, D. S. Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. **Phytopathology**, v. 100, p. 949-958, 2010.

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

FRANCIS, M. I.; REDONDO, A.; BURNS, J. K.; GRAHAM, J. H. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. **J. plant. Pathol.**, v. 124, p. 283-292, 2009.

FUNDECITRUS- Fundo de Defesa da Citricultura. Greening- Manual técnico. 2009. Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/greening>>. Acesso em: 3 ago. 2014.

FUNDECITRUS- Fundo de Defesa da Citricultura. Os dez mandamentos do HLB. 2015. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/pdf/revistas/28.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

FUNDECITRUS- Fundo de Defesa da Citricultura. Reestimativa da safra de laranja 2015/16 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro - fechamento em abril/2016. Disponível em: http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0416_Fechamento_Sa_fra_de_Laranja.pdf. Acesso em 22 abr. 2016.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v. 261, p. 754-756, 1993.

GARCION, C.; LOHMANN, A.; LAMODIÈRE E. J.; CATINOT, J.; BUCHALA, A.; DOERMANN, P.; MÉTRAUX, J.-P. Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1279-1287, 2008.

GARNIER, M.; BOVÉ, J. M. **Citrus greening disease and the greening bacterium**. In: Proc. 12th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol., IOCV, Riverside-CA., p. 212-219, 1993.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. A etiology of citrus greening disease. **Ann. Microbiol.**, p. 169-179, 1984a.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. **The greening disease organism is a Gram negative bacterium**. In: Proc. 9th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol., IOCV, Riverside-CA., p. 115-124, 1984b.

GARNIER, M.; LATRILLE, J.; BOVÉ, J. M. Spiroplasma citri and the organism associated with likubin: comparison of their envelope systems. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. **Proceedings of 7th Conference IOCV**, Riverside: University of California, p.13-17, 1976.

GASPAROTO, M. C. G.; COLETTA-FILHO, H. D.; BASSANEZI, R. B.; LOPES S. A.; LOUREÇO, A. S.; AMORIM, L. Influence of temperature on infection and establishment of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Plant Pathology**, v. 61, p. 658-664, 2012.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, n. 27, p. 93, 2001.

GOTTWALD, T. R. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 48, p. 119-139, 2010.

GOTTWALD, T. R.; da GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and Its impact. **Plant Management Network**, 2007.

GRAHAM, J. H.; JOHNSON, E. G.; GOTTWALD, T. R.; IREY, M. S. Pre-symptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by Huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, v. 97, n. 9, p. 1195-1199, 2013.

GRAHAM, J. H.; MYERS, M. E. Soil Application of SAR Inducers Imidacloprid, Thiamethoxam, and Acibenzolar-S-Methyl for Citrus Canker Control in Young Grapefruit Trees. **Plant Disease**, v. 95, p.725-728, 2011.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 9, p. 414-420. 2006.

GUZZO, S. D.; de CASTRO, R. M.; KID, A.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do Acibenzolar-S-Methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, p. 89-94, 2001.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 34, p. 387-412, 1996.

HALBERT S. E. **The discovery of huanglongbing in Florida.** Proceedings of 2nd International Citrus Canker And Huanglongbing Research Workshop, Florida Citrus Mutual, Orlando. 2005.

HARMS, K.; ATZORN, R.; BRASH, A.; KUHN, H.; WASTERNAACK, C.; WILLMITZER, L.; PENÑ-CORTÉS, H. Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. **Plant Cell**, v. 7, p. 1645-1654, 1995.

HEATH, M. C. Now-host resistance to plant pathogens, nonspecific defence or the result of specific recognition events. **Physical and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p. 53-54, 2001.

HEIL, M. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 137-146, 2001.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, 1993.

HILF, M. E.; LEWIS, R.S. Transmission and Propagation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' by Grafting with Individual Citrus Leaves. **Bacteriology**, v. 106, n. 5, p. 452-458, 2016.

HUNG, T. H.; HUNG, S. C.; CHEN, C. N.; HSU, M. H.; SU, H. J. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. **Plant Pathology**, v. 53, p. 96-102, 2004.

