



DANILA SOUZA OLIVEIRA COQUEIRO

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL INDUZIDA POR
ELICIADORES (QUITOSANA E ÁCIDO SALICÍLICO) NOS
PATOSSISTEMAS CITROS-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* e
CITROS-*Xylella fastidiosa***

**DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION INDUCED BY
ELICITORS (CHITOSAN AND SALICYLIC ACID) IN CITRUS-
Xanthomonas citri subsp. *citri* AND CITRUS-*Xylella fastidiosa*
PATHOSYSTEMS**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**



DANILO SOUZA OLIVEIRA COQUEIRO

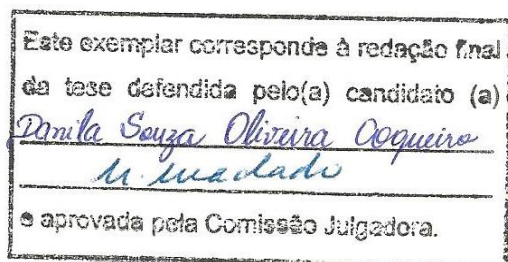
**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL INDUZIDA POR ELICIADORES
(QUITOSANA E ÁCIDO SALICÍLICO) NOS PATOSSISTEMAS CITROS-**

Xanthomonas citri* subsp. *citri* e CITROS-*Xylella fastidiosa

DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION INDUCED BY ELICITORS

(CHITOSAN AND SALICYLIC ACID) IN CITRUS- *Xanthomonas citri*

subsp. *citri* AND CITRUS-*Xylella fastidiosa* PATHOSYSTEMS



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Functional and Molecular Biology, in the área of Biochemistry.

Orientador: Prof. Dr Marcos Antonio Machado
Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C797e Coqueiro, Danila Souza Oliveira, 1984-
Expressão gênica diferencial induzida por eliciadores (quitosana e ácido salicílico) nos patossistemas citros-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* e citros-*Xylella fastidiosa* / Danila Souza Oliveira Coqueiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcos Antonio Machado.
Coorientador: Alessandra Alves de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bactérias. 2. Cítricos. 3. Expressão gênica. 4. Transcriptoma. I. Machado, Marcos Antonio. II. Souza, Alessandra Alves de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Differential gene expression induced by elicitors (chitosan and salicylic acid) in citrus-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* and citrus-*Xylella fastidiosa* pathosystems

Palavras-chave em inglês:

Bacteria

Citrus

Gene expression

Transcriptome

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcos Antonio Machado [Orientador]

Ione Salgado

Antonio Carlos de Oliveira

Sérgio Florentino Pascholati

Juliana de Freitas Astúa

Data de defesa: 30-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 30 de Outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado (orientador)

M. Machado
Assinatura

Profa. Dra. Ione Salgado

Ione Salgado
Assinatura

Prof. Dr. Antonio Carlos de Oliveira

Antonio C. Oliveira
Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

S. Pascholati
Assinatura

Dra. Juliana de Freitas Astúa

Juliana de Freitas Astúa
Assinatura

Prof. Dr. Jose Camillo Novello

Assinatura

Dr. Marco Aurélio Takita

Assinatura

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

RESUMO

COQUEIRO, D. S. O. **Expressão gênica diferencial induzida por eliciadores (quitosana e ácido salicílico) nos patossistemas citros-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* e citros-*Xylella fastidiosa*.** 2013. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Avaliou-se as alterações transcricionais em laranja ‘Pera’ (*Citrus sinensis* L. Osb.) promovidas por quitosana (CHI) e ácido salicílico (SA), utilizando RNA-seq, e o efeito destes compostos no controle do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) e da clorose variegada dos citros (CVC - *Xylella fastidiosa*). As plantas foram tratadas com CHI ou SA e após 48h e 24h, respectivamente, foram coletadas amostras foliares para avaliar seus transcriptomas. Para a avaliação dos eliciadores sobre o cancro cítrico e a CVC, as plantas foram tratadas com CHI ou SA e após 48h e 24h, respectivamente, inoculadas com as duas bactérias separadamente. A partir de 24h da inoculação, foram coletadas amostras foliares para avaliar a curva de crescimento de ambas as bactérias, a redução da severidade e/ou incidência das doenças e respostas de defesa da planta por RT-qPCR. Com os resultados do transcriptoma, observou-se que mais genes foram induzidos pelo tratamento com SA do que com CHI. O tratamento com SA aumentou a expressão de genes que participam da via de sinalização do SA na planta (*WRKY50*, *PR2* e *PR-9*) e genes da biossíntese do etileno e ácido jasmônico (*ACS 12*, fator de transcrição contendo domínio *AP2* e *OPR3*). Além disso, promoveu a indução de genes relacionados ao metabolismo secundário, processos redox e estresse biótico. No tratamento com CHI, foi observada maior indução de genes relacionados ao metabolismo secundário. Para ambos os tratamentos, a via da auxina foi reprimida. No experimento para controle do cancro cítrico, observou-se que ambos os eliciadores promoveram reduções na severidade e incidência da doença. Entretanto, a CHI

pareceu não interferir diretamente na formação do biofilme pela bactéria, mas pode ter dificultado a multiplicação de *X. citri* na planta. O SA retardou a entrada da bactéria na planta e, aparentemente, inibiu mais a formação do biofilme bacteriano do que a CHI. Comparações da expressão gênica entre os eliciadores reforçam a ideia de que a CHI tem maior potencial de induzir resistência ao cancro cítrico do que SA. No experimento para o controle da CVC, observou-se que a CHI induziu importantes genes da via do SA (*NPR1*, *TGA*, *EDS1*) e etileno (*EIN-3*, *PR-4*) 24h após a inoculação. Aplicações exógenas de SA potencializaram o seu efeito endógeno na planta, pois houve indução de *NPR1*, *TGA* e *PRs*. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação clara entre a multiplicação de *X. fastidiosa*, a incidência da doença e o uso da CHI e SA em laranja ‘Pera’, já que na maioria das avaliações não houve redução da população bacteriana em amostras foliares e não houve redução da incidência em plantas tratadas. Com base nos resultados, observou-se que CHI e SA induziram diversos genes envolvidos em respostas de defesa em laranja ‘Pera’. Entretanto, essas respostas podem ser moduladas diferencialmente a depender do patógeno que afeta a planta, pois os eliciadores foram eficientes no controle da *X. citri*, um patógeno que coloniza o mesófilo da planta, entretanto não foram efetivos no controle da *X. fastidiosa*, um patógeno que coloniza o xilema da planta, embora respostas de defesa tenham sido expressas nos momentos iniciais (24h) após a inoculação com *X. fastidiosa*.

Palavras-chave: Bactérias. Cítricos. Expressão gênica. Transcriptoma..

ABSTRACT

COQUEIRO, D. S. O. **Differential gene expression induced by elicitors (chitosan and salicylic acid) in citrus-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* and citrus-*Xylella fastidiosa* pathosystems.** 2013. Doctoral Thesis, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas.

This study was carried out to evaluate transcriptional modification in sweet orange 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osb.), promoted by chitosan (CHI) and salicylic acid (SA), using RNA-seq, and the effect of these compounds on citrus canker (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) and citrus variegated chlorosis (CVC - *Xylella fastidiosa*). Plants were treated with CHI or SA and after 48h and 24h, respectively, leaf samples were collected to assess the transcriptome. In the experiments for disease assessment, the plants were treated with CHI or SA and after 48h and 24h, respectively, inoculated. Starting from 24h after inoculation, leaf samples were collected to evaluate the multiplication of the pathogens (*X. citri* and *X. fastidiosa*), reduction of the severity and / or incidence and plant defense responses by RT-qPCR. Based upon the transcriptome results, it was observed that more genes were induced by SA than by CHI. SA treatment increased the expression of genes that participate in the SA signaling pathway in the plant (*WRKY50*, *PR2* and *PR9*), and genes involved in the biosynthesis of ethylene and jasmonic acid (*ACS 12*, transcription factor containing *AP2* and *OPR3* domain). Besides these, SA promoted induction of genes of secondary metabolism, redox processes and biotic stress. The treatment with CHI exhibited higher induction of genes related to secondary metabolism. For both treatments, the auxin pathway was suppressed. In the experiment for the control of citrus canker, it was observed that both elicitors reduced the severity and incidence of the disease. However, CHI seems not to

interfere directly in biofilm formation, but may have hindered the multiplication of *X. citri* in the plant. The SA slowed down the entry of the bacteria into the plant and, apparently, inhibited the formation of biofilm more efficiently than the CHI. Comparisons of gene expression between elicitors reinforce the idea that CHI has higher potential to induce resistance to citrus canker than SA. In the experiment for the control of CVC, it was observed that the CHI induced important genes of the SA (*NPR1*, *TGA*, *EDS1*) and ethylene (*EIN-3*, *PR-4*) pathways 24h after inoculation. Exogenous applications of SA potentiated its endogenous effect in the plant, since there was induction of *EDS-1*, *NPR1*, *TGA* and *PRs*. However, it was not possible to establish a clear relationship between the multiplication of *X. fastidiosa*, the incidence of the disease and the use of CHI and SA in 'Pera' sweet orange, since most of the assessments did not show reduction of bacterial populations in leaf samples and there was no reduction of the incidence in treated plants. Based upon the results of this study, it was observed that CHI and SA induced several genes involved in defense responses in 'Pera' sweet orange. However, these responses can be modulated differentially depending on the pathogen that affects the plant. This fact was demonstrated in this study, as elicitors were effective in controlling *X. citri*, a pathogen that colonizes the mesophyll of the plant, but were not effective in controlling *X. fastidiosa*, a pathogen that colonizes the xylem of the plant, although defense responses were expressed in the early stages (24 h) after inoculation with *X. fastidiosa*.

Keywords: Bacteria; Citrus; Gene expression; Transcriptome.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cancro cítrico	3
2.2 Clorose variegada dos citros	6
2.3 Mecanismos gerais da resistência em plantas	9
2.4 Indução de resistência em plantas por eliciadores	18
2.4.1 Quitosana (CHI) como indutor de resistência	22
2.4.2 Ácido salicílico (SA) como indutor de resistência	24
2.5 Análise da indução de resistência	26
2.5.1 Transcriptoma	26
2.5.1 PCR em tempo real (RT-qPCR)	30
3 Justificativa e hipótese do trabalho	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 Geral	37
4.2 Específicos	37
CAPÍTULO 1: Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid	39
Abstract.....	40
Introduction	41
Materials and Methods.....	44
Plant materials and treatment with elicitors	44
RNA extraction and RNA-seq preparation	45
Sequence analysis.....	45
Validation of RNA-seq data by real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR)	46
Results and Discussion.....	47
Transcriptome profiling	47
Modulated metabolic process induced by exogenous SA and CHI	51
Conclusions.....	66
Authors' Contributions	66
References	67
CAPÍTULO 2: Quitosana e ácido salicílico como eliciadores no controle do cancro cítrico e clorose variegada dos citros	77
1 INTRODUÇÃO	77
2 MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 Material vegetal e tratamento com os eliciadores.....	78
2.2 Avaliação dos eliciadores sobre multiplicação de <i>X. citri</i> e na redução do cancro cítrico	79
2.2.1 Inoculação bacteriana	79
2.2.2 Análise da sobrevivência da comunidade epifítica de <i>X. citri</i>	79
2.2.3 Curva de crescimento bacteriano	80
2.2.4 Incidência e severidade da doença	80
2.2.5 Extração de RNA, síntese do cDNA e RT-qPCR	80

2.3 Avaliação dos eliciadores sobre a multiplicação de <i>X. fastidiosa</i> e na redução da clorose variegada dos citros.....	84
2.3.1 Condições de crescimento da <i>X. fastidiosa</i> , procedimentos para inoculação e detecção da bactéria.....	84
2.3.2 Curva de crescimento de <i>X. fastidiosa</i>	84
2.3.3 Avaliação da incidência da CVC	86
2.3.4 Extração de RNA, síntese do cDNA e RT-qPCR	86
2.4 Análises estatísticas	88
3 RESULTADOS	88
3.1 Efeitos dos eliciadores sobre o cancro cítrico	88
3.3.1 Atuação dos eliciadores contra <i>X. citri</i>	88
3.3.2 Elicidores reduzem a incidência e severidade do cancro cítrico em laranja ‘Pera’	92
3.3.3 Respostas de defesa em laranja ‘Pera’ aos eliciadores e à infecção com <i>X. citri</i>	93
3.4 Efeitos dos eliciadores sobre a clorose variegada dos citros	96
3.4.1 Efeito da quitosana e ácido salicílico na defesa de laranja ‘Pera’ contra <i>X. fastidiosa</i>	96
3.4.2 Evolução da infecção bacteriana em plantas tratadas com os eliciadores	97
4 DISCUSSÃO	101
4.1 Efeito dos eliciadores sobre o cancro cítrico	101
4.1.2 Quitosana (CHI) na interação laranja ‘Pera’ e <i>X. citri</i>	102
4.1.3 Ácido salicílico na interação laranja ‘Pera’ <i>X. citri</i>	105
4.1.4 Quitosana vs. ácido salicílico na interação laranja ‘Pera’ e <i>X. citri</i>	107
4.2 Efeito dos eliciadores sobre a clorose variegada dos citros	109
4.2.1 Respostas de laranja ‘Pera’ ao tratamento com eliciadores.....	109
4.2.2 Multiplicação da <i>X. fastidiosa</i> em laranja ‘Pera’ tratada com eliciadores	111
5 Referências.....	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	137

**À minha família, meu maior tesouro, por
compartilhar e apoiar cada experiência da
minha formação acadêmica,**

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela coragem e força concedidas para batalhar pelos meus ideais.

Ao meu marido Raildo pelo amor, companheirismo, amizade, compreensão e por sempre me encorajar e auxiliar em várias etapas deste trabalho.

Aos meus pais João e Nelzita pelos ensinamentos e incentivo. Às minhas irmãs, Daniela e Daniane, pelo apoio e por enfrentarmos sempre juntas os obstáculos da vida, sobretudo neste momento em que buscamos melhorias nas nossas formações acadêmicas.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pela orientação. A minha gratidão pela confiança e pela oportunidade em realizar este trabalho.

À Dra. Alessandra Alves de Souza pela co-orientação, amizade, ensinamentos e dedicação ao me auxiliar em várias etapas do trabalho.

Ao Dr. Marco Aurélio Takita, Dr. Luciano Takeshi Kishi e Dra. Carolina Munari Rodrigues pelo auxílio na bioinformática.

Ao Dr. Helvécio Della Coletta Filho pela colaboração na execução de etapas deste trabalho.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora.

Ao Prof. Antonio Carlos de Oliveira pelas conversas, conselhos, apoio e incentivo ao longo da minha caminhada acadêmica.

Aos integrantes do Grupo *Xylella* pelo aprendizado e ideias compartilhadas.

Às amigas Simone, Rosangela, Bárbara, Laís, Cíntia, Inaiara, Karine, pelos conselhos, apoio, carinho e convívio agradável no alojamento do Centro de Citricultura.

Aos (as) amigos(as) Raquel Caserta, Joadson, Carolina Sardinha, Juarez, Thaís Giorgiano, Mariana Silva, Mariana Saragiotto, Silvia, Eliane Locali, Willian, pelas trocas de conhecimentos no laboratório, auxílios e momentos agradáveis compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Kleber, Tiago, Valéria, Michèle, Amélia, Leonardo Boava, Diogo Galdeano, Diogo Magalhães, Eduardo, Reinaldo, Marcus e Isabella pela atenção e convívio.

Aos pesquisadores, técnicos e funcionários do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo apoio no laboratório e/ou na casa de vegetação.

A CAPES pelo auxílio financeiro no primeiro ano do doutorado.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, pela oportunidade.

À Universidade Federal da Bahia pelos afastamentos concedidos para condução dos trabalhos no Centro de Citricultura.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Estágios para formação do biofilme de *X. citri* na superfície de folhas de plantas cítricas. Adaptado de Gottig *et al.* (2010) 4
- Figura 2:** Microscopia eletrônica de varredura mostrando a liberação de *X. citri*, a partir de abertura estomática 5 dias após a infiltração do mesofilo com 10^5 ufc/ml. Fonte: Graham *et al.* (2004)..... 5
- Figura 3:** Sintomas foliares do cancro cítrico 10 dias após a infecção. (A) Superfície abaxial. (B) Superfície adaxial. Fonte: Gottwald (2000)..... 5
- Figura 4:** Níveis de contaminação da clorose variegada dos citros. Fonte: Yamamoto *et al.* (2009)..... 7
- Figura 5:** Porcentagem de plantas apresentando sintomas da CVC nas diferentes regiões do Estado de São Paulo e parte do Triângulo mineiro, considerando o levantamento realizado pelo Fundecitrus meses antes da colheita das quatro principais variedades de laranja (Pêra, Rio, Valência, Natal e Hamlin). Fonte: <http://www.fundecitrus.com.br>..... 8
- Figura 6:** Resumo esquemático da sinalização do ácido salicílico (SA) na resistência de plantas contra patógenos. As setas indicam a ativação de atividades enzimáticas, indução ou acúmulo de compostos ou gene de transcrições ou, no caso de NPR1, movimento do monômero NPR1 do citosol para o núcleo. As linhas vermelhas indicam repressão de atividade enzimática ou acúmulo de compostos (Adaptado de Vlot *et al.*, 2009). MeSA = metil salicilato; SAR = resistência sistêmica adquirida; TGA = fator de transcrição; SABP2 = proteína de ligação ao ácido salicílico..... 13
- Figura 7:** Modelo esquemático da via de sinalização do gás etileno. A ligação do etileno (C_2H_4) leva a inativação de seus receptores e, por sua vez, a inativação de CTR1 quinase. Isto permite que EIN2 regule positivamente a família dos fatores de transcrição EIN3/EILs localizados no núcleo. EIN3 direciona a expressão de ERF1 e outros alvos primários por se ligar diretamente, como um dímero, aos elementos de resposta ao etileno primários (PERE) presentes em seus promotores. ERF1, e provavelmente outros ERFs, ligam-se a elementos de resposta ao etileno secundários (SERE/GCC box) e ativa a expressão de genes efetores de defesa, como os genes *PRs* (Adaptado de Adie *et al.*, 2007)..... 14
- Figura 8:** *Network* da resposta de defesa de plantas envolvendo as vias do etileno (ET), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (SA) e ácido abscísico (ABA). O estresse biótico (ataque de patógeno e pragas) estimula a síntese destes hormônios. Após o estímulo, a indução assimétrica destas vias e sua interação permite que a planta ajuste a sua resposta de defesa a uma ameaça específica. Em geral, ET e JA cooperam, por meio de *ERF1*, na indução de defesas contra agentes patogênicos necrotróficos, enquanto são reprimidos pelo ferimento ou em resposta a organismos patogênicos biotróficos. Por outro lado,

SA induz defesas contra agentes patogênicos biotrófico por meio do fator de transcrição *WRKY70* e é reprimido em defesas contra agentes patogênicos necrotroficos. As análises de microarranjos do genoma inteiro estão mostrando a complexidade das interações hormonais na ativação de respostas de defesa, sendo que este modelo de rede representa apenas uma visão simples. As setas indicam indução ou interação positiva, enquanto as linhas tracejadas indicam repressão ou interação negativa. Setas mais grossas representam a via principal do ET (Adaptado de Adie *et al.*, 2007)..... 16

Figura 9: Via biossintética do ácido jasmônico. Os sinais/ eliciadores interagem com receptores de membrana fazendo com que ocorra a produção do 13-ácido hidroperoxilinolenico, a partir de ácido linolênico pela atuação de lipases e pela lipoxigenase (LOX). O 13-ácido hidroperoxilinolenico sofre ação da aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC) e é convertido em ácido jasmônico, o qual pode atuar modulando a expressão de genes ou ser catabolizado formando metil jasmonato (Adaptado de Creelman & Mullet, 1995)..... 17

Figura 10: Esquema geral da tecnologia de sequenciamento solexa. Primeiramente ocorre a fase sólida em que ao DNA fragmentado são ligados adaptadores em ambas as extremidades (5' e 3') randomicamente (A). Essas moléculas são aderidas à superfície da célula de corrida (B) e posteriormente seguem-se as etapas de desnaturação e anelamento em que os fragmentos são polimerizados com os nucleotídeos não marcados adicionados em cada linha da plataforma (C, D e E). Em vários ciclos são geradas várias cópias de todos os fragmentos formando os *clusters* de moléculas denticas (F). Após esta fase sólida, inicia-se o ciclo químico em que nucleotídeos marcados são adicionados à plataforma (G e H) e permitem a identificação e sequência correta do cDNA. Isso ocorre por meio da excitação dos nucleotídeos com laser, gerando uma fluorescência que é captada e interpretada (I e J). O ciclo se repete a partir da incorporação de nucleotídeos marcados, determinando a sequência de bases do fragmento de DNA (L). Posteriormente os dados são alinhados ao genoma de referência identificando a sequência obtida (M). Adaptado de Illumina® Systems & Software (2006)..... 29

Figura 11: PCR em tempo real com corante SYBR Green. Fonte: qPCR Technical Guide. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com>..... 32

Figura 12: PCR em tempo real com sonda *Taqman* (Oliveira, 2009)..... 33

CAPÍTULO 1

Figure 1. Venn diagrams showing the number of genes with significantly altered expression levels ($P \leq 0.05$). Non-overlapping numbers represent the number of genes unique to a particular treatment (CHI or SA). Overlapping numbers represent the number of mutual genes between treatments..... 48

Figure 2. A comparative PageMan display of modulated pathways in sweet orange plants submitted to SA and CHI treatments. The fold changes of gene expression levels were input into PageMan and subjected to a Wilcoxon test. Pathways that were significantly up-regulated are colored in blue, and

those colored in red were significantly down-regulated. Pathways without significant changes are in white. The names of pathways of interest are indicated on the right panel. PS, photosynthesis; CHO, carbohydrate..... 52

Figure 3. Display of treatment-modulated stress responses in SA-treated plants (A) and CHI-treated plants (B). The fold change of gene expression levels were analyzed using MapMan. Small red and blue squares represent up- and down-regulated genes, respectively..... 54

Figure 4. MapMan screenshots showing the expression of treatments-modulated genes.(A) Genes associated with biotic stress, abiotic stress and transcriptional factors, (B) differential expression of hormone-related transcripts in sweet orange submitted to SA and CHI treatments. The fold changes are indicated as gradients between red (down-regulated) and blue (up-regulated). Each point represents a transcript. IAA, indole-3-acetic acid; ABA, abscisic acid; BA, benzyladenine; SA, salicylic acid; GA, gibberellic acid..... 63

CAPÍTULO 2

Figura 1: Procedimento para amostragem destrutiva. (A) As plantas foram fragmentadas em 4 partes de 10 cm cada a partir do ponto de inoculação. (B) Cada segmento foi processado com auxílio de uma furadeira. (C) Pó resultante para extração de DNA..... 86

Figura 2: Agregados epifíticos de células de *X. citri* marcadas com GFP, analisados 24 e 48 hpi, usando microscopia de fluorescência. Escala da barra em 10 µm 89

Figura 3: (A) Crescimento de *X. citri* em amostras foliares de laranja ‘Pera’ após o tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e (B) após o tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA). (C) Comparações entre o crescimento bacteriano nos tratamentos +CHI e +SA. As populações são expressas em log₁₀ ufc/ml. A multiplicação bacteriana foi monitorada por um período de 21 dias. Os pontos representam a média de três repetições e as barras representam o erro padrão. (*) Indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05). 91

Figura 4: (A) Desenvolvimento do cancro cítrico (incidência e severidade) em folhas de laranja ‘Pera’ após tratamento com (+CHI) ou HCl (-CHI) e (B) depois do tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA) aos 11 e 19 dpi. (C) Comparações entre o desenvolvimento do cancro em plantas +CHI e +SA. Os resultados da severidade são referentes as médias de três repetições com avaliação de nove folhas de cada repetição (total de 27 folhas avaliadas por tratamento). Barras representam média ± erro padrão. (*) Indica diferença significativa (P < 0,05) entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI; +SA vs. -SA; +CHI vs. +SA). (D) Sintomas do cancro em folhas de laranja ‘Pera’ submetidas aos diferentes tratamentos aos 19 dpi..... 93

Figura 5: Valores de expressão relativa normalizados com a expressão dos genes de referência (ciclofilina e ubiquitina) e amostras controle. (A) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ 48h após tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e 24 h após inoculação com *X. citri*, ambos normalizados com amostras

<p>tratadas com HCl sem desafio com a bactéria. (B) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ 24h após tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA) e 24 h após inoculação com <i>X. citri</i>, ambos normalizados com amostras tratadas com etanol sem desafio com a bactéria. (C) Comparações da expressão relativa em amostras +CHI e +SA. Barras representam média \pm erro padrão. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI; +SA vs. -SA; +CHI vs. +SA).....</p>	95
<p>Figura 6: Valores de expressão relativa normalizados com a expressão dos genes de referência (ciclofilina e ubiquitina) e amostras controle. (A) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ após tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e inoculados com <i>X. fastidiosa</i>, ambos normalizados com amostras tratadas com HCl sem desafio com a bactéria. (B) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ após tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA) e inoculados com <i>X. fastidiosa</i>, ambos normalizados com amostras tratadas com etanol sem desafio com a bactéria. (C) Comparações da expressão relativa em amostras +CHI e +SA. Barras representam média \pm erro padrão. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI; +SA vs. -SA; +CHI vs. +SA).....</p>	97
<p>Figura 7: Curva padrão para a quantificação de células de <i>X. fastidiosa</i> em amostras foliares de laranja ‘Pera’</p>	98
<p>Figura 8: (A) Crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em amostras foliares de laranja ‘Pera’ após o tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e (B) após o tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA). (C) Comparações entre o crescimento bacteriano nos tratamentos +CHI e +SA. Populações são expressas em como \log_{10} ufc/ml. A multiplicação bacteriana foi monitorada por um período de 21 dias. Os pontos representam a media de três repetições e as barras representam o erro padrão. (*) Indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).....</p>	99
<p>Figura 9: (A) Crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em amostras do caule de laranja ‘Pera’ após o tratamento com quitosana (+CHI), (B) HCl (-CHI), (C) ácido salicílico (+SA), (D) ou etanol (-SA)</p>	101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Mecanismos de resistência vegetal.....	11
---	----

CAPÍTULO 1

Table 1: Total number of transcripts obtained by RNA-seq for different treatments and number of transcripts (up- and down-regulated) with significantly altered expression levels ($P \leq 0.05$) after treatment with elicitors when compared to controls, according to Cufflink analysis.....	48
--	----

Table 2: Categorization of more up- and down-regulated genes after treatments...	50
---	----

Table 3: Defense response-related up- and down-regulated genes after SA-treatment ($P < 0.01$).....	57
--	----

Table 4: Defense response-related up- and down-regulated genes after CHI-treatment ($P < 0.01$).....	58
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Genes com as sequências de <i>primers</i> utilizadas no estudo com cancro cítrico..	83
--	----

Tabela 2: Genes com as sequências de <i>primers</i> utilizadas no estudo com CVC.....	87
--	----

Tabela 3: Incidência da CVC em plantas submetidas os diferentes tratamentos.....	101
---	-----

1 INTRODUÇÃO

Com uma produção anual em torno de 40 milhões de toneladas, o Brasil ocupa o terceiro lugar no *ranking* mundial da produção de frutas, atrás da China e da Índia. A citricultura é uma das mais importantes culturas no país, que se destaca como maior produtor de laranja e maior produtor e exportador de suco concentrado dessa fruta, o que representa 80 % da produção mundial (Food Agricultural Organization, 2011). A maior parte desse montante está no Estado de São Paulo que é responsável por 80 % da produção nacional (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011).

