



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014  
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

**DESAFIO DE PLANTAS DE CITROS TRANSGÊNICAS AO VÍRUS DA LEPROSE DOS  
CITROS C, E TABACO TRANSGÊNICO À BACTÉRIA *CANDIDATUS LIBERIBACTER  
ASIATICUS***

Isabella de Oliveira **Simoni**<sup>1</sup>; Luiz Guilherme Bononi **Fachini**<sup>2</sup>; Rosangela Inui **Kishi**<sup>3</sup>; Alex  
Junior **Soares**<sup>4</sup>; Valdenice Moreira **Novelli**<sup>5</sup>

**Nº 14118**

**RESUMO** - O Brasil é o maior produtor mundial de laranja; no entanto, a cultura de citros é acometida por uma variedade muito grande de doenças, como a leprose. Causada pelo Citrus leprosis virus C, é considerada a principal doença viral da cultura no país. O manejo da doença tem sido feito por meio do controle químico do ácaro vetor, prática dispendiosa e ambientalmente indesejável. Outra doença de suma importância é o huanglongbing (HLB, ex-greening), causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, que vem causando prejuízos ao setor devido à severidade da doença e à dificuldade de controle. Em função disso, torna-se relevante desenvolver estratégias que promovam uma maior resistência aos patógenos, como a expressão de genes codificando proteínas de defesa por meio da transgenia. No presente estudo, foram testados materiais transgênicos de citros e tabaco expressando os genes de defesa TcPR10 e CitPR10, isolados de *Theobroma cacao* (cacau) e *Citrus sinensis* (citros), respectivamente, e que codificam uma proteína relacionada à patogênese (PR10). Apesar de ter sido proposto avaliar a resistência destas plantas quanto aos dois patógenos descritos, devido a problemas experimentais, optou-se por realizar este desafio com CiLV-C e *Xanthomonas citri subsp. citri*, bactéria causadora de outra doença de expressão na citricultura, o cancro cítrico. O trabalho foi realizado com o intuito de se identificar um possível aumento na resistência e assim poder contribuir para o manejo das doenças em estudo. No entanto, não foi observado aumento de resistência aos patógenos testados.

**Palavras-chave:** Cancro cítrico, *Citrus leprosis virus C*, 'Hamlin'

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Cordeirópolis-SP; isabellasimoni@hotmail.com

2 Bolsista Fapesp, Mestrando em Microbiologia Agrícola, Esalq-USP, Piracicaba, SP

3 Bolsista Fapesp: Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, UNICAMP, Campinas-SP

4 Bolsista Fapesp: Graduação em Ciências Biológicas UNIARARAS, Araras-SP

5 Orientadora: Pesquisadora do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP. valdenice@centrodecitricultura.br



**ABSTRACT** – Brazil is the world's largest orange producer; however, the citrus crop is affected by a very wide variety of diseases such as leprosis. Caused by Citrus leprosis virus C, it is considered the main viral disease of the crop in the country. The disease control has been done mainly by the chemical control of the mite vector, which is costly and environmentally undesirable. Another disease of high importance is the Huanglongbing (HLB, ex greening) caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter spp.*, which has been causing losses to the citrus industry due to its severity and difficulty of control. As a result, it becomes important to develop strategies that promote higher resistance to these pathogens. Our work tested the possibility to develop transgenic resistant citrus and tobacco plants expressing the defense genes *TcPR10* and *CitPR10*, isolated and cloned from *Theobroma cacao* (cocoa) and *Citrus sinensis* (citrus), respectively, encoding a pathogenesis-related (PR10) protein. Although it was proposed to evaluate the resistance of these plants to the pathogens described, due to experimental problems, it was decided to undertake this challenge with *CiLV-C* and *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent of citrus canker. The objective was to identify a possible increase in resistance that could be used in the disease management. However, no resistance was observed for the pathogens tested.

