



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



FLÁVIA ROCHA TRICAI

ANÁLISE MOLECULAR E FENOTÍPICA DE EVENTOS ELITE DE
***Citrus sinensis* GENETICAMENTE MODIFICADO EM CONDIÇÕES**
DE CAMPO

ARARAS – 2022



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



FLÁVIA ROCHA TRICAI

**ANÁLISE MOLECULAR E FENOTÍPICA DE EVENTOS ELITE DE
Citrus sinensis GENETICAMENTE MODIFICADO EM CONDIÇÕES
DE CAMPO**

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para a
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor.

ARARAS – 2022

Dedico aos meus pais, Arquimedes e Sandra e ao meu irmão Felipe por todo o apoio, paciência e confiança durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos, proteção e sabedoria.

Aos meus pais, Arquimedes e Sandra, por serem exemplo de integridade, bondade, amor e companheirismo, pelo apoio incondicional e incentivo.

Ao meu irmão, Felipe, pelo exemplo de dedicação e pelo apoio e credibilidade que sempre me concedeu.

Ao meu orientador Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor pelo auxílio e apoio durante o trabalho.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela oportunidade, material e apoio para a realização do trabalho, especialmente a minha coorientadora Dra. Alessandra Alves de Souza, pelo auxílio e confiança durante esse ano de realização do projeto.

Às minhas amigas da República Lactá, pelo companheirismo, amor, paciência, apoio e, principalmente, por serem minhas irmãs durante esses anos de graduação. Vocês foram parte essencial nessa etapa.

À minha amiga Thainá, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e aconselhando e por ser um dos melhores presentes que recebi nesse tempo.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha formação e acreditaram em mim.

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O Brasil se destaca mundialmente como maior produtor de laranja. O setor tem enfrentado desafios relacionados à problemas fitossanitários e dentre esses problemas destacam-se as doenças bacterianas, como a clorose variegada dos citros (CVC), cancro cítrico e *huanglongbing* (HLB). A biotecnologia tem buscado ferramentas visando a resistência de plantas a patógenos e a transformação de plantas tem se mostrado uma estratégia eficaz. Esse trabalho teve como objetivo avaliar plantas de laranja doce superexpressando a toxina *MqsR* e o gene *rpfF*, quanto à estabilidade do transgene, desenvolvimento agrônomico e resistência a CVC, cancro cítrico e HLB. O experimento foi conduzido com plantas de variedade Pineapple e da variedade Hamlin superexpressando o gene *rpfF* (Pi-*rpfF* e H-*rpfF*) e Pineapple superexpressando o *MqsR* (Pi-*MqsR*), instaladas no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (IAC) no município de Cordeirópolis, SP. Essas plantas foram avaliadas quanto ao teor de clorofila, desenvolvimento (altura de planta e volume de copa), resistência a CVC, cancro cítrico e HLB e qualidade de frutos, sempre comparadas a plantas não transgênicas (WT), realizando testes t de Student a 5% de significância. Apenas uma planta do evento Pi-*rpfF* não teve o transgene estável. A superexpressão dos genes não alterou o teor de clorofila das plantas, ou seja, o teor de clorofila foi equivalente entre plantas transgênicas e plantas WT. Quanto ao desenvolvimento, H-*rpfF* e Pi-*MqsR* tiveram menor altura de planta e volume de copa que as WT, enquanto Pi-*rpfF* mostrou-se equivalente nas duas características. Não foram encontrados sintomas de CVC e cancro cítrico nas plantas analisadas. Em relação aos sintomas de HLB, o evento Pi-*rpfF* demonstrou ter mais resistência que as plantas não transgênicas. Os frutos provenientes das plantas em estudo foram analisados quanto à massa, sólidos solúveis e rendimento de suco e acidez. Nessa análise os frutos provenientes das plantas transgênicas mostraram ter característica similar ao das não transgênicas.

Palavras-chave: citros, plantas transgênicas, características agrônomicas, resistência a patógenos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas de Clorose Variegada dos Citros. A. Manchas cloróticas irregulares na face adaxial das folhas. B. Manchas de coloração bege na face abaxial das folhas. C. Frutos de tamanho reduzido. D. Frutos com lesões tipo queimadura.....	16
Figura 2. Sintomas de Cancro Cítrico. A. Na face adaxial das folhas. B. Na face abaxial das folhas. C. Nos ramos. D. Nos frutos.....	18
Figura 3. Sintomas de HLB. A. Folha mosqueada. B. Nervura amarelada e saliente. C. Fruto deformado com sementes abortadas. D. Fruto pequeno com a casca manchada.	19
Figura 4. Esquema do sistema toxina-antitoxina tipo II.....	21
Figura 5. Esquema da funcionalidade da superexpressão da toxina MqsR em plantas de laranja doce.....	22
Figura 6. Sintomas de cancro cítrico e clorose variegada dos citros em plantas de laranja doce não transformadas e em plantas superexpressando a toxina MqsR. A. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce não transformada. B. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce superexpressando a toxina MqsR. C. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce não transformadas D. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce superexpressando a toxina MqsR. Fonte: SOUZA-NETO et al., 2022.	22
Figura 7. Esquema da funcionalidade da expressão do gene rpfF em plantas de laranja doce.	23
Figura 8. Sintomas de cancro cítrico e clorose variegada em plantas de laranja doce não transformadas e em plantas superexpressando o gene rpfF. A. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce não transformada. B. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce superexpressando o gene rpfF. C. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce não transformadas D. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce superexpressando o gene rpfF. FONTE: CASERTA et al., 2017.....	24
Figura 9. Plantas superexpressando o gene rpfF. A. Plantas da variedade Hamlin (H-rpfF). B. Plantas da variedade Pineapple (Pi-rpfF).	26
Figura 10. Plantas da variedade Pineapple superexpressando a toxina gene MqsR.	27
Figura 11. Plantas não transgênicas (WT). A. Variedade Pineapple. B. Variedade Hamlin.	27
Figura 12. Esquema da divisão das plantas em quadrantes para avaliação de sintomas de cancro cítrico, CVC e HLB.	29

Figura 13. Figura 9. Perfil de eletroforese da PCR das plantas em gel de agarose 1% A: Plantas do evento Pi-MqsR. Amplicon de 785 pb. B: 201 a 291 plantas do evento Pi-rpfF e 10 a 145 plantas do evento H-rpfF. Amplicon de 900 pb. M: marcador 1kb DNA Ladder (NEB); A: controle negativo da PCR; PWT: plantas WT da variedade Pineapple; HWT: plantas WT da variedade Hamlin; MC+: DNA de planta matriz já confirmadas com o gene mqsR; RC+: DNA de planta matriz já confirmada com o gene rpfF.	32
Figura 14. Teste histoquímico de GUS nas amostras de folhas da planta 291.....	32
Figura 15. Ensaio histoquímico de GUS das amostras de folhas da planta 252.	33
Figura 16. Perfil de eletroforese da PCR da planta 252 (Pi-MqsR) em gel de agarose 1%. Amplicon de 785 pb. M: marcador 1kb DNA Ladder (NEB); A: controle negativo da PCR; MC+: DNA de planta matriz já confirmadas com o gene mqsR.....	33
Figura 17. Perfil de eletroforese da PCR da planta 291 (Pi-rpfF) em gel de agarose 1%. Amplicon de 900 pb. M: marcador 1kb DNA Ladder (NEB); A: controle negativo da PCR; MR+: DNA de planta matriz já confirmadas com o gene rpfF.	33
Figura 18. Médias do teor de clorofila dos eventos analisados e suas respectivas plantas WT. Comparação realizada através de teste t de Student a nível de significância de 0.05.	34
Figura 19. Altura das plantas do evento Pi-MqsR e Pi-WT. A. Altura de cada planta. B. Média das alturas de planta. ** p<0,01 e *** p<0,001 no teste t de Student.....	35
Figura 20. Volume de copa do evento Pi-MqsR e Pi-WT. A. Volume de copa de cada planta do evento. B. Médias de volume copa. ** p<0,01 e *** p<0,001 no teste t de Student.	36
Figura 21. Volume de copa do evento Pi-rpfF e Pi-WT. A. Volume de copa de cada planta do evento. B. Médias de volume copa. ** p<0,01 no teste t de Student.	37
Figura 22. Altura das plantas do evento Pi-rpfF e Pi-WT. A. Altura de cada planta. B. Média das alturas de planta.....	37
Figura 23. Altura das plantas do evento H-rpfF e H-WT. A. Altura de cada planta. B. Média das alturas de planta. *** p<0,001 no teste t de Student.	38
Figura 24. Volume de copa do evento H-rpfF e H-WT. A. Volume de copa de cada planta do evento. B. Médias de volume copa. *** p<0,001 no teste t de Student.	38
Figura 25. Médias de notas de severidade de HLB das plantas transgênicas e WT. * p<0,05 no teste t de Student.....	40
Figura 26. Notas de severidade de HLB atribuídas às plantas. A. Evento Pi-MqsR. B. Evento H-rpfF. C. Evento Pi-rpfF.	41
Figura 27. PCR quantitativo em tempo real para avaliação da expressão dos transgenes em plantas escolhidas aleatoriamente. A: expressão de rpfF nas plantas do evento Pi-rpfF. B:	

expressão de rpfF nas plantas do evento H-rpfF. C: expressão de mqsR nas plantas do evento Pi-mqsR	42
Figura 28. Amostras representativas dos frutos analisados.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Notas e escalas atribuídas na avaliação de severidade de sintomas de HLB.....29

Tabela 2. Qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas.42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. A citricultura no Brasil	14
2.2. Clorose Variegada dos Citros (CVC)	15
2.3. Cancro Cítrico.....	16
2.4. Huanglongbing (HLB).....	18
2.5. Transformação Genética de Plantas.....	20
2.6. Toxina <i>MqsR</i> e sua relevância no sistema Toxina-Antitoxina de <i>Xylella fastidiosa</i>	20
2.7. <i>RpfF</i> e seu papel na síntese de DSF no <i>Quorum Sensing</i> de <i>X. fastidiosa</i>	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivos gerais	24
3.2. Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Localização e caracterização da área	25
4.2. Origem das plantas.....	25
4.3. Eventos analisados e delineamento experimental.....	26
4.4. Confirmação da transgenia	28
4.5. Intensidade de clorofila das plantas geneticamente modificadas	28
4.6. Avaliação do desenvolvimento das plantas geneticamente modificadas.....	28
4.7. Avaliação de sintomas de HLB, cancro cítrico e clorose variegada dos citros das plantas geneticamente modificadas	29
4.8. Análise da expressão gênica das plantas geneticamente modificadas com melhor desenvolvimento.....	30
4.9. Avaliação da qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas.....	30
4.10. Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Confirmação da transgenia por PCR	31
5.2. Intensidade de clorofila nas plantas	34
5.3. Desenvolvimento das plantas.....	35
5.4. Sintomas de HLB, Cancro cítrico e Clorose variegada dos citros.....	39
5.5. Expressão gênica das plantas transgênicas	41
5.6. Qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas ..	42
6. CONCLUSÃO.....	43

7. Referências Bibliográficas	43
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja. O país alcançou, no ano de 2020, a produção de mais de 16 milhões de toneladas (IBGE, 2021), sendo responsável por 34% da produção da fruta e 56% do suco no cenário mundial. A principal região produtora de citros, denominada de cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Sudoeste Mineiro, é responsável por mais de 407 mil hectares de produção de laranja (FUNDECITRUS, 2019).

A citricultura brasileira tem um extenso histórico de desafios, devido a introdução das principais doenças, gerando grande impacto no setor, tais como a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico e o *huanglongbing* (HLB), que foram introduzidas no país nos anos de 1987, 1957 e 2004, respectivamente. Essas doenças trazem grandes prejuízos aos produtores, uma vez que afetam os frutos (COLETTA-FILHO e al., 2020; MASSARI e BELASQUE JUNIOR, 2006; BOVÉ, 2006). Os sintomas da CVC se iniciam com manchas cloróticas pequenas e irregulares na face superior das folhas maduras e uma goma castanha saliente na face inferior. Conforme a doença se agrava, as bactérias se espalham sistemicamente no dossel das plantas, as manchas nas folhas se agregam tornando evidente as necroses (COLETTA-FILHO et al., 2020). Os frutos afetados ficam endurecidos, com tamanho reduzidos e com amarelecimento precoce, inviável para o comércio (ROSSETTI e NEGRI, 2011). Os frutos afetados pelo cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, tendem a cair precocemente (MANEIRA e NETO, 2019). O HLB, causado pela *Candidatus Liberibacter* spp, causa deformação e redução do tamanho dos frutos, além de queda prematura destes (SANCHES et al., 2018).