HUNT, M.; RYALS, J. Systemic acquired resistance signal transduction. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15: p. 583-606, 1996.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola municipal. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

ITO, A.; HAYAMA, H.; KASHIMURA, Y. Sugar metabolism in bud during flower bud formation: a comparison of the japanese pear [*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak.] Cultivars possessing different flowering habitats. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p. 163-175, 2003.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. PCR detection of the two '*Candidatus liberibacter*' species associated with greening disease of citrus. **Mol. Cell Probes**, v. 10, p. 43-50, 1996.

JAGOUEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, p. 379-386, 1994.

JAIN, M.; FLEITES, L. A.; GABRIEL, D. W. Prophage-Encoded peroxidase in *Candidatus Liberibacter asiaticus* is a secret effector that suppressed plant defenses. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 28, n. 12, p. 1330-1337, 2015.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JENDOUBI, W.; HARBAOUI, K.; HAMADA, W. Salicylic acid-induced resistance against *Fusarium oxysporum* f.s. *pradicis lycopersici*

in hydroponic grown tomato plants. **Journal of new sciences**, v. 21, p. 985-995, 2015.

JINYUAN, L.; OURA, C.; ASPURIA, E.T.; OONO, Y.; UCHIMIYA, H. Application of real-time RT-PCR quantification to evaluate differential expression of *Arabidopsis* Aux/IAA genes. **Chinese Science Bulletin**, v. 46, n. 19, p. 1642-1645, 2001.

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 trees prior to appearance of foliar symptoms. **Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 290-298, 2014.

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

KEEN, N. T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race-specificity in pathogens. **Science**, v. 187, p. 74-75. 1975.

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

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. Silencing the Jasmonate Cascade: Induced Plant Defenses and Insect Populations. **Science**, v. 305, 2004.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994a.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; LIGON, J.; OOSTENDORP, M.; RYALS, J. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 359-369, 1994b.

KIM, J. S.; SAGARAM, U. S.; BURNS, J. K.; LI, J. L.; WANG, N. Response of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Infection: Microscopy and Microarray Analyses. **Phytopathology**, v. 99, p. 50-57, 2008.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **Plant J.** v. 12, p.1067-1078, 1997.

KOLOMIETS, M. V.; CHEN, H.; GLADON, R. J.; BRAUN, E. J. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. **Plant Physiol.**, v. 124, p. 1121-1130, 2000.

KOO, Y. J., KIM, M. A.; KIM, E. H.; SONG, T. J.; JUNG, C.; MOON, J. K.; KIM, J. H.; SEO, H. S.; SONG, S. I.; KIM, J. K.; LEE, J. S.; CHEONG, J. J.; CHOI, Y. D. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.** v. 64, p. 1-15, 2007.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Fitness cost of induced resistance in bean plants by the rhizobacteria *Bacillus cereus* or acibenzolar-S-methyl: enzymes activities, phenol and lignin synthesis, and biomass. **Summa phytopathologica**, v. 36, n. 2, 2010.

LAFLÈCHE, D.; BOVÉ, J. M. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 270. p. 1915-1917, 1970.

LAFUENTE, M. T.; ZACARIAS, L.; MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A.; SANCHEZ-BALLESTA; M. T.; GRANELL, A. Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. **Postharvest Biology and Technology**, v. 29, p. 308-317, 2003.

LEE, H. I.; LEON, J.; RASKI, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Colloquium Paper**, v. 92, p. 4076-4079, 1995.

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

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

LI, J., TRIVEDI, P., WANG, N. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus Huanglongbing. **Phytopathology**, v. 106, p. 37-46, 2016.

LIMA, A. C. **Insetos do Brasil, Homópteros**. Escola Nacional de Agronomia 3° TOMO. Série didática, n. 4, 324 p., 1942.

LIU, P.-P.; YANG, Y.; PICHERSKY, E.; KLESSIG, D. F. Altering Expression of Benzoic Acid/Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase 1 Compromises Systemic Acquired Resistance and PAMP-Triggered Immunity in Arabidopsis. **MPMI**, v. 23, n. 1, p. 82-90, 2010.

LIU, P.; DAHL, C. V. D.; PARK, S. W.; KLESSIG, D. F. Interconnection between Methyl Salicylate and Lipid-Based Long-Distance Signaling during the Development of Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis and Tobacco. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1762-1717, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPES, S. A. **Situação do huanglongbing no Estado de São Paulo**. In: ZAMBOLIN, L., BASSANEZI, R. B. (Eds). Doenças quarentenárias dos citros. Viçosa/UFV, p. 175-193, 2006.