**Keywords:** Citrus canker, *Citrus leprosis virus C*, 'Hamlin'

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, responsáveis por 85% das exportações mundiais do produto, o país exporta cerca de milhões de toneladas de suco de laranja por ano, gerando uma receita anual de US\$ 1,5 a US\$ 2,5 bilhões (NEVES et al., 2011). Com tamanha importância econômica, a cultura de citros vem acompanhada também de uma variedade muito grande de doenças, como a leprose dos citros. Causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), a leprose foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1933, no Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1955), e é a principal doença viral dos citros no país. O vírus, transmitido de forma persistente por ácaros do gênero *Brevipalpus* (KITAJIMA et al., 1972), provoca sintomas que podem variar de acordo com as cultivares, a região onde ocorre a doença, a fase de desenvolvimento do órgão afetado e diferentes estirpes do patógeno (ROSSETTI, 1995). Aproximadamente 80% dos citros plantados no estado de São Paulo são de variedades suscetíveis ao vírus. A doença caracteriza-se por produzir lesões cloróticas e/ou necróticas restritas aos locais de alimentação do vetor, que são



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

visíveis a partir de 17 a 60 dias após a infecção do tecido vegetal (BASSANEZI et al., 2002), manifestando-se nas folhas, nos frutos e nos ramos infectados.

Outra doença de grande importância econômica na cultura do citros é o *huanglobing* (HLB, *ex-greening*), doença altamente destrutiva para os pomares e que reduz significativamente a produtividade da mesma (NEVES et al., 2010). É causada por bactérias, restritas ao floema das plantas hospedeiras que apresentam lento crescimento no tecido, denominadas *Candidatus Liberibacter* spp. (GARNIER & BOVÉ, 1996). O vetor do HLB no estado de São Paulo é o psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama, que transmite *Ca. L. asiaticus* (CaLas) e *Ca. L. Americanos* (CaLam), as duas espécies de *Liberibacter* associadas com o HLB no Brasil (YAMAMOTO et al., 2006). Os sintomas de HLB são percepções visuais das respostas fisiológicas das plantas afetadas, e se manifestam no limbo foliar, na brotação de ramos, no crescimento e amadurecimento dos frutos e no próprio desenvolvimento geral da planta. Plantas com a doença possuem ramos sintomáticos que geram frutos deformados, com necroses amarelo-escuro no albedo. Em casos severos, toda a planta mostra sinais da doença. (COLETTA-FILHO et al., 2010)

Medidas preconizadas para o controle de ambas doenças têm sido tomadas, dentre elas a principal prática adotada pelos citricultores em relação à leprose dos citros tem sido a pulverização do talhão com acaricidas, visando reduzir a população do ácaro vetor (CZERMAINSKI et al., 2007). Além de ambientalmente indesejável, esta prática é bastante dispendiosa, gerando custos anuais de cerca de U\$75 a U\$100 milhões. Tratando-se de HLB, o controle do inseto vetor e a erradicação de plantas afetadas têm-se apresentado como medidas mais eficientes para redução do inóculo no pomar e manutenção da produção de frutos (BELASQUE Jr. et al., 2009). No entanto, características como a rápida evolução da doença dentro e entre regiões de cultivo fazem com que a sua erradicação seja inviável e seu controle um grande desafio.

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é considerado uma ameaça potencialmente grave para diversas regiões produtoras de citros do Brasil (LEITE JÚNIOR et al., 1987), pois trata-se de uma doença séria, atacando diversas variedades de importância comercial, tais como laranjas, limões, limas, entre outros. A primeira ocorrência do cancro cítrico no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (AMARAL, 1957). O cancro em si, que é a principal manifestação da doença, é causado pela excessiva divisão celular (hiperplasia) no mesófilo foliar onde houve a infecção, provocando o rompimento da epiderme e seu surgimento em forma de erupção, no meio da lesão (AMARAL, 2003). No Brasil, o cancro cítrico é mais severo no início do verão, quando altas temperaturas, chuvas intensas e ventos ocorrem ao mesmo tempo e num período no qual as plantas hospedeiras apresentam grande



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

quantidade de tecidos imaturos (ramos, folhas e frutos). Medidas de exclusão e erradicação foram adotadas regionalmente no mesmo ano em que a doença foi identificada e foi iniciada em São Paulo uma campanha de erradicação do cancro cítrico, que permanece em execução até os dias atuais. (BELASQUE Jr. et al., 2009).