Entretanto, as doenças são fatores limitantes que ameaçam a expansão e a produtividade dos cultivos de citros. Dentre aquelas que afetam a citricultura, encontra-se o cancro cítrico e a clorose variegada dos citros (CVC), não só por causar prejuízos direto e imediato à planta, mas por reduzir a produtividade e qualidade dos frutos.

Ambas as doenças são causadas por bactérias, sendo o cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e a CVC por *Xylella fastidiosa*. A razão para os danos econômicos causados por estas bactérias é a ausência de uma efetiva medida de controle. Uma das medidas que pode contribuir no controle de doenças em plantas é a indução de resistência, sendo que essa ferramenta permite a utilização de genótipos suscetíveis e que possuem características agronômicas desejáveis, sem a alteração do genoma da planta e a utilização de defensivos agrícolas.

Provavelmente, a indução de resistência resulta em uma ação coordenada de muitos genes com funções diversas, as quais culminam com a defesa de plantas contra patógenos (Hammerschmidt, 1999).

A quitosana (CHI) e o ácido salicílico (SA) são compostos que têm demonstrado potencial na indução de respostas de defesa em plantas contra fitopatógenos (Hooft Van Huijsduijnen *et al.*, 1986; Raskin, 1992; Palva *et al.*, 1994; Majeti & Kumar, 2000; Babu *et al.*, 2003; He & Wolyn, 2005; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Cavalcanti *et al.*, 2007; Faoro *et al.*, 2008; Mandal & Mitra, 2009). Dessa forma, estudos funcionais de genes relacionados à defesa de citros poderão conduzir ao melhor entendimento dos mecanismos de defesa induzidos pelo tratamento prévio com eliciadores contra *X. citri* e *X. fastidiosa*. Portanto, este trabalho buscou determinar se plantas de laranja ‘Pera’ apresentam capacidade de responder a eliciadores (CHI e SA), sendo que esta resposta pode ser monitorada através da análise de expressão gênica. Assim, foi avaliada a expressão gênica global por RNA-seq em plantas de laranja ‘Pera’ sob o tratamento de eliciadores de resistência e expressão gênica específica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) em plantas submetidas aos eliciadores e desafiadas com os patógenos. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir com maior conhecimento sobre genes diferencialmente expressos em plantas de laranja ‘Pera’ submetidas ao tratamento com os eliciadores quitosana e ácido salicílico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cancro cítrico

O cancro cítrico é uma das doenças mais devastadoras da cultura do citros. Em todo o mundo gastam-se milhões de dólares com a prevenção, quarentenas, programas de erradicação e controle da doença (Das, 2003). São distinguidas três formas do cancro (A, B e C) causadas por vários patovares e variantes da bactéria *X. citri* subsp. *citri* (anteriormente denominada *X. axonopodis* pv. *citri*). O cancro A (forma asiática do cancro), causada por *X. citri*, é a mais comum. A forma B ou falso cancro é causado por *X. fusacan* subsp. *aurantifolii* e exibe lesões menores que a do cancro A, afetando plantas de limão na Argentina, Uruguai e Paraguai, sendo que lima mexicana, laranja azeda e pomelo também são suscetíveis. O cancro C, também causado por *X. fusacan* subsp. *aurantifolii*, foi detectado em lima mexicana no Brasil e exibe sintomas semelhantes ao cancro A (Das, 2003).

O cancro cítrico afeta variedades comerciais de citros em todo o mundo (Gottig *et al.*, 2010), sendo que todas as cultivares de citros são suscetíveis à *X. citri*. Toranjas, lima mexicana e limão são altamente suscetíveis, enquanto laranjas doce e azeda são moderadamente suscetíveis. As tangerinas, por outro lado, são consideradas moderadamente resistentes (Brunings & Gabriel, 2003).

A bactéria *X. citri* é gram-negativa e tem a forma de bastonete com um único flagelo. Pode formar biofilme constituído por uma matriz exopolissacarídica que se estabelece na superfície da planta e confere proteção à bactéria (Gottig *et al.*, 2010) (Figura 1).

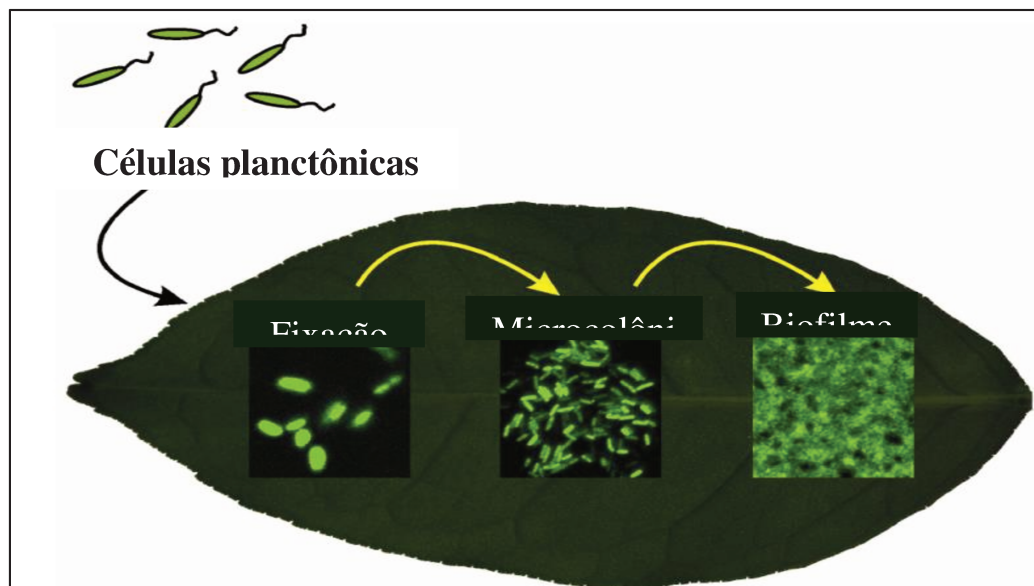


Figura 1: Estágios para formação do biofilme de *X. citri* na superfície de folhas de plantas cítricas. Adaptado de Gottig *et al.* (2010).

Estudos sugerem que a formação de biofilme durante a sobrevivência epifítica de *X. citri* desempenha papel importante para o desenvolvimento do cancro cítrico (Rigano *et al.*, 2007). Após estabelecimento na superfície da folha, a bactéria penetra e coloniza a folha principalmente através de estômatos e ferimentos, e então rompe a epiderme foliar devido a indução de hiperplasia celular (Gottwald, 1993, Gottig *et al.*, 2010). Todos os tecidos de citros estão sujeitos à infecção por *X. citri* durante a fase de crescimento da planta. Em condições favoráveis de temperatura entre 20 e 30 °C, a bactéria se multiplica nos espaços intercelulares e emerge a partir das aberturas estomáticas em menos de 5 dias para formar inóculo para o desenvolvimento da doença (Figura 2) (Graham *et al.*, 2004).

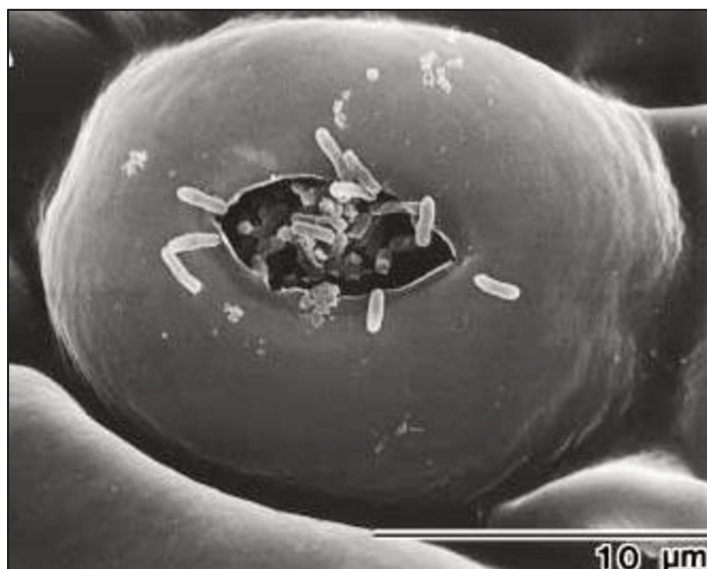


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a liberação de *X. citri*, a partir de abertura estomática 5 dias após a infiltração do mesófilo com 10^5 ufc/ml. Fonte: Graham *et al.* (2004).

Os sintomas foliares se iniciam com pequenas pontuações e tornam-se visíveis, formando pústulas, entre 7 e 10 dias após infecção na superfície abaxial e logo as lesões atingem a superfície adaxial da folha (Figura 3).



Figura 3: Sintomas foliares do cancro cítrico 10 dias após a infecção. (A) Superfície abaxial. (B) Superfície adaxial. Fonte: Gottwald (2000).

O controle do cancro cítrico consiste em sistemas integrados de práticas culturais e medidas fitossanitárias que envolvem na utilização de plantas resistentes, remoção de fontes de inóculo, sistemas de quebra-ventos e aplicações de cobre. Nos países em que há tentativas

de erradicação, são utilizados programas de quarentena e regulamentação para proibir a introdução de materiais de citros infectado, além do levantamento periódico no campo e destruição de árvores infectadas (Das, 2003). Tais medidas ainda não são satisfatórias, seja pelo custo elevado (como aplicações periódicas de compostos antimicrobianos), seja pela demora na sua disponibilidade ao produtor (como cultivares resistentes que são medidas a longo prazo). Dessa forma, torna-se imprescindível a implementação de alternativas que possam prevenir e/ou controlar o cancro cítrico e que venham somar às medidas atualmente utilizadas.

2.2 Clorose variegada dos citros

A clorose variegada dos citros (CVC) é causada pela bactéria *X. fastidiosa* a qual coloniza os vasos do xilema e afeta o transporte de água e nutrientes do sistema radicular para a copa. A bactéria é transmitida por cigarrinhas, por borbulhas e mudas infectadas e afeta igualmente todas as variedades de laranja doce. As tangerinas comerciais e seus híbridos com laranja são resistentes (Laranjeira, 1997; Donadio & Moreira, 1998).

É possível distinguir dois níveis de contaminação da doença: 1 (folhas sintomáticas) e 2 (folhas e frutos sintomáticos) (Figura 4). Os sintomas manifestam-se inicialmente nas folhas, com manchas amarelas na superfície adaxial, que podem evoluir para lesões de cor palha na superfície abaxial e avançam para os frutos. Em estágios mais avançados a planta perde as folhas, os galhos podem secar e os frutos apresentam redução de tamanho (Yamamoto *et al.*, 2009).

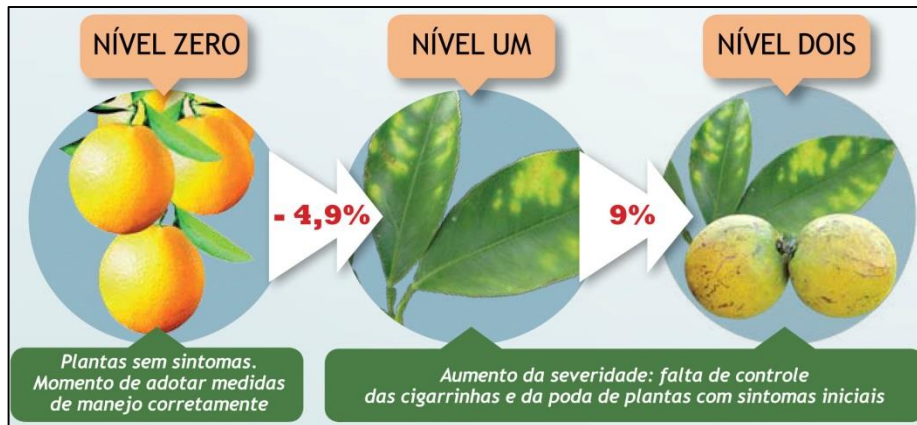


Figura 4: Níveis de contaminação da clorose variegada dos citros (CVC). Fonte: Yamamoto *et al.* (2009).

Mais de 40 % das plantas dos pomares do Estado de São Paulo, maior produtor de citros no Brasil, estão sintomáticas para a CVC, sendo que a região Norte é a mais afetada (Figura 5). Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura (Yamamoto *et al.*, 2009), o aumento da doença comprova que muitos citricultores deixaram de adotar as medidas recomendadas para prevenir a doença (monitoramento das cigarrinhas, inspeções dos pomares, poda de ramos sintomáticos ou a eliminação de plantas doentes).

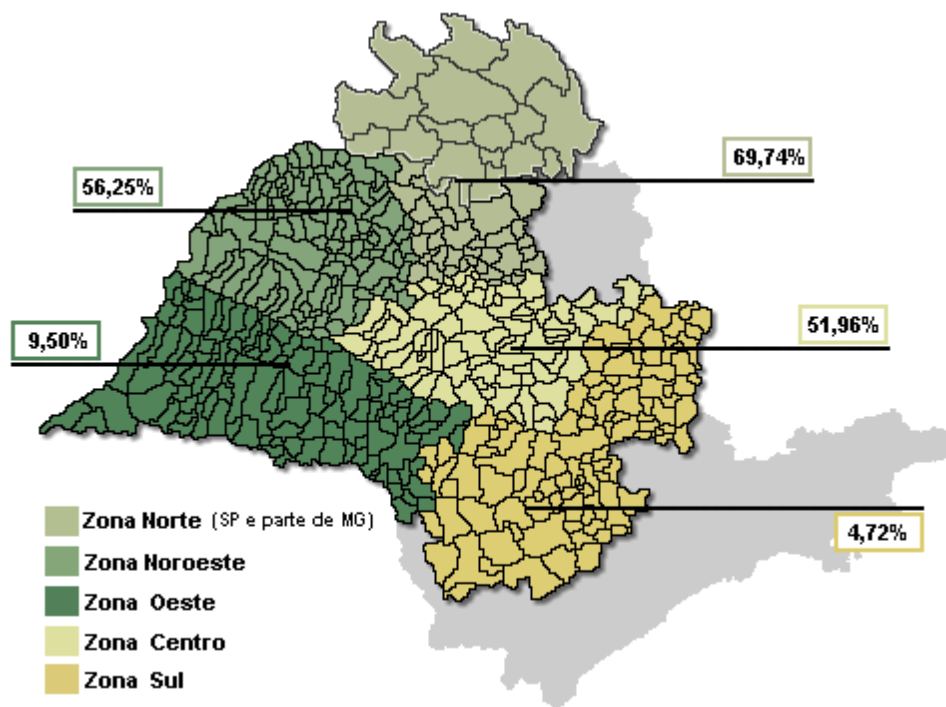


Figura 5: Porcentagem de plantas apresentando sintomas da CVC nas diferentes regiões do Estado de São Paulo e parte do Triângulo mineiro, considerando o levantamento realizado pelo Fundecitrus meses antes da colheita das quatro principais variedades de laranja (Pêra, Rio, Valência, Natal e Hamlin). Fonte: <http://www.fundecitrus.com.br>.

O mecanismo de patogenicidade de *X. fastidiosa* difere do de outros fitopatógenos, uma vez que ela não apresenta genes que conferem especificidade planta-patógeno (*avr* e/ou *hrp*). A bactéria é injetada pela cigarrinha diretamente nos vasos do xilema, aos quais se adere e coloniza. O processo todo leva à formação de biofilme, sendo esse considerado o principal mecanismo de patogenicidade desse microrganismo (De Souza *et al.*, 2004; Osiro *et al.*, 2004).

Em condições naturais, a CVC é essencialmente uma doença de laranja doce (*C. sinensis* L. Osb), a espécie de citros mais cultivada no mundo. Entretanto, há um amplo espectro de resistência à suscetibilidade para CVC dentro do gênero *Citrus*. Análise de mais de 200 acessos de laranja doce não detectou nenhuma variedade resistente ou tolerante a *X. fastidiosa* (Coletta-Filho *et al.*, 2007). Entre as tangerinas, a Poncan é a variedade

comercialmente predominante no Brasil, sendo esta variedade é considerada resistente, uma vez que nenhum sintoma ou dano econômico ocorrem como consequência da infecção por *X. fastidiosa*. Por esta razão, esta espécie foi incluída nos programas de melhoramento com foco na resistência a CVC no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas (Coletta-Filho *et al.*, 2007) e usada como fonte para identificação de genes com potencial para uma possível produção de plantas transgênicas resistentes a CVC (De Souza *et al.*, 2007).

O manejo da doença consiste em medidas conjuntas como o uso de mudas sadias, controle da cigarrinha e poda de ramos sintomáticos em estágio inicial de infecção ou eliminação de plantas doentes em estágio intermediário à terminal. No que tange ao controle genético, as tangerinas e seus híbridos, como tangores e tangelos, podem apresentar sintomas em condições de campo, embora com intensidades menores do que nas laranjas doces. Em lima ácida Tahiti não foram detectados sintomas, bem como bactérias em seus tecidos (Santos Filho *et al.*, 2010).

2.3 Mecanismos gerais da resistência em plantas

Cada planta é afetada por, aproximadamente, 100 tipos diferentes de fungos, bactérias, vírus e nematoides e, embora, elas possam sofrer danos decorrentes destes ataques, muitas sobrevivem e conseguem apresentar bom crescimento e produção (Agrios, 2004). A sobrevivência se deve ao fato de as plantas conseguirem se defender dos patógenos por uma combinação de fatores, os quais envolvem características estruturais que atuam como barreiras físicas e inibem a penetração do patógeno ou reações bioquímicas, as quais produzem substâncias tóxicas aos patógenos criando condições que inibem o crescimento destes dentro das plantas (Agrios, 2004). Neste sentido, pode-se definir a resistência de uma

planta como a capacidade que ela apresenta de atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade de um determinado patógeno em seus tecidos (Goodman *et al.*, 1986).

Uma série de mecanismos bioquímicos e estruturais, pré- e pós-formados em relação à presença do patógeno, atuam de forma dinâmica, coordenada e adequada no momento e local apropriados para evitar a proliferação do microrganismo patogênico (Pascholati & Leite, 1995). Segundo Somssich e Hahlbrock (1998), esse processo tem início com o reconhecimento de moléculas exógenas do patógeno (fitotoxinas, polissacarídeos extracelulares, enzimas degradadoras da parede celular vegetal, etc.) pelo hospedeiro, continua com mecanismos de transdução de sinais, os quais resultam em uma reprogramação do metabolismo da planta com a alteração na expressão gênica.

Os mecanismos de defesa pré-formados envolvem substâncias presentes nas plantas em altas concentrações antes do contato com o patógeno ou que podem ser convertidas em substâncias tóxicas com o início da infecção. Já os mecanismos pós-formados são aqueles em que as substâncias encontram-se ausentes ou em concentrações muito baixas antes da infecção, mas que são ativadas em resposta ao ataque do patógeno ou produzidas a partir de um precursor (Tabela 1) (Pascholati & Leite, 1994).

A ativação de mecanismos de defesa é decorrente de vias de sinalização e envolvem importantes mensageiros secundários presentes nas plantas. Quando há uma infecção local por bactéria, fungo ou vírus muitas espécies de plantas são induzidas a sintetizar um sinal no sítio de infecção que pode se espalhar através da planta. A amplificação desses sinais se dá por mensageiros secundários como SA, ácido jasmônico e etileno, os quais ativam fatores de transcrição de importantes genes de defesa, culminando com a resistência sistêmica adquirida (SAR) (Grant & Lamb, 2006).

Tabela 1: Mecanismos de resistência vegetal*

Mecanismos de resistência	Mecanismos estruturais	Mecanismos bioquímicos
Pré-formados	Cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores	Fenóis, alcaloides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, fototoxinas, quitinases e β -1,3-glucanases.
Pós-formados	Papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina e glicina, camadas de cortiça, camadas de abscisão, tiloses.	Fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies ativas de oxigênio.

*Adaptado de Pascholati e Leite (1994).

O SA é um membro do grupo de compostos fenólicos sintetizados pelas plantas e que regula vários aspectos do seu crescimento e desenvolvimento, bem como desempenha papel chave na sinalização da termogênese e resistência a doenças (Raskin, 1992). Duas vias distintas levam à formação do SA: a via do isocorismato e a via da fenilalanina amônia-liase, sendo que ambas originam-se a partir do corismato, produto final da via do shiquimato. Uma vez formado, o SA pode sofrer várias modificações como glicolisação, metilação, hidroxilação, entre outros. A metilação é realizada pela enzima ácido benzoico/SA carboxil metiltransferase 1 (BSMT1), cuja expressão é induzida em folhas em resposta a estresse biótico ou abiótico e leva à formação do metil salicilato (MeSA). Estudos indicam que a forma metilada do SA funciona como um sinal móvel, o qual é transmitido via floema de forma sistêmica para as folhas, induzindo a SAR (Chen *et al.*, 2003; Dempsey *et al.*, 2011).

A indução e o acúmulo do SA resultam na translocação de monômeros de *NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1 (NPR1)*, um sinal crítico de SA, do citoplasma da célula para dentro do núcleo. As proteínas NPR1, por sua vez, interagem com fatores de transcrição *TGA* possibilitando a expressão de genes de defesa, como os genes

PR, e o estabelecimento da SAR. O SA induz a expressão de fatores de transcrição *WRKY*, os quais também estão implicados em respostas de defesa (Vlot *et al.*, 2009) (Figura 6). As proteínas *WRKY* formam uma grande família de fatores de transcrição que se ligam em elementos W-box e têm o potencial para regular diferencialmente a expressão de uma variedade de genes alvos (Eulgem *et al.*, 2000). Os fatores *WRKY* podem se associar com MAP-quinases no núcleo, e cascatas de MAP-quinases constituem componentes chaves na sinalização de defesa de planta. Os *WRKY* parecem desempenhar papel regulatório em uma variedade de respostas contra estresses bióticos e abióticos (Chujo *et al.*, 2008).

O SA pode atuar sozinho em respostas de defesa ou em conjunto com outros sinalizadores como etileno, ácido jasmônico ou ácido abscísico (Kunkel & Brooks, 2002).

O etileno também desempenha um papel crítico na ativação de respostas de defesa das plantas. O reconhecimento específico de moléculas derivadas de patógenos ou de ferimentos, como oligossacarídeos da parede celular de plantas e fatores de virulência bacteriana, constitui o primeiro estímulo que leva à produção de etileno (Avni *et al.*, 1994; Nimchuk *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005; Zhao *et al.*, 2005a). Este hormônio é produzido a partir da metionina, a qual é convertida em S-AdoMet pela ação da S-AdoMet sintase (SAM sintase; Peleman *et al.*, 1989). Posteriormente, a S-AdoMet é convertida em ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ACS sintase, reação esta considerada o passo limitante na produção do etileno. A conversão final de ACC a etileno é conduzida pela enzima ACC oxidase (ACO) (Adie *et al.*, 2007).

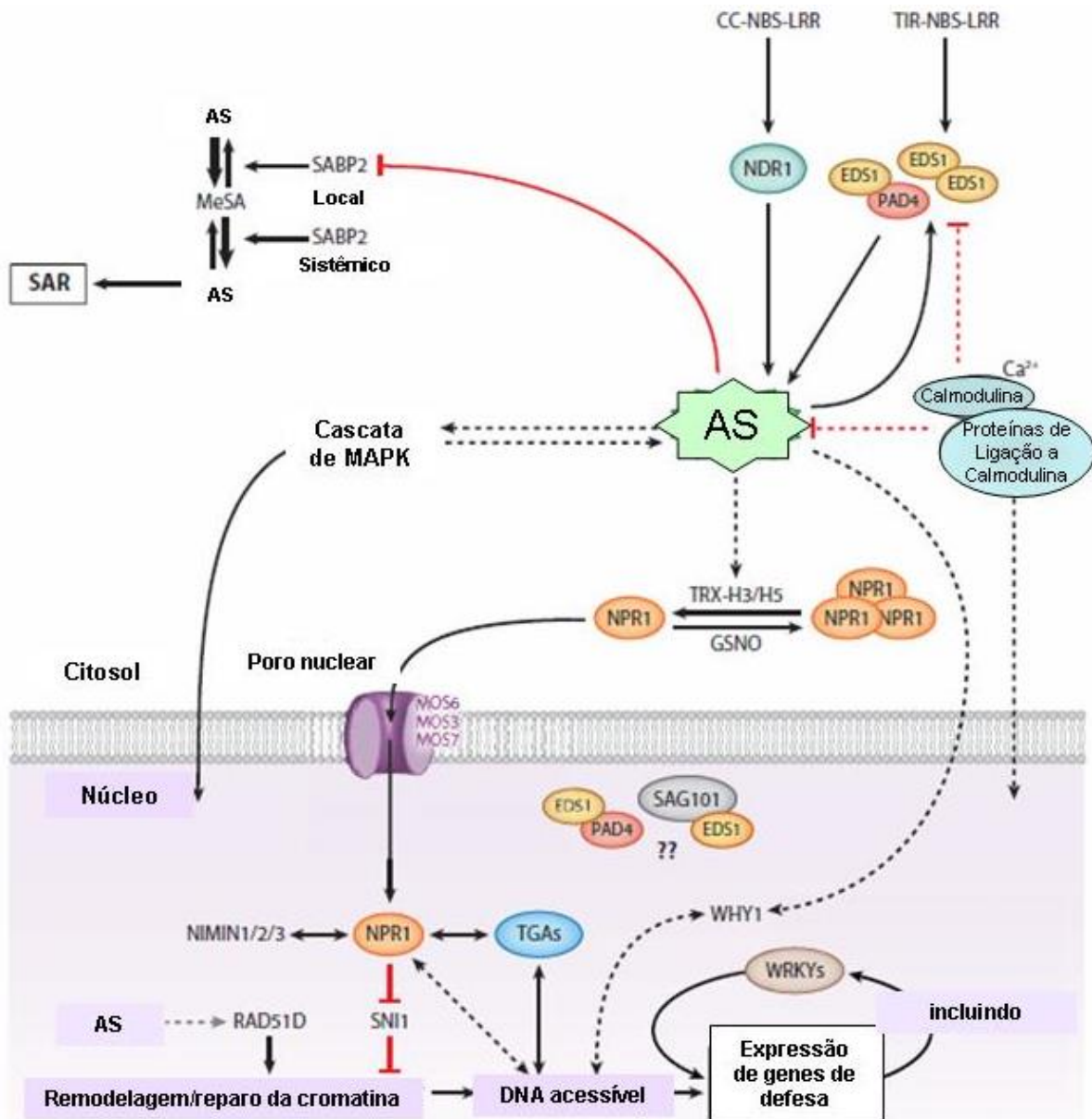


Figura 6: Resumo esquemático da sinalização do ácido salicílico (SA) na resistência de plantas contra patógenos. As setas indicam a ativação de atividades enzimáticas, indução ou acúmulo de compostos ou gene de transcrições ou, no caso de NPR1, movimento do monômero NPR1 do citosol para o núcleo. As linhas vermelhas indicam repressão de atividade enzimática ou acúmulo de compostos (Adaptado de Vlot *et al.*, 2009). MeSA = metil salicilato; SAR = resistência sistêmica adquirida; TGA = fator de transcrição; SABP2 = proteína de ligação ao ácido salicílico.