A biotecnologia tem contribuído efetivamente no desenvolvimento científico e tecnológico da citricultura, especialmente no controle de doenças, sendo a transformação genética uma das alternativas mais importantes (ASTUA-MONGE et al., 2004). A transformação genética de plantas consiste na introdução controlada de ácidos nucleicos exógenos em um genoma receptor, de forma que não comprometa a viabilidade das células. Para que esse processo seja efetivo o DNA deve ser introduzido em células ou tecido vegetais aptos a regenerar plantas por completo (SANTARÉM, 2000). A primeira transformação genética de citros relatada foi na década de 1980 e atualmente a maioria dos trabalhos realizados utiliza a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* para introduzir os genes em espécies cítricas (ASTUA-MONGE et al., 2004). Baseado em estudos de infecção dos patógenos e patogenicidade em planta, foram selecionados alguns genes como estratégias visando resistência a patógenos bacterianos. Uma das estratégias avaliadas nesse trabalho foi a

superexpressão da toxina *MqsR* em plantas de laranja doce, visando a resistência destas à patógenos bacterianos. Essa toxina integra um sistema toxina-antitoxina bacteriano do tipo 2. Em condições de estresse essa toxina reduz o crescimento celular bacteriano (LEPLAE et al., 2011; MURANAKA et al., 2012). Plantas superexpressando essa toxina foram desafiados com *X. citri* e *X. fastidiosa* e avaliadas em casa de vegetação, e observou-se menor severidade de sintomas desses patógenos que nas plantas não transgênicas (SOUZA-NETO et al., 2022). A outra estratégia avaliada foi a obtenção de plantas geneticamente modificadas, superexpressando o gene *rpfF*. Esse gene está relacionado com a comunicação entre as células bacterianas, denominada de *Quorum Sensing*. Essa comunicação depende da produção de moléculas sinalizadoras de ácido graxos (Fator de Sinal Difusível – DSF), que contribui para a patogenicidade através de uma resposta coordenada da população bacteriana (BEAULIEU, 2013; CHATTERJEE, 2008; LINDOW et al., 2014). Dessa forma, essa estratégia pode ser utilizada de forma a causar uma “confusão” do patógeno, promovendo resistência ao hospedeiro. Plantas superexpressando o gene *rpfF* foram desafiadas com *X. fastidiosa* e *X. citri*, e então avaliadas em casa de vegetação quanto aos sintomas de CVC e cancro cítrico, e em ambos os casos houve uma menor severidade dos sintomas que nas plantas não transgênicas (WT) (CASERTA et al., 2014, 2017).

Os eventos com cada gene foram avaliados em casa de vegetação e os clones mais promissores foram levados a campo. Uma vez que dispostas a condições de campo, foi necessário realizar avaliações quanto às características agrônômicas e fisiológicas, bem como a resistência à clorose variegada dos citros, cancro cítrico e HLB dessas plantas, para futura seleção das elites.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A citricultura no Brasil

A citricultura se destaca por ser uma das principais atividades agrícolas do país, pois tem grande importância econômica e gera um alto número de empregos (FUNDECITRUS, 2016). O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja, detendo mais da metade da produção mundial e exportando mais de 98% do que produz. Em 2020 o país destinou 574.563 hectares à produção de laranja sendo o estado de São Paulo o líder com 77% da área plantada, seguido de Minas Gerais com 6%. Todo o estado de São Paulo e parte de Minas Gerais formam a região denominada cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste

mineiro, onde se encontram a maior parte das propriedades dedicadas a produção da fruta do país (CROPLIFE BRASIL, 2020; IBGE, 2020).

O histórico da citricultura brasileira é marcado por adaptações devido ao surgimento de pragas e doenças que resultam no aumento de custos da cultura (AZEVEDO et al., 2013). Das doenças que causam impacto econômico, destacam-se as doenças bacterianas, dentre elas a clorose variegada dos citros (ROSSETTI e NEGRI, 2017), o cancro cítrico (AMARAL, 2003) e o *huanglongbing* (HLB) (BELASQUE JR, 2017).

2.2. Clorose Variegada dos Citros (CVC)

A clorose variegada dos citros é uma doença que surgiu em meados de 1980 no triângulo mineiro e no norte e nordeste do estado de São Paulo, de onde se alastrou rapidamente promovendo prejuízos nos laranjais do Brasil (ROSSETTI e NEGRI, 2017). A incidência de CVC não é uniforme nas principais áreas de citros do Brasil e esse fato pode estar associado à temperatura e regime hídrico ao longo do ano. Áreas com temperaturas mais altas e chuvas irregulares, como as regiões Norte e Noroeste de São Paulo, são mais severamente afetadas, enquanto as Regiões Sul e Oeste, com temperaturas mais amenas e chuvas mais distribuídas, são menos acometidas (DE SOUZA et al., 2009). A CVC que, no fim dos anos 2000 já teve o índice de incidência maior que 42% nas plantas do cinturão citrícola, hoje tem o menor índice dos últimos 20 anos, presente em apenas 0,46% das laranjeiras da região (FUNDECITRUS, 2021). Essa queda na incidência se deve à soma dos avanços na pesquisa sobre a transmissão, patógeno e vetor com o desenraizamento de plantas velhas e infectadas (COLETTA-FILHO et al., 2020). A clorose variegada dos citros é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que pode ser transmitida via material vegetal, através da enxertia de material infectado ou por inseto vetor, as cigarrinhas (COLETTA-FILHO e DE SOUZA, 2014). Essas bactérias acumulam-se no xilema das plantas e a colonização ocorre através do movimento do patógeno na planta e da formação de biofilme. Essa movimentação ocorre devido a degradação da parede celular através de enzimas, permitindo a colonização bacteriana e, conseqüentemente, causando um bloqueio dos vasos do xilema (CHATTERJEE et al., 2008; DE SOUZA et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2018). Os sintomas da CVC podem ser observados nas folhas e nos frutos. Os sintomas foliares são observados em folhas maduras e tratam-se de manchas cloróticas de formato irregular espalhadas pelo limbo. Na face inferior das folhas ocorre o desenvolvimento de bolsas de goma, que se rompem, e formam manchas de coloração bege (LOPES et al., 2004). Com o avanço da doença, as manchas podem se unir e ocorrer a queda das folhas (DE SOUZA, 2009).

Os frutos ficam com tamanho reduzidos, com possibilidade de produzirem em cachos, são endurecidos, podendo causar danos às máquinas de moagem das fábricas de suco. O amarelecimento ocorre precocemente e lesões com cor marrom-escura, como queimaduras, podem surgir. Os sintomas nos frutos surgem após o aparecimento dos sintomas foliares e apenas em ramos mais infectados (SANTOS FILHO et al., 2010).

Para controle da CVC, deve-se utilizar mudas sadias e certificadas, erradicação das plantas com dois a quatro anos com sintomas severos e podar ramos sintomáticos à 70 cm de distância dos sintomas. O controle químico apenas é realizado para o controle do inseto vetor, utilizando inseticidas sistêmicos (THEODORO et al., 2005; SANTOS FILHO et al., 2010).



Figura 1. Sintomas de Clorose Variegada dos Citros. A. Manchas cloróticas irregulares na face adaxial das folhas. B. Manchas de coloração bege na face abaxial das folhas. C. Frutos de tamanho reduzido. D. Frutos com lesões tipo queimadura.

Fonte: Fundecitrus, 2018.

2.3. Cancro Cítrico

O cancro cítrico é uma das doenças de citros mais antigas e estudadas no mundo (OLIVEIRA et al., 2008). Distribuída em dezenas de países, a primeira constatação da doença em território brasileiro foi em 1957, no município de Presidente Prudente – SP (BITANCOURT, 1957, apud BELASQUE JUNIOR, 2005).

A doença causou grande impacto econômico no Brasil, pois por muitos anos, desde a entrada do patógeno no país, a medida de controle foi erradicar plantas sintomáticas e

próximas a estas. O raio determinado para erradicação de plantas próximas às que apresentavam sintomas diminuiu com o passar dos anos, até que em 2018 essa recomendação foi substituída por um conjunto de medidas utilizadas para prevenir e controlar a doença (BEHLAU, 2020; BRASIL 2018).

No ano de 2021 10,76% das plantas do cinturão citrícola apresentaram incidência de cancro cítrico (FUNDECITRUS, 2021). A doença está presente em todas as áreas citrícolas do estado de São Paulo, sendo a região central e noroeste as mais afetadas (BEHLAU, 2020).

O agente causal do cancro cítrico é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, patógeno que provoca lesões nas folhas, frutos e ramos (IRENO et al., 2014).

A disseminação do patógeno pode ser realizada naturalmente, por meio da chuva, ou através de homem, pelo trânsito das mudas, material de colheita, implementos e veículos (BEHLAU e BELASQUE JR, 2014). A infecção ocorre quando a bactéria penetra na planta por aberturas naturais, ferimentos causados por máquinas, atrito entre partes da própria planta, abrasão de partículas de poeira, ou por insetos mastigadores, como o minador dos citros (BEHLAU et al., 2019).

Os sintomas foliares iniciam-se com o amarelecimento puntiforme, levemente saliente. Com o avanço da doença o tecido afetado apresenta uma erupção esponjosa, inicialmente esbranquiçada e, posteriormente, parda, circundada por halo amarelo em ambas as faces do limbo foliar (OLIVEIRA et al., 2008). Nos ramos formam-se crostas salientes de cor parda, semelhante às das folhas, que ficam agrupadas, envolvendo uma extensa área (IRENO et al., 2014). Já nos frutos, as lesões são, inicialmente, pontuações marrons e salientes. Em frutos verdes ocorre o aparecimento do halo amarelo, que desaparece com a maturação. A medida que se desenvolvem, as lesões tornam-se maiores e podem se unir, formando uma única grande lesão (BEHLAU et al., 2019). Os frutos afetados geralmente caem antes de atingirem a maturação final (KIMATI et al., 1995).

O cancro cítrico pode ser controlado utilizando quebra-ventos e mudas sadias e certificadas. A utilização de cobre e fungicidas cúpricos diminuem a severidade dos sintomas. Máquinas, trabalhadores e equipamentos devem ser higienizados, de modo a não levarem o patógeno até as propriedades. A erradicação de plantas contaminadas é indicada em locais com baixa ocorrência da doença. Indutores de resistência controla o cancro cítrico através da ativação da resistência latente da planta, impedindo ou dificultando a colonização do patógeno nos tecidos vegetais. Também é importante controlar o minador dos citros *Phyllocnistis citrella*, pois esse inseto causa ferimentos nas plantas, que servem de porta de entrada para o patógeno (OLIVEIRA, et al., 2008; BEHLAU, 2019).



Figura 2. Sintomas de Cancro Cítrico. A. Na face adaxial das folhas. B. Na face abaxial das folhas. C. Nos ramos. D. Nos frutos.
Fonte: Fundecitrus, 2016.

2.4. *Huanglongbing (HLB)*

O HLB, também conhecido como *Greening*, é a doença mais grave e destrutiva dos citros, e vem afetando a citricultura mundial (ALQUÉZAR et al., 2021). A doença foi detectada em plantas cítricas em diversos países e, em 2004, foram observados os primeiros sintomas em território brasileiro, no município de Araraquara-SP (COLETTA-FILHO, 2004).

Sabe-se que, após a contaminação da planta, não existem medidas de controle curativas, portanto, é necessário a eliminação da árvore para que não se torne fonte de contaminação para as demais plantas do talhão (AYRES et al., 2019). Sendo assim, um dos principais motivos da intensificação do HLB nos últimos anos, foi a falta da eliminação de árvores doentes de pomares comerciais das regiões do cinturão citrícola, que atingiu o índice de 26,52% de incidência em 2021 (FUNDECITRUS, 2021).

O HLB é causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., sendo que três espécies foram identificadas e associadas a doença, a *Candidatus Liberibacter africanus*, a *Candidatus Liberibacter americanus* e a *Candidatus Liberibacter asiaticus*. No Brasil, atualmente, ocorre apenas a *Ca. Liberibacter asiaticus*. A espécie tem como vetor o psíldeo *Diaphorina citri*

(BOVÉ, 2006). Essas bactérias são capazes de habitar o interior dos vasos do floema, causando expressivos distúrbios no metabolismo da planta hospedeira (MACHADO et al., 2017).

O sintoma mais característico do HLB é o mosqueamento das folhas, que consiste no amarelecimento destas, ocorrendo de forma gradual, sem uma delimitação clara entre a cor verde e a cor amarela. Essas manchas ocorrem de forma assimétrica quando comparados os dois lados do limbo foliar, delimitados pela nervura central (BELASQUE JR et al., 2009). A nervura central pode ficar saliente, principalmente nas folhas maduras (AYRES et al., 2019). Os frutos afetados apresentam aspecto deformado, crescem menos, e podem apresentar sementes abortadas. A casca pode manifestar pequenas manchas circulares com a coloração verde mais clara que o normal e pode ocorrer o espessamento do albedo (ATIHE JR et al., 2006). A extremidade estilar, à medida que amadurecem, permanece verde. Quando cortados ao meio os feixes vasculares no eixo do fruto são descoloridos e deslocados. Há queda excessiva de frutos em plantas infectadas (GOTTWALD et al., 2007).



Figura 3. Sintomas de HLB. A. Folha mosqueada. B. Nervura amarelada e saliente. C. Fruto deformado com sementes abortadas. D. Fruto pequeno com a casca manchada.
Fonte: Fundecitrus, 2019.

Não existem medidas de controle curativas para o HLB em pomares comerciais (YAMAMOTO et al., 2014). Medidas de manejo são utilizadas para controlar a disseminação da doença, sendo uma das principais a eliminação de plantas sintomáticas (BASSANEZI et

al., 2019). A utilização de mudas sadias e o controle do inseto vetor (*D. citri*) também são técnicas de manejo adotadas para o *huanglongbing* (BELASQUE JR et al., 2010).

2.5. Transformação Genética de Plantas

O melhoramento genético convencional de citros apresenta limitações em seus resultados relacionadas à biologia reprodutiva dessas plantas. A integração de novas tecnologias, tais como métodos moleculares e cultura de tecidos têm oferecido alternativas que ajudam a superar essas barreiras (MENDES et al., 2002). Uma das alternativas biotecnológicas que vem sendo utilizada para citros é a transformação genética de plantas.