LOPES, S. A.; BASSANESI, R. B. **A doença do Huanglongbing do citros no Estado de São Paulo**. In: Manejo integrado de doenças em fruteiras. Núcleo de estudos em Fitopatologia, Viçosa: UFV. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 257-258, 2007.

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BARBOSA, J. C. Ineffectiveness of pruning to control citrus Huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus* **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 119, p. 463-468, 2007.

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

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

LOPES, J. M.; DÉO, T. F. G.; ANDRE, B. J. M.; GIROT, M.; FELIP, A. S.; JUNIOR, C. E. I.; BRUNO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. Importância econômica do citros no Brasil. **Revista científica eletrônica de agronomia**, n. 20, 2011.

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

LOPES, S. A.; LUIZ, F. Q. B. F.; MARTINS, E. C.; FASSINI, C. G.; SOUSA, M. C.; BARBOSA, J. C.; BEATTIE, G. A. C. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. **Plant Disease**, v. 97, p. 1563-1570, 2013.

LUO, W.; RILEY, T.; GOTTWALD, T. R. Assessment of citrus healthy management areas and their performance in Florida. In: **International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando, p. 154, 2015.

MACHADO, E. C.; MEDINA, C. L.; GOMES, M. M. A. Teor de água no substrato de crescimento e fotossíntese em laranjeira ‘Valência’. **Bragantia**, v. 58, n. 2, p. 217-226, 1999.

MACHADO, E. C.; MEDINA, C. L.; GOMES, M. M. A.; HABERMANN, G. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranjeira ‘Valência’. **Sci. agric.**, v. 59, n. 1, 2002.

MACHADO, E. C.; QUAGGIO, J. A.; MAGALHÃES, A. M.; LAGÔA, A.; TICELLI, M.; FURLANI, P. R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 6, p. 53-57, 1994.

MAFRA, V.; KUBO, K. S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R. M.; BOAVA, L. P.; RODRIGUES, C. M.; MACHADO, M. A. Reference Genes for Accurate Transcript Normalization in Citrus Genotypes under Different Experimental Conditions. **PLoS ONE**, v.7, p. 2, 2012.

MAGALHÃES-FILHO, J. R.; AMARAL, L. R.; MACHADO, D. F. P.; MEDINA, L. C.; MACHADO, E. C. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v. 67, n. 1, p.75-82, 2008.

MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. **Science**, v. 250, p. 1002-1004, 1990.

MALAMY, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and plant disease resistance **The Plant Journal**, v. 2, n. 5, p. 643-654, 1992.

MALAMY, J.; SANCHEZ-CASAS, P.; HENNIG, J.; GUO, A. L.; KLESSIG, D. F. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 9, p. 474-482, 1996.

MANDAL, B.; MANDAL, S.; CSINOS, A. S.; MARTINEZ, N.; CULBREATH, A. K.; PAPPU, H. R. Biological and molecular analyses of the Acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance in flue-cured tobacco against Tomato spotted wilt virus. **Phytopathology**, v. 98, p. 196-204, 2008.

MANN, R. S.; ALI, J. G.; HERMANN, S. L.; TIWARI, S.; PELZ-STELINSKI, K. S.; ALBORN, H. T.; STELINSKI, L. L. Induced Release of a Plant-Defense Volatile 'Deceptively' Attracts Insect Vectors to Plants Infected with a Bacterial Pathogen. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, 2012.

MASSEY, F. J. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. **Journal of the American Statistical Association**, v. 46, n. 253, p. 68-78, 1951.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal- Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 3^a ed. atual. Ampl., Ed. UFV, 2009.

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

MARTINEZ, C.; BACCOU, J. C.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y.; DANIEL, J. F.; JALLOUL, A.; MONTILLET, J. L.; GEIGER, J. P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 757-766, 2000.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.-P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, v. 82, p. 535-540, 1998.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B., BOLLER, T. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue: II. Inhibition of Fungal Growth by Combinations of Chitinase and β -1, 3-Glucanase. **Plant Physiol.**, v. 88, n. 3, p. 936-942. 1988.