A regulação transcricional do etileno envolve os elementos de resposta ao etileno (ethylene responsive elements - *ERE*) que se mostraram necessários e, em alguns casos, suficientes para a regulação por etileno de genes *PR* em diferentes espécies de plantas

(Fujimoto *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2000; Chakravarthy *et al.*, 2003). Associado aos *ERE* encontram-se as proteínas de ligação a elementos de resposta ao etileno (ethylene-responsive-element-binding-proteins EREBPs ou ERFs), uma das maiores subfamílias de fatores de transcrição em plantas. Vários estudos têm sugerido o envolvimento dos ERF na sinalização por etileno e/ou em defesas ativadas por etileno, como ativação de genes *PRs* (Lorenzo *et al.*, 2003; Mcgrath *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Outros fatores importantes são o *EIN3* (ethylene-insensitive3) e *EIL* (EIN3-LIKE), sendo que ambos requeridos para respostas ao etileno (Chao *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2004) (Figura 7).

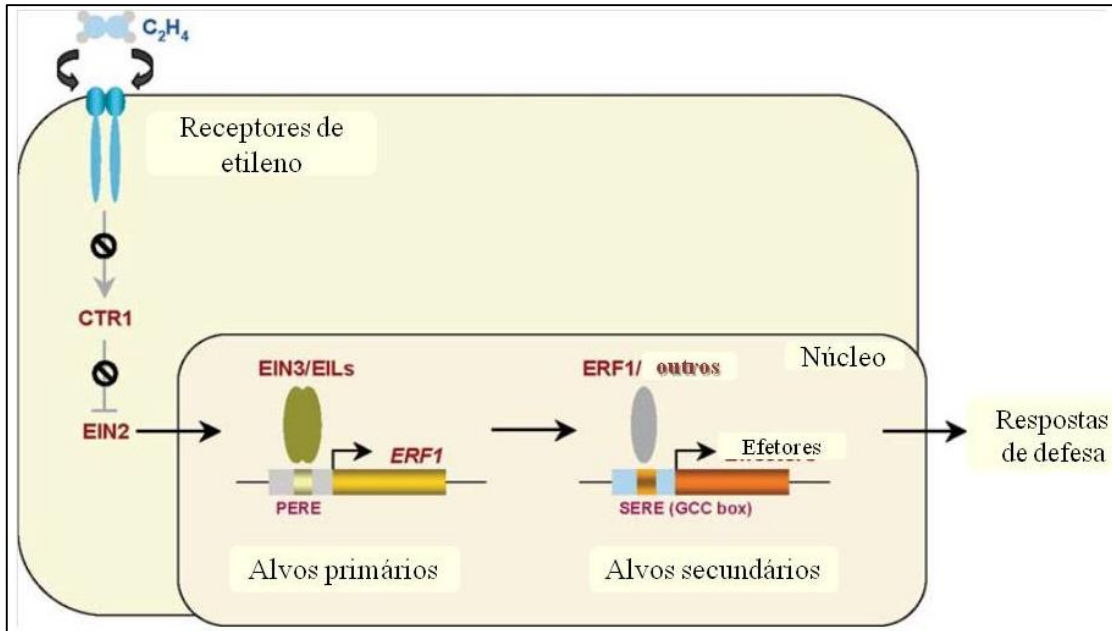


Figura 7: Modelo esquemático da via de sinalização do gás etileno. A ligação do etileno (C_2H_4) leva a inativação de seus receptores e, por sua vez, a inativação de CTR1 quinase. Isto permite que EIN2 regule positivamente a família dos fatores de transcrição EIN3/EILs localizados no núcleo. EIN3 direciona a expressão de ERF1 e outros alvos primários por se ligar diretamente, como um dímero, aos elementos de resposta ao etileno primários (PERE) presentes em seus promotores. ERF1, e provavelmente outros ERFs, ligam-se a elementos de resposta ao etileno secundários (SERE/GCC box) e ativa a expressão de genes efetores de defesa, como os genes *PRs* (Adaptado de Adie *et al.*, 2007).

Dentre as respostas de defesa mediadas pelo etileno encontram-se a oclusão do xilema com a produção de gel que bloqueia o vaso impedindo a infecção por patógenos vasculares,

insolubilização de proteínas estruturais, produção de fitoalexinas e, como já mencionado, a indução de proteínas PRs (Adie *et al.*, 2007). Conforme já salientado, tais respostas não resultam de uma via de defesa isolada, mas são baseadas em interações entre diferentes vias de sinalização (Figura 8).

O etileno e o ácido jasmônico atuam sinergicamente na ativação de respostas a patógenos expressando PR3 (quitinases), PR4 (hevein-like proteins), PR5 (osmotina), e PDF1.2 (plant defensin 1.2) (Thomma *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2003). O ácido jasmônico, que também pertence à classe de moléculas sinalizadoras e hormônio de plantas, é derivado de ácidos graxos poliinsaturados pela via octadecanoides, tendo como precursor o ácido linolênico e a participação de importantes enzimas como lipoxigenases (LOX), aleno oxidase (AOS) e aleno oxidase ciclase (AOC) (Figura 9). Semelhante a outros hormônios, o ácido jasmônico e seus derivados oxilipinas (coletivamente chamados de jasmonatos) exibem um amplo espectro de atividades fisiológicas atuando na germinação de sementes, desenvolvimento reprodutivo e atuando como moléculas sinalizadoras na defesa de plantas, particularmente contra insetos herbívoros e patógenos necrotróficos (Creelman & Mullet, 1997; Schaller & Stintzi, 2008; Koo & Howe, 2009).

A via do ácido jasmônico envolve vários eventos de transduções de sinais: a percepção do ferimento ou estímulo por estresse e transdução do sinal local e sistemicamente; a percepção deste sinal e indução da biossíntese de ácido jasmônico; a percepção do ácido jasmônico e indução de respostas; e finalmente, a integração da sinalização de ácido jasmônico com outras vias de sinalização (SA, etileno e outras) (Turner *et al.*, 2002).

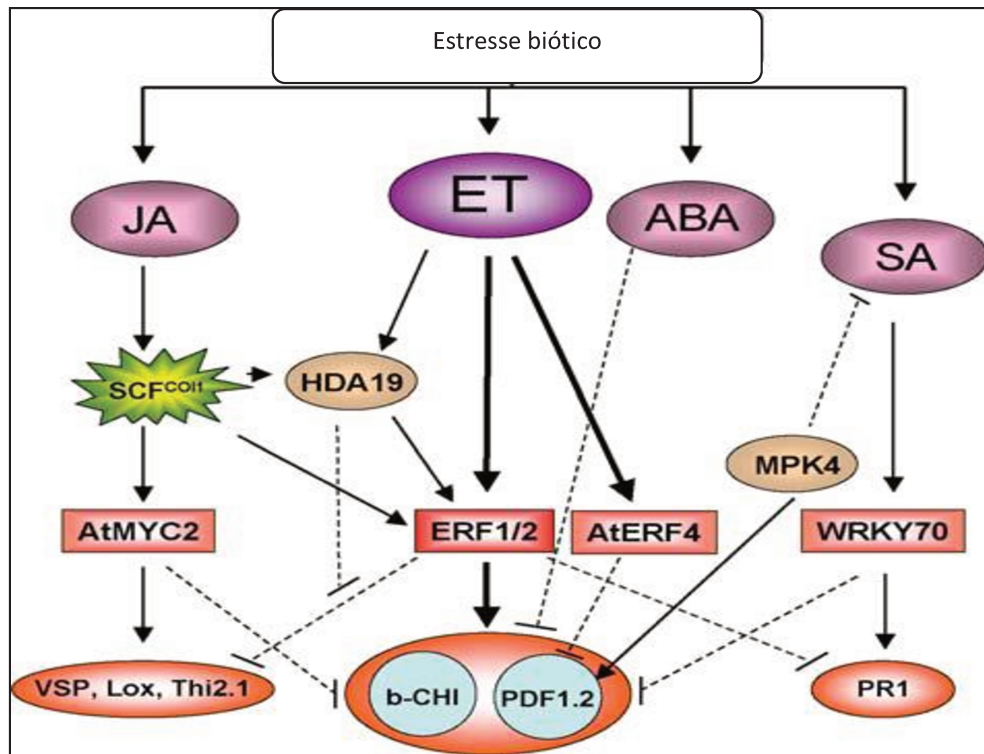


Figura 8: *Network* da resposta de defesa de plantas envolvendo as vias do etileno (ET), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (SA) e ácido abscísico (ABA). O estresse biótico (ataque de patógeno e pragas) estimula a síntese destes hormônios. Após o estímulo, a indução assimétrica destas vias e sua interação permite que a planta ajuste a sua resposta de defesa a uma ameaça específica. Em geral, ET e JA cooperam, por meio de *ERF1*, na indução de defesas contra agentes patogênicos necrotróficos, enquanto são reprimidos pelo ferimento ou em resposta a organismos patogênicos biotróficos. Por outro lado, SA induz defesas contra agentes patogênicos biotrófico por meio do fator de transcrição *WRKY70* e é reprimido em defesas contra agentes patogênicos necrotróficos. As análises de microarranjos do genoma inteiro estão mostrando a complexidade das interações hormonais na ativação de respostas de defesa, sendo que este modelo de rede representa apenas uma visão simples. As setas indicam indução ou interação positiva, enquanto as linhas tracejadas indicam repressão ou interação negativa. Setas mais grossas representam a via principal do ET (Adaptado de Adie *et al.*, 2007).

Após a síntese do ácido jasmônico, o mesmo pode ser conjugado com aminoácidos pela ação da enzima ácido jasmônico sintase JAR1, como a isoleucina, formando JA-Ile (Fonseca *et al.*, 2009). A proteína F-box COL1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) funciona como um receptor para JA-Ile no complexo F-box SCF (E3ubiquitin-ligase Skip-Cullin- F-box complex SCF COI1) e quando ocorre a ligação da proteína ao receptor, ocorre a

degradação da proteína repressora transcricional JAZ (JASMONATE ZIM-domain) via proteossomo, estimulando a ativação de um grande número de genes responsivos ao ácido jasmônico (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Memelink, 2009). O ácido jasmônico induz a biossíntese de diversas classes de metabólitos secundários em diferentes espécies. O *ORCA3* é um fator de transcrição *APETALA2* (AP2) responsivo ao ácido jasmônico em *Catharanthus roseus* e sua superexpressão resulta no aumento da expressão de vários genes da biossíntese de metabólitos e no acúmulo de alcalóides (Van Der Fits & Memelink, 2000).

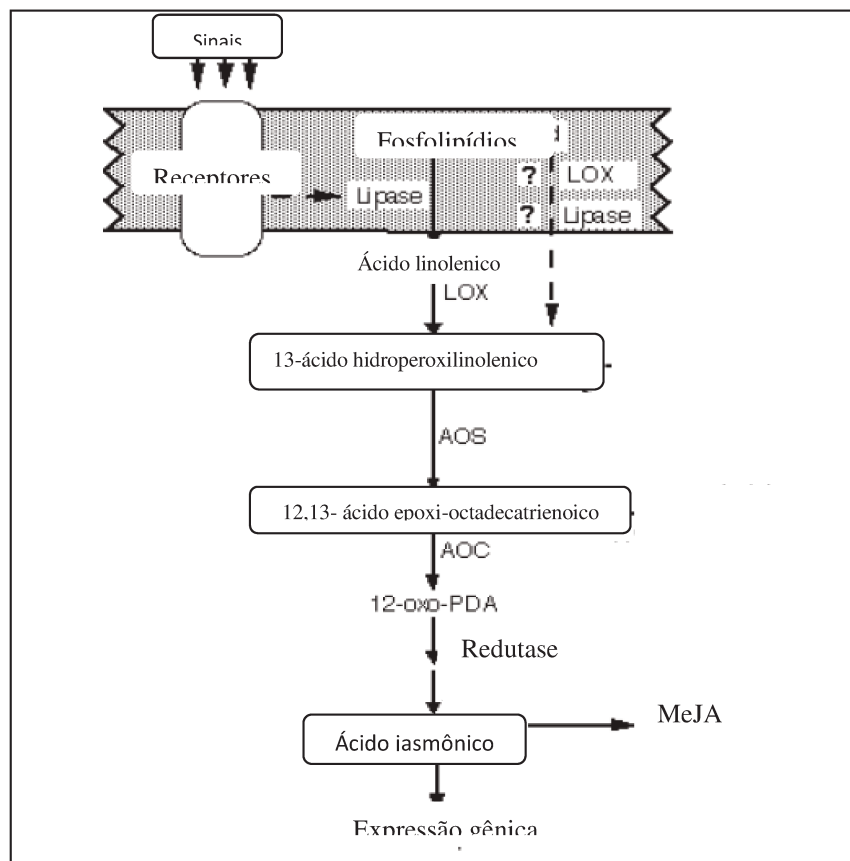


Figura 9: Via biossintética do ácido jasmônico. Os sinais/ eliciadores interagem com receptores de membrana fazendo com que ocorra a produção do 13-ácido hidroperoxilinenico, a partir de ácido linolênico pela atuação de lipases e pela lipoxigenase (LOX). O 13-ácido hidroperoxilinenico sofre ação da aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC) e é convertido em ácido jasmônico, o qual pode atuar modulando a expressão de genes ou ser catabolizado formando metil jasmonato (Adaptado de Creelman & Mullet, 1995).

O SA pode atuar antagonicamente em respostas mediadas por ácido jasmônico, em contrapartida, o etileno e ácido abscísico co-regulam as diferentes respostas do ácido jasmônico (Adie *et al.*, 2007; Kazan & Manners, 2008; Koornneef *et al.*, 2008; Verhage *et al.*, 2010). O ácido jasmônico e etileno atuam na expressão de *PDF1.2* e em dois membros da família *AP2/ERF* (APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR), o *ERF1* e *ORA59* (Lorenzo *et al.*, 2003; Pre *et al.*, 2008).

2.4 Indução de resistência em plantas por eliciadores

As doenças das plantas representam um grande problema para a agricultura e por mais que se tenha estudado sobre as medidas de controle, elas ainda causam muitas preocupações. Grande parte deste problema reside na adaptabilidade genética que os patógenos apresentam, desenvolvendo resistência aos agroquímicos e burlando a resistência das novas variedades que são lançadas no mercado. Considerando tais entraves para o manejo de doenças, é importante que medidas adicionais sejam implementadas a fim de contribuir com a obtenção de níveis satisfatórios de controle dessas doenças.

Dessa forma, partindo do pressuposto que o manejo integrado de doenças em plantas preconiza a utilização do aparato tecnológico disponível para reduzir os efeitos deletérios de patógenos, uma estratégia que pode trazer grandes contribuições é a indução de resistência (IR) em plantas. Essa alternativa permite a utilização de genótipos suscetíveis e que possuem características agronômicas desejáveis, sem a alteração do genoma da planta e a utilização de defensivos agrícolas. É um método de ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta através de tratamentos prévios envolvendo eliciadores. As respostas podem culminar com a formação de barreiras estruturais, como lignificação e síntese de calose, inibindo proliferação dos patógenos nos tecidos das plantas (El Ghaouth & Kuc, 2001), além de

respostas bioquímicas como acúmulo de compostos fenólicos, fitoalexinas e várias proteínas de defesa (Brisset *et al.*, 2001; Baysal *et al.*, 2003; Cavalcanti *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006). Neste sentido, a IR pode levar uma relação compatível entre planta e patógeno à incompatibilidade (Labanca, 2002) e vem se tornando importante em programas de manejo de doenças (Pascholati & Cia, 2005).

Os compostos indutores de resistência são usualmente efetores ou moduladores da resposta da planta, muitos deles atuando em complexas cascatas de sinais. Diferentes compostos já foram avaliados, dentre eles o Bion® (Syngenta), Messenger® (Eden Bioscience), Milsana® (KHH BioSci Inc), Oxycom® (Redox Chemicals), Phytogard® (IntraChem BIO), Serenade® (Agrquest), Neemazal® (EID-Parry), Oryzemat® (Biosafe), Ecolife 40® (Quinabra), além de cogumelos® (*Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*), rizobactérias e extratos de plantas, os quais foram pesquisados em diferentes culturas (Chen *et al.*, 2000; Almeida & Coelho, 2006; Franzener *et al.*, 2007; Di Piero, 2004).

A IR, provavelmente, resulta em uma ação coordenada de muitos genes com funções diversas que culmina com a defesa de plantas contra patógenos. A regulação transcricional de genes relacionados com a defesa é um mecanismo importante para a indução de resistência. Em plantas de arroz, a expressão de *WRKY* foi induzida por eliciadores bióticos, resultando no aumento da resistência contra a bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Liu *et al.*, 2007). Em *Arabidopsis thaliana*, 49 dos 72 genes *WRKY* testados responderam à infecção bacteriana e ao tratamento com SA (Dong *et al.*, 2003). O tratamento de *Populus tremula* com CHI e SA promoveu um aumento dos níveis de transcrito do fator de transcrição *PtWRKY23* (Levéé *et al.*, 2009). Os autores sugeriram, através da análise do transcriptoma, que o fator de transcrição *PtWRKY23* poderia afetar o metabolismo da parede celular da

planta, o que foi confirmado pelas alterações na atividade de peroxidases, no acúmulo de H₂O₂ e na deposição de lignina.

O estabelecimento da indução de resistência pode estar associada ao aumento da biossíntese de SA endógeno e a expressão de genes relacionados à patogênese. Em algumas plantas, como *A. thaliana*, a indução de resistência requer a função do gene *NPRI* (Delaney *et al.*, 1995). Esse gene é expresso em baixos níveis em plantas saudáveis, porém quando as plantas são infectadas com patógenos ou tratadas com SA e seus análogos, a expressão do *NPRI* é induzida ao dobro ou triplo (Cao *et al.*, 1997). Yu *et al.* (2001) relataram a presença de sequências W-box no promotor do gene *NPR*, as quais são reconhecidas especificamente por proteínas *WRKY* induzidas por patógenos ou SA. As análises indicaram que as sequências W-box são necessárias para a indução da transcrição do *NPRI* e ativação de respostas de defesa da planta mediadas por *NPRI*. Os resultados dos pesquisadores sugeriram que certas proteínas *WRKY* atuam *upstream* do *NPRI* e regulam positivamente a sua expressão para ativação da resposta de defesa da planta.

A IR pode culminar também com a expressão de genes relacionados à patogênese (*PRs*). Até 2006, 17 famílias dessas proteínas foram reconhecidas e caracterizadas, algumas com funções desconhecidas (Van Loon *et al.*, 2006). As proteínas *PRs* apresentam propriedades físico-químicas típicas, as quais permitem distingui-las das demais proteínas: são estáveis em pH ácido e altas temperaturas, e resistentes à ação de enzimas proteolíticas, características estas que possibilitam sua existência nos locais onde ocorrem como vacúolo, parede celular ou espaços intercelulares (Stintzi *et al.*, 1993).

Em fumo, o nível de expressão do mRNA da β -1-3 glucanase (*PR-2*) foi 11 vezes maior 8 h após o tratamento de plantas com oligoquitosana (obtida por hidrólise enzimática

da CHI), comparadas ao controle, evidenciando a associação dessa enzima na defesa da planta contra o TMV. A porcentagem de inibição das lesões virais foi de 31,16%, considerada significativa em relação ao controle (Yafei *et al.*, 2009). Campos *et al.* (2008) observaram que quando plantas de feijão-comum foram induzidas com uma raça avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum* e inoculadas com raça virulenta, houve aumento na atividade de β -1-3 glucanases, sendo esse aumento altamente correlacionado com a redução da severidade da antracnose. A IR em tomate com aplicação exógena de SA contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* esteve associada a uma ativação de peroxidases (PR-9) que foi 4,7 e 3,3 vezes maior em plantas tratadas com SA nas raízes e aplicação foliar, respectivamente, comparadas ao controle. O composto reduziu significativamente o escurecimento vascular e o amarelecimento foliar causado pelo patógeno (Mandal *et al.*, 2009). Cavalcanti *et al.* (2007) observaram que a suspensão aquosa do micélio de *Moniliophthora perniciosa*, contendo CHI, induziu a resistência em plantas de tomate contra *Xanthomonas vesicatoria*, aumentando a atividade da enzima quitinase (PR-4).

Em frutíferas, a indução de resistência tem mostrado grande potencial. O Agro-Mos[®] (produto à base de *Saccharomyces cerevisiae*) e o fosfito de potássio+Ecolife[®] (formulação comercial originado de biomassa cítrica), quando aplicados em videiras, promoveram o controle do míldio em mais de 87 % e aumento na produtividade média das plantas (Gomes, 2009). Em plantas de cacau, o uso do Acibenzolar-S-metílico (ASM - um análogo do SA) promoveu uma redução de 55,4 % na severidade da murcha de *Verticillium* (*Verticillium dahliae*) e 84,5 % na incidência da vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*). Além disso, um aumento na atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e compostos fenólicos foi observado em algumas das cultivares testadas (Resende *et al.*, 2002). O uso do ASM e da

proteína harpina em frutos de pêsegos aumentou a resistência a *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão-parda, com redução da área lesionada e aumento nos teores de proteínas totais, açúcares redutores e totais, fenóis, além da atividade da fenilalanina amônia-liase (Danner *et al.*, 2008). Em frutos de laranja, eliciadores presentes em extratos aquosos de *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* promoveram uma inibição do aparecimento de novas lesões causadas por *Guignardia citricarpa*, responsável pela mancha-preta em frutos cítricos, fato esse que pode estar associado com ativação de mecanismos de defesa nos frutos (Toffano, 2005).

Dois compostos que vem sendo amplamente pesquisados na interação planta-patógeno e até o momento pouco se sabe sobre seus efeitos na cultura dos citros, são a quitosana (CHI) e o ácido salicílico (SA).

2.4.1 Quitosana (CHI) como indutor de resistência

A CHI é um polissacarídeo obtido do exoesqueleto de crustáceos, pela desacetilação alcalina da quitina, ou da parede celular de alguns fungos. É constituído por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose (glucosamina) e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose (acetilglucosamina) unidas por ligações glicosídicas β 1→4 (Majeti & Kumar, 2000). O polissacarídeo é versátil com duplo efeito: (i) no controle direto de patógenos, portanto, tendo um efeito antimicrobiano e (ii) na ativação de vários mecanismos de defesa da planta durante a interação patógeno-hospedeiro, o que aumenta a tolerância a uma gama de patógenos (Bautista-Baños *et al.*, 2006).

As respostas de defesa desencadeadas pela CHI envolvem reação de hipersensibilidade, deposição de calose, lignificação, síntese de ácido abscísico, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (Cavalcanti *et al.*, 2007; Faoro *et al.*, 2008; Iriti

et al., 2008). Além disso, a CHI pode ativar genes da via das MAP-quinases em várias espécies de plantas (Xiangyang *et al.*, 2004 Lizama *et al.*, 2007).

Evidências experimentais têm demonstrado a capacidade da CHI em modificar o metabolismo de defesa vegetal em diversas culturas. Plantas de feijão caupi submetidas ao tratamento indutivo com a CHI apresentaram uma redução na severidade da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* diferindo significativamente de plantas controle (Rodrigues *et al.*, 2006). Em pepino, houve inibição no desenvolvimento do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, pelo tratamento prévio com CHI (Ben-Shalom *et al.*, 2003). Em plantas de fumo, a aplicação foliar de CHI conferiu proteção de 55% contra *Phytophthora parasitica nicotianae* (Falcón *et al.*, 2008). Bhaskara Reddy *et al.* (1999) mostraram que no patossistema trigo-*Fusarium graminearum*, a síntese de ácidos fenólicos foi estimulada pelo tratamento prévio com CHI. Em *A. thaliana*, a CHI também induziu importantes fatores transcricionais da sinalização do etileno, como o *ERF*, além de aumentar a expressão de moduladores da via de jasmonato, como *WRKY40* (Povero *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre o efeito da CHI em bacterioses de plantas. No patossistema tomate/*Xanthomonas vesicatoria*, frações heterogêneas de CHI, obtidas do micélio de *Moniliophthora perniciosa* e aplicadas em plantas 4 dias antes da inoculação, conferiram proteção de 42,7% em relação ao controle, com um aumento na atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, e na lignificação. Entretanto a CHI não apresentou efeito direto sobre a bactéria (Cavalcanti *et al.*, 2007). Em 2008 Li *et al.* demonstraram a atividade *in vitro* da CHI obtida a partir de carapaças de crustáceos sobre *X. arboricola* pv. *poinsettiicola* e *X. axonopodis* pv. *poinsettiicola*, causadoras da mancha bacteriana da poinsetia. Na cultura do tomateiro, a CHI se mostrou eficiente na indução de mecanismos de defesa contra a mancha

bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, e também apresentando um efeito antimicrobiano contra esta bactéria (Coqueiro *et al.*, 2011).

Em frutíferas, grande parte das pesquisas com CHI tem se destinado ao tratamento pós-colheita, por conta da habilidade do polissacarídeo em formar uma cobertura semipermeável modificando a atmosfera e diminuindo as perdas por transpiração e desidratação e aumento do tempo de prateleira dos frutos. Além disso, pode levar à indução de resistência nos frutos. A CHI reduziu a severidade da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (Cia, 2005) e do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em uvas (Romanazzi *et al.*, 2002). Rappussi *et al.* (2009) verificaram que a CHI inibiu o desenvolvimento de novas lesões da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) em laranja e promoveu aumento na atividade enzimática da quitinase, β -1,3- glucanase, peroxidase e polifenoloxidase. Adicionalmente, o polissacarídeo inibiu o crescimento micelial e afetou a germinação de conídios e formação de apressórios por *G. citricarpa*.

2.4.2 Ácido salicílico (SA) como indutor de resistência

O SA, pertencente ao grupo dos compostos fenólicos, tem um importante papel como sinalizador envolvido na defesa de plantas contra patógenos (Mauch-Mani & Métraux, 1998). A biossíntese de SA pode culminar com a expressão de genes de resistência (Figura 6).

Durante a infecção, o SA se acumula no sítio de penetração do patógeno, atuando na reação de hipersensibilidade, e também se distribui em outras partes da planta para induzir uma gama de respostas de defesa (Zhao *et al.*, 2005). Ele atua como um inibidor da catalase, enzima envolvida na conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Investigações

acerca da aplicação exógena de SA em plantas revelaram que este pode induzir resistência sistêmica e promover o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (Raskin, 1992).