A transformação genética consiste na introdução controlada de genes em um genoma receptor, por meio da tecnologia do DNA recombinante. As técnicas de transformação podem ser divididas em diretas, que se utiliza métodos físicos ou químicos e indiretas, que se utiliza um vetor, que é capaz de transferir naturalmente para as plantas parte de seu DNA, como a *Agrobacterium tumefaciens* (FALEIRO e ANDRADE, 2009).

A transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* é um método de grande importância para o melhoramento vegetal, uma vez que permite a inserção de uma ou poucas cópias do transgene no DNA da planta hospedeira (HANDEL et al., 1997). Trata-se de uma bactéria fitopatogênica, Gram-negativa que pode infectar centenas de espécies (BRASILEIRO e DUSI, 1999). A *Agrobacterium tumefaciens* possui um plasmídeo indutor de tumor (Ti), que consegue transferir uma parte de seu DNA para a célula vegetal infectada, DNA esse que é chamado de DNA de transferência (T-DNA) e contém genes envolvidos na produção de reguladores de crescimento vegetais e aminoácidos utilizados como fonte de carbono e nitrogênio (opinas). Em sua normalidade, quando ocorre a transferência do T-DNA para a célula vegetal, esta vai produzir opinas para o patógeno, fazendo com que a célula vegetal se multiplique, formando tumores. Devido a esse domínio do plasmídeo Ti, tornou-se possível a substituição de sequências originárias no T-DNA por genes de interesse (BESPALHOK et al., 2017).

2.6. Toxina *MqsR* e sua relevância no sistema Toxina-Antitoxina de *Xylella fastidiosa*

MqsR é uma toxina que integra um sistema toxina-antitoxina (TA) tipo 2. Esse sistema é composto por dois genes, dispostos em um único operon, codificando uma toxina lábil e uma antitoxina estável. Sob condições de estresse, as antitoxinas são degradadas por proteases e liberam as toxinas livres, resultando na redução do crescimento celular (LEPLAE et al., 2011; MURANAKA et al., 2012; YAMAGUCHI e INOUE, 2011) (Figura 4).

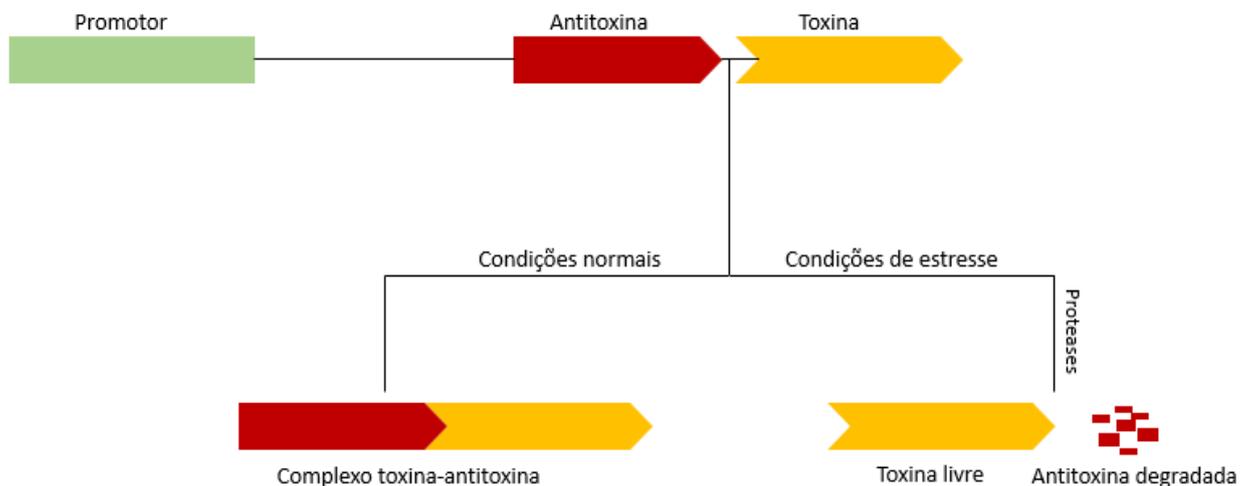


Figura 4. Esquema do sistema toxina-antitoxina tipo II. Esse sistema consiste em dois genes dispostos em um mesmo operon, sendo que um deles codifica a toxina e o outro a antitoxina. Em condições normais a antitoxina liga-se a toxina, permitindo que o crescimento celular bacteriano ocorra normalmente. Em condições de estresse, a antitoxina é degradada por proteases, e a toxina livre causa uma redução do crescimento celular bacteriano.

No caso em questão, a toxina codificada é *MqsR* e a antitoxina é *MqsA*, formando o sistema *mqsRA*. Este está presente no genoma de *X. fastidiosa* e ausente em *X. citri*. A superexpressão da toxina *MqsR* em *X. fastidiosa* interrompe o crescimento celular, aumenta a produção de biofilme, reduz a motilidade e, conseqüentemente, diminui a patogenicidade *in planta* (LEE et al., 2014, 2012; MERFA et al., 2016).

Baseado nesses conhecimentos, foi pensado em superexpressar *MqsR* em plantas, de forma que a toxina produzida por esta também desencadeasse na redução da motilidade e patogenicidade e, conseqüentemente, de sintomas de patógenos bacterianos (Figura 5).

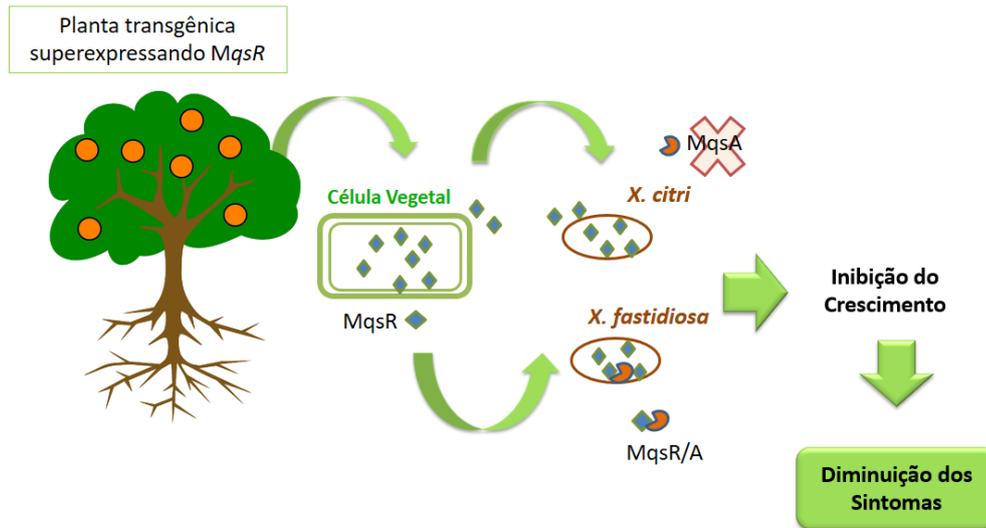


Figura 5. Esquema da funcionalidade da superexpressão da toxina *MqsR* em plantas de laranja doce. Superexpressando a toxina *MqsR* nas plantas, uma vez que esta não produz a antitoxina, ocorreria a inibição do crescimento celular bacteriano tendo como consequência a diminuição de severidade dos sintomas de patógenos bacterianos.

SOUZA-NETO et al. (2022), transformou plantas de laranja doce superexpressando essa toxina, via *Agrobacterium tumefaciens*, posteriormente desafiou essas plantas com *X. fastidiosa* e *X. citri* e avaliou em casa de vegetação. Para *X. fastidiosa*, constatou-se que houve redução na população bacteriana e na severidade dos sintomas. Em relação à *X. citri*, foi verificado que a toxina superexpressa na planta transgênica, ocasionou uma interferência na capacidade de multiplicação da bactéria e, conseqüentemente, redução dos sintomas (Figura 6).

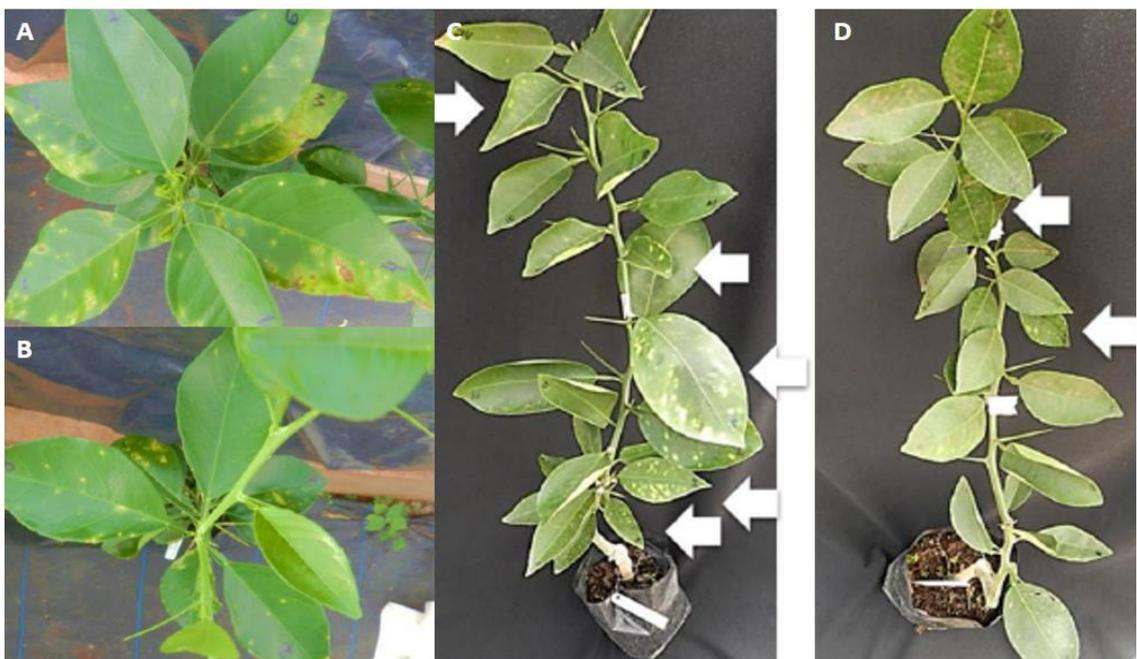


Figura 6. Sintomas de cancro cítrico e clorose variegada dos citros em plantas de laranja doce não transformadas e em plantas superexpressando a toxina *MqsR*. A. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce não transformada. B. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce superexpressando a toxina *MqsR*. C. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce não transformada. D. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce superexpressando a toxina *MqsR*.
Fonte: SOUZA-NETO et al., 2022.

2.15. *RpfF* e seu papel na síntese de DSF no *Quorum Sensing* de *X. fastidiosa*

O gene *rpfF* é relacionado com a comunicação entre as células bacterianas, denominada *Quorum Sensing* (QS). Em bactérias Gram-negativas esse sistema de comunicação é realizado através da produção de moléculas sinalizadoras de ácido graxo, denominadas de Fator de Sinal Difusível (DSF), que controlam a formação de biofilme. *RpfF* integra um conjunto de genes chamado de *rpf* (regulation of pathogenicity factors), que regulam a virulência das bactérias através da produção de DSF (BASSLER, 2002; WANG et al., 2012; WHITEHEAD et al., 2001). O acúmulo dessas moléculas modula a expressão de diferentes conjuntos de genes em *X. fastidiosa* e *Xanthomonas* spp (CASERTA et al, 2014).

A partir dessas informações, foi suposto uma estratégia denominada “confusão do patógeno”, que se baseia na superexpressão do gene *rpfF* em plantas, de modo que a produção de DSF realizada por estas diminua a movimentação celular, a colonização, patogenicidade e, conseqüentemente, os sintomas de patógenos bacterianos (Figura 7).

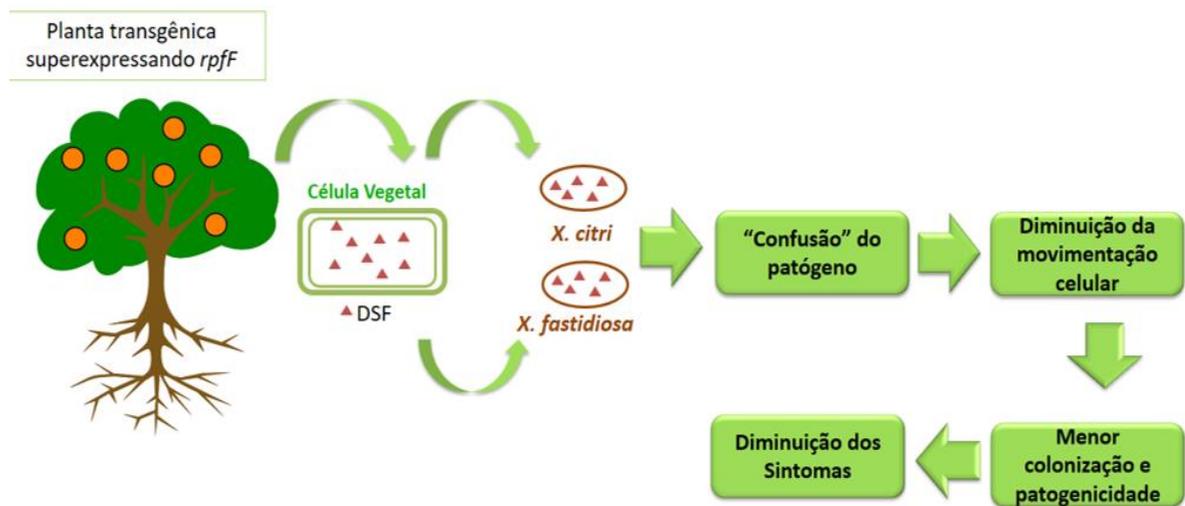


Figura 7. Esquema da funcionalidade da expressão do gene *rpfF* em plantas de laranja doce. A superexpressão do gene nas plantas, de forma que a própria planta produza moléculas de DSF, causaria a estratégia denominada de “confusão” do patógeno, diminuindo a movimentação celular, a colonização e a patogenicidade e, conseqüentemente, a severidade dos sintomas de patógenos bacterianos.