Diante da necessidade de se desenvolver estratégias que promovam maior resistência a patógenos, a expressão de genes codificando proteínas de defesa em plantas transgênicas tem sido sugerida como uma prática promissora. Esforços têm sido tomados neste sentido, buscando-se obter plantas resistentes por meio de várias abordagens, tais como a introdução de genes codificando proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR). Com tal propósito, foram construídos e estão disponíveis citros transgênicos expressando o gene *TcPR10*, clonado a partir de sequência de cacauero (*Theobroma cacao*) e gentilmente cedido pelo Dr. Abelmon Gesteira (Embrapa Mandioca e Fruticultura).

As proteínas PR compreendem a uma ampla classe de proteínas acumuladas em tecidos de plantas após a infecção por patógenos. Essas proteínas foram descobertas inicialmente em cultivares de tabaco que reagiram ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) e ajudaram a limitar a multiplicação e/ou disseminação do vírus invasor, reduzindo consideravelmente sua infecciosidade. As proteínas PR são primeiramente detectáveis em um anel em torno do centro da necrose. Na fase seguinte à expansão da lesão, elas atingem seu máximo de concentração nas margens das lesões (VAN LOON, 1985). As proteínas da classe PR10, que possuem uma relação de defesa intracelular, já foram encontradas induzidas em resposta ao ataque de patógenos em ampla variedade de espécies, incluindo milho e tomate. Uma explicação associando as proteínas PR10 a respostas de defesa é baseada no achado de que algumas delas não apenas apresentam homologia com ribonucleases como exibem atividade de ribonuclease *in vitro* e também *in vivo*, o que poderia auxiliar na restrição da infecção do patógeno. Estudos realizados com pimenta (*Capsicum annuum*) descrevem que a PR10 é fosforilada após a inoculação com o TMV, aumentando sua atividade ribonucleolítica e fazendo com que esta funcione como uma RNase, sendo capaz de clivar o RNA viral, podendo então atuar como uma proteína antiviral e assim inibir a penetração ou a replicação do mesmo (PARK et al., 2004).

Estudos de transgenia superexpressando proteínas PR resultaram em plantas exibindo severidade decrescente de doenças após a infecção por patógenos, comprovando a importância do mesmo em respostas de defesa e a eficácia da estratégia no controle de doenças.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Identificação de plantas transgênicas

As plantas a serem utilizadas, provenientes de experimentos prévios de transformação genética, foram avaliadas por PCR, para identificar a integração do gene *TcPR10* e *CitPR10*. Para tanto, foi realizada a extração de DNA usando o kit DNeasy (Qiagen). Em seguida, os fragmentos foram amplificados por meio de primers específicos para o gene em questão, desenhado usando o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). As reações consistirão de 1X tampão, 1,8mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP mix, 1U Taq DNA polymerase, 2ng dos primers e água Milli-Q completando o volume para 25 µL. Será realizado um ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 40 seg a temperatura de anelamento (normalmente de 54 a 58°C, em função da sequência e tamanho dos primers) e 45 a 60 seg a 72°C (em função do tamanho do produto a ser amplificado). A visualização do fragmento de interesse foi feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, confirmando assim a presença do transgene.

### 2.2 Inoculação de plantas transgênicas com CiLV-C

Plantas de citros comprovadamente transgênicas expressando *TcPR10* e *CitPR10* foram inoculadas com CiLV-C, através de ácaros virulíferos provenientes de uma população virulífera mantida sobre frutos sintomáticos para leprose no Laboratório de Acarologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. Um total de 15 ácaros virulíferos foram transferidos para cada planta-teste, num total de 23 plantas transgênicas expressando o gene *TcPR10*, 10 plantas transgênicas expressando o gene *CitPR10* e 10 não transgênicas para avaliação dos sintomas.