A pulverização de plantas de fumo com SA induziu a produção de mRNA da PR-1 e inibiu a multiplicação sistêmica do vírus do mosaico da alfafa (A1MV) (Hooft Van Huijsduijnen *et al.*, 1986). Também foi observada indução de resistência no fumo contra o *Cucumber mosaic virus* (CMV) pelo SA, o qual inibiu a circulação sistêmica do vírus. O SA induziu a síntese de PRs em feijão e reduziu em 75% a produção de lesões locais em plantas de feijão inoculadas com o A1MV (Hooft Van Huijsduijnen *et al.*, 1986). Em aspargos tratados com SA houve resistência sistêmica com redução significativa da doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. Além disso, o composto ativou peroxidases e fenilalanina amônia-liase e aumentou a lignificação (He & Wolyn, 2005). Em plantas de tomate, houve uma redução do escurecimento vascular e da murcha causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e um aumento na atividade de peroxidase e fenilalanina amônia-liase, promovido pelo SA. O trabalho mostrou que o sistema radicular do tomate pode ter a capacidade de assimilar e distribuir o SA por toda a planta, já que o mesmo foi aplicado nas raízes (Mandal *et al.*, 2009). Também há relatos da aplicação exógena de SA em plantas contra bactérias. Houve um aumento da resistência de plantas de fumo contra *Erwinia carotovora* com o uso do SA, sendo observada uma redução dos sintomas da doença e da proliferação bacteriana (Palva *et al.*, 1994). Um estudo recente demonstrou o potencial do SA em reduzir os sintomas do cancro cítrico em folhas destacadas de laranja de umbigo (*Citrus sinensis*) por mensurar atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase, além de avaliar os níveis de mRNA de *CsCHI* e *CsPR4A* (Wang *et al.*, 2012).

2.5 Análise da indução de resistência

Quando as plantas são tratadas com um indutor é necessário analisar quais mecanismos induzidos promoveram a resistência da planta. Diferentes ferramentas têm sido utilizadas para avaliar a expressão gênica de plantas tratadas com eliciadores, como a hibridização subtrativa por supressão (Guzzo, 2004), microrranjos (Salzman *et al.*, 2005), sequenciamento de RNA (RNA-seq) (Li *et al.*, 2012), RT-qPCR (Han *et al.*, 2013) e por meio da mensuração da atividade de enzimas de defesa (Coqueiro *et al.*, 2011).

2.5.1 Transcriptoma

Entender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares das células e tecidos, e também entender o desenvolvimento das doenças. Várias tecnologias têm sido utilizadas para deduzir e quantificar os transcritos. As técnicas de hibridização de arranjos de DNA em lâminas (microarranjos) ou o sequenciamento em larga escala com novas plataformas de sequenciamento (454, Solid ou Solexa) têm se tornado abordagens que permitem avaliação mais rápida de um grande número de sequências e em diferentes condições.

Jantasuriyarat *et al.* (2005) monitoraram as mudanças transcricionais em arroz durante os estágios iniciais da infecção por *Magnaporthe grisea*, por meio de uma grande coleção de EST gerada a partir de biblioteca de cDNA derivada de tecido foliar inoculado com o patógeno e do controle (sem inoculação). A partir das análises das sequências e a comparação das bibliotecas oriundas de tecidos desafiados com *M. grisea* e daquelas onde não houve o desafio, foi observado um grande aumento na porcentagem de genes das categorias funcionais de mecanismos de defesa e transdução de sinais. Em *A. thaliana*, o sequenciamento em larga escala foi utilizado para o estabelecimento de EST a partir de

biblioteca de cDNA representando uma gama de órgãos da planta (folha, raiz, caule, etc.), sendo que mais de 5.000 EST foram gerados e categorizados funcionalmente (Dong *et al.*, 2003). No trigo, estudos também têm se concentrado na análise em larga escala de EST e até o momento, 46 bibliotecas de cDNA derivadas de tecidos durante o ciclo de vida do trigo, bem como tecidos submetidos a estresse foram construídas, sequenciadas e analisadas (Ogihara *et al.*, 2008).

A tecnologia de sequenciamento Solexa apresenta um diferencial, já que a clonagem dos fragmentos de cDNA ocorre *in vitro* em uma superfície sólida de vidro, a qual é dividida em oito linhas e, portanto, pode ser utilizado para geração de até oito bibliotecas. Nessa fase sólida, os fragmentos de cDNA são fixados a adaptadores e aderidos à célula de corrida (Figura 10A e 10B). Em seguida, são adicionados nucleotídeos não marcados e enzima para amplificação da sequência complementar dos fragmentos aderidos à célula de corrida (Figura 10C). O ciclo de amplificação é repetido 35 vezes com geração de cerca de mil cópias de cada fragmento, formando os *clusters* de sequenciamento (Figura 10D, 10E e 10F). Após a fase sólida, dá-se início ao ciclo químico em que quatro terminadores reversíveis marcados são adicionados, juntamente com iniciadores e DNA polimerase (Figura 10G). Depois ocorre excitação com laser, geração e captura das imagens da fluorescência emitida em cada ciclo a partir dos *clusters* da célula de corrida (Figura 10H). O ciclo se repete a partir da incorporação de nucleotídeos marcados, determinando a sequência de bases do fragmento de DNA (Figura 10I e 10J). Posteriormente, os dados são alinhados ao genoma de referência identificando a sequência obtida (Figura 10L e 10M) (Illumina® Systems & Software, 2006).

A plataforma solexa da Illumina® vem sendo amplamente utilizada para a geração de perfis transcricionais em diferentes condições fisiológicas e, juntamente com as outras tecnologias de sequenciamento (Solexa, SOLiD e Roche 454 Life Science), é utilizada para

sequenciamento de RNA ou RNA-seq, sendo uma ferramenta que fornece maior precisão na mensuração dos níveis de transcrito e suas isoformas do que outros métodos (Wang *et al.*, 2009).

Em células de *Taxus chinensis*, o RNA-seq foi utilizado para investigar as alterações transcricionais em resposta ao metil jasmonato. Mais do que 58 milhões de *reads* de cDNA foram gerados e 46.581 unigenes foram encontrados. Destes, 13.469 genes foram diferencialmente expressos, incluindo todos os genes conhecidos da via de biossíntese e sinalização de jasmonato e genes relacionados ao taxol (Li *et al.*, 2012). Na avaliação da resistência de plantas a patógenos, o RNA-seq mostrou que em algodão inoculado com o fungo *Verticillium dahliae*, o metabolismo da lignina exerce um papel central na resistência da planta contra o patógeno (Xu *et al.*, 2011). O RNA-seq também foi utilizado para avaliar o transcriptoma de plantas de sorgo submetidas a estresse osmótico e aplicações exógenas de ácido abscísico (Duga *et al.*, 2011).

A maioria dos trabalhos que avaliam o transcriptoma de plantas submetidas a diferentes condições seja por RNA-seq, microarranjos ou outras ferramentas, conduzem a procedimentos de validação dos dados por meio da RT-qPCR, método amplamente utilizado em análises de expressão gênica e que permite corroborar os dados obtidos pelas técnicas de transcriptoma.

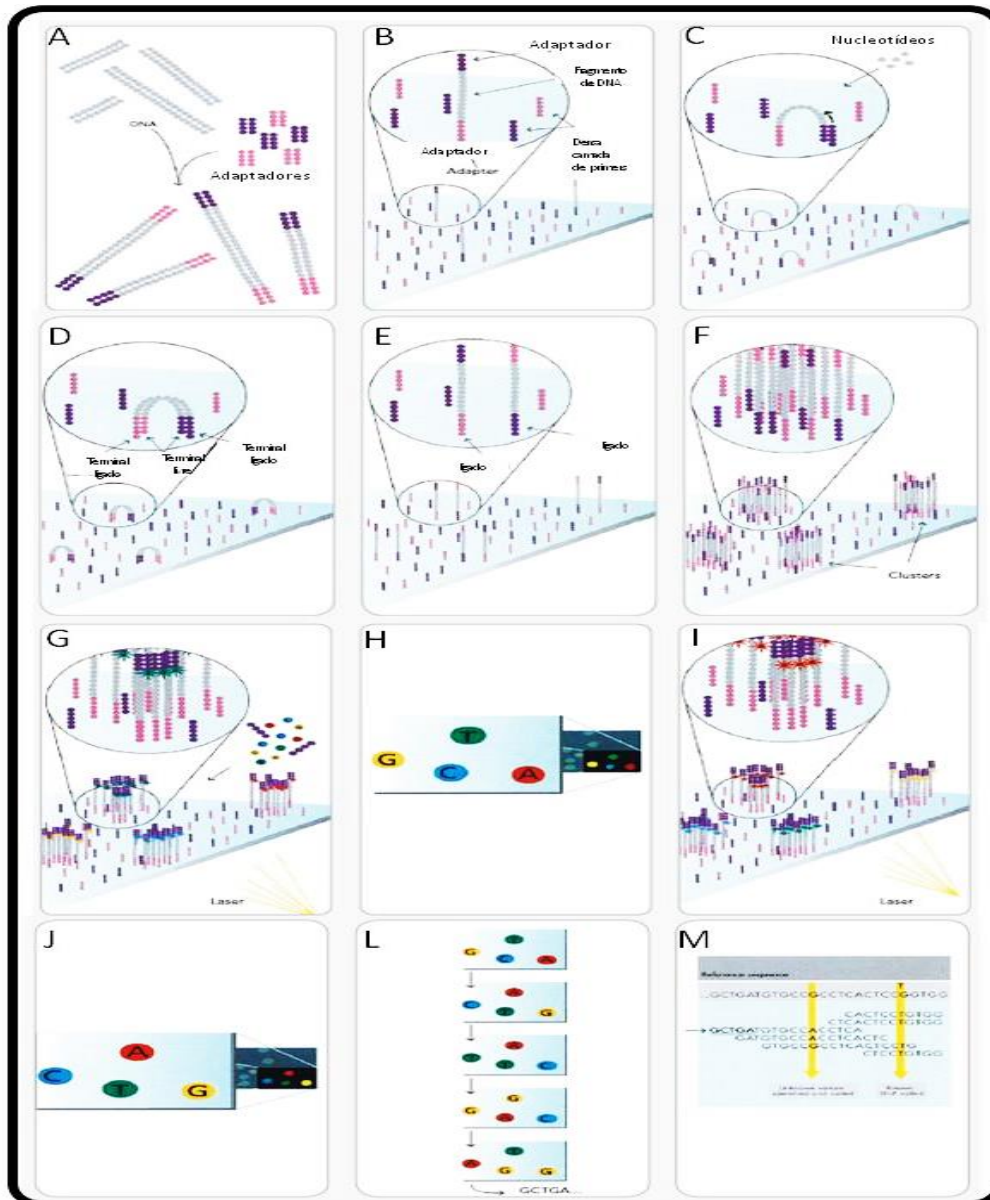


Figura 10: Esquema geral da tecnologia de sequenciamento solexa. Primeiramente ocorre a fase sólida em que ao DNA fragmentado são ligados adaptadores em ambas as extremidades (5' e 3') randomicamente (A). Essas moléculas são aderidas à superfície da célula de corrida (B) e posteriormente seguem-se as etapas de desnaturação e anelamento em que os fragmentos são polimerizados com os nucleotídeos não marcados adicionados em cada linha da plataforma (C, D e E). Em vários ciclos são geradas várias cópias de todos os fragmentos formando os *clusters* de moléculas idênticas (F). Após esta fase sólida, inicia-se o ciclo químico em que nucleotídeos marcados são adicionados à plataforma (G e H) e permitem a identificação e sequência correta do cDNA. Isso ocorre por meio da excitação dos nucleotídeos com laser, gerando uma fluorescência que é captada e interpretada (I e J). O ciclo se repete a partir da incorporação de nucleotídeos marcados, determinando a sequência de bases do fragmento de DNA (L). Posteriormente os dados são alinhados ao genoma de referência identificando a sequência obtida (M). Adaptado de Illumina® Systems & Software (2006).

2.5.2 PCR em tempo real (RT-qPCR)

RNA-seq ou microarranjos constituem-se em poderosas ferramentas para gerar um retrato do genoma completo de um organismo. Entretanto, estes dados precisam ser validados em laboratório (Chuaqui *et al.*, 2002). A validação em laboratório permite uma verificação dos níveis de expressão gênica experimental independente, sendo que as técnicas comumente usadas para esta validação incluem PCR semi-quantitativo, RT-qPCR, Northern blot, ensaio de proteção de ribonuclease e hibridação *in situ* ou imunohistoquímica usando microarranjos de tecidos. Todavia, o PCR quantitativo em tempo real é a principal técnica para se avaliar quantitativamente mRNAs específicos uma vez que é rápido, relativamente barato e necessita de baixa quantidade de molde (Rajeevan *et al.*, 2001).

A RT-qPCR segue o princípio geral da PCR convencional, apresentando a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. No entanto, diferentemente da PCR clássica, a RT-qPCR mede o produto amplificado a cada ciclo da reação, permitindo assim que a amplificação seja avaliada em tempo real durante a fase exponencial da corrida, favorecendo uma determinação precisa da quantidade inicial de molde na reação. Contrariamente, técnicas de PCR *end-point* monitoram a saturação da reação, levando a uma quantificação imprecisa. Apesar de acreditar-se que este tipo de validação está longe de ser ideal, uma vez que a mesma verifica o perfil de expressão de apenas parte pequena do conjunto completo de genes testados e métodos que determinem uma avaliação mais global sejam necessárias (Miron *et al.*, 2006), RT-qPCR é um método poderoso para confirmar a expressão diferencial encontrada em análises de transcriptoma. Diversos métodos de detecção podem ser utilizados na RT-qPCR, dentre eles *SYBR*[®] *Green* e *TaqMan*.

A tecnologia *SYBR[®] Green* é baseada em um conjunto de moléculas que apresentam capacidade de se ligar à dupla fita de DNA e quando excitadas emitem fluorescência verde que é medida e convertida em uma quantidade de DNA (Figura 11), tendo a vantagem de apresentar alta sensibilidade, reduzido custo e ser de fácil manuseio. Em contrapartida, a principal desvantagem é a possibilidade da molécula se ligar a qualquer DNA dupla fita durante a polimerização, incluindo os dímeros de iniciadores e outros produtos inespecíficos, o que gera uma superestimação da concentração do fragmento alvo (Oliveira, 2009).

Na tecnologia *TaqMan[®]* são utilizados dois iniciadores específicos de uma determinada sequência de DNA e uma sonda *Taqman[®]* homóloga à região do fragmento de DNA entre os iniciadores (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A sonda apresenta na extremidade 5' um fluorocromo *repórter* e na extremidade 3' uma molécula que aceita a energia da molécula *repórter* e a dissipa na forma de luz ou calor, conhecida como *quencher* (Heid *et al.*, 1996; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Quando as duas moléculas da sonda, *reporter* e *quencher* estão próximas há supressão da detecção da fluorescência. Na fase de amplificação, a sonda é degradada fazendo com que *repórter* e *quencher* afastem-se e então ocorre a emissão do sinal fluorescente, o qual é convertido em uma quantidade de DNA (Figura 12). O *TaqMan[®]* é muito usada para se determinar a presença ou ausência de sequências específicas, além de ser uma tecnologia bastante rápida, com elevada sensibilidade e precisão e menor risco de contaminação. Entretanto, é um método relativamente dispendioso, por exigir duas moléculas (*repórter* e *quencher*) ligadas às extremidades da sonda, e ser complexo por requerer amplificação e hidrólise eficientes (Oliveira, 2009).

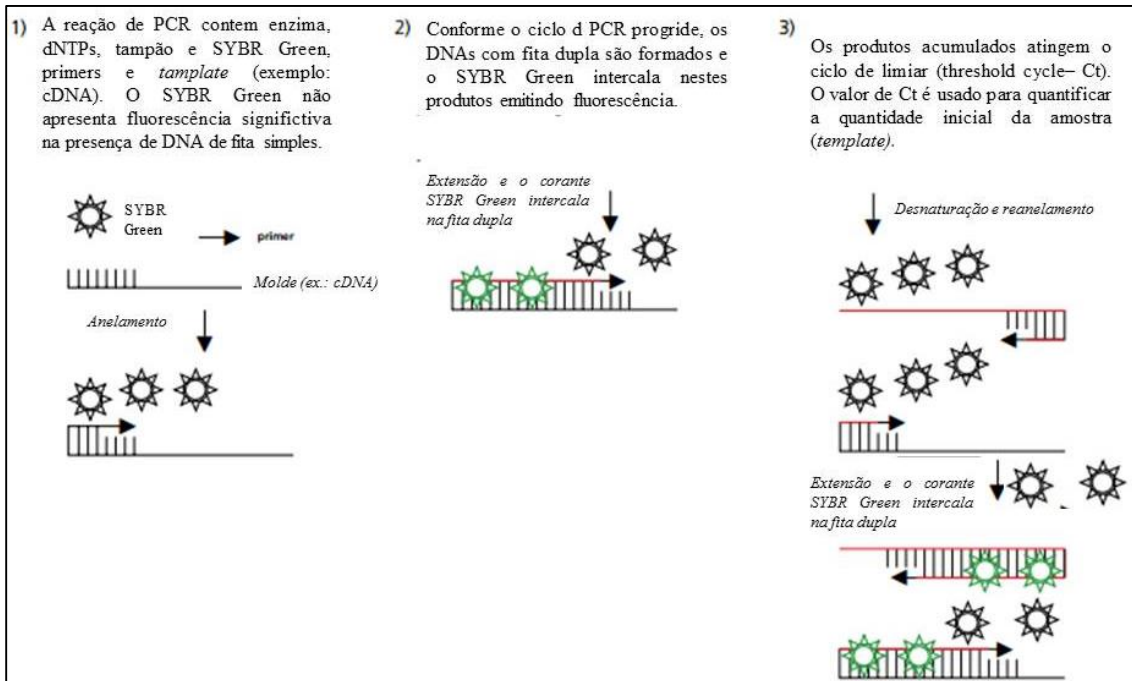


Figura 11: PCR em tempo real com corante SYBR Green. Fonte: qPCR Technical Guide. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com>.

De maneira geral, devido a sua rapidez, especificidade, sensibilidade e possibilidade de acurada quantificação do alvo, o método RT-qPCR apresenta grandes aplicações em estudos de planta (Gachon *et al.*, 2004). Nos estudos sobre interações planta-patógenos, o número de publicações envolvendo microarranjos ou RNA-seq e validação através de qPCR vêm crescendo bastante. É possível encontrar diversas interações sendo avaliadas deste modo, como citros-*Candidatus* sp. (Fan *et al.*, 2012; Albrech & Bowman, 2012), algodão-*Verticillium* (Xu *et al.*, 2011), trigo-*Fusarium* (Bernardo *et al.*, 2007), *Arabidopsis*-*Agrobacterium* (Ditt *et al.*, 2006), e grão de bico-*Ascochyta* (Coram & Pang, 2006).

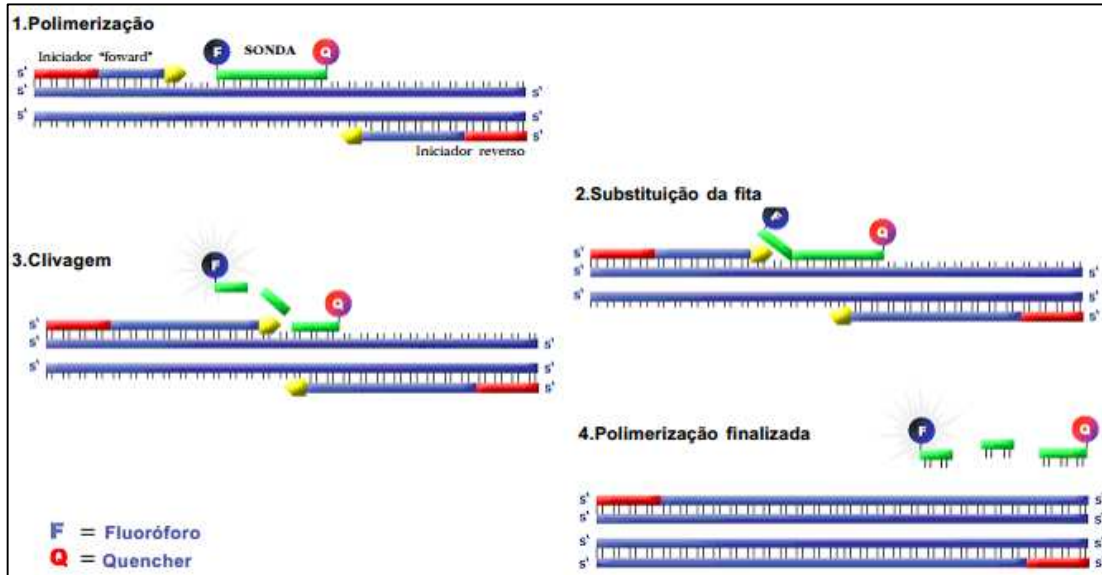


Figura 12: PCR em tempo real com sonda *Taqman* (Oliveira, 2009).

3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO TRABALHO

Considerando:

- A importância de ampliação da base de informação nos patossistemas citros-*X. citri* e citros-*X. fastidiosa*;
- O potencial da indução de resistência dos eliciadores quitosana e ácido salicílico;
- As poucas ou inexistentes informações sobre o efeito desses eliciadores nos patossistemas em estudo;
- A existência de ferramentas de análise de expressão gênica em larga escala através de sequenciamento de nova geração;
- A necessidade de se estabelecer parâmetros moleculares, através da análise de genes associados a resposta de resistência, para avaliação dos efeitos desses eliciadores.

A presente pesquisa tem a seguinte **hipótese de trabalho**: Plantas de laranja ‘Pera’ apresentam capacidade de resposta a eliciadores, sendo que essa resposta pode ser monitorada pela análise de expressão gênica. Essa hipótese foi testada em plantas somente tratadas com eliciadores quitosana e ácido salicílico; e tratadas com os eliciadores e desafiadas com *X. citri* e *X. fastidiosa*.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral: Avaliar o efeito da quitosana e do salicílico na ativação de genes relacionados à defesa em laranja 'Pera'.

4.2 Específicos

- Avaliar o transcriptoma de plantas de laranja 'Pera' apenas tratadas com quitosana ou ácido salicílico;
- Investigar o efeito da quitosana e do ácido salicílico na interação laranja 'Pera'-*X.* e laranja 'Pera'-*X. fastidiosa*.

CAPÍTULO 1

Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid

Danila Souza Oliveira Coqueiro^{1,2}

Alessandra Alves de Souza¹

Marco Aurélio Takita¹

Carolina Munari Rodrigues¹

Luciano Takeshi Kishi³

Marcos Antonio Machado^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil.

²Universidade Federal da Bahia, UFBA, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

³Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

*Corresponding author: ¹Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil (marcos@centrodecitricultura.br)

Submission for:

Journal: PLOS ONE

Article title: Transcriptional profile of sweet orange in response to elicitors

MS ID: 4 PONE-D-13-29664.

Authors: Danila Souza Oliveira Coqueiro; Alessandra Alves de Souza; Marco Aurélio Takita; Carolina Munari Rodrigues; Luciano Takeshi Kishi; Marcos Antonio Machado.

Corresponding author: marcos@centrodecitricultura.br

ABSTRACT

Resistance inducers have been used in annual crops as an alternative for disease control. Wood perennial fruit trees, such as those of the citrus species, are candidates for treatment with resistance inducers, such as salicylic acid (SA) and chitosan (CHI); However, the involved mechanisms in resistance induced by elicitors in citrus are currently few known. In the present manuscript, we report information regarding the transcriptional changes observed in sweet orange in response to exogenous applications of SA and CHI using RNA-seq technology. More genes were induced by SA treatment than by CHI treatment. In total, 1,425 differentially expressed genes (DEG) were identified following treatment with SA, including the important genes *WRKY50*, *PR2*, and *PR-9*, which are known to participate in the salicylic acid signaling pathway, and genes involved in ethylene/Jasmonic acid biosynthesis (*ACS 12*, *AP2* domain-containing transcription factor, and *OPR3*). In addition, SA treatment promoted the induction of a subset of genes involved in several metabolic processes, such as redox states and secondary metabolism, which are associated with biotic stress. For CHI treatment, there were 640 DEG, many of them involved in secondary metabolism. For both SA and CHI treatments, the auxin pathway genes were repressed, but SA treatment promoted induction in the ethylene and jasmonate acid pathway genes, in addition to repressing the abscisic acid pathway genes. Chitosan treatment altered some hormone metabolism pathways. The DEG were validated by real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR), and the results were consistent with the RNA-seq data, with a high correlation between the two analyses. Thus, we expanded the available information regarding induced defense by elicitors in a species of *Citrus* that is susceptible to various diseases and identified the molecular mechanisms by which this defense might be mediated.

INTRODUCTION

Citrus is one of the most important crops around the world. Brazil is currently the largest producer of sweet oranges and is the largest producer and exporter of freezer concentrate and not-from-concentrate orange juice [1]. However, one of the limiting factors that threatens the growth and productivity of citrus production are citrus diseases. The integrated management of plant (IMP) diseases advocates alternate technologies, such as biological control and genetic resistance, to reduce the deleterious effects of pathogens. One strategy that may contribute to disease reduction is the use of elicitors to improve the natural resistance of the plant. Among the compounds that have been used to control pathogens are salicylic acid (SA) and chitosan (CHI).

SA is a phenolic compound produced by plants, and its biosynthesis and signaling pathways have been well characterized, demonstrating its important role as a signal involved in the plant defense against pathogens [2]. The biosynthesis of SA may culminate in the expression of resistance genes that promote systemic acquired resistance (SAR). During infection, SA accumulates at the site of pathogen penetration, acting in the hypersensitivity reaction, and is also distributed to other parts of the plants as a mobile signal, as methyl salicylate, to induce a range of defense responses [3]. Many plants are not able to deploy these mechanisms effectively. Studies on the exogenous application of SA in plants have revealed that it may induce systemic resistance and promote the accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins [4]. The effectiveness of SA treatment has been verified against diseases caused by virus [5], fungi [6,7], and bacteria [8,9]. The exogenous application of SA has been shown to induce *PR-1* mRNA and to reduce the systemic multiplication of the Alfalfa mosaic virus (*AIMV*) [5]. The potential for the exogenous application of SA to increase PR protein

expression in bean plants and to reduce local lesions caused by AIMV was also demonstrated [5]. SA treatment promoted the resistance of asparagus against *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*, with increases in the levels of peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignifications [6]. Similar results were obtained in tomato plants, where the application of SA to the roots reduced vascular browning caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersicie* and increased the levels of peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase activities and the endogenous accumulation of free SA, showing that the root system might assimilate and distribute SA throughout the plant [7]. SA treatment was also effective in inducing several PR proteins in grapevine leaves [10]. In addition to demonstrating the effectiveness of SA applications against virus and fungi, studies have reported the effects of exogenous applications of SA for the control of bacterial diseases. There was an increase in the resistance of tobacco against *Erwinia carotovora* following SA treatment, which promoted reductions in disease symptoms and bacterial multiplication [11]. A recent study demonstrated the potential for SA treatment to attenuate the symptoms of citrus canker in sweet orange (*Citrus sinensis* L Osbeck) by measuring the enzyme activities of phenylalanine ammonia-lyase and β -1,3-glucanase, as well as the mRNA levels of *CsCHI* and *CsPR4* [12]. Chitosan (CHI), a β -1,4-linked glucosamine, is a deacetylated derivative of chitin and has a double effect: it is antimicrobial and it activates several plant defense mechanisms during host-pathogen interactions, such as the hypersensitivity reaction, callose deposition, lignification, synthesis of abscisic acid, phytoalexins, and pathogenesis-related proteins [13,14,15,16,17]. In grapevine, CHI treatment was effective against powdery mildew, reducing disease severity and increasing the polyphenol content [18]. A recent study showed that CHI can act on the phenylpropanoid pathway, increasing the levels of phenolic compounds in tomato plants and contributing to the reduction of bacterial spots [19]. In fruit

trees, much of the research conducted on CHI treatments has been focused on post-harvest treatment, due to the ability of this polysaccharide to form a semi-permeable biofilm that modifies the atmosphere and reduces losses due to perspiration and dehydration, thus increasing the shelf life of fruits. Furthermore, CHI treatment may lead to the induction of resistance in fruits [20,21].