Plantas de laranja doce foram transformadas, via *Agrobacterium tumefaciens*, superexpressando o gene *rpfF*, desafiadas com *X. fastidiosa* e *X. citri* e avaliadas em casa de vegetação quanto a severidade de sintomas de clorose variegada dos citros e cancro cítrico e então observou-se que essas plantas tiveram sintomas foliares menos severos que as plantas não transgênicas (WT) (CASERTA et al., 2014, 2017) (Figura 8).



Figura 8. Sintomas de cancro cítrico e clorose variegada em plantas de laranja doce não transformadas e em plantas superexpressando o gene *rpfF*. A. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce não transformada. B. Sintomas de cancro cítrico em planta de laranja doce superexpressando o gene *rpfF*. C. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce não transformadas. D. Sintomas de clorose variegada dos citros em planta de laranja doce superexpressando o gene *rpfF*. **FONTE:** CASERTA et al., 2017.

Uma vez que as plantas superexpressando a toxina *MqsR* e o gene *rpfF* foram avaliadas em casa de vegetação, se tornaram necessárias avaliações das características agrônomicas, fisiológicas e de resistência à patógenos bacterianos em condições de campo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar a estabilidade do transgene das plantas geneticamente modificadas, bem como o desenvolvimento agrônomico, fisiológico e resistência a patógenos bacterianos.

3.1.1. Objetivos específicos

- Confirmação da transgenia das plantas por PCR e teste histoquímico de GUS;
- Averiguar intensidade de clorofila das plantas geneticamente modificadas;
- Avaliar desenvolvimento das plantas quanto à altura e volume de copa;
- Avaliar as plantas geneticamente modificadas quanto aos sintomas de *huanglongbing*, cancro cítrico e clorose variegada dos citros;
- Avaliar expressão gênica das plantas geneticamente modificadas;
- Avaliar a qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização e caracterização da área

O trabalho foi realizado em plantas já instaladas em campo na área de liberação planejada em meio ambiente (LPMA) do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, no município de Cordeirópolis/SP, que apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 22°32' S e 47°27' O, com altitude de 690 m e clima subtropical úmido sem estação seca. O solo da região é do tipo latossolo-vermelho escuro distrófico típico (PIO et al., 2001).

4.2. Origem das plantas

As plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*) foram anteriormente transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* superexpressando os genes *rpfF* e *mqsR*. Dessas plantas foram feitos clones, enxertados em limão-cravo, os quais foram avaliadas em casa de vegetação quanto aos sintomas de *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri*, sendo observado uma diminuição na severidade dos sintomas causados por esses patógenos. Assim, em 2018, os clones mais promissores foram selecionados e levados a campo para avaliação das características fisiológicas e agrônomicas e resistência ao cancro cítrico, clorose variegada dos citros e HLB. Todos os processos que antecederam o projeto foram realizados por integrantes do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC.

4.3. Eventos analisados e delineamento experimental

Em campo, as plantas estavam distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, sendo 19 plantas superexpressando *rpfF*, dez da variedade Pineapple (plantas 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281 e 291) e nove plantas da variedade Hamlin (plantas 10, 25, 40, 55, 70, 85, 100, 130 e 145), eventos denominados de Pi-*rpfF* e H-*rpfF* (Figura 9), respectivamente, e seis plantas da variedade Pineapple superexpressando o gene *mqsR* (plantas 202, 212, 222, 232, 252 e 272), evento denominado de Pi-*mqsR* (Figura 10). Também haviam plantas não transformadas utilizadas para comparação dos resultados, sendo nove da variedade Pineapple (plantas 13, 28, 43, 58, 73, 103, 118, 133 e 148) e oito da variedade Hamlin (plantas 11, 26, 41, 71, 101, 116, 131 e 146), denominadas de Pi-WT e H-WT, respectivamente (Figura 11).

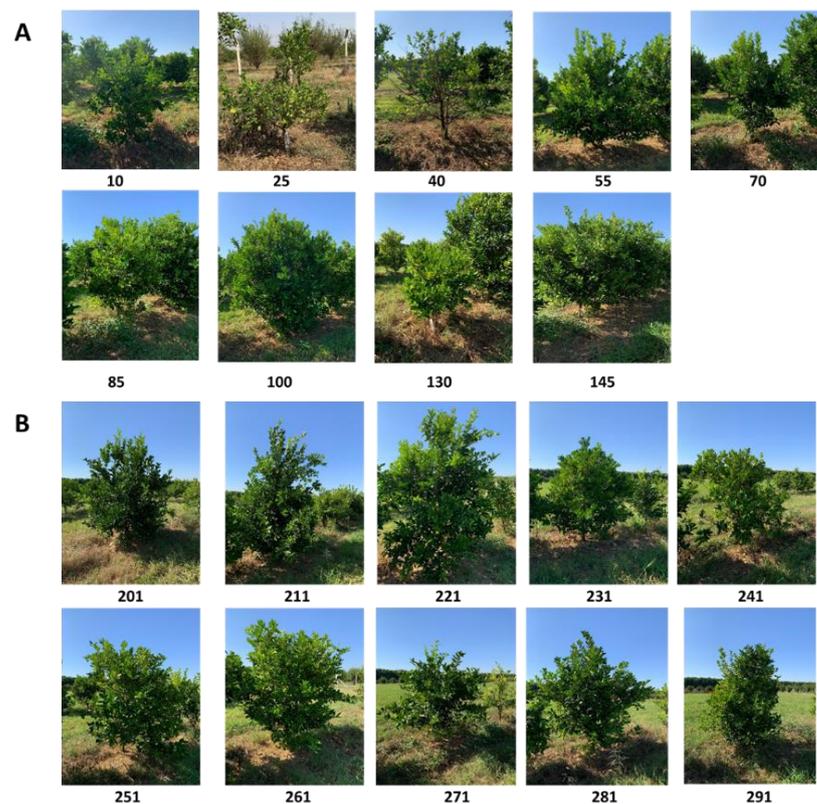


Figura 9. Plantas superexpressando o gene *rpfF*. A. Plantas da variedade Hamlin (H-*rpfF*). B. Plantas da variedade Pineapple (Pi-*rpfF*).



Figura 10. Plantas da variedade Pineapple superexpressando a toxina gene *MqsR*.

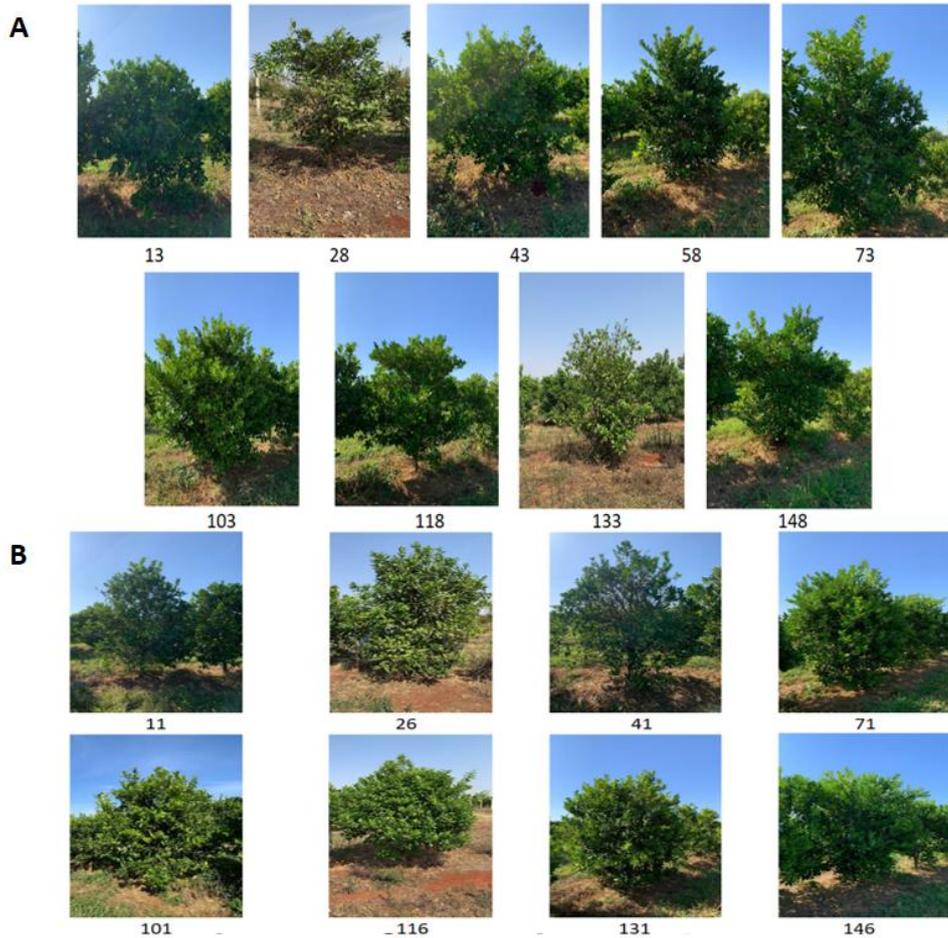


Figura 11. Plantas não transgênicas (WT). A. Variedade Pineapple. B. Variedade Hamlin.

4.4. Confirmação da transgenia

Para avaliar se o transgene se manteve estável nas plantas, foram coletadas duas folhas jovens de cada planta, as quais foram levadas para extração de DNA utilizando o método CTAB. O DNA extraído foi quantificado, padronizado a $150\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ e tratado com RNase (Promega), seguindo as especificações do fabricante. Em seguida o DNA foi utilizado para realização de PCR (polymerase chain reaction), que foi realizada utilizando $7,5 \mu\text{L}$ de água mili-Q autoclavada, $10\mu\text{L}$ de GoTAQ Master Mix (Promega), $1\mu\text{L}$ de cada primer (para *mqsR*: 35S forward - GAATTCAACATGGTGGAGCACGACAC e reverse - GACGTGAGCGCCAAGACAA; para *rpfF*: forward - AGAGGTACCAATGTCCGCTGTACAT e reverse-AGCGGATCCTGCTCAGTTTTTTAGTG) e 100ng de DNA da amostra. Foram utilizados água e DNA de plantas não transformadas (WT) como controle negativo da reação e o vetor pCambia2301 como controle positivo. O produto da PCR foi revelado em gel de agarose 1% utilizando como marcador DNA Ladder 1kb para comparar o tamanho das bandas.

Para confirmação da transgenia também foram realizados testes histoquímico de GUS de amostras de folhas de algumas plantas, sendo estas incubadas em solução de X-GLUC (5-bromo-4cloro-3-indolil glucuronida), à temperatura de 37°C , por aproximadamente 16 horas. Após retiradas da estufa, as amostras foram lavadas com etanol 96% para facilitar a visualização da coloração azul dada pela reação.

4.5. Intensidade de clorofila das plantas geneticamente modificadas

Foram realizadas duas avaliações da intensidade de clorofila, com um intervalo de dez meses entre elas, utilizando o equipamento atLEAF CHL PLUS. Esse instrumento mede o conteúdo relativo de clorofila de folhas verdes, através da diferença ótica entre dois comprimentos de onda, a 640 nm onde ocorre a absorção de luz pela clorofila e a 940 nm onde não ocorre (AtLEAF, 2020). Para essa análise foram escolhidas três folhas dos ramos mais representativos, tanto do lado leste quanto do lado oeste de cada planta e depois foi calculada a média desses valores.

4.6. Avaliação do desenvolvimento das plantas geneticamente modificadas

Foram realizadas duas avaliações de desenvolvimento das plantas, com um intervalo de sete meses entre elas. Essas avaliações foram feitas medindo a altura das plantas e o

diâmetro de copa com o auxílio de uma régua milimetrada. Posteriormente foi calculado o volume de copa, de acordo com a equação de Mendel: $V = 2/3 \times \pi \times h \times r^2$.

4.7. Avaliação de sintomas de HLB, cancro cítrico e clorose variegada dos citros das plantas geneticamente modificadas

Foi realizada uma avaliação de incidência e severidade de sintomas. Dividiu-se as plantas em quatro quadrantes, sendo dois do lado direito e dois do lado esquerdo (Figura 12). A avaliação foi feita visualmente, atribuindo notas de 0 a 5 para cada quadrante. Cada nota é referente ao tipo e quantidade de sintomas nas plantas (Tabela 1). Após atribuídas essas notas, estas foram adaptadas para melhor interpretação dos resultados e determinação da porcentagem dos sintomas. As notas finais são dadas pela média das porcentagens referente à cada quadrante da planta.