MCCLEAN, A. P. D.; OBERHOLZER, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange in South Africa. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 297-298, 1965.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira 'valência' sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 29-34, 1999.

MOONS, A.; PRINCE, E.; BAUW, G.; VAN-MONTAGU, M. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-

ducible transcripts in rice roots. **The Plant Cell**, v. 9, p. 2243-2259, 1997.

MULLER, M. J. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. **Physiol. Plant**, v. 100, p. 653-663, 1997.

MUR, L. A.; KENTON, P.; ATZORN, R.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, v. 140, p. 249-262, 2006.

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

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic Note: A Proposal for Recording the Properties of Putative Taxa of Procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 174-176, 1994.

NASCIMENTO, A. R.; FERNANDES, P. M.; ROCHA, M. R.; DA SILVA, E. A. Fontes de fosfito e Acibenzolar-S-Metil no controle de doenças e produtividade do tomateiro. **Biosci. Journal**, v. 24, p. 53-59, 2008.

NASSEM, M., KALTDORF, M., DANDEKAR, T. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 16, p. 4885-4896. 2015.

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. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1393–1404, 1999.

NEVES, M. F.; JANK, M. S.; LOPES, F. F.; TROMBIN, V. G. Ações para aumentar a competitividade da cadeia da laranja no Brasil. **Laranja, Cordeirópolis**, v. 27, n. 2, p.213-229, 2006.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira**. Centro

de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia- FEALQ- USP, Ribeirão Preto- SP, 2010.

OHL, S.; HEDRICK, S. A.; CHORY, J.; LAMB, C. J. Functional Properties of a Phenylalanine Ammonia-Lyase Promoter from *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 2, p. 837-884, 1990.

OLIVEIRA, T. S. **Expressão de genes da via do Ácido Salicílico em resposta à infecção por ‘Candidatus Liberibacter spp.’, agente do Huanglongbing do citros**. 2013. 104 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas-SP. 2013.

PALLAS, J. A.; PAIVA, N. L.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. **The Plant Journal**, v. 10, p. 281-293, 1996.

PARK, J. H.; HALITSCHKE, R.; KIM, H. B.; BALDWIN, I. T.; FELDMANN, K. A.; FEYEREISEN, R. A. knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 31, p.1-12, 2002.

PARK, S. W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plants systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, p. 113-116, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; BLUMER, S.; REZENDE, D. C.; BRAND, S. C. **Indução De Resistência Novos Conceitos e Aplicações**. *Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas*. Lavras, MG, 2010.

PASCHOLATTI, S. F.; LEITE, B. **Hospedeiro: mecanismos de resistência**. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Piracicaba- SP. Editora Ceres, v. 1, p. 415-453, 1995.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia**

molecular. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v. 13, Piracicaba: *FEALQ*, 2008, 627p.

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. **Trends Plant Sci.** v. 4, n. 2, p. 52-58, 1999.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1571-1580, 1998.

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

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WESS, S. C. M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489-521, 2012.

QUIRINO, B. F.; BENT, A. F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis*/*Pseudomonas* interaction as a model. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 517-530, 2003.

RAITHORE, S.; DEA, S.; PLOTTO, A.; BAI, J.; MANTHEY, J.; NARCISO, J.; IREY, M.; BALDWIN, E. Effect of Blending Huanglongbing (HLB) Disease Affected Orange Juice 1 with Juice from Healthy Orange on Flavor Quality. **Food Science and Technology**, v. 62, p. 868-874, 2015.

REINKING, O. A. Diseases of economic plants in South China. **Philippine Agriculturist**, v. 8, p. 109-135, 1919.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis perniciosus* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 149-156, 2000.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. Hormone *crosstalk* in plant disease and defense: More than just jasmonate-

salicylate antagonism. **Annual Reviews of Phytopathology**. v. 49, p. 317-343, 2011.

ROBERT-SEILANIANZ, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J. D. Pathological hormone imbalances. **Science Direct**, v. 10, n. 4, p. 372-379, 2007.