Previously, researchers evaluated the induction of resistance in plants by analyzing individual mechanisms involved in the stress response. However, these strategies contribute little to the comprehension of the defense-related mechanisms promoted by elicitors of resistance. Large-scale studies of gene expression have been increasingly conducted to assess the effects of elicitors on plant metabolism. The transcriptional profile of sorghum following exogenous applications of SA showed the induction of several defense genes, such as numerous pathogenesis-related genes (*PR* genes) and members of the phenylpropanoid and jasmonic acid (JA) pathway, showing patterns of synergistic effects between SA and JA, as well as mutual antagonism for the regulation of some genes [22]. Studies conducted by RNA-seq to describe the transcriptome in *Taxus chinensis* in response to the exogenous application of MeJA revealed the induction of JA biosynthesis/JA signaling pathway/defense responses [23]. For CHI-treated *Arabidopsis thaliana* that was challenged with *Botrytis cinerea*, the transcriptome profile showed that the polysaccharide was able to induce camalexin biosynthesis genes through of the CERK1-independent pathway [24]. To the best of our knowledge, there are no previous studies showing the effects of CHI treatment in sweet orange. Although studies examining the exogenous application of SA on citrus are available, these studies lack the information regarding the changes in the general profile that are caused by the elicitor. To provide a large-scale study of gene expression in citrus treated with SA and CHI, and considering the important role these elicitors have played in inducing defense

mechanisms in several species, in the present study we aimed to evaluate the changes in the transcript pattern in sweet orange plants induced by these elicitors. The Illumina platform has been widely used to generate transcriptional profiles through the sequencing of RNA (RNA-seq), providing greater accuracy in measuring the levels of transcript. Using this method we observed important changes mediated by elicitors in the defense response of sweet orange.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and treatment with elicitors

Seven-month-old sweet orange cv. Pera (*Citrus sinensis*) plants grafted onto Rangpur lime were selected from a uniform population and used in the experiment. SA (Sigma Aldrich Chemicals) was dissolved in 10% ethanol and the CHI was prepared in 0.05 N hydrochloric acid, and the pH was adjusted to 5.6 with NaOH before use. The concentrations were determined in a preliminary experiment in which plants healthy were treated as follows: SA at concentrations of 0, 1.25, 2.5 and 5 mM, and the CHI 0, 1, 2 and 4mg/ml. Solutions of 10% ethanol (E) and 0.05 N hydrochloric acid (H), pH 5.6, were used as controls (mock) for SA and CHI, respectively. After 1, 12, 24 and 48 hours of spraying elicitors until point of running off the leaves, leaf samples were collected, immediately placed in liquid nitrogen and stored at -80 ° C until extraction of RNA for analysis of expression of four genes related to resistance (*NPR1-3 WRKY70*, *PR1* and *PR4*) by RT-qPCR.

After determine the best conditions (concentration and intervals) which promoted higher expression of these defense genes, was conducted the experiment to evaluate the transcriptome. Three plants were used for each treatment and were sprayed with the treatment solutions. Young leaf samples (two leaves per plant) from the three replicates were harvested

24 h post-treatment for SA and 48 h post-treatment for CHI, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for RNA extraction.

RNA extraction and RNA-seq preparation

Total RNA was extracted from 100 mg of fresh tissue from each replicate with Tri Reagent (Life Technologies, Foster City, CA), according to the manufacturer's protocol. The total RNA was treated with RNase-free DNase (Qiagen, Maryland, USA), and then the replicates from each treatment were combined in a pool (10 µg) (according to Venturi et al, 2013 [81]) and sent to Macrogen (South Korea) for mRNA purification, cDNA library construction and sequencing, using the *Genome Analyzer Iix platform* (Illumina/Solexa technology).

Sequence analysis

The raw data from the RNA-seq in Fasta format and with a quality score of Phred ≥ 20 were indexed, trimmed, and aligned. The transcripts were mapped against the whole reference genome of *Citrus clementina* (www.phytosome.org) by using TopHat software [25]. An initial consensus of the exon sequences was extracted from the mapped reads and was used to measure the relative abundance of transcripts, with Cufflinks software [26]. A quantitative evaluation of the transcripts was used to calculate the levels of differential expression between the treatment and control groups and their levels of significance using Cuffdiff software [26]. The differentially expressed transcripts ($P \leq 0.05$) were annotated and categorized automatically on GO (Gene Ontology). The functions of the identified genes were validated using BLASTx data from *A. thaliana*. PageMan [27] and MapMan3.5.1R2 [28] softwares were used to visualize any functional classes that were significantly altered by the treatments.

Validation of RNA-seq data by real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR)

To validate the mRNA abundance of 15 genes found to be significantly regulated by the compounds during the RNA-seq analysis, RT-qPCR was also performed. cDNAs were generated using the same RNA samples as those used for the RNA-seq experiment. For each sample, 1 µg of total RNA was used with the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, according to the manufacturer's protocol (Fermentas, USA). The cDNA was diluted in RNase-free water (1:25) and stored at -80°C until used for RT-qPCR analysis. The RT-qPCR assay was performed with three technical replicates using the Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Foster City, CA) on an ABI 7500 Real Time PCR system in a total volume of 20 µL. The PCR cycle consisted of one 20 s cycle at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 3s and 60°C for 30s. All amplified products were subjected to melt curve analysis. A negative control without a cDNA template was run with all analyses to evaluate the overall specificity. The reference genes ubiquitin and cyclophilin were used to normalize the total amount of cDNA in each reaction. Then, amplification efficiency and relative gene expression levels were calculated using *Miner* tool [29] and GenEx 4.3.5. To assess the correlation between different analyses, Pearson correlations were calculated using Bioestat 5.0 [30] to compare the gene expression levels measured by RNA-seq and RT-qPCR. To assess the significant differences between treatments, Student's t-test for independent samples was calculated using Bioestat 5.0. Gene-specific primers were designed using Primer premier 5.0 software and were synthesized by Exxtend (São Paulo, Brazil). Detailed information regarding the selected genes can be found in Table S1.

RESULTS AND DISCUSSION

None of the treatments proved to be phytotoxic. With the results obtained from the preliminary experiment was observed that the best concentration for CHI and SA was 4 mg/ml and 2.5 mM, respectively. For CHI the interval of 48 hours after treatment was the most appropriate and SA 24 hours. These conditions were used in the experiment of the transcriptome, since there most genes evaluated was higher expression, suggesting that the plant can provide important defense mechanisms against pathogens in these intervals.

Transcriptome profiling

To contribute to the understanding of how SA and CHI-treatments promote changes in gene expression in sweet orange, transcriptional profiles of leaf samples treated with elicitors were generated using RNA-seq. Total RNA was extracted from elicitor-treated sweet orange plants and mock-treated plants (ethanol solution 10% or HCl 0.05N, pH 5.6 for SA and chitosan, respectively), and then four cDNA libraries were created for sequencing with Illumina technology.

Between 11 and 15 million 31-nt single-end reads were generated from leaves that received different treatments (Table S2 and Table S3). The reads were aligned with the *Citrus clementina* reference genome and comparisons were made between SA- and E-treated plants (mock) and between CHI- and H-treated plants (mock). The numbers of transcripts with significantly altered expression levels ($P \leq 0.05$) following treatment with elicitors, based on the Cufflink analysis, are shown in Table 1. Compared to controls, more down-regulated genes were identified than up-regulated genes in plants treated with elicitors. Among the genes significantly induced by the treatments, 350 were unique to SA-treated plants, and 194 were unique to CHI-treated plants. Among the genes that were significantly repressed, 1,073

were unique to SA-treated plants, and 444 were unique to CHI-treated plants (Figure 1). Only two genes were coregulated by SA and CHI treatments (encoding disease resistance family protein/LRR family protein, and hypothetical protein), and these genes were corepressed. Between the two treatments, SA treatment altered the mRNA levels of a substantially greater number of genes compared with CHI treatment (Figure 1).

Table 1: Total number of transcripts obtained by RNA-seq for different treatments and number of transcripts (up- and down-regulated) with significantly altered expression levels ($P \leq 0.05$) after treatment with elicitors when compared to controls, according to Cufflink analysis.

Treatment	Number of transcripts	Transcripts changed expression
CHI	11,691.216	640
H*	13,253.654	-
SA	14,833.464	1,425
E *	12,279.260	-

*H and E represent the controls for CHI and SA, respectively.

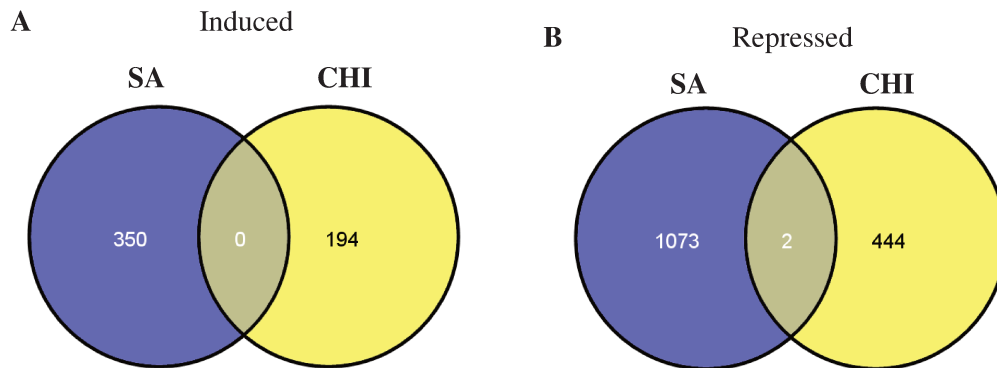


Figure 1: Venn diagrams showing the number of genes with significantly altered expression levels ($P \leq 0.05$). Non-overlapping numbers represent the number of genes unique to a particular treatment (CHI or SA). Overlapping numbers represent the number of mutual genes between treatments.

All of the differentially up- and down-regulated genes were functionally categorized by Blast2GO in biological process, cellular component, and molecular function (level 2) (Table

2), and visualizations of the functional groups that were significantly altered by the treatments were generated by PageMan [27] and MapMan 3.5.1R2 [28] software.

The differentially expressed genes were distributed into 10 biological processes, five cellular components and nine molecular functions. Within each category, the greatest number of GO annotated genes were associated with metabolic processes (28.3% for both SA and CHI treatments), cellular processes (27% for SA treatment and 28.9% for CHI treatment), cell (51.4% for SA treatment and 52.1% for CHI treatment), and binding (42.6% for SA treatment and 45.7% for CHI treatment) (Table 2).

Table 2: Categorization of more up- and down-regulated genes after treatments.

Categories*	Name	Number of transcripts			
		UP _{SA}	DOWN _{SA}	UP _{CHI}	DOWN _{CHI}
Biological process	Metabolic process	179	122	81	221
	Cellular process	161	137	79	229
	Response to stimulus	68	59	20	70
	Biological regulation	47	49	28	93
	Localization	42	30	16	47
	Multicellular organismal process	25	20	8	44
	Developmental process	23	22	8	44
	Multi-organism process	17	7	4	13
	Cellular component organization	15	16	8	25
	Signaling	9	17	10	18
	Total annotations	586	479	262	804
Cellular component	Cell	196	142	102	283
	Organelle	140	98	73	197
	Macromolecular complex	42	12	22	40
	Membrane-enclosed lumen	9	4	4	11
	Extracellular region	8	3	3	4
	Total annotations	395	259	204	535
Molecular function	Binding	157	140	77	281
	Catalytic activity	149	123	74	217
	Transporter activity	25	25	7	33
	Electron carrier activity	15	3	15	5
	Structural molecule activity	14	2	7	4
	Molecular transducer activity	11	9	7	17
	Enzyme regulator activity	8	6	3	2
	Antioxidant activity	5	0	2	3
	Transcription regulator activity	1	5	6	23
	Total annotations	385	313	198	585

*Individual gene products may be assigned to more than one functional category.

For SA treatment, nearly 12% of the altered genes were considered to be genes that change expression in response to stimulus, and for CHI treatment that number was nearly 8% (Table 2). The transcripts most strongly up-regulated by SA treatment were those that encoded

peroxidase superfamily proteins, which are involved in the response to oxidative stress during the defense response and the deposition of lignin, 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily proteins that are involved in the biosynthetic process of flavonoids, and β -1,3-glucanase, which has antimicrobial properties (Table S6 and Table S8). For CHI treatment, the most strongly up-regulated transcripts were those that encode members of the tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily, the glycosyltransferase family, and the 2OG and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily (Table S7 and Table S9).

Modulated metabolic process induced by exogenous SA and CHI

Many studies have shown that applications of exogenous SA and CHI increase the defense response in several plants [5,6,7-21]. SA is required for systemic acquired resistance (SAR) and plays an important role in defense signaling. In a study performed in *Citrus sinensis* Osbeck it was demonstrated that SA treatment was able to enhance resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* elevating the activities of phenylalanine ammonia-lyase and glucanase, and the mRNA levels of *CsCHI* and *CsPR4A* [12]. However, studies of the large-scale transcriptional responses promoted by SA and CHI treatments have not yet been reported in citrus. Our results provided a broader vision of the mechanisms involved in response induced by SA treatment and were consistent with the mechanisms discussed in previous studies, demonstrating that exogenous SA application increased the expression levels of genes involved in the defense response; However, CHI treatment did not promote considerable changes in the expression levels of genes involved in plant defense metabolism.

Genes with putative roles in photosynthesis, cell wall synthesis/degradation/modification, hormone metabolism, the regulation of oxidative states, and transcriptional regulation

showed distinctive patterns of regulation, as shown in Figure 2, which was obtained using PageMan software.

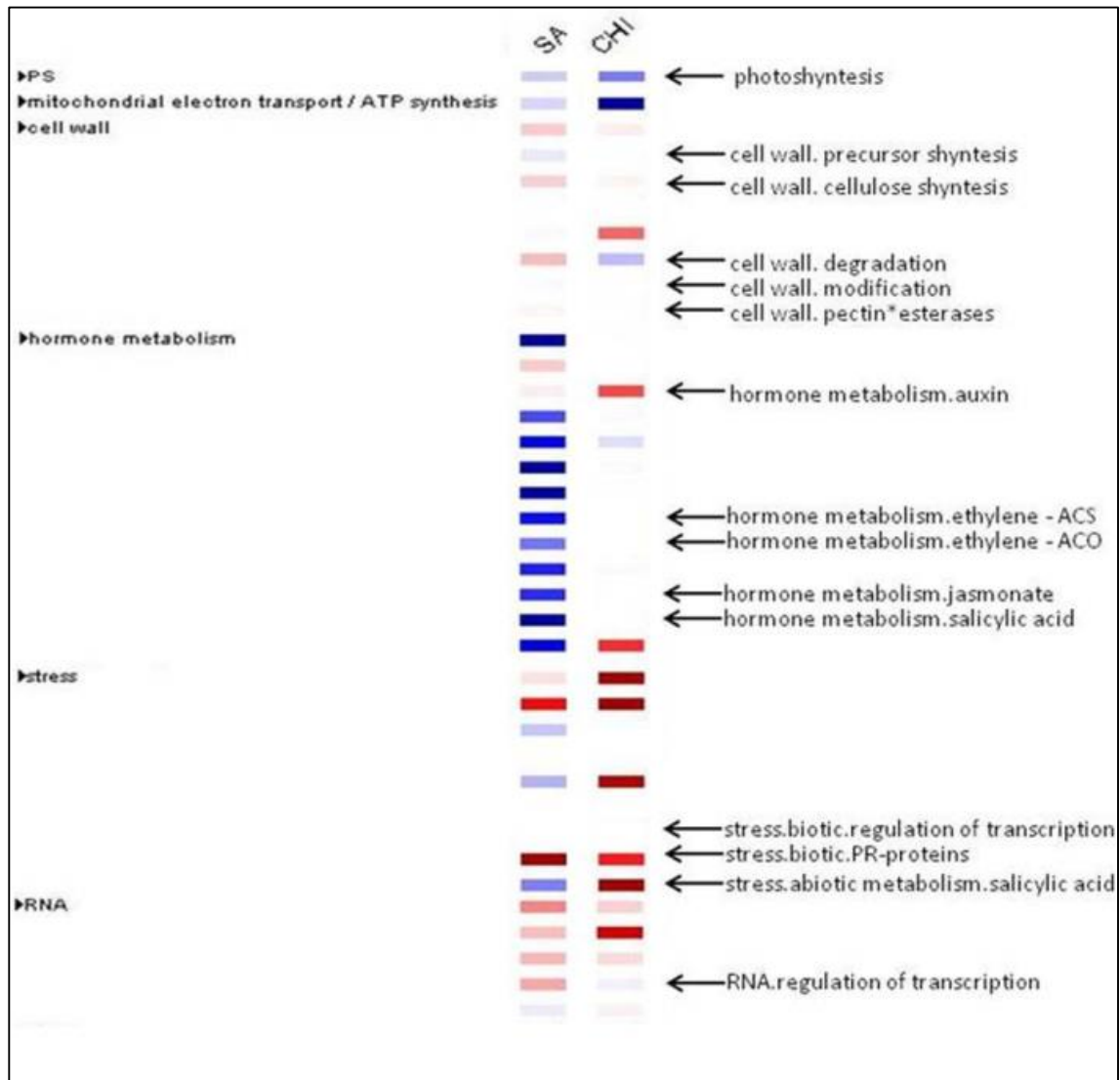


Figure 2: A comparative PageMan display of modulated pathways in sweet orange plants submitted to SA and CHI treatments. The fold changes of gene expression levels were input into PageMan and subjected to a Wilcoxon test. Pathways that were significantly up-regulated are colored in blue, and those colored in red were significantly down-regulated. Pathways without significant changes are in white. The names of pathways of interest are indicated on the right panel. PS, photosynthesis; CHO, carbohydrate.

Several subsets of genes encoding receptor-like kinases, signaling proteins, transcriptional factors, oxidative stress response elements, secondary metabolism factors, and

phytohormone-responsive genes were identified (Figure 3). Notably, a greater number of genes were modulated by SA treatment than by CHI treatment in all of the identified pathways. The functions of the genes described below are based on homology to genes of known functions from other organisms, primarily *A. thaliana*, with the help of MapMan software.

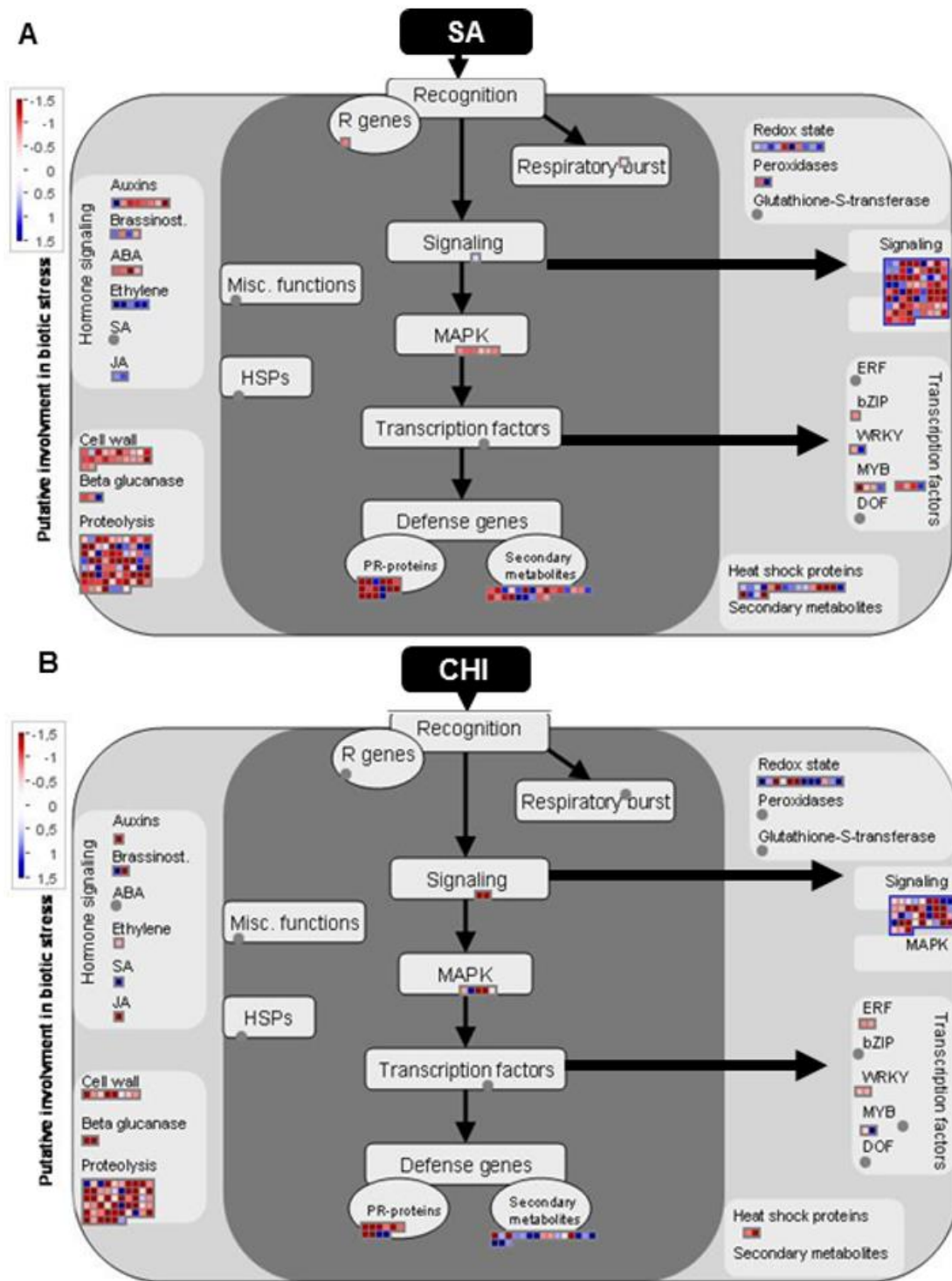


Figure 3: Display of treatment-modulated stress responses in SA-treated plants (A) and CHI-treated plants (B). The fold change of gene expression levels were analyzed using MapMan. Small red and blue squares represent up- and down-regulated genes, respectively.

Genes associated with defense signaling/activation and redox state

A sequence of molecular events leads to the establishment of plant defense mechanisms, and the first step of this sequence is the recognition of the elicitor molecule by a specific receptor. Our results have shown that several receptor-like kinases were observed among the differentially expressed genes, with a greater number of genes that contain aLRR (leucine rich repeat) sequence being identified in SA-treated plants than in CHI-treated plants. Of these LRR containing genes, only one was considered up-regulated in SA-treated plants, where as two were considered up-regulated in CHI-treated plants. One member of the receptor lectin kinase (RLK) family was induced only by SA treatment, while the receptor kinase extensin, which is associated with the primary cell wall of plants, was repressed in both treatment groups (Table S6 and Table S7). The gene encoding the plasma membrane protein PLC4 (phosphoinositide-specific phospholipase C) was also induced by both SA and CHI treatments. The PLC pathway may respond to hormones or pathogen elicitors by releasing cytosolic Ca²⁺ [31].

Our results suggest that in sweet orange exogenous SA might be activating RLK receptors. In *A. thaliana*, it was observed that the exogenous application of SA increased the expression levels of *RLK* genes, which exhibit a TTGAC sequence in their promoter regions that appear to be related to plant defense genes [32]. Thus, it is possible that exogenous SA might be recognized by RLK family members and might be able to increase the expression levels of various RLKs in citrus. The exact CHI recognition mechanisms in plants are not completely understood. Studies have suggested that CHI can be recognized by chitin receptors, such as CERK [33]; However, in *A. thaliana*, it was observed that the perception of CHI occurred through a CERK1-independent pathway [24]. In our results, the CERK gene was not

represented in the profile of CHI-treated plants, suggesting that the CHI is recognized by CERK independent mechanisms.

Another signaling factor that appeared to be involved in SA treatment but was not observed in CHI treatment was the repression of the *GLB1* gene (GLNB1-like protein), which is responsible for encoding a haemoglobin that oxidizes nitric oxide (NO)[34]. The suppression of *GLB1* suggests that SA treatment can favor the accumulation of NO in citrus, as has been shown in *A. thaliana* [35]. Just as studies have demonstrated that SA produces NO, it is also possible that NO stimulates SA accumulation [36,37]. Both signaling molecules, SA and NO, are well known to play important roles in the activation of plant defense after elicitation; However, the interrelationship between these two signaling molecules and their pathways is not understood. It is likely that SA and NO promote the hypersensitive response and pathogen death [38].

Because elicitors are recognized and accumulate in cells, they may trigger diverse processes, such as redox regulation. Oxidative stress occurs when there are changes in environmental conditions, causing the cell to produce reactive oxygen species (ROS), which result in the oxidation of cellular components, alter metabolic activities and affect organelle integrity. Thus, balancing these ROS through the activation of ROS responsive regulatory genes is required [39]. Several proteins play a critical role in redox in plants, including thioredoxins, superoxide dismutase, and glutaredoxin. Thioredoxins were induced by SA and CHI treatments. These proteins may participate in the conversion of *NRPI* (SA-induced nonexpresser of *PR* genes1) to a monomer when the plant is elicited, by a pathogen or by SA treatment [40]. *CSD2* (copper/zinc superoxide dismutase 2), which was induced by both treatments as determined by RNA-seq and by RT-qPCR (Table 3 and Table 4), may promote

the dismutation of superoxide radicals (O_2^-) in H_2O_2 , which is part of the programmed cell death of plant cells and has been correlated with disease resistance [41]. The enhanced expression of superoxide dismutase by SA and CHI treatments has been reported in *A. thaliana*. Kliebenstein et al. [42] have shown that treatment with the SA analogs 2,6-dichloroisonicotinic acid and BTH induced two CuZnSOD proteins, which is consistent with the differential expression of *CSD2* in SA-treated plants observed in our results. Similarly, the protective effect of CHI against brown rot in peaches was associated with the induction of superoxide dismutase activity [43]. Therefore, SA and CHI appear to act in plant protection by contributing to programmed cell death during the important event of disease resistance.