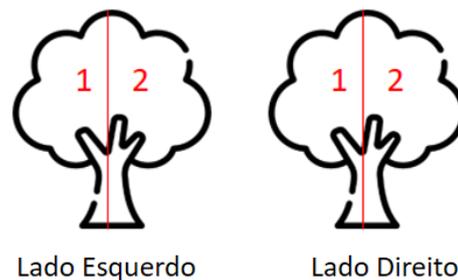


Figura 12. Esquema da divisão das plantas em quadrantes para avaliação de sintomas de cancro cítrico, CVC e HLB.

Tabela 1. Notas e escalas atribuídas na avaliação de severidade de sintomas de HLB.

Notas	Tipo e Quantidade de Sintomas	Adaptação das notas
0	Nenhum sintoma foliar visível	0%
1	Sintomas foliares em menos de 20% do quadrante. Quadrante denso, sem morte de galhos e mosqueado mínimo.	12,5%
2	Sintomas foliares em 20 a 40% do quadrante. Quadrante denso, alguns galhos mortos, folhas mosqueadas e crescimento	25%

	das folhas em tufo.	
3	Sintomas foliares de 40 a 60% do quadrante. Quadrante com queda perceptível de galhos e algumas áreas de dossel aberto. Bastante folhas mosqueadas e aparente crescimento em tufos.	50%
4	Sintomas foliares de 60 a 80% do quadrante. Quadrante bastante fino com bastante morte de galhos. A maior parte da planta apresenta mosqueado e/ou crescimento em tufos.	75%
5	Sintomas foliares em mais de 80% do quadrante. O declínio resultou na morte de galhos grandes e as folhas restantes são pequenas, mosqueadas e podem ser deformadas.	90%

4.8. Análise da expressão gênica das plantas geneticamente modificadas com melhor desenvolvimento

Foram escolhidos, aleatoriamente, três clones de cada evento (Pi-*rpfF*, H-*rpfF* e Pi-*mqsR*), dos quais foram coletadas duas folhas jovens para realização da extração de RNA. Esse procedimento foi feito através do Purelink RNA minikit (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. Para confirmar a ausência de DNA nas amostras, foi realizada PCR e, em seguida, as amostras foram utilizadas para síntese de cDNA, utilizando o kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega). Os cDNAs obtidos foram levados para reações de RT-qPCR. Estas foram realizadas em placas de 96 poços de detecção de sequências ABI PRISM 7500 Fast, utilizando SYBR Green como detector. Esse procedimento foi feito para quantificar a expressão de *mqsR* e *rpfF* inserido. Como controle endógeno foi utilizado o gene ciclofilina.

4.9. Avaliação da qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas

Devido as normas da CTNBio os frutos devem ser descartados, porém 5 a 10 frutos de cada planta que frutificaram durante o período de execução do projeto foram levadas para análise no Laboratório de Qualidade da Fruta do Centro de Citricultura Sylvio Moreira.

A massa dos frutos foi obtida em uma balança da marca Filizola, com capacidade para 15kg e sensibilidade de 5g.

A altura e a largura foram determinadas por leitura direta de cada amostra, utilizando uma escala graduada em centímetros.

Outro fator analisado foi o rendimento de suco, extraído através do esmagamento dos frutos na extratora OIC (Organização Internacional Centenário) modelo OTTO 1800 e calculado através da relação massa de suco/massa do fruto e expresso em porcentagem.

O teor de sólidos solúveis foi expresso em °Brix e foi determinado através da leitura direta em refratômetro B&S, modelo RFM 330. Após a leitura, os dados foram corrigidos pela temperatura e acidez do suco.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações em campo foram analisados utilizando o software R[®], através de teste t de Student, comparando os resultados obtidos das plantas geneticamente modificadas com as plantas não transformadas (WT), a 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Confirmação da transgenia por PCR

Na Figura 13 observa-se que todas as amostras das plantas geneticamente modificadas amplificaram na PCR, as amostras com a toxina *MqsR* apresentando amplicon de 785 pares de base e as amostras com o gene *rpfF* com amplicon de 900 pares de base, exceto a 291 (evento Pi-*rpfF*) e 252 (evento Pi-*MqsR*).



Figura 13. Perfil de eletroforese da PCR das plantas em gel de agarose 1% A: Plantas do evento Pi-*MqsR*. Amplicon de 785 pb. B: 201 a 291 plantas do evento Pi-*rpfF* e 10 a 145 plantas do evento H-*rpfF*. Amplicon de 900 pb. M: marcador 1kb DNA Ladder (NEB); A: controle negativo da PCR; PWT: plantas não transgênicas da variedade Pineapple; HWT: plantas não transgênicas da variedade Hamlin; MC+: DNA de planta matriz já confirmadas com a toxina *MqsR*; RC+: DNA de planta matriz já confirmada com o gene *rpfF*.

Sendo assim, foi realizado um teste histoquímico de GUS para confirmar a ausência do gene *rpfF* na amostra 291 e da toxina *MqsR* na amostra 252. Para realizar esse teste foram coletadas oito folhas, sendo quatro do lado oeste e quatro do lado leste dessas plantas e então observou-se que a planta 291 teve resultado negativo para a presença do *rpfF* em todas as amostras coletadas da planta 291 (Figura 14) e positivo para a presença de *MqsR* na planta 252 (Figura 15).



Figura 14. Teste histoquímico de GUS nas amostras de folhas da planta 291.

Uma segunda PCR dessas duas plantas foi realizada para confirmação da presença da toxina na planta 252 (Figura 16) e ausência do gene na 291 (Figura 17).



Figura 15. Ensaio histoquímico de GUS das amostras de folhas da planta 252.

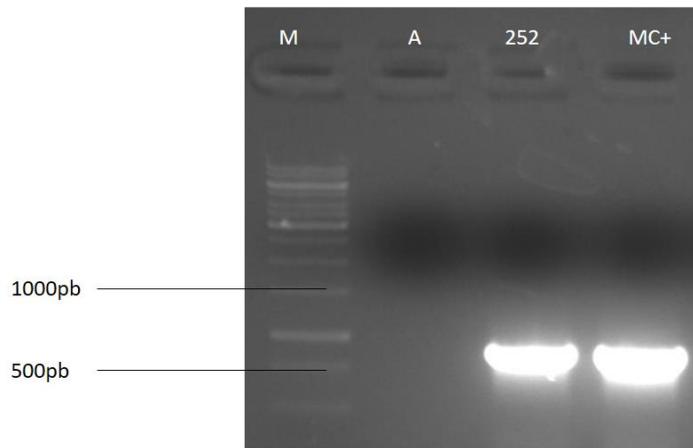


Figura 16. Perfil de eletroforese da PCR da planta 252 (*Pi-MqsR*) em gel de agarose 1%. Amplicon de 785 pb. M: marcador 1kb DNA Ladder (NEB); A: controle negativo da PCR; MC+: DNA de planta matriz já confirmadas com o gene *mqsR*.

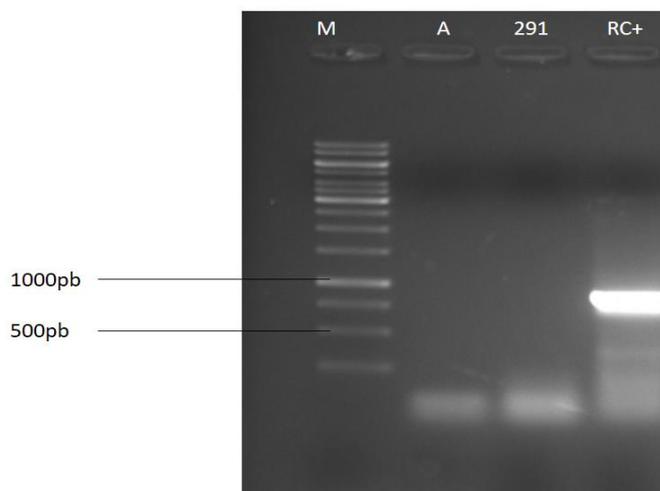


Figura 17. Perfil de eletroforese da PCR da planta 291 (*Pi-rpfF*) em gel de agarose 1%. Amplicon de 900 pb. M: marcador 1kb DNA Ladder (NEB); A: controle negativo da PCR; MR+: DNA de planta matriz já confirmadas com o gene *rpfF*.

Apenas a planta 291 (*Pi-rpfF*) teve instabilidade no transgene, uma vez que este foi confirmado por PCR antes de serem levados a condições de campo, ou seja, 96% das plantas mantiveram o gene estável nessas condições.

5.2. Intensidade de clorofila nas plantas

As duas avaliações realizadas mostraram que nenhum dos três eventos analisados tem diferença significativa no teor de clorofila quando comparadas a seus respectivos controles (plantas WT), pode-se desta forma afirmar que a superexpressão de *rpfF* e *MqsR* não afeta da quantidade de clorofila das plantas superexpressando a toxina *MqsR* e o gene *rpfF* tem produção de clorofila e taxa fotossintética similar às plantas não transformadas (Figura 18).

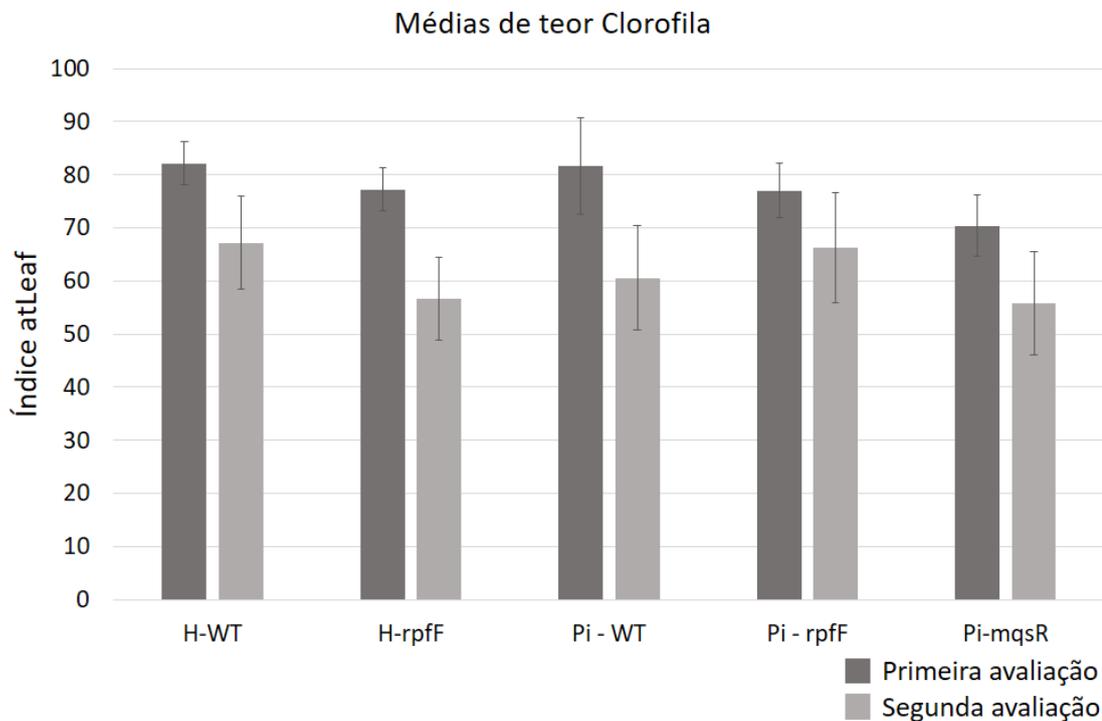


Figura 18. Médias do teor de clorofila dos eventos analisados e suas respectivas plantas WT. Comparação realizada através de teste t de Student a nível de significância de 0.05.

5.3.Desenvolvimento das plantas

Em relação às plantas do evento Pi-*MqsR*, estas tiveram altura de plantas e volume de copa inferior em comparação às plantas controle (Pi-WT) (Figura 19 e 20). As plantas que tiveram maior porte dentro desse evento foram a 212, 222 e 232.