RODRÍGUEZ, A.; SHIMADA, T.; CERVERA, M.; ALQUÉZAR, B.; GADEA, J.; GÓMEZ-CADENAS, A.; OLLAS, C. J. D.; RODRIGO, M. J.; ZACARÍAS, L.; PENÃ, L. Terpene Down-Regulation Triggers Defense Responses in Transgenic Orange Leading to Resistance against Fungal Pathogens. **Plant Physiology**, v. 164, p. 321-339, 2014.

ROJO, E.; SANCHEZ-SERRANO, J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, p. 82-89, 2003.

ROMERO, A. M.; KOUSIK, C. S.; RITCHIE, D. F. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, v. 85, p. 189-194, 2001.

ROSSETTI, V., GARNIER, M., BOVÉ, J. M. BERETTA, M. J. G., TEIXEIRA, A. R., QUAGGIO, J. A.; DE NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes Rendus. Académie des Sciences de Paris*, t. 310, serie III, p.345-349, 1990.

SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, T.; AMAGAI, S.; KUWATA, A.; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H.; TABATA, S. Monitoring of Methyl Jasmonate-responsive Genes in Arabidopsis by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. **DNA Research**, v. 8, p. 153-161, 2001.

SCHALLER, A.; STINTZI, A. Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. **Phytochemistry**, 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time,

quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 46, p. 69-81, 2000.

SCORA, R. W. On the story and Origen of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club.*, v. 102. p. 369-375, 1975.

SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Fruticultura-2015. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf. Acesso em: 27 de maio de 2016.

SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and physiological and molecular actions of jasmonates. *Plant Molecular Biology*, v. 44, p. 569-589, 1993.

SEO, H. S.; SONG, J. T.; CHEONG, J. J.; LEE, Y. H.; LEE, Y. W.; HWAN, I.; LEE, J. S.; CHOI, Y. D. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate- regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p. 4788-4793, 2001.

SHARKEY, T. D. Photosynthesis in intact leaves of C₃ Plants: physics, physiology and rate limitations. *Botanical Review*, v. 51, p. 53-105, 1985.

SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, v. 285, 1997.

SIEGEL, S. Nonparametric Statistics. *The American Statistician*, v. 11, n. 3, p. 13-19, 1957.

SIGNORETTI, A. G. C. **Identificação de voláteis de plantas de citros com potencial para uso no manejo integrado de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**. 2014. 76 p. il. *Tese de Doutorado* (Doutorado em Ciências/Entomologia). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 2014.

SINGERMAN, A.; USECHE, P. Impact of Citrus Greening on Citrus Operations in Florida. USDA-NASS. Flórida Department of Agricultural Services/University of Florida. 2015. Disponível em: <<http://www.crec.ifas.ufl.edu/extension/economics/pdf/Impact%20Citrus%20Greening%20.web.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

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

SONG, J. T. Induction of a Salicylic Acid Glucosyltransferase, AtSGT1, Is an Early Disease Response in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Cells**, v. 22, n. 2, p. 233-238. 2006.

SONG, J. T.; KOO, Y. J.; SEO, H. S.; KIM, M. C.; CHOI, Y. D.; KIM, J. H. Overexpression of atSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Phytochemistry**, v. 69, p 1128-1134. 2008.

SONG, J. T.; KOO, Y. J.; PARK, J.-B.; SEO, Y. J.; CHO, Y.-J.; SEO, H. S.; CHOI, Y. D. The Expression Patterns of AtBSMT1 and AtSAGT1 Encoding a Salicylic Acid (SA) Methyltransferase and a SA Glucosyltransferase, Respectively, in Arabidopsis Plants with Altered Defense Responses. **Mol. Cells**, v. 28, p. 105-109, 2009.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. Biology of citrus. **Biology of horticultural crops**. Cambridge University, 1996.

SPOEL, S. H.; KOORNNEEF, A.; CLAESSENS, SUSANNE, M. C.; KORZELIUS, J. P.; VAN PELT J. A.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J. P.; BROWN, R.; KAZAN, K.; VAN LOON L. C.; DONG, X.; PIETERSE, C. M. J. NPR1 modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. **The Plant Cell**, v. 15, p. 760-770, 2003.

STENZEL, I.; HAUSE, B. MIERSCH, O.; KURZ, T.; MAUCHER, H.; WEICHERT, H.; ZIEGLER, J.; FEUSSNER, I.; WASTERNAC, K. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 895-911, 2003.