Table 3: Defense response-related up- and down-regulated genes after SA-treatment ($P < 0.01$).

SA			
Gene ID	Gene name/function	RNA-seq*	RT-qPCR*
AT1G19220	ARF19/ auxin response factor 19	-2.67	-1.39
AT3G12500	HCHIB/ basic chitinase	-2.13	NA‡
AT5G14420	RGLG2/ RING domain ligase2	-1.89	-1.92
AT3G62980	TIR1/ F-box/RNI-like superfamily protein	-1.19	-1.17
AT1G75580	SAUR-like auxin-responsive protein family	-1.12	-1.85
AT5G17820	Peroxidase superfamily protein	3.19	1.09
AT2G28190	CSD2/copper/zinc superoxide dismutase 2	2.27	1.04
AT3G57260	BGL2/beta-1,3-glucanase 2	2.06	1.14
AT4G10490	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	1.80	3.07
AT2G32440	ACS12/ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	1.54	NA
AT5G26170	WRKY50/WRKY DNA-binding protein 50	1.31	1.42
AT5G23960	TPS21/terpene synthase 21	1.05	NA
AT2G06050	OPR3/12-oxophytodienoate reductase 3	1.03	NA
AT1G05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	0.9	0.85

* $r = 0.85$

‡ not assessed

Table 4: Defense response-related up- and down-regulated genes after CHI-treatment ($P < 0.01$).

CHI			
Gene ID	Gene name/function	RNA-seq*	RT-qPCR†
AT5G60450	ARF4/auxin response factor 4	-227.07**	NA‡
AT3G12500	HCHIB/basic chitinase	-226.22	NA
AT5G62000	ARF2/auxin response factor 2	-182.94	-1.81
AT3G61415	EBF1 - protein binding / ubiquitin-protein ligase	-134.34	-1,36
AT2G25490	SK21/SKP1-like 21-SCF ubiquitin ligase complex	-135.59	-2.56
AT5G17420	Cellulose synthase	-160.14	-1.67
AT2G02560	CAND1/cullin-associated and neddylation dissociated	-198.86	NA
AT5G49330	MYB111/myb domain protein 111	175.1	NA
AT3G50740	UDP-glucosyltransferase 72E1	158.32	NA
AT3G11480	BSMT1/S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	158.09	NA
AT4G13400	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	153.90	1.31
AT4G34050	CCoAOMT1/S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	111.50	NA
AT2G28190	CSD2/copper/zinc superoxide dismutase 2	104.85	1.30

† $r = 0.96$

‡ not assessed

**= Important genes modulated >100-fold by chitosan based on the transcript profiling and considering the study of Povero et al. [24].

Genes associated with the cell wall and secondary metabolism

Under the conditions used in this study, most of the genes associated with cell wall related-pathways were repressed by the treatments (e.g., any cellulose synthase, expansin, extensin, and UDP-arabinose 4-epimerase – Table S6 to Table S9), with more genes being represented in the profile for SA-treated plants. Expansin is involved in cell wall modification. This enzyme is required for wall relaxation during plant cell enlargement [44]. Proteins that loosen the cell wall play key roles in plant growth; However, this process may also make the plant vulnerable to attack by pathogens [45]. Thus, these data support the idea that expansin is negatively regulated by SA treatment. The auxin hormone, which has been implicated in

disease susceptibility, induces the expression of expansins [45]. The suppression of auxin signaling by microRNA in *A. thaliana* resulted in the restriction of *Pseudomonas syringae* growth, indicating that the repression of auxin signaling is part of the plant-induced immune response [46]. Additionally, *A. thaliana* treated with the SA analog benzothiadiazole S-methyl ester (BTH) showed the global repression of auxin-related genes, including the TIR1 receptor, indicating that the inhibition of auxin responses is a part of the SA-mediated disease-resistance mechanism [47]. We have shown that the sweet orange response to SA treatment appears to be functionally similar to that observed in *A. thaliana*. The factor that corroborates our results with those reported in previous studies is that expansins are induced by auxin, and this pathway was repressed in the present study. Other components of the auxin pathway were repressed and are described below. CHI treatment altered few genes involved in cell wall metabolism, promoting the repression of genes involved in cellulose synthesis (e. g. cellulose synthase), as assessed by RT-qPCR (Table 4).

It is well known that the treatment of plants with elicitors promotes the accumulation of defensive secondary metabolites. RNA-seq analysis showed that the expression levels of genes encoding enzymes associated with lignin synthesis, flavonoids, chalcones, and isoprenoid were altered in response to SA and/or CHI treatment (Table S6 and Table S7). We observed that more than 60% of the differentially expressed genes in this group were repressed by treatments, including anthocyanins, chalcones, and 4-coumaroyl-CoA synthase. However, the 2OG-Fe(II) oxygenase family protein was induced by both SA and CHI treatments, which was confirmed by RT-qPCR (Table 3 and Table 4). In addition, the genes *DMR6* (downy mildew resistant 6) and terpene synthase were observed to be induced by SA treatment. For CHI treatment, the induction of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, coniferyl-alcohol glucosyltransferase, and flavonoid 3'-monooxygenase was observed. The

2OG-Fe(II) oxygenase protein uses a dioxygen molecule to catalyze the 2OG and Fe(II)-dependent oxidation of an organic substrate. In plants, the 2OG-Fe(II) oxygenase protein participates in the synthesis of diverse compounds, such as flavones. ACC oxidase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase), which is involved in the biosynthesis of ethylene (ET) and was represented in the profile of SA-treated plants, belongs to this family [48]. DMR6 is also a member of the 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily of oxidoreductases and has been considered an enzyme that is activated during various defense responses, which can be activated by pathogen stimulation or can be chemically induced. Van Damme et al. [49] analyzed several *dmr6* mutants in *A. thaliana* and observed that *DMR6* expression was sensitive to SA analogous. Interestingly, *DMR6* was observed to be induced to higher levels during incompatible interactions than during compatible interactions. During incompatible interactions, the induction of genes dependent on SA is observed. Therefore, the authors suggest that *DMR6* expression can be considered to be SAR-induced. Our results also indicated the participation of this gene in response to SA treatment in sweet orange.

A gene that is potentially involved with terpenoids was also observed to be regulated by treatments and is involved in secondary metabolism. The terpene synthases (TPSs), which were induced by SA treatment but not by CHI treatment, are involved in the synthesis of various terpene molecules, which may serve as plant defenses against herbivores and pathogens [50,51,52]. However, we observed that CHI treatment induced important genes involved in phenylpropanoids metabolism, such as the caffeoyl CoA O-methyltransferases (Table 3, Table 4, and Table S5), which have been implicated in lignin biosynthesis and were not represented in the profile of SA-treated plants. The participation of CHI in phenylpropanoid metabolism has also been observed in tomato plants [19].

Transcriptional factors and hormone metabolism

Transcriptional factors were more strongly represented in the profile of SA-treated plants than in CHI-treated plants. A total of 106 regulated transcription factors were identified in SA-treated plants, and 59 were identified in CHI-treated plants (Figure 4A), including members of the *WRKY*, *ARF*, *MYB*, *bHLH*, *bZIP*, and *AP2/ERF* families (Table S6 and Tables S7). Most of these transcripts were down-regulated in both treatments (Figure 4A). Both treatments promoted the repression of *ARF* members involved in the response to auxin, which was confirmed by RT-qPCR (Table 3 and Table 4). *TIR* (transport inhibitor response 1) was also repressed by SA treatment, which was also confirmed by RT-qPCR (Table 3). *WRKY* factors, which are known to be involved in biotic stress and to participate in defense responses, showed increased expression levels in SA-treated plants, with *WRKY50* being up-regulated, which was confirmed by RT-qPCR; however, *WRKY2* and *WRKY4* were repressed in CHI-treated plants. Unsurprisingly, SA treatment has the potential to induce the transcription factors in the *WRKY* family [53] (Figure 3A). The *WRKY* proteins form a large family of transcription factors that bind w-box elements and have the potential to differentially regulate the expression of a variety of target genes [54]. The *WRKY* family members appear to play regulatory roles in responses against biotic and abiotic stress [55]. After an increase in the SA concentration in the cell cytosol, the *WRKY* family activates defense responses through its downstream components, which promote the expression of defense genes, such as the *PR* genes [53]. The induction of *WRKY* genes by SA treatment or BTH treatment has been demonstrated in other plants [56,57,58,59].

For hormone metabolism, the most differentially represented transcripts in the profile of SA-treated plants were involved in the auxin pathway, and 87.5% of these were down-regulated

(Figure 4B), including *TIR1*, *ARF19*, and *BIG* transcriptional factors (Table 2). For CHI-treated plants, only nine genes were related to hormone metabolism, with most being down-regulated. We observed that the exogenous application of SA promoted an increase in the typical endogenous SA response because this hormone is able to attenuate auxin signaling, and reciprocally, the activation of the auxin pathway suppresses SA biosynthesis [60,61]. Genes involved in abscisic acid (ABA) biosynthesis and signaling were also repressed by SA treatment, such as *ELD1*, *AREB3*, and *HVA22K* (Table S6), which were not represented in the profile of CHI-treated plants. The activation of this pathway promotes disease susceptibility to several pathogens, but this pathway is important for abiotic stress resistance [62,63]. The MapMan analyses showed no genes in the SA pathway, but closer analyses showed that several components of the SA pathway were identified, such as *WRKY* family members and SA-dependent *PR* genes (Table 3; Table S6). A putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (*BSMT1*), which promotes the methylation of SA for the conversion into methyl salicylate (MeSA) and is implicated in several aspects of plant defense signaling, was induced by CHI treatment (Table 4 and Table S6).

Interestingly, genes involved in ET metabolism were up-regulated by SA treatment (Figure 4B), such as enzymes involved in synthesis and signal transduction (Table 3). In SA-treated plants, 15.6% of the up-regulated transcripts that were related to hormone metabolism were involved in ET metabolism, such as the ACS enzyme and AP2 domain-containing transcription factor (*ERF105*). Additionally, OPR3 (12-oxophytodienoate reductase 3) and proteinase inhibitors were up-regulated in SA-treated plants. The OPR3 enzyme is responsible for the conversion of JA from 12-oxophytodienoic acid, and proteinase inhibitors are produced by JA pathway signaling [64].

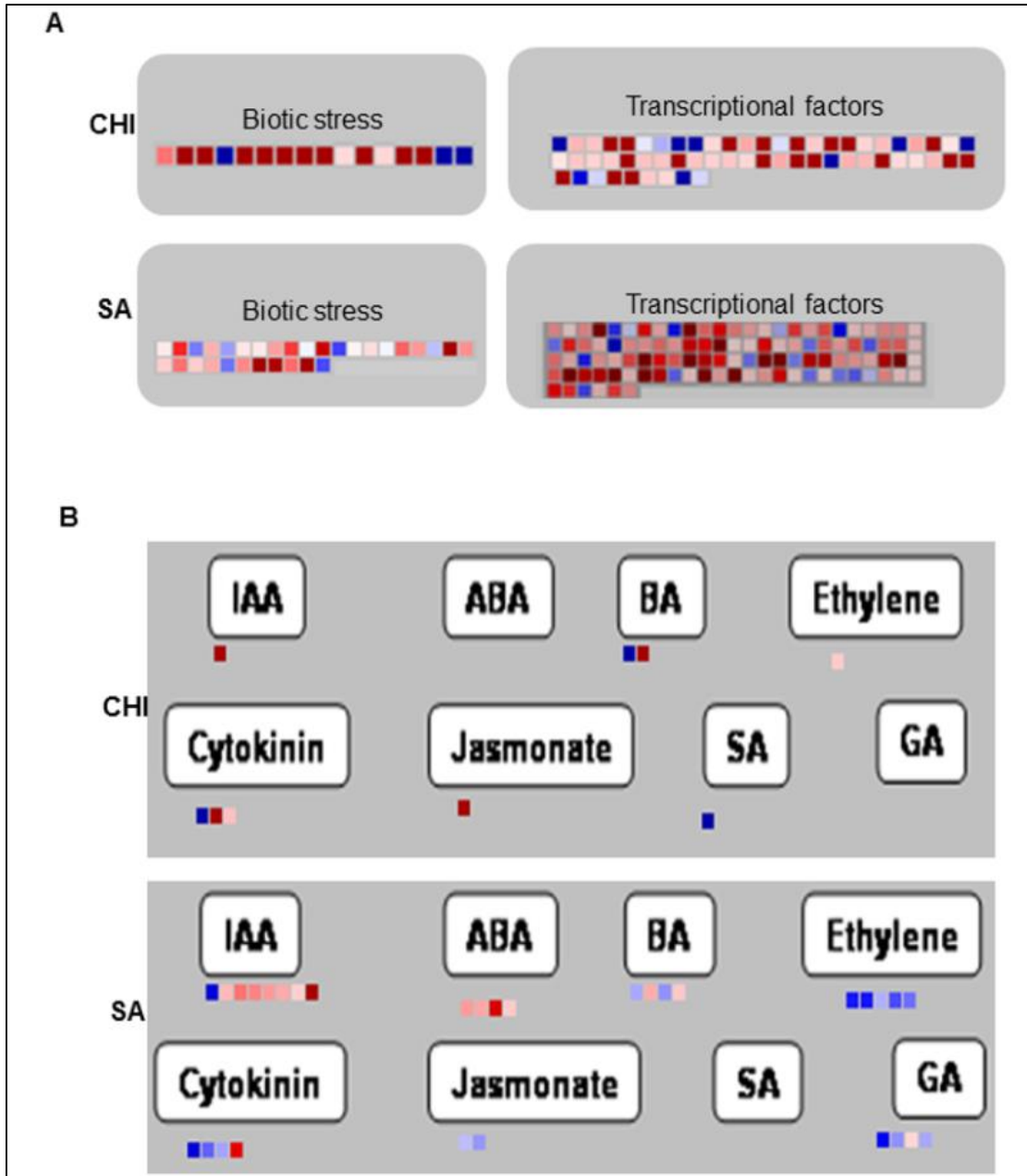


Figure 4: MapMan screenshots showing the expression of treatments-modulated genes. (A) Genes associated with biotic stress, abiotic stress and transcriptional factors, (B) differential expression of hormone-related transcripts in sweet orange submitted to SA and CHI treatments. The fold changes are indicated as gradients between red (down-regulated) and blue (up-regulated). Each point represents a transcript. IAA, indole-3-acetic acid; ABA, abscisic acid; BA, benzyladenine; SA, salicylic acid; GA, gibberellic acid.

The hormone interactions that occur during the defense response in plants are complex, but it has been well demonstrated that SA and the auxin pathway interact antagonistically

[65,66]. Similarly, ABA is able to antagonize the JA-ET signaling networks [66], and there have been data to suggest both positive and negative regulatory interactions between the ET and SA signaling pathways. Our results showed that SA-treatment promotes an antagonism between SA and auxin and between SA and ABA because the repression of characteristic genes of the auxin and ABA pathways was observed. However, genes that participate in the SA pathway and the ET and JA biosynthesis pathways were induced, which is contrary to the idea that SA should suppress ET/JA synthesis. Several studies have suggested a mutual antagonism between SA and JA [67,68,69,70,71]. In contrast to this paradigm, some evidence has demonstrated strong positive interactions between the JA and SA pathways [72,73]. Sorghum treated with SA and other elicitors demonstrated the induction of genes belonging to the octadecanoic acid pathway of JA synthesis, and an increase in JA content was observed [22]. In tomato, it was demonstrated that the accumulation of SA after inoculation with *X. campestris* pv. *vesicatoria* requires ET synthesis [74]. In tobacco and *A. thaliana*, there were indications that SA and JA act synergistically, suggesting that the two pathways regulate defense-related genes together [73,74]. We suggest that, in sweet orange, the three pathways (SA, ET, and JA) somehow interact early to promote an increase in the defense mechanism because we observed the induction of genes involved in ET and JA synthesis (*ACS12* and *OPR3*, respectively) and in the SA pathway (*WRKY*, *PR2*, and *PR9*). Our analysis demonstrated that the interaction among hormonal pathways promoted by exogenous SA occur together with cellular redox signaling because many hormones produce reactive oxygen species (ROS) [75]. A similar interaction has been described previously, and thioredoxins have been linked to the SA signaling cascade. During the SAR, the oligomeric cytosolic protein NPR1 forms monomers [76] to interact with nuclear *TAG* transcription

factors, a process that requires thioredoxins [41]. For CHI treatment, we observed fewer transcriptional changes when compared to SA treatment.

PRs genes

Among the many components that are altered as a result of a plant's defensive response are the *PR* genes, which may accumulate locally or systemically and are associated with the development of SAR. The induction of resistance may culminate with the expression of pathogenesis-related genes (PRs), and both CHI and SA treatments have been demonstrated to induce these genes in other plants (Figure 3) [5,7,9,77,78,79]. The regulation of a number of genes encoding putative PR proteins was observed, such as trypsin and protease inhibitor/Kunitz family proteins, several disease resistance proteins (CC-NBS-LRR class), peroxidase (*PR9*) and glucanase (*PR2*), as well as a number of genes that were annotated as “pathogenesis-related” but not possessing homology to known PR genes (Table S6 and S7). Peroxidases and glucanases appeared to be induced by SA treatment, as assessed by RNA-seq and RT-qPCR (Table 3; Figure 2), but not by CHI treatment. The peroxidases are important for catalyzing lignin deposition in the cell wall, an important event in the primary defense against pathogens. Similarly, β -1,3-glucanase is a member of a family with antimicrobial properties [80]. Our results suggest that the expression of *PR* genes following the application of SA may contribute to increased plant resistance against pathogens in sweet orange.

CONCLUSIONS

Using Illumina sequencing technology, we investigated the transcriptome of plants treated with SA and CHI and identified differentially expressed genes, with more genes being influenced by SA treatment than by CHI treatment. Analysis of the annotated genes showed significant increases in the expression levels of genes involved in signaling, biotic stress (redox state, secondary metabolism, PRs-genes) and hormonal interaction, especially for SA treatment. SA treatment altered the expression of nearly twice the number of genes when compared to CHI treatment. We observed responses typical of endogenous SA, such as an increase in *WRKY* transcriptional factors (in this case, *WRKY50*) and *PR* genes. Interestingly, our results did not show the suppression of ET/JA synthesis after the exogenous application of SA, but we did observe the suppression of the auxin pathway and the ABA pathway. Although CHI treatment promoted fewer changes in the transcriptional profile compared to SA treatment, it is possible that the elicitors promote the “priming phenomenon”; in this case, an increase in the capacity for the rapid and effective activation of defense mechanisms occurs only after contact with the pathogen, which involves *PR* genes, an oxidative burst, cell wall lignification, and the secretion of phytoalexins [81]. Thus, we expanded the knowledge regarding defense induced by elicitors in a species of citrus that is susceptible to various diseases as well as the molecular mechanisms mediated by SA/CHI treatments. Additional studies are being conducted to evaluate the effects of these compounds against citrus pathogens.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The following authors conceived and designed the experiments: DSOC, AAS, MAT, and MAM. The following author performed the experiments: DSOC. The following authors

analyzed the data: DSOC, AAS, MAT, CMR, LTK, and MAM. The following author wrote the paper: DSOC. The following authors read, corrected and approved the final manuscript: DSOC, AAS, MAT, CMR, LTK, and MAM.

REFERENCES

1. Food and Agricultural Organization of the United Nations [<http://Faostat.fao.org>].
2. Mauch-Mani B, Métraux J (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Ann Bot* 82: 535–540.
3. Zhao J, Davis LC, Verpoorte RV (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23: 283–333.
4. Raskin I (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 43: 439–463.
5. Hooft Van Huijsduijnen RAM, Alblas SW, DE Rijk RH, Bolr JF (1986) Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. *J Gen Virol* 67: 2135–2143.
6. He CT, Wolyn DJ (2005) Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum f. sp. asparagi*. *Plant Pathol* 54: 227–232.
7. Mandal S, Mallick N, Mitra A (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* in tomato. *Plant Physiol Biochem* 47: 642–649.
8. Palva TK, Hurtig M, Saindrenan P, Palva ET (1994) Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 356–363.
9. Babu RM, Sajeena A, VijayaSamundeeswari A, Sreedhar A, Vidhyasekaran P, et al. (2003) Induction of systemic resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by salicylic acid in *Oryza sativa* (L.). *J Plant Dis Prot* 110: 419–431.

10. Renault A, Deloire A, Bierne J (1996) Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis* 35: 49-52.
11. Palva TK, Hurtig M, Saindrenan P, Palva ET (1994) Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 356-363.
12. Wang Y, Liu J (2012) Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *J Plant Physiol* 169: 1143-1149.
13. Faoro F, Maffi D, Cantu D, Iriti M (2008) Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. *Bio Control* 53: 387-401.
14. Iriti M, Faoro F (2008) Abscisic acid mediates the chitosan-induced resistance in plant against viral disease. *Plant Physiol Biochem* 46: 1106-1111.
15. Cavalcanti FR, Resende MLV, Carvalho CPS, Silveira, JAG, Oliveira JTA (2007) Na aqueous suspension of *Crinipellis perniciosus* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Prot* 26: 729-738.
16. Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-Del Valle MG, Hernández-López MG, AitBarka E, et al. (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot* 25: 108-118.
17. Majeti NV, Kumar R (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46: 1-27.
18. Iriti M, Vitalini S, Di Tommaso G, D'Amico S, Borgo M, et al. (2011) New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Aust J Grape Wine Res* 17: 263-269.

19. Coqueiro DSO, Maraschin M, Di Piero RM (2011) Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. *J Phytopathol* 159: 488-494.
20. Romanazzi G, Nigro F, Ippolito A, Di Venere D, Saler DM (2002) Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *J Food Sci* 67: 1862-1867.
21. Rappussi MCC, Pascholati SF, Benato EA, Cia P (2009) Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges. *Braz Arch Biol Technol* 52: 513-521.
22. Salzman RA, Brady JA, Finlayson SA, Buchanan CD, Summer EJ, et al. (2005) Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiol* 138: 352-368.
23. Li ST, Zhang P, Zhang M, Fu CH, Zhao CF, et al. (2012) Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC Genomics* 13: 295-305.
24. Povero G, Loreti E, Pucciariello CH, Santaniello A, Di Tommaso D, et al. (2011) Transcript profiling of chitosan-treated *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Res* 124: 619-629.
25. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111.
26. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, et al. (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28: 511-515.

27. Usadel B, Nagel A, Steinhauser D, Gibon Y, Blasing OE, et al. (2006) PageMan: An interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics* 7: 535-542.
28. Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, et al. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37: 914-939.
29. Zhao S, Fernald RD (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol* 12: 1045-1062.
30. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA (2007) Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: ONG Mamiraua. 364p.
31. Van Der Luit AH, Piatti T, Van Doorn A, Musgrave A, Felix G, et al. (2000) Elicitation of suspension cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol* 123: 1507-1516.
32. Ohtake Y, Takahashi T, Komeda Y (2000) Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 1038-1044.
33. Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, et al. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Nat Acad Sci* 103: 11086-11091.
34. Mur LA, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJ, et al. (2012) Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene mediated resistance mechanisms against pathogens. *J Exp Bot* 63: 4375-4387.

35. Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F, et al. (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 58: 1397-1405.
36. Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2: 369-374.
37. Van Camp W, Montagu MV, Gent U, Inzé D (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* 3: 330-334.
38. Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, et al. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Nat Acad Sci* 97: 8849-8855.
39. Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 35: 259-270.
40. Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956.
41. Mittler R, Herr EH, Orvar BL, Van Camp W, Willekens H, et al. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Nat Acad Sci* 96: 14165-14170.
42. Kliebenstein DJ, Dietrich RA, Martin AC, Last RL, Dang JL (1999) LSD1 Regulates Salicylic Acid Induction of Copper Zinc Superoxide Dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 1022-1026.
43. Li H, Yu T (2000) Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *J Sci Food Agric* 81: 269-274.
44. McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.

45. Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, et al. (2008) Activation of the indole-3-acetic acid–amidohydroxylase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell* 20: 228-240.
46. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, et al. (2006) A Plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439.
47. Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17: 1784-1790.
48. Aravind L, Koonin EV (2001) The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron dependent dioxygenases. *Genome Biol* 2, 0007.1-0007.8.
49. Van Damme M, Huibers RP, Elberse J, Van Den Ackerveken G (2008) Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *Plant J* 54: 785-793.
50. De Moraes CM, Mescheer MC, Tumlinson JH (2001) Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410: 577-580.
51. Kessler A, Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144.
52. Andersen RA, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand DF, McCracken CT Jr, Collins RW, et al. (1994) Structure-antifungal activity relationships among volatile C₆ and C₉ aliphatic aldehydes, ketones and alcohols. *J Agric Food Chem* 42: 1563-1568.
53. Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47: 177-206.

54. Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199-205.
55. Chujo T, Kato T, Yamada K, Takai R, Akimoto-Tomiyama C, et al. (2008) Characterization of an elicitor-induced rice WRKY gene, OsWRKY71. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 240-245.
56. Liu X, Bai X, Wang X, Chu C (2007) OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol* 164: 969-979.
57. Shimono M, Sugano S, Nakayama A, Jiang CJ, Ono K, et al. (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* 19: 2064-2076.
58. Dong J, Chen C, Chen Z (2003) Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51: 21-37.
59. Levée V, Major I, Levasseur C, Tremblay L, Mackay J, et al. (2009) Expression profiling and functional analysis of *Populus*WRKY23 reveals a regulatory role in defense. *New Phytol* 184: 48-70.
60. Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10: 372-379.
61. Asselbergh B, Curvers K, Franca SC, Audenaert K, Vuylsteke M, et al. (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol* 144: 1863-1877.
62. Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56: 165-185.

63. Creelman RA, Mullet JE (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci* 92: 4114-4119.
64. Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, et al. (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *CurrBio* 118: 650-655.
65. Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, et al. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 3460-3479.
66. Doherty HM, Selvendran RR, Bowles DJ (1988) The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxybenzoic acids. *Physiol Mol Plant Pathol* 33: 377-384.
67. Pena-Cortes H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191: 123-128.
68. Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconin A, Ryan CA (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol* 108: 1741-1746.
69. Gupta V, Willits MG, Glazebrook J (2000) Arabidopsis thaliana EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 503-511.

70. Niki T, Mitsuhara I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol* 39: 500-507.
71. Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci* 97: 11655-11660.
72. Xu Y, Chang PLC, Liu D, Narasimhan ML, Kashchandra GR (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077-1085.
73. Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci* 97:11655-11660.
74. Bartoli CG, Casalongue CA, Simontacchi M, Marquez-Garcia B, Foyer CH (2012) Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ Exp Bot* doi:10.1016/j.envexpbot.2012.05.003.
75. Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity. *Plant Cell* 15: 2181-2191.
76. Falcón-Rodríguez AB, Costales D, Cabrera JC, Martínez-Téllez MA (2011) Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora anicotianae*. *Pest Biochem Physiol*. doi:10.1016/j.pestbp.2011.04.005.
77. Reglinskia T, Elmera PAG, Taylora JT, Woodb PN, Hoyte SM (2010) Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathol* 59: 882-890.