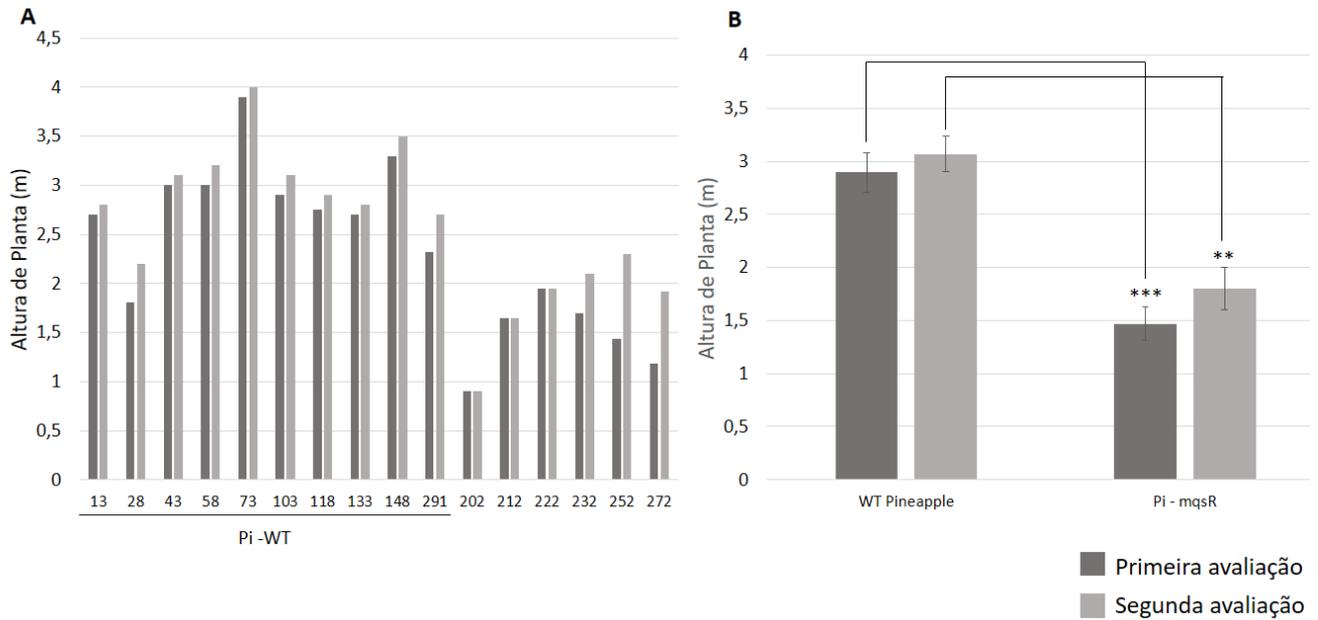


Figura 19. Altura das plantas do evento Pi-*MqsR* e Pi-WT. A. Altura de cada planta. B. Média das alturas de planta. ** p<0,01 e *** p<0,001 no teste t de Student.

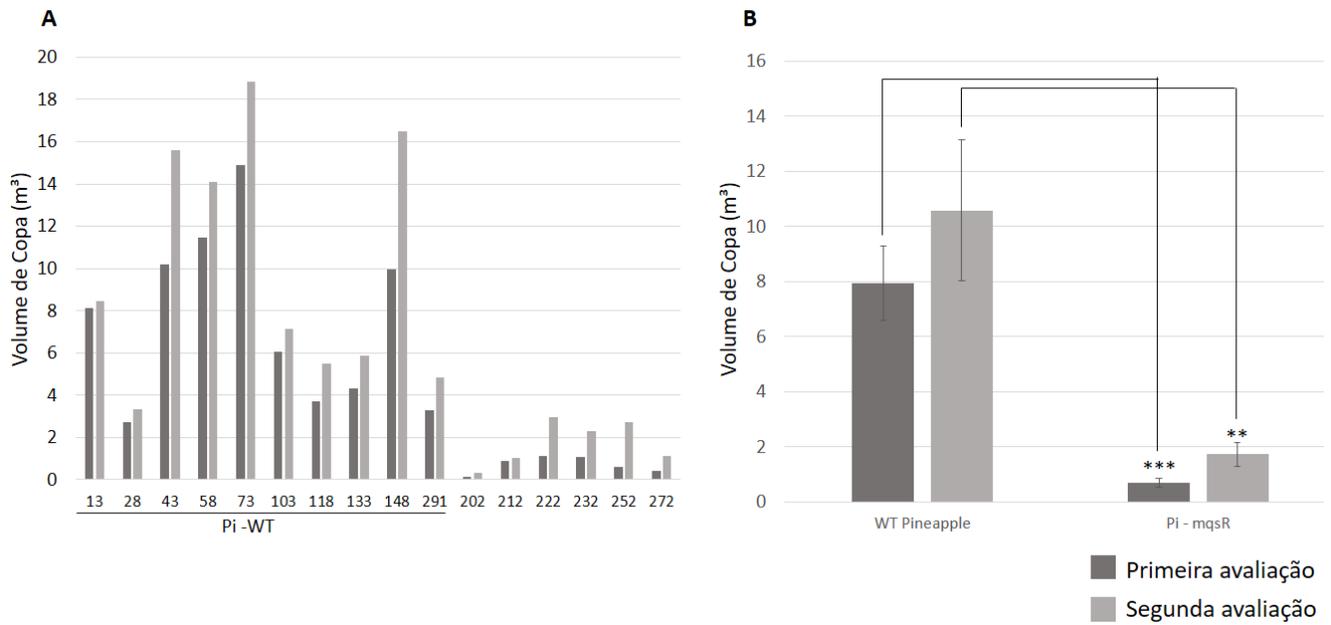


Figura 20. Volume de copa do evento Pi-*MqsR* e Pi-WT. A. Volume de copa de cada planta do evento. B. Médias de volume copa. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ no teste t de Student.

Nas duas avaliações realizadas, a altura das plantas do evento Pi-*rpfF* não foi significativamente diferente quando comparadas às plantas WT Pineapple (Figura 21). Em relação ao volume de copa, este foi maior nas plantas WT que nas plantas Pi-*rpfF* na primeira avaliação, mas na segunda essa diferença não era mais significativa (Figura 22).

Nesse evento, destacaram-se com maior porte as plantas 211, 221 e 281.

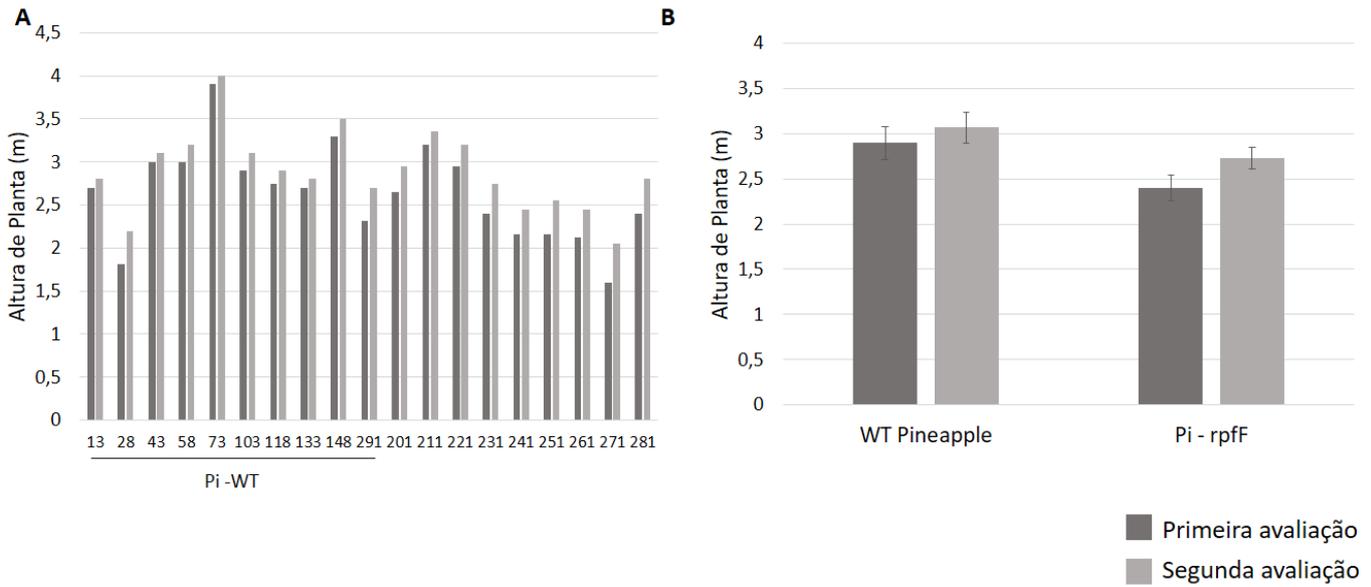


Figura 22. Altura das plantas do evento *Pi-rpfF* e *Pi-WT*. A. Altura de cada planta. B. Média das alturas de planta.

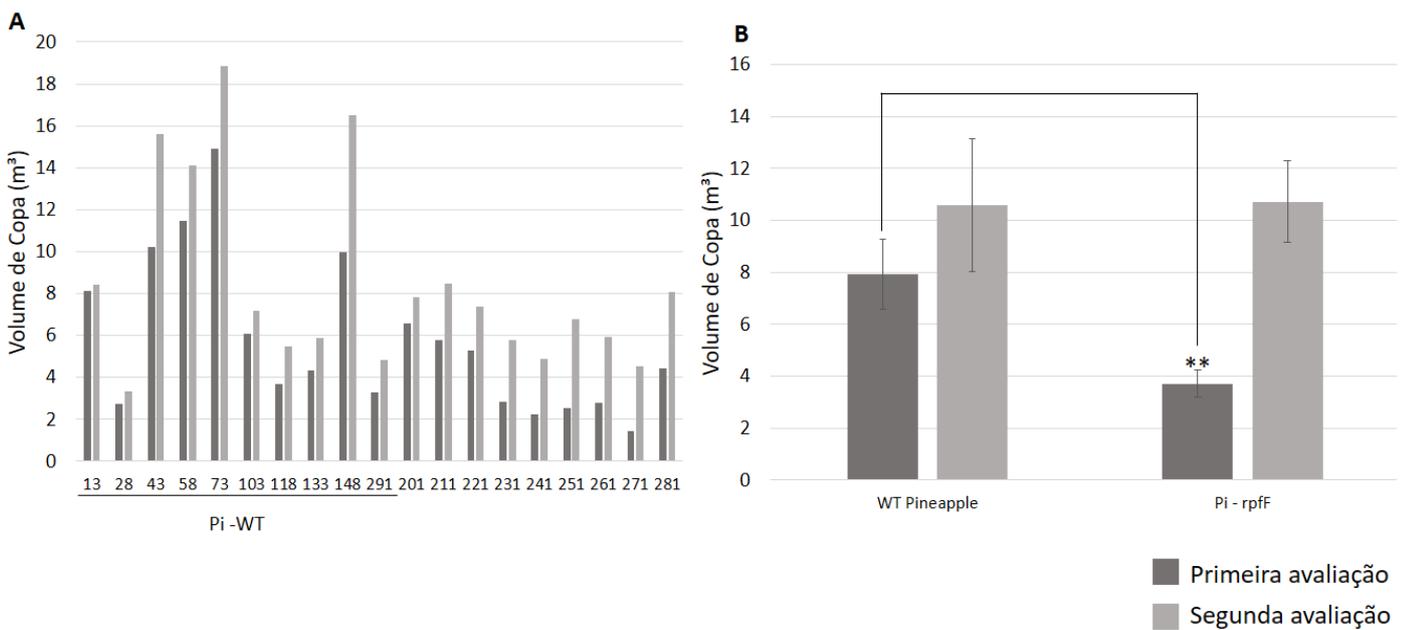


Figura 21. Volume de copa do evento *Pi-rpfF* e *Pi-WT*. A. Volume de copa de cada planta do evento. B. Médias de volume copa. ** $p < 0,01$ no teste t de Student.

As plantas do evento *H-rpfF*, em ambas as avaliações realizadas, mostraram menor altura de plantas e volume de copa quando comparadas com as plantas controle da variedade Hamlin (*H-WT*) (Figuras 23 e 24). Nesse evento, destacaram-se as plantas 55, 85 e 145.

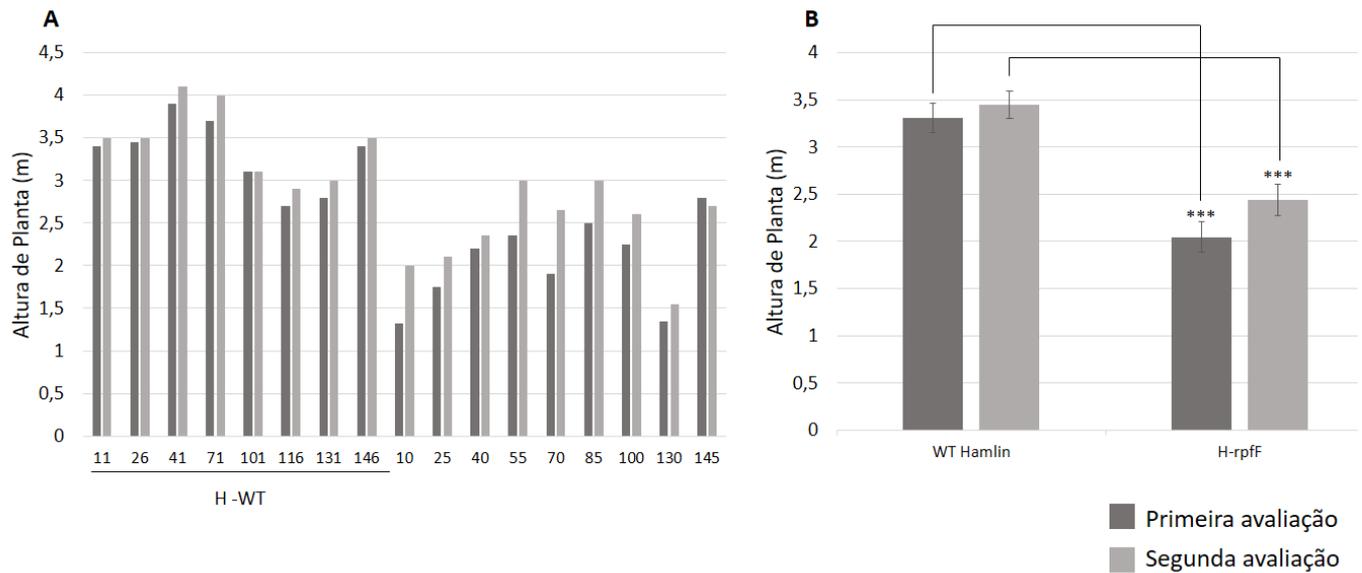


Figura 23. Altura das plantas do evento H-*rpfF* e H-WT. A. Altura de cada planta. B. Média das alturas de planta. *** $p < 0,001$ no teste t de Student.