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

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 35, p. 235-270, 1997.

STOVER, E.; MCCOLLUM, G. Incidence and Severity of Huanglongbing and Candidatus *Liberibacter asiaticus* Titer among Field-infected Citrus Cultivars. **Hortscience**, v. 46, n. 10, p. 1344-1348, 2011.

SUMMERMATTER, K.; STICHER, L.; MÉTRAUX, J.-P. Systemic Responses in *Arabidopsis thaliana* Infected and Challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. **Plant Physiol.** v. 108, p. 1379-1385, 1995.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS, W. C. J. R.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “*Candidatus*” *Liberibacter* species associated with the disease. **Mol. Cell. Probes**, v. 19, p. 173-179, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. A new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, is associated with Huanglongbing in Sao Paulo. In: *Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Monterrey: IOCV, p. 81, 2004.

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

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R. A.; AYRES, J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, n. 9, 2008b.

TOUNEKTI, T.; HERNÁNDEZ, I.; MUNNÉ-BOSCH, S. Salicylic Acid Biosynthesis and Role in Modulating Terpenoid and Flavonoid

Metabolism, in Plant Responses to Abiotic Stress. In: SHAMSUL, H.; AHMAD, A.; ALVEMENI, M. N. **Salicylic acid: plant growth and development**. 2013, p. 141-162.

TRAPP, M. A.; SOUZA, G. D.; RODRIGUES-FILHO, E.; BOLAND, W.; MITHÖFER, A. Validated method for phytohormone quantification in plants. **Front. Plant Sci.**, v. 26, n. 5, 417, 2014.

TRIVEDI, P.; U. SAGARAM, S.; KIM, J.-S.; BRLANSKY, R. H.; ROGERS, M. E.; STELINSKI, L. L.; OSWALT, C.; WANG, N. Quantification of viable '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 124, p. 553-563, 2009.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-62, 2006.

VAN LOON, L. C.; STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins the activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopatology**, v. 95, n. 12, p. 1368-1373, 2005.

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. **The Plant Cell**, v. 3, p.1085-1094, 1991.

WEN, P. F.; CHENA, J. Y.; KONGA, W. F.; PANA, O. K.; WANA, S. B.; HUANG, W. D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, v. 169, n. 5, p. 928-934, 2005.

VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, A.; MORSE, A.; REIST, R.; KOLDITZ-JAWHAR, R.; WARD, E.; UKNES, S.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. **The Plant Cell**, v. 6, p. 959-965, 1994.

WHITE, R. F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, v. 99, p. 410-412, 1979.

VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 111, p. 470-477, 1983.

WILDERMUTH, M.C.; DEWDNEY, J.; WU, H.; AUSUBEL, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, 2001.

WULFF, N. A.; ZHANG, S.; SETUBAL, J. C.; ALMEIDA, M. F.; MARTINS, E. C.; HARAKAVA, R.; KUMAR, D.; RANGEL, L. T.; FOISSAC, X.; BOVÉ, J. M.; GABRIEL, D.W. The Complete Genome Sequence of 'Candidatus Liberibacter americanus', associated with Citrus Huanglongbing. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 27, n. 2, p. 163-176, 2014.

XU, C. F.; XIA, Y. H.; LI, K. B.; KE, C. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 17-21 November 1986, Valencia- Spain. p. 243-248, University of California, Riverside, CA, USA, 1988.

YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; GARBIM, L. F.; COELHO, J. H. C.; XIMENES, N. L.; MARTINS, E. C.; LEITE, A. P. R.; SOUSA, M. C.; ABRAHÃO, D. P.; BRAZ, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter americanus*. *Huanglongbing- Greening- International Workshop*, Ribeirão Preto- SP, p. 96, 2006.

YAMAMOTO, P. T.; PAIVA, P. E. B.; GRAVENA, E. S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 165-170, 2001.

YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 4, 2001.

YANG, Y. H.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes Dev.**, v. 11, n. 13, p. 1621-1639, 1997.

YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; WILSON, T. M. A.; KLEIER, D. A.; RASKI, I. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. **The Plant Cell**, v. 3, p. 809-818, 1991.

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