78. Yalpani N, Shulaev V, Raskin I (1993) Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* 83: 702-708.
79. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162.
80. Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant–pathogen interactions. *TrendsPlantSci* 7: 210-216.
81. Venturini L, Ferrarini A, Zenoni S, Tornielli GB, Fasoli M, Santo SD, Minio A, Buson G, Tononi P, Zago ED, Zamperin G, Bellin D, Pezzotti M, Delledonne M (2013) De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. Corvina unveils varietal diversity. *BMC Genomics* 14:41.

CAPÍTULO 2

Quitosana e ácido salicílico como eliciadores no controle do cancro cítrico e clorose variegada dos citros

1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores limitantes que ameaçam a expansão e a produtividade citrícola são as doenças. Dentre elas, a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico causam prejuízos direto e imediato à planta reduzindo a produtividade e qualidade dos frutos.

A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, colonizadora dos vasos do xilema, e afeta o transporte de água e nutrientes do sistema radicular para a copa. A CVC afeta igualmente todas as variedades de laranja doce e é transmitida por cigarrinhas, por borbulhas e mudas infectadas. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri* e outros patovares, afeta variedades comerciais de citros em todo o mundo (Gottig *et al.*, 2010). Tanto para a CVC quanto para o cancro as medidas de controle não são satisfatórias.

Os eliciadores de resistência podem induzir defesa local ou sistêmica nas plantas contra o ataque de patógenos, levando ao controle da doença por reduzir o tamanho e/ou o número de lesões ocasionadas por estes (Kuc, 1982; Walters & Fountaine, 2009). A quitosana (CHI) e ácido salicílico (SA) são elicitores que demonstram controlar doenças em diversas culturas (Wang *et al.*, 2012; Felliziani, 2013; Thakur & Sohal, 2013; Osman *et al.*, 2013;). A CHI é um polissacarídeo derivado da quitina e formado por unidades de glucosamina. Estudos têm mostrado duplo efeito da CHI: antimicrobiano e indutor de defesa de plantas (Majeti & Kumar, 2000; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Cavalcanti *et l.*, 2007; Faoro *et al.*, 2008; Iriti & Faoro, 2008) O SA é um composto fenólico produzido naturalmente pelas plantas e desempenha um papel importante como sinalizador em respostas de defesa.

Aplicações exógenas do composto pode contribuir par aumentar as respostas de defesa da planta (Hooft Van Huijsduijnen *et al.*, 1986 Raskin, 1992; Palva *et al.*, 1994; Majeti & Kumar, 2000; Babu *et al.*, 2003; He & Wolyn, 2005; Mandal *et al.*, 2009). Em estudo prévio com folhas destacada de laranja de umbigo a aplicação exógena de SA promoveu reduções do cancro cítrico e diminuiu a população bacteriana nas folhas. No entanto, em plantas de laranja ‘Pera’ sob condições de casa de vegetação o SA nem a CHI ainda não foram testados contra *X. citri*. Portanto, no presente estudo foi investigado o papel da CHI e do SA na interação entre plantas de laranja ‘Pera’-*X. citri* e laranja ‘Pera’-*X. fastidiosa* comparando o efeito destes dois elicitores no que tange suas eficácias no controle da doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e tratamento com os eliciadores

Clones de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) cv. ‘Pêra’ foram enxertados sobre limão Cravo e mantidos em casa de vegetação. As plantas foram utilizadas com sete meses, sendo selecionadas conforme uniformidade de crescimento e estágio de desenvolvimento foliar. A quitosana de baixo peso molecular (CHI) (Sigma Aldrich Chemicals) foi preparada a 4 mg/ml em ácido clorídrico (HCl) 0,05N e o pH ajustado com NaOH 1M para 5,6 antes do uso. O ácido salicílico (SA) (Sigma Aldrich Chemicals) a 2,5 mM foi dissolvido em solução de etanol 10%. Soluções de HCl (-CHI) e etanol 10% (-SA) foram usadas como controles para os tratamentos com CHI (+CHI) e SA (+SA), respectivamente. As plantas foram pulverizadas com CHI/HCl 48h antes da inoculação e com SA/etanol 24h antes, todos contendo Tween 20, até o ponto de escorrimento das folhas. As concentrações e intervalos foram determinadas em experimento piloto descrito no capítulo 1.

2.2 Avaliação dos eliciadores sobre multiplicação de *X. citri* e na redução do cancro cítrico

2.2.1 Inoculação bacteriana

Foi utilizada a *X. citri* (estipe 306) marcada com GFP (Green Fluorescent Protein), cedida pelo Dr Adrian Vojnov (National Scientific and Technical Research Council, Argentina, Biology and Agricultural Science), para auxiliar na observação da comunidade epifítica na superfície foliar. Células bacterianas foram cultivadas em meio NBY por 24h a 28°C em agitação sob fotoperíodo de 12h de luz. O inóculo foi preparado a partir de uma alíquota da suspensão bacteriana em tampão PBS (Phosphate Buffered Saline), ajustada em espectrofotômetro para aproximadamente 10^7 células/ml. As plantas foram inoculadas, após os tratamentos com os eliciadores, por aspersão da suspensão bacteriana em toda a planta com auxílio de um atomizador manual até o ponto de escorrimento e mantidas em câmara úmida por 24h.

2.2.2 Análise da sobrevivência da comunidade epifítica de *X. citri*

Amostras foliares obtidas a partir de plantas tratadas e desafiadas foram coletadas 24h e 48h após a inoculação (hpi) para avaliar os efeitos dos eliciadores na sobrevivência epifítica de *X. citri*. A detecção de *X. citri* marcada com GFP foi feita por microscopia de fluorescência. Para a análise, foram cortadas áreas de aproximadamente 1 cm² das folhas, e colocadas em lâminas de vidro para visualização da superfície abaxial. As imagens foram obtidas utilizando-se lente com aumento de 40 x (abertura numérica, 2.0) com um microscópio de fluorescência Olympus BX61 sendo utilizado filtro que permite a excitação da GFP.

2.2.3 Curva de crescimento bacteriano

Três folhas de cada repetição foram coletadas aos 2, 3, 7, 14 e 21 dias após inoculação (dpi) com *X. citri* para a recuperação das células bacterianas e contagem de unidades formadoras de colônia (ufc). Para padronização, as folhas foram cortadas com 2 cm de diâmetro e desinfestadas com etanol 70% por 2 min para excluir contaminações. Então, foram lavadas com água esterilizada e picotadas com auxílio de uma tesoura no interior de tubos tipo falcon, contendo 10 ml de PBS. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min e a suspensão obtida foi diluída em PBS (10^{-1} a 10^{-8}) e plaqueada (100 μ l) em meio NBY. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas por 48h a 28 °C sob fotoperíodo de 12h de luz, para contagem de ufc. Os resultados foram expressos como \log_{10} ufc/ml.

2.2.4 Incidência e severidade da doença

A incidência da doença foi calculada pelo número de folhas com sintomas de cancro/número total de folhas da planta x 100. A severidade foi avaliada com o auxílio de uma escala diagramática, conforme descrito por Belasque Júnior *et al.* (2005), o qual leva em consideração a porcentagem de área foliar lesionada. Nove folhas de cada planta foram avaliadas. Ambas, incidência e severidade, foram avaliadas aos 12 e 19 dpi e expressas em porcentagem.

2.2.5 Extração de RNA, síntese do cDNA e RT-qPCR

Amostras foliares foram coletadas 24 hpi, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C para a extração do RNA.

O RNA total das amostras foi extraído a partir de 100 mg de tecido usando o reagente Tri Reagent, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystem), e em seguida

foi tratado com a enzima RNase-free DNase (Qiagen, Maryland, EUA), para eliminar qualquer contaminação por DNA. O RNA total foi avaliado quanto a qualidade e concentração por meio do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total por meio do RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, segundo instruções do fabricante (Fermentas, EUA). O cDNA obtido foi diluído em água DEPC na proporção de 1:25 e armazenado em freezer -20 °C até o uso.

O RT-qPCR foi conduzido com três repetições técnicas utilizando o Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA) no aparelho ABI 7500 Real Time PCR system em um volume total de 20 µl. O ciclo da PCR foi o seguinte: um ciclo de 20 s a 95°C, seguindo por 40 ciclos a 95°C por 3s e 60°C a 30s. Após a amplificação, todos os produtos foram submetidos à curva de *melt*. Um controle negativo sem cDNA foi utilizado em todas as análises para detectar possíveis contaminações. Os genes de referência ubiquitina e ciclofilina foram utilizados para normalizar a quantidade de cDNA em cada reação utilizando-se a equação: $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{gene de referência})$. A expressão gênica relativa foi calculada pelo $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra teste}) - \Delta Ct(\text{amostra de referência})$ por meio dos programas Miner (gera valores de Cqs com base nos valores de Rn obtidos no RT-qPCR) (Zhao & Fernald, 2005) e do GenEx versão 5.0.1.5.

A especificidade do *primer* foi avaliada pela curva de dissociação obtida após as corridas do RT-qPCR, já que cada *amplicon* tem uma temperatura específica de *melting* onde a dupla fita sofre desnaturação e a intensidade do *SYBR Green* diminui gerando um pico se houver somente um *amplicon*, ou picos adicionais se ocorrer amplificações inespecíficas (anelamento em outras regiões do DNA não esperadas). A eficiência dos *primers* foi obtida pelo programa Miner (Zhao & Fernald, 2005) o qual permite uma quantificação dos

resultados do RT-qPCR com base na cinética da amplificação por PCR individualmente para cada amostra, não sendo necessária uma curva-padrão, permitindo o cálculo direto de eficiência e dos valores do ciclo de quantificação (Cq) (Artico *et al.*, 2010).

Os normalizadores foram selecionados a partir de genes β -tubulina, ubiquitina e ciclofilina, os quais apresentam expressão constitutiva em citros (Boava *et al.*, 2011), sendo feita a quantificação dos níveis de expressão de cada um destes genes nas amostras do experimento por meio da RT-qPCR e os dados obtidos foram analisados pelo programa GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) - encontrado no programa GenEx versão 5.0.1.5 - que determina a estabilidade dos genes normalizados por meio do fator de estabilidade (M), sendo que quanto menor o valor de M, maior é estabilidade do gene normalizador.

Foram avaliados genes envolvidos em respostas de defesa mediadas por SA, etileno e auxina, além da expressão de genes envolvidos na parede celular (Tabela 1), todos eles selecionados com base no transcriptoma obtido (Capítulo 1).

Tabela 1: Genes com as seqüências de *primers* utilizadas no estudo com cancro cítrico.

Gene		Seqüência do <i>primer</i> (5'-3')
ACS12 / 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 12	F	TCAAACGGCTGGTAGGTCGTA
	R	ATGGGACGGGACGGTGAT
ERF5 / ethylene responsive element binding factor 5	F	CCGGCTTCAAGAGGAAAGTTG
	R	CGTGCCGCTTCCAGCTA
AOC3 / allene oxide cyclase 3	F	CAGCCCGCAATTCTGAA
	R	TCGCCGATTGTGAGATGTTG
ICS / isochorismate synthase	F	GCCATGATGAATGGTTGCAA
	R	CTGCAGGTAACGTACAACGTGCAA
EDS1 / enhanced disease susceptibility 1	F	TTTACAGGGCATTCTCAGCTGGT
	R	TATAGGTGGCATTCTGCTGGTGCT
BSMT1 / S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	F	GCCACAGCTCTCATGCAATTC
	R	AGGCCGTTGATGCATTTAATG
NPR1-3 / non expressor of PR1- like protein 3	F	GGTTGAGAAGGCTCTTGTGGAA
	R	TGCAATTCTCTGGATGCAGAAA
TGA1	F	TGTGAACCAGGCCGATCAT
	R	TTCCCCAAGGCAAGTAATG
WRKY70	F	GTGTGCGTATCGTGCGCTAT
	R	TCAAAAACCTCGAAAAGGCGAAT
PR1 / pathogenesis-related gene 1	F	ACAAACACACATCTCCGAAATGA
	R	TTGAAATGAGCAGCAGCAAAA
PR2 / beta-1,3-glucanase 2	F	CCTTGTTCGCCATGAG
	R	GCCAAGAGCTCCAGTTTCGA
Cellulose synthase	F	ACCCACCTCCTCGCAAACCT
	R	GCTTCGATGCTGCTGTTTGA
EXLB1 / expansin-like B1	F	AGCCCGCGCGCATAT
	R	CACCATAAGAATAGAGCTCTGCTGACT
PR9 / peroxidase superfamily protein	F	CATTAATTGTAACCGCGGAAT
	R	ACACCACCATATGAAAAATTTCCA
CSD2 / copper/zinc superoxide dismutase 2	F	TGGCCCTTTAACTGTGAAGTATTTTC
	R	AGGGTTTTTATTTCCAGGTTTGA
CCOAMT1 / S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	F	AAGGAGTCGTAACATTCGATCAAGT
	R	CAGCTTCTCTTCTGAGATTGCA
IAA9 / indole-3-acetic acid inducible 9	F	CCATTGCCCTGGGAGCTAA
	R	TGCAAGCGATTAAAGATCATGAA
ARF19 / auxin response factor 19	F	CCGGGCCACTGGTTT
	R	TGTGGCCTTGAGGGAAGTAAA
TIR1 / F-box/RNI-like superfamily protein	F	AAGTGCGGCTTTCCTTTGAG
	R	TGGCGATAAGGCGTTTCC
Ciclofilin	F	AGAGTATGCAGAGGAATGG
	R	GTCCTTAACAGAAGTCCGT
Ubiquitin	F	TTCGTCAGTTGACTAATCCT
	R	GTTGCTGTGTTGACTGTG

2.3 Avaliação dos eliciadores sobre a multiplicação de *X. fastidiosa* e na redução da clorose variegada dos citros

2.3.1 Condições de crescimento da *X. fastidiosa*, procedimentos para inoculação e detecção da bactéria

Foi utilizada a estipe 9a5c a qual foi re-isolada de plantas de laranja doce Pêra sintomáticas para CVC e mantidas em meio PW (DAVIS et al., 1981). Para inoculação das plantas, as colônias de *X. fastidiosa* foram re-suspensas em tampão PSB e a absorbância foi mensurada. Para certificação do número de unidades formadoras de colônias/ml (ufc/ml) foram realizadas diluições seriadas em PBS (10^{-1} a 10^{-8}) partindo de uma alíquota da suspensão de inoculação e após 15 dias o número de colônias foi mensurado com um auxílio de estereoscópio.

As plantas inoculadas com a suspensão de *X. fastidiosa* (10^8 u.f.c/ml) em uma região na base da planta marcada previamente para garantir o ponto de inoculação. Foi utilizada uma agulha hipodérmica para promover furos na base do pecíolo de duas folhas e em seguida foi depositado 10 μ L da suspensão bacteriana. Para maior eficiência da inoculação, as plantas foram submetidas a estresse hídrico dois dias antes do procedimento.

2.3.2 Curva de crescimento de *X. fastidiosa*

Uma vez que os sintomas de CVC é consequência da colonização de plantas cítricas por *X. fastidiosa*, amostras foliares foram coletadas 1, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a inoculação (dpi) para avaliar a infecção e multiplicação bacteriana. O DNA total foi extraído conforme descrito por Irey *et al.* (2006) e o ensaio de qPCR (PCR quantitativo) foi conduzido usando os *primers* CVC-1 (5'-GATGAAAACAATCATGCAAA-3') e CCSM-1 (5'-GCGCATGCCAAGTCCATATTT-3') e a sonda TaqMan [TAQCVC (5'-(6FAM)

AACCGCAGCAGAAGCCGCTCATC (TAMRA) p-3'; 335–313 bp)] (Oliveira *et al.*, 2002). As amplificações foram feitas usando-se o ABI 7500 real-time PCR system e TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies). A reação de amplificação foi realizada em um volume de 25 µl contendo 12,5 µl TaqMam PCR Master Mix (Life Technologies), 525 nM de cada *primer* e 20 ng do DNA da amostra. Em cada corrida experimental foram sempre utilizados os controles negativo (sem o DNA da bactéria) e positivo (DNA total das plantas infectadas com *X. fastidiosa*). Todas as amostras foram testadas em triplicatas dentro de cada corrida experimental.

Para a quantificação absoluta do número de células bacterianas presentes em cada amostra, foi construída uma curva padrão a partir do DNA da *X. fastidiosa* com 10^7 ufc/ml misturado ao DNA da planta. Considerando-se que uma fita de DNA da *X. fastidiosa* tem 2.679.310 pares de bases e que o peso molecular de duas bases é de 660 dáltons, conclui-se que uma fita de DNA da *X. fastidiosa* (equivalente a uma célula bacteriana) corresponde a 0,000002936 ng/µl. A partir deste cálculo foi estimada a quantidade de células na solução utilizada para diluição seriada. Da mesma forma procedeu-se com o DNA da planta. Neste caso, uma fita de DNA de citros corresponde a 0,0006 ng/µl e a partir de então foi estimada a quantidade de DNA na amostra da planta (10^6 DNA/µl). Foram utilizados cinco pontos da diluição, os quais foram quantificados por RT-qPCR, seguindo os critérios descritos anteriormente.

Adicionalmente, no final do experimento, ou seja, aos sete meses após a inoculação das plantas foi feita uma amostragem destrutiva com três repetições biológicas. Para tanto, cada planta foi cortada em quatro fragmentos de 10 cm cada a partir do ponto de inoculação (Figura 1A) e o caule foi processado com auxílio de uma furadeira (1B). O pó resultante (1C) foi utilizado para extração de DNA e quantificação absoluta da população bacteriana.

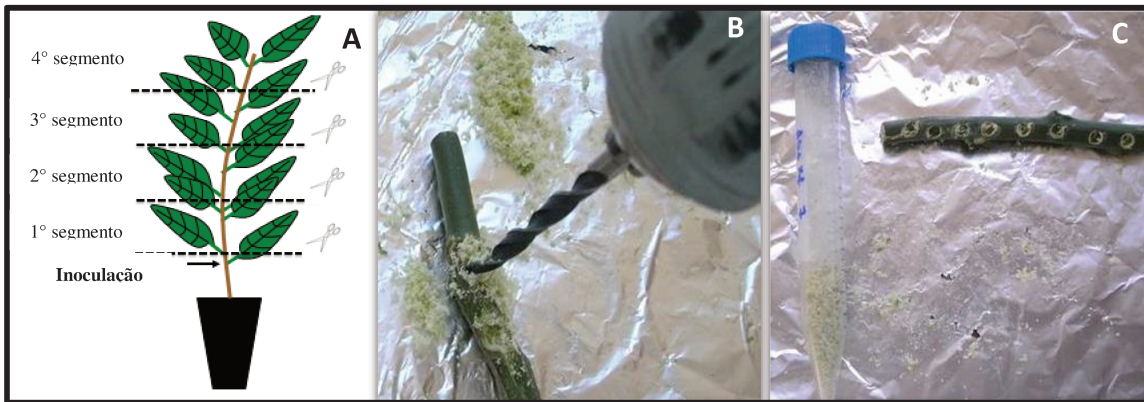


Figura 1: Procedimento para amostragem destrutiva. **(A)** As plantas foram fragmentadas em quatro partes de 10 cm cada a partir do ponto de inoculação. **(B)** Cada segmento foi processado com auxílio de uma furadeira. **(C)** Pó resultante para extração de DNA.

2.3.3 Avaliação da incidência da CVC

Além de avaliar a colonização bacteriana, antes da amostragem destrutiva foi mensurada a incidência da doença calculada pelo número de folhas com sintomas de CVC/número total de folhas da planta x 100.

2.3.4 Extração de RNA, síntese do cDNA e qPCR

Amostras foliares foram coletadas 24 hpi, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para extração do RNA. Os procedimentos para extração de RNA, síntese do cDNA e qPCR foram feitos como descrito no item 2.2.5. Foram avaliados genes envolvidos em respostas de defesa mediadas por SA e etileno (Tabela 2), todos eles selecionados com base no transcriptoma obtido (Capítulo 1).

Tabela 2: Genes com as sequências de *primers* utilizadas no estudo com CVC.

Gene	Sequência
NPR1-1	F 5' CAGAAGTGTCCACGTGTGTTGA 3' R 5' TGAAAAGCAGCGGAAGCATA 3'
NPR1-2	F 5' TGAGAGCAATCGTTCAGGAATG 3' R 5' CAATCGAGCTCACTCAACTCCTT 3'
NPR1-3	F 5' GGTTGAGAAGGCTCTTGTGGAA 3' R 5' TGCAATTCTCTGGATGCAGAAA 3'
NPR1-4	F 5' CAGAAGTGTCCACGTGTGTTGA 3' R 5' TGAAAAGCAGCGGAAGCATA 3'
NPR1-6	F 5' TCGCTTTTTGGATTGGACCTA 3' R 5' GTGATAAGCCACGTCCTTGCA 3'
TGA-1	F 5' TGTGAACCAGGCCGATCAT 3' R 5' TTCCTTCAAGGCAAGTAATG 3'
TGA-3	F 5' TGGATAAATTGGAGGCTCTTGTC 3' R 5' GCTTGACGAGTTGTTAGGATACGA 3'
TGA-5	F 5' GACCCAGCTTGAACAAGAGCTT 3' R 5' CATCGCTCCATTTCCACTCA 3'
PR-1	F 5' ACAAACACACATCTCCGAAATGA 3' R 5' TTGAAATGAGCAGCAGCAAAA 3'
PR-2	F 5' CCTTGTTCCTCCGATGAG 3' R 5' GCCAAGAGCTCCAGTTTCGA 3'
PR-4	F 5' GGCAAGTGCTTAAGGGTGACTAA 3' R 5' CACCAGCGTCCAAATCTAAACC 3'
PR-9	F 5' CATTAATTGTAACCGGCGGAAT 3' R 5' ACACCACCATATGAAAAATTTCCA 3'
WRKY-70	F 5' GTGTGCGTATCGTGCCTAT 3' R 5' TCAAAAACCTCGAAAAGGCGAAT 3'
EDS-1	F 5' GCATGCTCGATAGCCATGAA 3' R 5' ATGAGCCACGATTCTTTTCCA 3'
PAD-4	F 5' GGAACCCGTCTTGGTGCAT 3' R 5' TCCATCATCTGGGTTTGAAAGC 3'
SNI-1	F 5' GTAGTTGTATGCATGATTGATTGTG 3' R 5' GCATCATCAACAGGACCGTTT 3'
ACC oxidase	F 5' GATACCTTGACCGGAG 3' R 5' GATACCTTCAAGTGCCCT 3'
EIN-3	F 5' GGAGCGTCTGATAATCTTCG 3' R 5' AAGGTGTGAGGCGTAGACAC 3'
Ubiquitina	F 5' TTCGTCAGTTGACTAATCCT 3' R 5' GTTGCTGTGTTGACTGTG 3'
Ciclofilina	F 5' AGAGTATGCAGAGGAATGG 3' R 5' GTCCTTAACAGAAGTCCGT 3'

Foram avaliados alguns genes normalmente envolvidos com a sinalização por AS como membros da família dos *NPR1* (Non-expressor of pathogenesis related genes 1) e *PRs* (Pathogenesis related genes), os quais codificam enzimas importantes na defesa da planta, sendo, portanto, essenciais na resistência sistêmica adquirida (Cao *et al.*, 1995), *TGA* (fatores de transcrição que se ligam preferencialmente em regiões TGACG), *WRKY-70* (membro da família de fatores de transcrição que codificam proteínas que apresentam a sequência de aminoácidos WRKYGQK conservados na extremidade N-terminal), *EDS-1* (enanced disease susceptibility), *ICS* (isochorismate synthase), *PAD-4* (phytoalexin deficiente 4) e *SNI-1* (suppressor of npr1-1 inducible 1). Adicionalmente, foram avaliados genes envolvidos à biossíntese e sinalização por etileno, o ACC oxidase (1-aminocyclopropane-carboxylase oxidase), gene que codifica a uma enzima chave na via biossintética do etileno e o *ein-3* (ethylene insensitive-3), um importante regulador positivo de resposta ao etileno.

2.4 Análises estatísticas

Os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados com três repetições por tratamento. Para se avaliar diferenças estatísticas entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI, +SA vs. -SA e +CHI vs. +SA) foi utilizado o teste *t* de student para amostras independentes com auxílio do programa Bioestat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos dos eliciadores sobre o cancro cítrico

3.3.1 Atuação dos eliciadores contra *X. citri*

A comunidade epifítica analisada 24 hpi apresentou forte agregação bacteriana em plantas +CHI quando comparado a -CHI. Às 48 hpi a agregação se intensificou em plantas

+CHI, sendo observados vários aglomerados bacterianos nas amostras foliares (Figura 2). Nas plantas +SA foram observados menores agregações 24 hpi comparadas a plantas -SA e em 48 hpi não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos (+SA e -SA), não sendo observados agregados bacterianos. Comparações entre plantas +CHI e +SA revelaram que aparentemente a CHI favorece mais a formação de agregados epifíticos de *X. citri* do que SA.

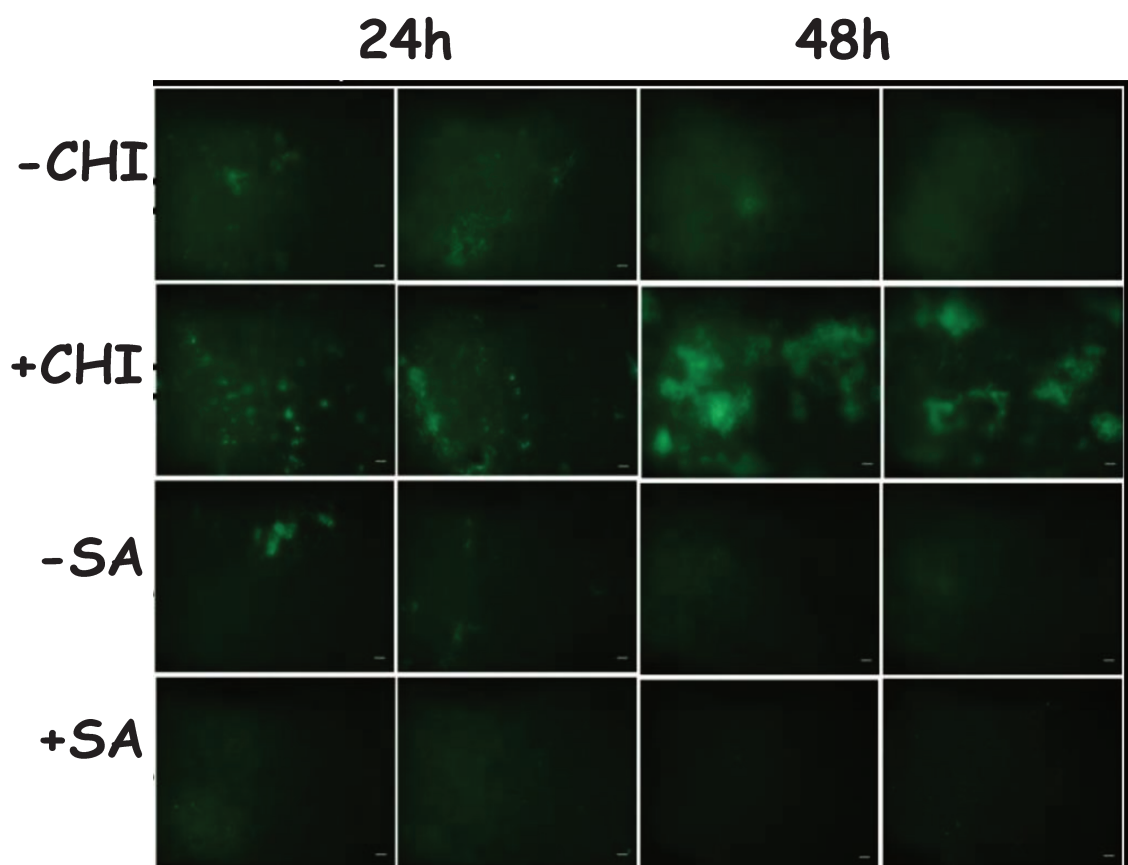


Figura 2: Agregados epifíticos de células de *X. citri* marcadas com GFP, analisados 24 e 48 hpi, usando microscopia de fluorescência. Escala da barra em 10 μm .