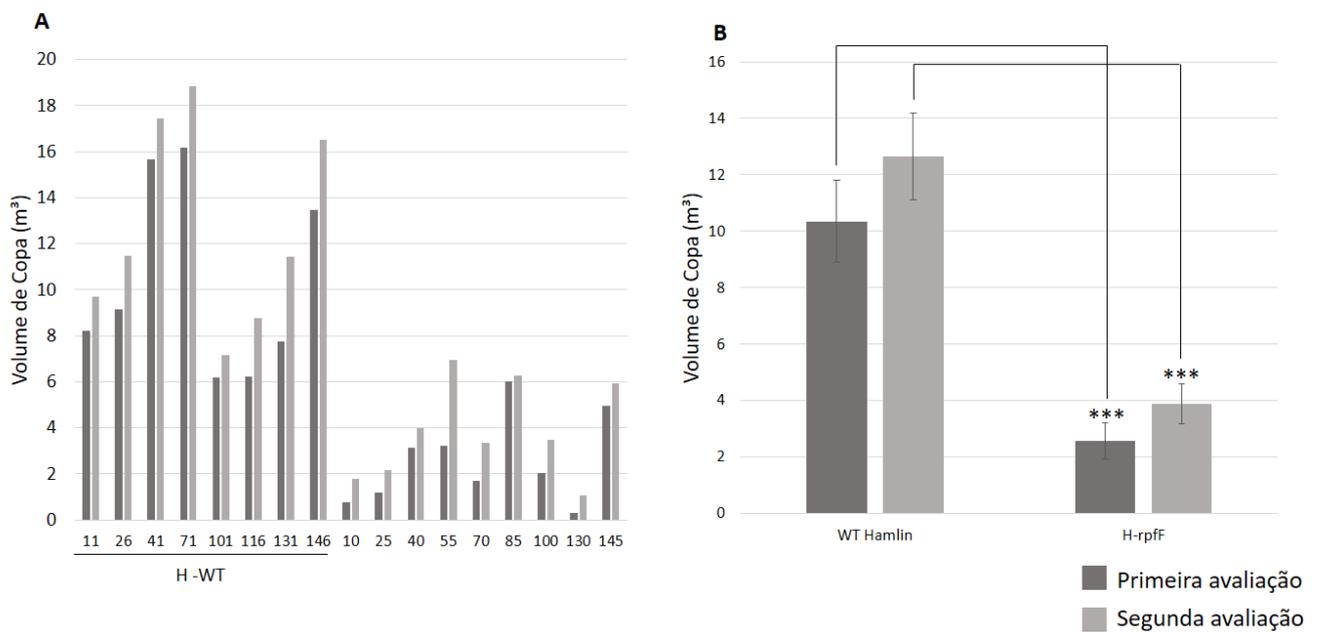


Figura 24. Volume de copa do evento H-*rpfF* e H-WT. A. Volume de copa de cada planta do evento. B. Médias de volume de copa. *** $p < 0,001$ no teste t de Student.

Tendo em vista que plantas transgênicas são obtidas buscando melhorias em determinados aspectos críticos das plantas, como produção, redução do ataque de pragas e,

como é o caso desse trabalho, aumento de resistência a doenças, espera-se que essas plantas tenham desenvolvimento equivalente ao das plantas convencionais. Sendo assim, dentre os três eventos analisados, destaca-se Pi-*rpfF*, que teve porte de planta semelhante as plantas não transgênicas de sua variedade.

Deve-se levar em conta que todas as plantas não transgênicas avaliadas no trabalho foram plantadas seis meses antes das plantas transgênicas, de forma a interferir nos resultados de porte das plantas, já que são utilizadas como controle para comparação.

O menor porte das plantas transgênicas, tanto as que superexpressam *rpfF* quanto *mqsR*, pode ser explicado por uma demanda maior de energia para manter a estabilidade do transgene, reduzindo assim a quantidade de energia que é voltada para o crescimento e desenvolvimento da planta. Para as plantas com a toxina *MqsR*, outra explicação para esse resultado é que, por se tratar de uma toxina que interfere no crescimento bacteriano, pode estar afetando o microbioma da planta, afetando o seu desenvolvimento.

5.4. Sintomas de HLB, Cancro cítrico e Clorose variegada dos citros

Não foram encontrados sintomas de CVC e cancro cítrico durante o período de avaliações das plantas. Tal resultado corresponde ao esperado, uma vez que o local do experimento não registrou incidência dessas doenças nos últimos anos, devido a utilização de métodos eficazes de controle.

Em relação aos sintomas de HLB, quando comparadas as médias dos eventos transgênicos com as plantas não transgênicas, destaca-se o evento Pi-*rpfF*, que teve menor média de severidade de sintomas (Figura 25).

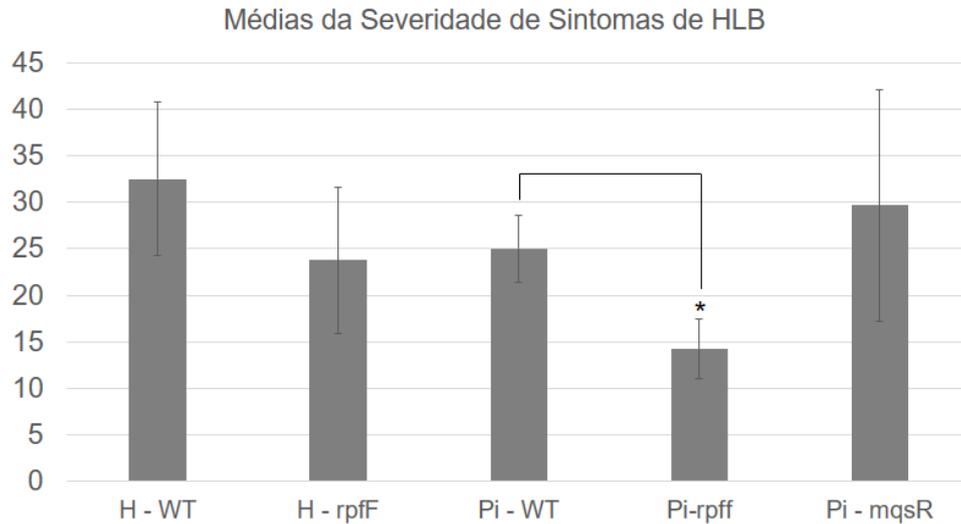


Figura 25. Médias de notas de severidade de HLB das plantas transgênicas e WT. * $p < 0,05$ no teste t de Student.

Individualizando cada clone, algumas plantas transgênicas tiveram menor nota que a nota mínima estabelecida para as respectivas plantas WT sendo estas, no evento Pi-*MqsR* 222, 232 e 252, em H-*rpfF* 55 e 70 e em Pi-*rpfF* 201, 211 e 271. Essas plantas são consideradas destaques dentro de cada evento. Segundo Bassanezi et al. (2019), dependendo da idade da planta, a evolução da severidade de HLB pode ser rápida. Entre um a cinco anos após o aparecimento dos primeiros sintomas na planta, já é possível observar sintomas severos. Considerando que as plantas estão em campo há três anos e já existem plantas com alta severidade de sintomas, deve-se dar continuidade no estudo das plantas destaques, uma vez que, até o momento, demonstraram ser mais resistentes ao *huanglongbing* (Figura 26).

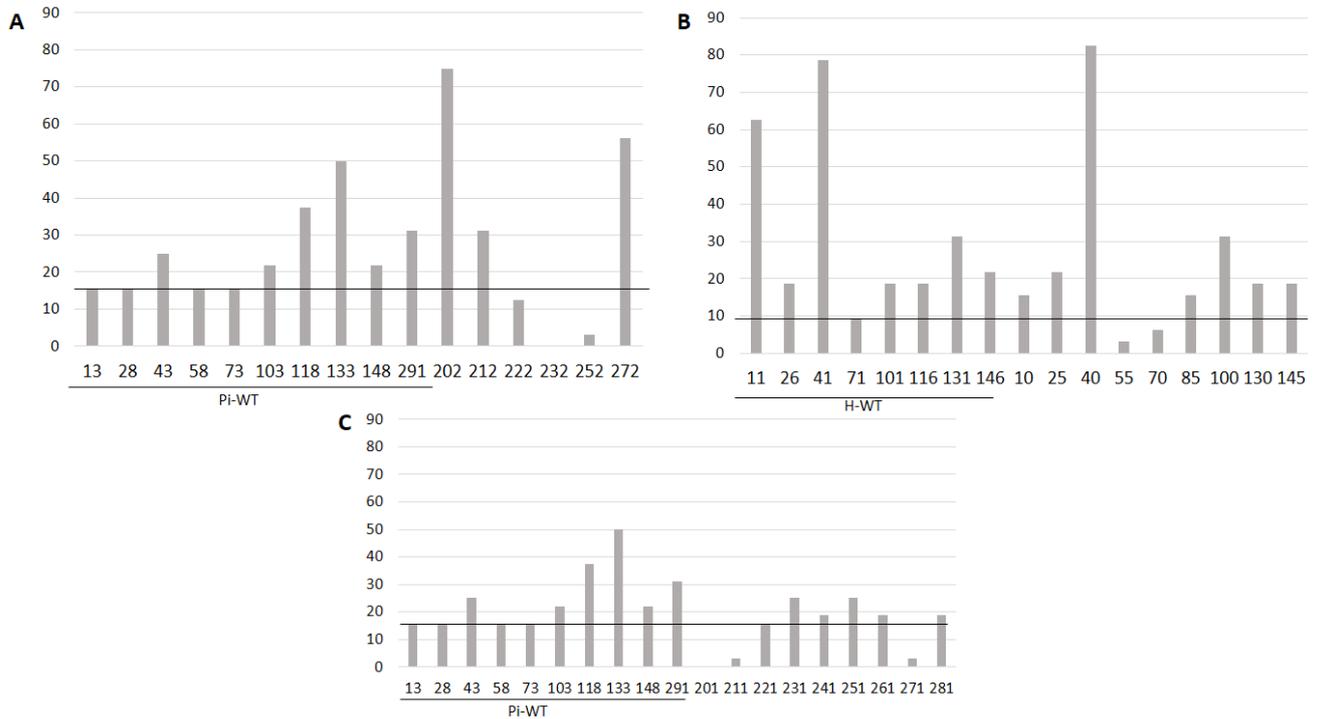


Figura 26. Notas de severidade de HLB atribuídas às plantas. A. Evento *Pi-MqsR*. B. Evento *H-rpfF*. C. Evento *Pi-rpfF*.

As plantas de citros são conhecidas, historicamente, por apresentarem quimerismo, ou seja, organismos que possuem genoma heterogêneo, formados através de um conglomerado de células com diferentes origens (FRANK e CHITWOOD, 2016). Essa variação no genótipo pode ser o motivo das plantas com mesmo gene ou toxina diferirem quanto à resistência ao HLB.

5.5. Expressão gênica das plantas transgênicas

Três plantas foram escolhidas aleatoriamente para análise da expressão dos transgenes. Apesar de apresentar variações dentro dos eventos, os genes estão expressando em todas as plantas avaliadas. (Figura 27).

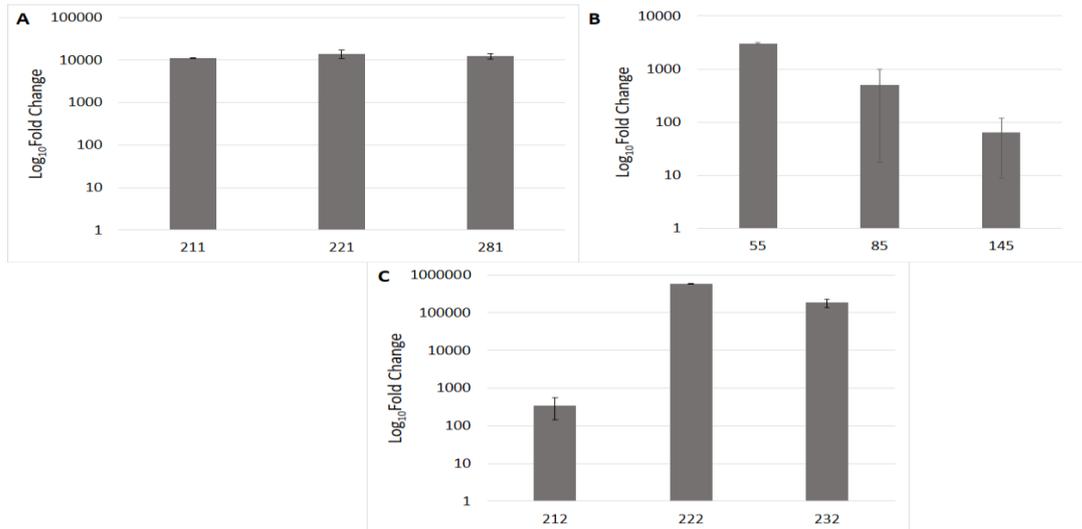


Figura 27. PCR quantitativo em tempo real para avaliação da expressão dos transgenes em plantas escolhidas aleatoriamente. A: expressão de *rpfF* nas plantas do evento Pi-*rpfF*. B: expressão de *rpfF* nas plantas do evento H-*rpfF*. C: expressão de *mqsR* nas plantas do evento Pi-*mqsR*

5.6. Qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas

Dos frutos analisados até o momento (Figura 28), não houve diferença significativa para massa, rendimento de suco e teor de sólidos solúveis (expresso em °Brix) quando comparados os frutos transgênicos dos não transgênicos (WT) (Tabela 2). Sendo assim, pode-se afirmar que os frutos provenientes dos eventos Pi-*rpfF* e Pi-*mqsR* têm a mesma qualidade que os frutos provenientes das plantas controle, mesmo que as plantas de Pi-*mqsR* apresentem menor desenvolvimento. Levando em conta que a criação de plantas transgênicas é realizada visando características tão boas quanto as plantas não transformadas, esse resultado mostra os eventos como promissores em relação a características dos frutos.