### 2.3 Transmissão de CaLas para plantas transgênicas

Tentativas de transmissão da bactéria causadora do HLB para as plantas foi feita pela conexão das plantas transgênicas de tabaco com vincas infectadas por meio de *Cuscuta* sp. A conexão foi mantida inicialmente por quatro semanas. Para verificar a transmissão da bactéria nas plantas seria feita análise visual e detecção de CaLas por qPCR em folhas sintomáticas e assintomáticas 30 e 60 dias após o fim do período de transmissão da bactéria para as plantas. Porém, houve problemas com a manutenção das vincas e, portanto, o experimento não pôde ser realizado.



#### **2.4 Inoculação das plantas transgênicas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.**

Folhas destacadas de plantas de citros comprovadamente transgênicas expressando os genes *TcPR10* e *CitPR10* foram lavadas com água destilada, seguidas de uma desinfestação em uma solução de hipoclorito a 10% por 30 segundos, seguida de duas lavagens em água destilada. As folhas foram secas com o auxílio de algodão autoclavado. Após o preparo das folhas, cerca de 10 µL de suspensão bacteriana ( $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) foram utilizados para a inoculação nas folhas destacadas com auxílio de uma seringa. Três folhas de cada planta foram utilizadas em um total de 22 plantas expressando o gene *TcPR10*, 10 plantas expressando o gene *CitPR10* e 10 plantas controle. As folhas foram mantidas verticalmente em tubos plásticos (50 ml), contendo 7mL de água autoclavada à temperatura ambiente.

#### **2.5 Avaliação dos sintomas e detecção dos patógenos**

As plantas desafiadas com CiLV-C, foram analisadas de maneira visual. A partir de quatro semanas de inoculação foram feitas contagem dos sintomas, analisando todas folhas inoculadas. Já as plantas desafiadas com *Xanthomonas* marcada com GFP foram avaliadas qualitativamente aos sete e catorze dias após a inoculação.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1 Identificação de plantas transgênicas**

Para confirmação da transgenia, as plantas de citros utilizadas foram avaliadas por PCR, para identificar a integração do gene *TcPR10* e *CitPR10*. Sendo confirmado a inserção do transgene em três plantas expressando o gene *TcPR10* e uma planta expressando o gene *CitPR10*. Posteriormente estas plantas foram multiplicadas através de enxertia, somando-se 20 plantas positivas para o gene *CitPR10* e 45 positivas para o gene *TcPR10*.

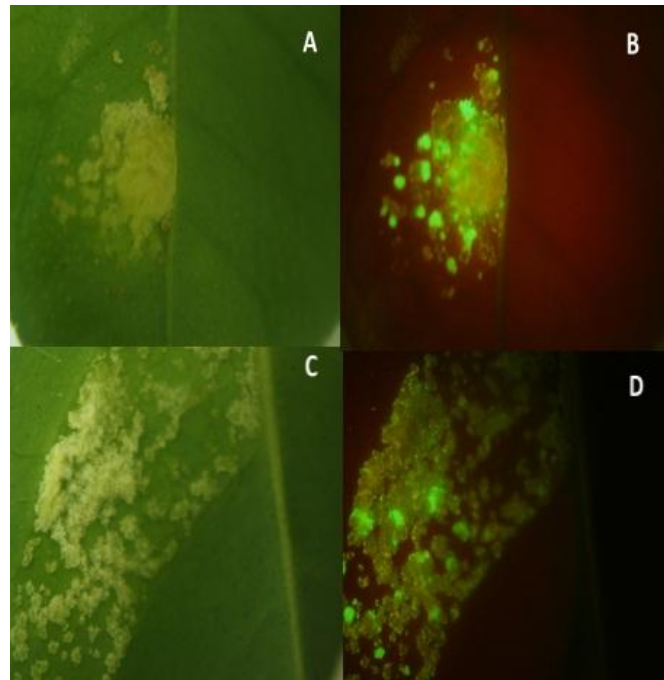
#### **3.2 Avaliação de plantas transgênicas com CiLV-C**