Durante a execução desse trabalho não houveram frutos maduros do evento H-*rpfF* para análise de qualidade.

Tabela 2. Qualidade dos frutos provenientes das plantas geneticamente modificadas.

Planta	Evento	Massa (g)	Altura (cm)	Largura (cm)	Rd. Suco (%) (m/m)	°Brix
73	Pi-WT	100,0	6,2	5,7	40,0	5,5
103	Pi-WT	111,7	6,4	6,0	42,5	5,4
212	Pi- <i>MqsR</i>	159,4	6,9	7,0	44,7	9,8
222	Pi- <i>MqsR</i>	135,0	4,2	4,2	45,8	7,7
211	Pi- <i>rpfF</i>	139,4	4,4	4,4	22,0	6,5
221	Pi- <i>rpfF</i>	122,5	6,6	6,2	41,8	5,3

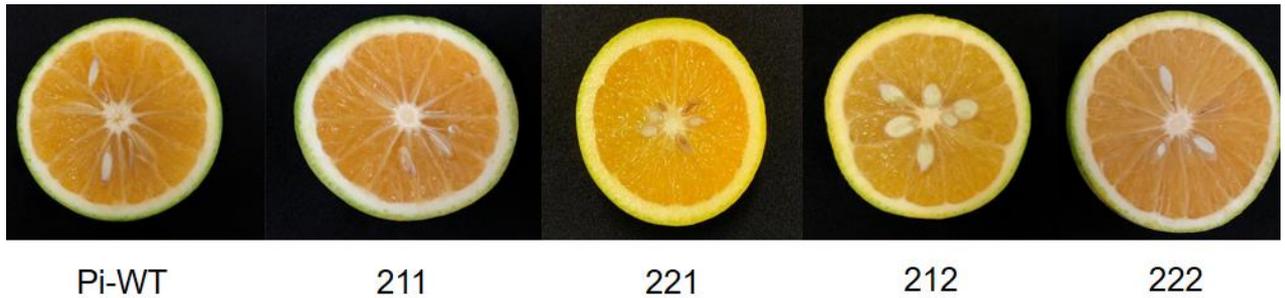


Figura 28. Amostras representativas dos frutos analisados.

6. CONCLUSÃO

Do total das plantas transgênicas avaliadas, 96% mantiveram o transgene estável em condições de campo e esses genes além de presente, estão expressando no genoma das plantas.

O evento Pi-*MqsR* tem menor porte que as plantas não transgênicas, mas produz frutos de boa qualidade. Em média, esse evento não diferiu quanto ao teor de clorofila e não demonstrou ser mais resistente ao HLB que as plantas não transgênicas.

O evento H-*rpfF* também apresentou plantas com porte menor que plantas não transgênicas. As plantas desse evento não diferiram das não transgênicas quanto ao teor de clorofila e à severidade de sintomas.

As plantas do evento Pi-*rpfF* não diferiram quanto ao teor de clorofila das plantas não transgênicas, apresentaram plantas com maior porte e maior resistência ao HLB, além de produzirem frutos de boa qualidade. Desse evento destacam-se as plantas 201 e 211 como plantas elite pois apresentaram bom desenvolvimento agrônômico e maior resistência ao HLB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALQUÉZAR, B. et al. Engineering of citrus to obtain *huanglongbing* resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 70, p. 196-203, 2021.

AMARAL, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2003.

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

ATIHE JR, J. A. et al. Incidência de *Huanglongbing* (HLB) (greening) em citros na região de Araraquara. **Laranja**, v. 27, n. 2, p. 251-262, 2006.

AtLEAF. **CHL PLUS chlorophyll meter**. Washington, ago. 2020. Disponível em: <<https://www.atleaf.com/Download/atLEAF%20CHL%20PLUS%20Flyer.pdf>>. Acesso em 07 jul. 2022.

AZEVEDO, F. A. de et al. Poda na citricultura. **Citrus Research & Technology**, v. 34, n. 1, p. 17-30, 2013.

AYRES, A. J. et al. **Manejo do greening: 10 mandamentos para o sucesso no controle da doença**. Araraquara: Fundecitrus, 2019.

BASSANEZI, R. B. et al. Epidemiologia do *huanglongbing* e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 11-23, 2019.

BASSLER, Bonnie L. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. **Cell**, v. 109, n. 4, p. 421-424, 2002.

BEAULIEU, Ellen D. et al. Characterization of a diffusible signaling factor from *Xylella fastidiosa*. **MBio**, v. 4, n. 1, p. e00539-12, 2013.

BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 2020

BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J. **Cancro Cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara: Fundecitrus, 2014.

BEHLAU, F. et al. **Manual de Cancro cítrico: medidas essenciais de controle**. Fundecitrus, Araraquara, 2019. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/manual-de-cancro-citrico/79>. Acesso em 11 ago. 2022.

BELASQUE JR., J. et al. 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 JR, J. et al. Controle do *huanglongbing* no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 53-64, 2017.

BELASQUE JR, J. et al. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.

BELASQUE JR, J. et al. Lessons from *huanglongbing* management in São Paulo state, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, p. 285-302, 2010.

BOVÉ, J. M. *Huanglongbing*: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of plant pathology**, p. 7-37, 2006.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Plantas Transgênicas. In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. 2017. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%20transgenicos.pdf>>. Acesso em 03 mar. 2022.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1999.

CASERTA, R. et al. Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in citrus disrupts signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and thereby its virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 11, p. 1241-1252, 2014.

CASERTA, R. et al. Ectopic expression of *Xylella fastidiosa* *rpfF* conferring production of diffusible signal factor in transgenic tobacco and citrus alters pathogen behavior and reduces disease severity. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 30, n. 11, p. 866-875, 2017.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. P.; LINDOW, S. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annu. Rev. Phytopathology**, v. 46, p. 243-271, 2008.

COLETTA-FILHO, H. D.; DE SOUZA, A. A. Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: Uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. **Citrus Research Technology**, v. 35, p. 19-33, 2014.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. Citrus variegated chlorosis: an overview of 30 years of research and disease management. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 175-191, 2020.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus* Liberibacter asiaticus”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382-1382, 2004.

CROPLIFE BRASIL. **Produção de laranjas: Brasil é líder nesse negócio**. 2020. Disponível em: <<https://croplifebrasil.org/noticias/producao-de-laranjas-brasil-e-lider-nesse-negocio/>>. Acesso em 28 jan. 2022.

FIGUEIREDO, M. G.; DE BARROS, A. L. M.; FRIZZONE, J. A.; JUNIOR, J. B. Dano econômico evitado pelo controle de doenças na citricultura paulista. In: **Congresso**

SOBER, 47, 2009, Porto Alegre. Anais... Brasília/DF: Sociedade Brasileira de economia, administração e sociologia rural, 2009.

DE LA FUENTE, L et al.. Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73,p. 2690-2696, 2018.

DE SOUZA, A. A. et al. Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent of citrus variegated chlorosis. **Tree For Sci Biotech**, v. 2, n. 3, p. 957-964, 2009.

DE SOUZA, A. A. et al. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 867-875, 2003.

FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

FRANK, M. H.; CHITWOOD, D. H. Plant chimeras: the good, the bad, and the 'Bizzaria'. **Developmental biology**, v. 419, n. 1, p. 41-53, 2016.

Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS. **Clorose Variegada dos Citros**. 2018. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc/9%3E>>. Acesso em 01 mar. 2022.

Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS. **Levantamento da incidência das doenças dos citros: greening, CVC e cancro cítrico**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2021. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf>. Acesso em 21 fev. 2022.

Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS. **Quinze anos de greening no Brasil: como a citricultura de SP e MG tem conseguido controlar a doença e se manter como principal produtora de suco de laranja do mundo**. 2019. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/quinze-anos-de-greening-no-brasil-como-a-citriculturade-sp-e-mg-tem-conseguido-controlar-a-doenca-e-semanter-como-principal-produtora-de-suco-de-laranjado-mundo/777>>. Acesso em 25 jul. 2022.

Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITROS. **Unidos contra o greening**. 2018. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/campanha-unidoscontraogreening/71>. Acesso em 03 mar. 2022.

Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS. **Sinal positivo: pela primeira vez, crescimento de HLB é interrompido por conta do manejo dos pomares e eliminação das plantas doentes**. 2016. Disponível em:

<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/download_revista/42>. Acesso em 10 ago. 2022.

GERDES, K., MAISONNEUVE, E. Persistência bacteriana e loci toxina-antitoxina. **Anu. Rev. Microbiol.** 66, 103-123. 2012.

GOTTWALD, T. R. et al. **Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact.** **Plant Health Progress**, v. 8, n. 1, p. 31, 2007.

HANDEL, C. L. et al. Transformação genética de cereais via *Agrobacterium tumefaciens*. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 359-365, 1997.

GIL, P. T et al. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico de produtividade de batata. **Horticultura brasileira**, v. 20: 611-615. 2002.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, K. C. et al. Análisis funcional de los genes que codifican al sistema toxina-antitoxina del plásmido **pUM505**. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal**. 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>>. Acesso em 28 jan. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção de laranja. 2021.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/br>>. Acesso em 25 jul. 2022.

IRENO, M. T., et al. Doença do Cítrus-Cancro Cítrico. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 25, n. 1, p. 34-37, 2014.

KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia. 3 ed. São Paulo: **Agonômica Ceres**, 1995.

LEE, M. W. et al. *Xylella fastidiosa* plasmid-encoded PemK toxin is an endoribonuclease. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, p. 32-40, 2012.

LEE, M. W. et al. Toxin-antitoxin systems *mqsR/ygiT* and *dinJ/reIE* of *Xylella fastidiosa*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 87, p. 59-68, 2014.

LEPLAE, R. et al. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 13, p. 5513-5525, 2011.

LI, L. et al. Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-22, 2019.

LINDOW, S. et al. Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 3, p. 244-254, 2014.

LOPES, S. A., F. F. Laranjeira, L. Amorim, and A. Bergamin Filho. Clorose variegada: perdas anuais de US\$100 milhões. **Visão agríc.**, v. 1 p. 20-23, 2004.

MACHADO, M. A. et al. Candidatus Liberibacter spp., agentes do huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2017.

MACHADO, E. C. et al. Deficiência hídrica agrava os sintomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranja 'Natal'. **Bragantia**, v. 66, p. 373-379, 2007.

MACHADO, E. C. et al. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranja 'Natal' com clorose variegada dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 911-918, 2006.

MANEIRA, R.; NETO, P. D. **Cancro cítrico: estratégias na prevenção e controle da doença**. Informativo Técnico: Nortox. v. 22. 2019. Disponível em: <<https://portal-api.nortox.com.br/technical-information/file/e75a0ee6-3592-46ad-8351-5d4bbce1c34f.pdf>>.

MASSARI, C. A.; BELASQUE JR, J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo - Situação atual e contaminação em viveiros. **Citrus Research & Technology**, v. 27, n. 1, p. 41-55, 2006.

MERFA, Marcus V. et al. The MqsRA toxin-antitoxin system from *Xylella fastidiosa* plays a key role in bacterial fitness, pathogenicity, and persister cell formation. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 904, 2016.

MURANAKA, L. S. et al. Global expression profile of biofilm resistance to antimicrobial compounds in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* reveals evidence of persister cells. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4561-4569, 2012.

OLIVEIRA, R. P. de et al. **Cancro cítrico: epidemiologia e controle**. Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E), 2008.

PIO, ROSE, et al. Características do fruto da variedade Span Americana (*Citrus reticulata* Blanco): uma tangerina do tipo 'Poncã' de maturação precoce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 325-329, 2001.

ROSSETTI, V.; NEGRI, J. D. Clorose variegada dos citros-revisão. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis v. 32, n. 1, 2011.

SANCHES, M. M. et al. **Levantamento de huanglongbing (HLB) em citros no Brasil e diagnose dos agentes etiológicos**. Brasília (DF): Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista da Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, SP, v. 8, n. 15, p. 81-90, 2000.

SANTOS FILHO, H. P. et al. **Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul**. Embrapa Mandioca e Fruticultura-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2010.

SOUZA-NETO, R. R. et al. MqsR toxin as a biotechnological tool for plant pathogen bacterial control. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2022.

THEODORO, G. F. de. et al. Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares de laranja doce no Oeste Catarinense. **Agropecuária Catarinense**, v. 18, n. 1, p. 91-94, 2005.

WANG, N et al. RpfF-dependent regulon of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v. 102, n. 11, p. 1045-1053, 2012. 2015.

WHITEHEAD, N. A. et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 365-404, 2001.

YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin–antitoxin systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 779-790, 2011.

YAMAMOTO, P. T. et al. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos. **Investigación Agraria**, v. 16, n. 2, p. 69-82, 2014.