Após confirmação da transgenia, 23 plantas de citros transgênicas expressando o gene *TcPR10*, 10 expressando o gene *CitPR10* e 10 plantas controle foram inoculadas com leprose utilizando ácaros virulíferos. As avaliações foram feitas de maneira visual, porém todas as plantas, inclusive os controles apresentaram poucos sintomas.



### 3.3 Avaliação das plantas transgênicas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Sete dias após a inoculação, as plantas transgênicas foram avaliadas de maneira visual, apresentando sintomas similares. Catorze dias depois, as mesmas plantas foram avaliadas de maneira visual e foram tiradas fotos com o filtro GFP (**Fig. 1**). As plantas transgênicas expressando os genes *TcPR10* e *CitPR10* apresentaram sintomas bem similares.



**Figura 1.** Plantas controle (A, B) e transgênica (C, D) inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B e D representam fotos tiradas com filtro específico para visualização da bactéria marcada com proteína GFP.

## 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que os genes *TcPR10* e *CitPR10* que codificam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR10) não foram capazes de conferir resistência aos patógenos estudados.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida. Ao Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pela oportunidade de estágio



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Amaral, S. F. (1957) Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico** 23:112-123.
- Bassanezi, R.B.; Spósito, M.B. & Yamamoto, P.T. Adeus à leprose. **Revista Cultivar**, 10 ed., 2002.
- Bantignies, B., J. Séguin, I. Muzac, F. Dédaldéchamp, P. Gulick and R. Ibrahim. 2000. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. **Plant Mol. Biol.** 42:871–881.
- Bitancourt, A. A. (1955). Estudos sobre a leprose dos citros. **Arq. Inst. Biol**, v. 22, p. 161-231.
- Colariccio, A.; Lovisollo, O.; Chagas, C. M.; Galetti, S. R.; Rossetti, V. V.; Kitajima, E. W. (1995). Mechanical transmission and ultrastructural aspects of Citrus leprosis virus. **Fitopatol. Bras.**, v. 20, p. 208-213.
- Czermainski, A.B.C., Bassanezi, R.B., Laranjeira, F.F. & Amorim, L. Dinâmica temporal da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* da leprose dos citros sob condições naturais de epidemia. **Fitopatologia Brasileira** 32:295-303. 2007.
- Gibbs, A.; Mackenzie, A. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 63: 9-16.
- Gottwald TR, da Graça JV, Bassanezi RB (2007a) Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress** 6 September 2007. Online (doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).
- Kitajima, E. W.; Müller, G. W.; Costa, A. S.; Yuki, W. (1972). Short, rodlike particles associated with citrus leprosis. **Virology** 50, p. 254-258.
- Leite Jr. RP, Mohan SK, Pereira ALG, Campacci CA (1987) Integrated control of citrus canker: effect of genetic resistance and application of bactericides. **Fitopatologia Brasileira** 12:257–263.
- Locali, E. C.; Freitas-Astúa, J.; Souza, A. A.; Takita, M. A.; Astúa-Monge, G.; Antonioli, R.; Kitajima, E. W.; Machado, M. A. (2003). Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease**, v. 87, p. 1317-1321.
- Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Cressoni F, Kalaki R (2011). O retrato da citricultura brasileira. Elaboração: Markestrat - **Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia**. 137p.
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C., Paek, K.H. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. **The Plant Journal** 37, 186-198
- Rossetti, V. A leprose dos citros no Brasil. In: Oliveira, C. A; Donadio, L. C. (Ed.). *Leprose dos citros*. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.1-12. (5)
- Van Loon LC (1985): Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology** 4:111 – 116.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., and Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins, **Plant Mol. Biol. Rep.**, 12:245–264.