A primeira detecção da bactéria em plantas -CHI ocorreu 2 dpi, enquanto em plantas +CHI ocorreu aos 3 dpi, sendo a população bacteriana menor em plantas +CHI quando comparadas ao controle (Figura 3A). Na primeira semana de infecção, notou-se que o número

de bactérias recuperadas a partir de folhas infectadas em plantas +CHI foi consideravelmente menor do que em plantas -CHI, porém a partir de 7 dpi não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos (Figura 3A). Para plantas -SA a primeira detecção da bactéria ocorreu aos 2 dpi e em plantas +SA aos 3 dpi (Figura 3B). Ao final do experimento (21 dpi) a população bacteriana em plantas +SA foi menor do que em plantas -SA (Figura 3B). Comparações entre plantas +CHI e +SA revelaram que aos 3 dpi a população da bactéria foi menor em plantas +CHI, porém aos 14 e 21 dpi observou-se menor população em +SA (Figura 3C).

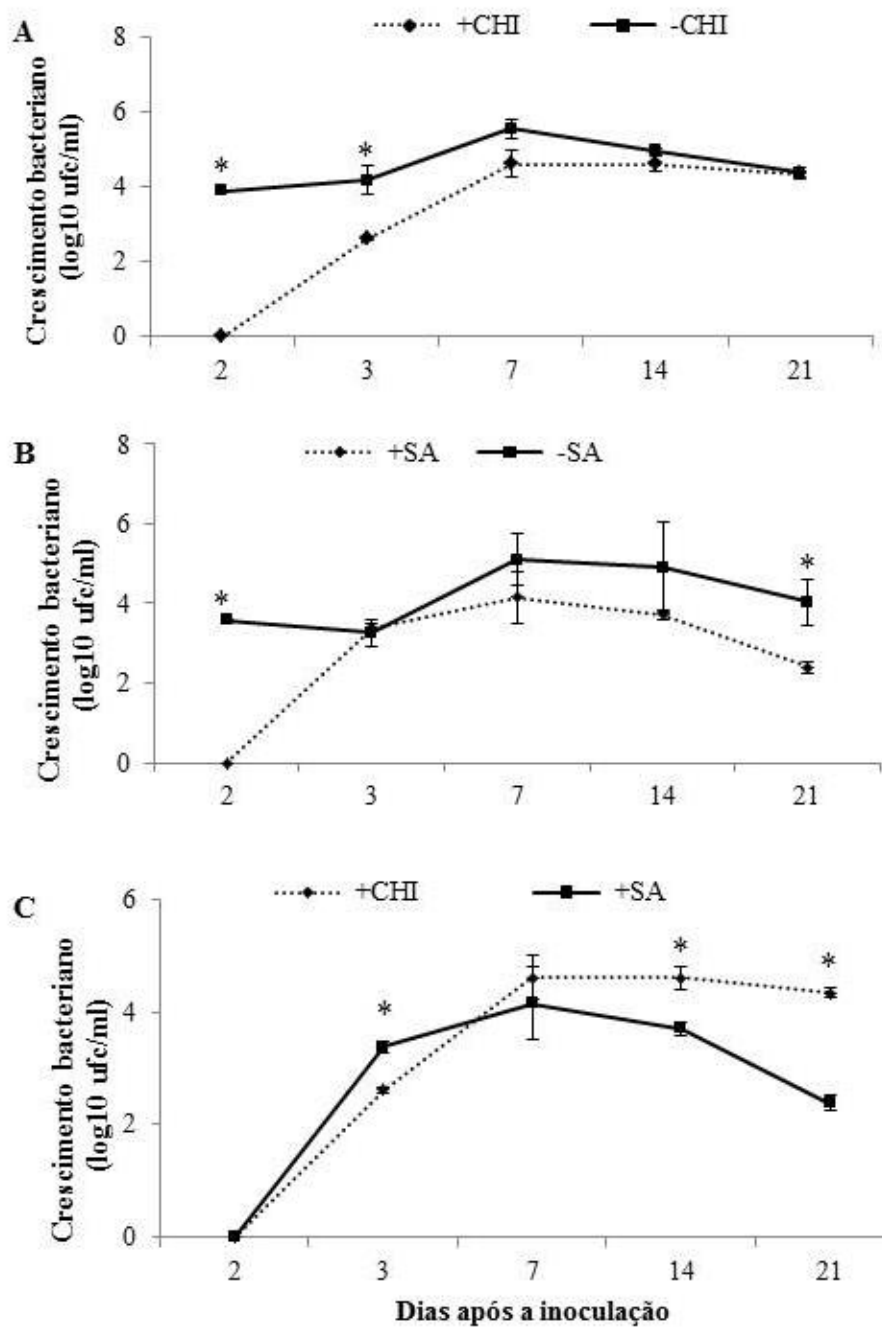


Figura 3: (A) Crescimento de *X. citri* em amostras foliares de laranja ‘Pera’ após o tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e (B) após o tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA). (C) Comparações entre o crescimento bacteriano nos tratamentos +CHI e +SA. As populações são expressas em log₁₀ ufc/ml. A multiplicação bacteriana foi monitorada por um período de 21 dias. Os pontos representam a média de três repetições e as barras representam o erro padrão. (*) Indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05).

3.3.2 Elicidores reduzem a incidência e severidade do cancro cítrico em laranja ‘Pera’

Nas avaliações efetuadas 12 e 19 dpi observou-se que plantas +CHI apresentaram valores de incidência e severidade significativamente menores do que plantas -CHI (Figura 4A). Aos 12 dpi houve redução de mais de 42% da incidência em plantas +CHI e aos 19 dpi a redução foi de 55% quando comparadas a plantas -CHI. A efetividade do tratamento com CHI também foi observada na redução da severidade causada pela bactéria, sendo observado controle do cancro de 94% e 88% aos 12 e 19 dpi, respectivamente, em plantas +CHI comparadas às plantas -CHI (Figura 4A). Forte redução da incidência também foi obtida em plantas +SA nas duas avaliações realizadas (Figura 4B). Houve redução da incidência de 53% e 55% aos 12 e 19 dpi, respectivamente, em plantas +SA comparadas a plantas -SA (Figura 4B). Análises comparativas da severidade também mostraram diferenças significativas entre plantas +SA e -SA, com o tratamento +SA reduzindo a severidade em mais de 95% nas duas avaliações comprado ao controle (Figura 4B). Os elicidores promoveram controle da incidência e severidade de forma similar, não sendo detectadas diferenças entre +CHI e +SA (Figura 4C). Os sintomas do cancro cítrico nas condições utilizadas neste estudo estão mostrados nas Figuras 4D (19 dpi).

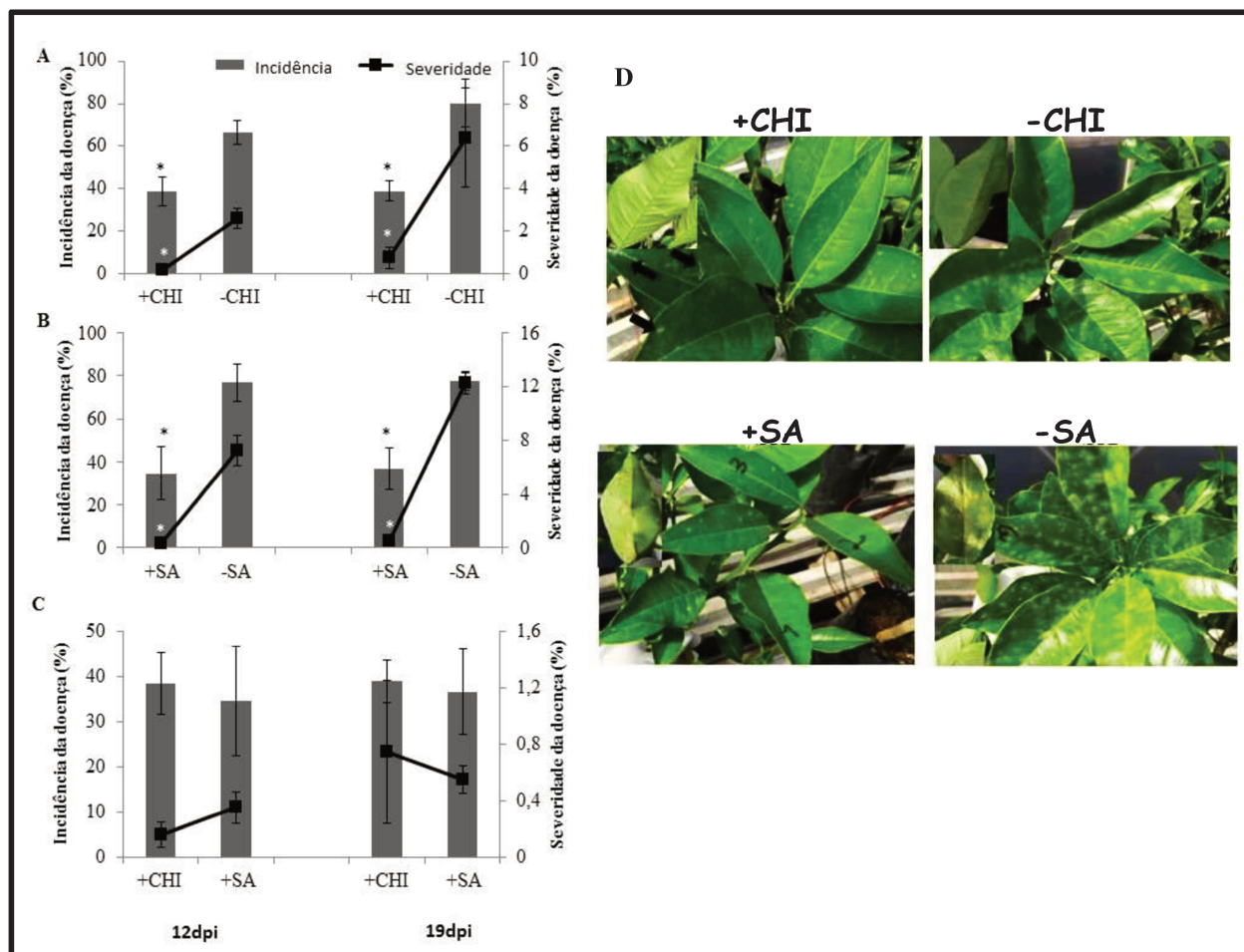


Figura 4: (A) Desenvolvimento do cancro cítrico (incidência e severidade) em folhas de laranja ‘Pera’ após tratamento com (+CHI) ou HCl (-CHI) e (B) depois do tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA) aos 11 e 19 dpi. (C) Comparações entre o desenvolvimento do cancro em plantas +CHI e +SA. Os resultados da severidade são referentes as médias de três repetições com avaliação de nove folhas de cada repetição (total de 27 folhas avaliadas por tratamento). Barras representam média \pm erro padrão. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI; +SA vs. -SA; +CHI vs. +SA). (D) Sintomas do cancro em folhas de laranja ‘Pera’ submetidas aos diferentes tratamentos aos 19 dpi.

3.3.3 Respostas de defesa em laranja ‘Pera’ aos eliciadores e à infecção com *X. citri*

O padrão de expressão dos diferentes genes avaliados está apresentado na Figura 5. Na Figura 5A é mostrado o efeito da CHI na expressão dos diferentes genes. O tratamento com CHI promoveu aumento na expressão dos genes *ERF5*, *BSMT1*, *WRKY70* e *PR9*, e menor expressão do *ACS12*, *PR2*, *IAA9* e *ARF19* comparado ao tratamento ao controle. A

expressão dos outros genes mostrados na Figura 5A não foi diferente entre +CHI e - CHI. Para o tratamento com SA, apenas o gene *CSD2* apresentou maior expressão quando comparadas a -SA. Em contrapartida, a expressão dos genes *ACS12*, *ICS*, *NPRI-3*, *WRKY70* e celulose sintase foi menor em plantas +SA. Os demais genes apresentaram expressão similar nos dois tratamentos (Figura 5B). A análise comparativa dos efeitos da CHI e SA revelaram diferenças na expressão dos genes *ACS12*, *ICS* e *WRKY70* (Figura 5C), com maior expressão do *ACS12* em plantas +SA e maior expressão dos *ICS* e *WRKY70* em plantas +CHI (Figura 5C).

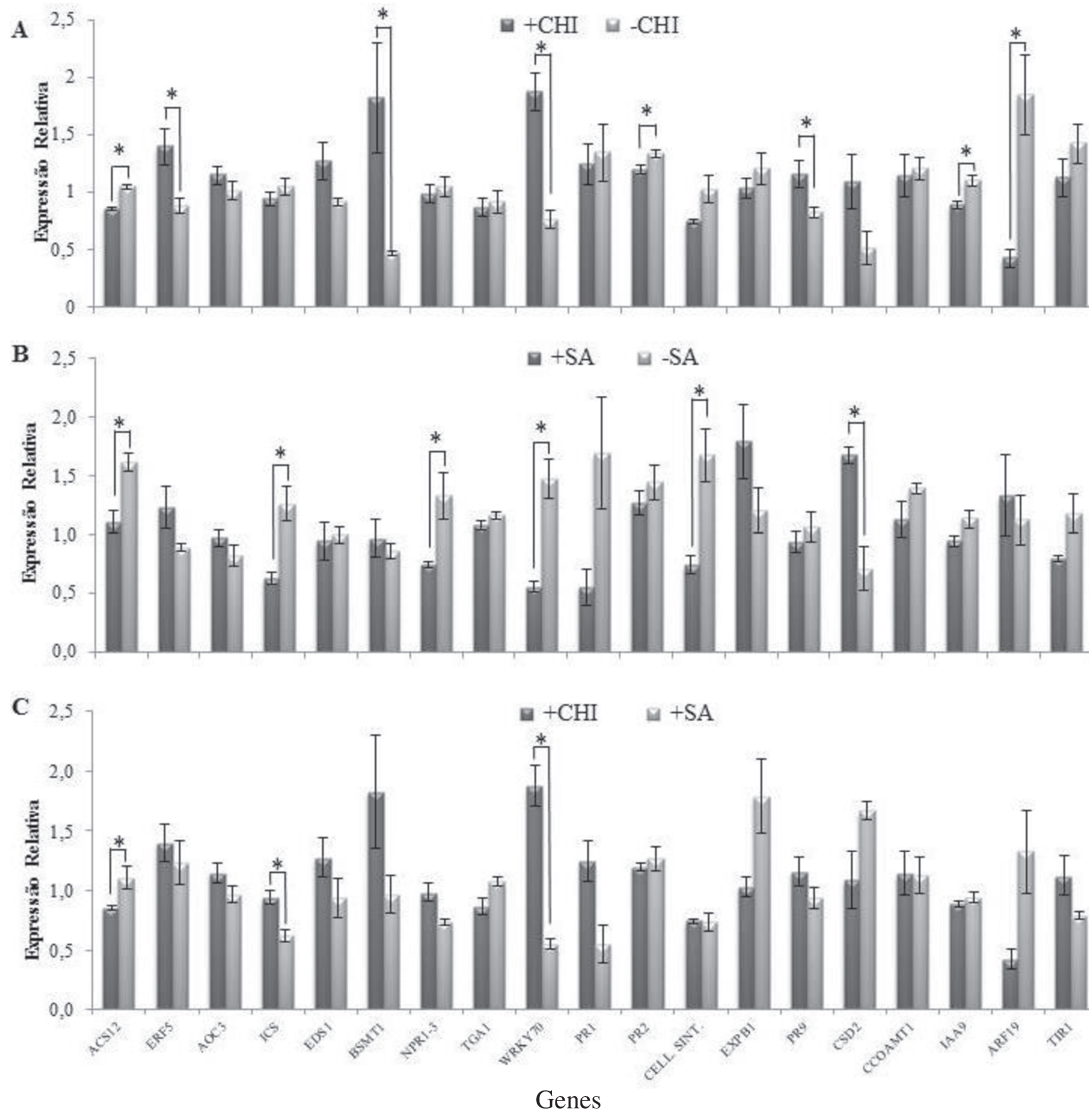


Figura 5: Valores de expressão relativa normalizados com a expressão dos genes de referência (ciclofilina e ubiquitina) e amostras controle (A) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ 48h após tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e 24 h após inoculação com *X. citri*, ambos normalizados com amostras tratadas com HCl sem desafio com a bactéria. (B) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ 24h após tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA) e 24 h após inoculação com *X. citri*, ambos normalizados com amostras tratadas com etanol sem desafio com a bactéria. (C) Comparações da expressão relativa em amostras +CHI e +SA. Barras representam média \pm erro padrão. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI; +SA vs. -SA; +CHI vs. +SA).

3.4 Efeitos dos eliciadores sobre a clorose variegada dos citros

3.4.1 Efeito da quitosana e ácido salicílico na defesa de laranja ‘Pera’ contra *X. fastidiosa*

A maioria dos genes avaliados apresentou maior expressão em plantas +CHI do que -CHI (Figura 6A). Os cinco genes *NPRI* de citros mostraram interessante padrão de expressão, com forte indução em plantas +CHI comparadas a -CHI. Dos genes *PRs*, apenas o *PR4* foi mais induzido em plantas +CHI, em contrapartida o *PR2* foi mais expresso em plantas -CHI. Quanto aos fatores de transcrição, o *TGA3* e o *TGA5* apresentaram padrões de indução similares em plantas +CHI, apresentando maior expressão nestas plantas em relação à plantas -CHI. O *ACO* apresentou maior expressão em plantas -CHI e os genes *EIN-3*, *EDS* e *SNI-1* foram mais expressos em plantas +CHI. Os demais genes avaliados apresentaram padrões de expressão similares em ambas as plantas +CHI e -CHI (Figura 6A).

Os resultados com o SA sobre os membros dos *NPRI* mostraram padrões distintos de expressão em apenas dois membros, sendo o *NPRI-3* mais expresso em plantas +SA e o *NPRI-4* em plantas -SA (Figura 6B). Houve maior expressão dos genes *PR-2* e *PR-9* em plantas +SA do que plantas -SA. Por outro lado o *PR-4* foi mais expresso em plantas -SA. Dos fatores de transcrição avaliados, os *TGA-1* e *TGA-3* apresentaram maior expressão em plantas +SA. Em contrapartida, o *EIN-3* foi mais expresso em plantas -SA. O gene *EDS-1* foi fortemente induzido em plantas +SA quando comparado a plantas -SA.

Análises comparativas mostraram que plantas +CHI apresentaram mais genes com maiores expressões comparados a plantas +SA. Apenas os genes *PR-1*, *PR-9* e *EDS* foram mais expressos em plantas +SA, sendo os demais (*NPRI-2*, *NPRI-3*, *PR-*, *TGA-3* e *SNI-1*) apresentaram maiores expressões em plantas +CHI (Figura 6C).

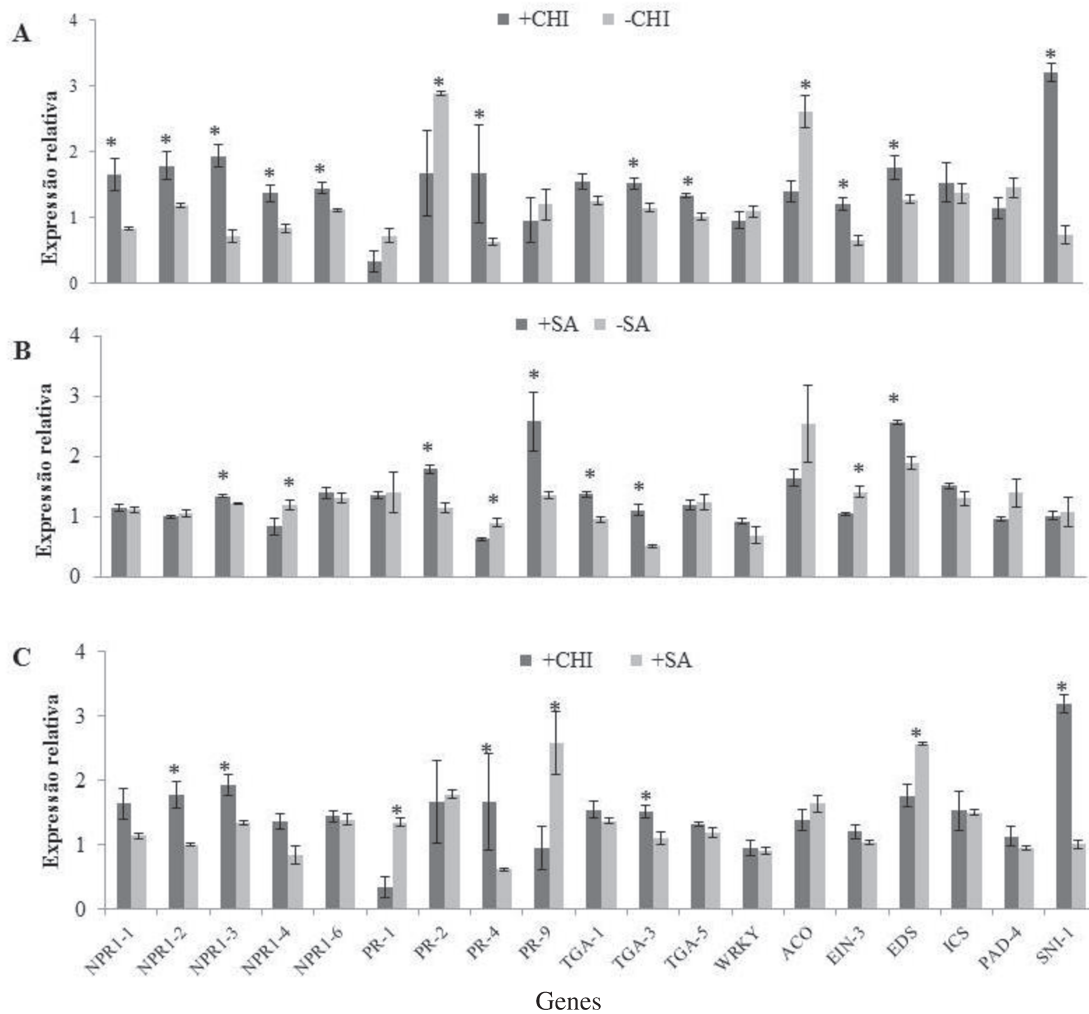


Figura 6: Valores de expressão relativa normalizados com a expressão dos genes de referência (ciclofilina e ubiquitina) e amostras controle. (A) Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ após tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e inoculados com *X. fastidiosa*, ambos normalizados com amostras tratadas com HCl sem desafio com a bactéria. **(B)** Expressão relativa em folhas de laranja ‘Pera’ após tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA) e inoculados com *X. fastidiosa*, ambos normalizados com amostras tratadas com etanol sem desafio com a bactéria. **(C)** Comparações da expressão relativa em amostras +CHI e +SA. Barras representam média \pm erro padrão. (*) Indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (+CHI vs. -CHI; +SA vs. -SA; +CHI vs. +SA).

3.4.2 Evolução da infecção bacteriana em plantas tratadas com os eliciadores

A avaliação da eficácia da inoculação artificial com *X. fastidiosa* é fundamental para a confirmação da infecção para posterior estudos da expressão gênica em citros. Para a

realização da quantificação absoluta do número de células de *X. fastidiosa* nas amostras ao longo das avaliações foi obtida uma curva-padrão com valores de Ct gerados no RT-qPCR para cada diluição (10^6 a 10^1) contendo amostras conhecidas de DNA da bactéria misturado ao DNA de laranja ‘Pera’ (Figura 7). O número de células nas amostras foliares foi calculado plotando-se o valor do Ct de cada amostra na equação da curva padrão obtida, permitindo avaliar a colonização bacteriana.

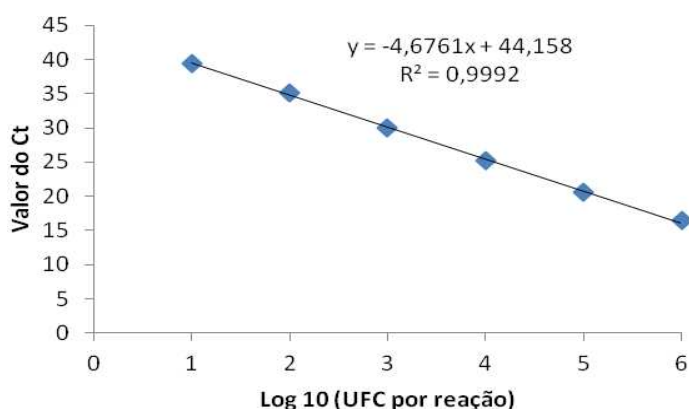


Figura 7: Curva padrão para a quantificação de células de *X. fastidiosa* em amostras foliares de laranja ‘Pera’.

Às 24h após inoculação de plantas submetidas ao tratamento com os eliciadores foi conduzido o qPCR e confirmada a presença da bactéria em plantas inoculadas.

A análise da evolução da infecção por *X. fastidiosa* em folhas e pecíolos não revelou diferenças estatísticas entre plantas +CHI e -CHI; no entanto, houve uma tendência de redução da população bacteriana em plantas +CHI entre os 60 e 120 dai (Figura 8A). No final do experimento (aos 150 dai) a população bacteriana nas plantas +CHI foi similar a plantas -CHI. Em plantas -SA houve uma redução significativa da população bacteriana aos 90 dai, sendo que nas outras avaliações não observaram-se diferença entre plantas +SA e -SA (Figura 8B). Análises comparativas não mostraram diferenças nas populações bacteriana em plantas +CHI e +SA (Figura 8C).

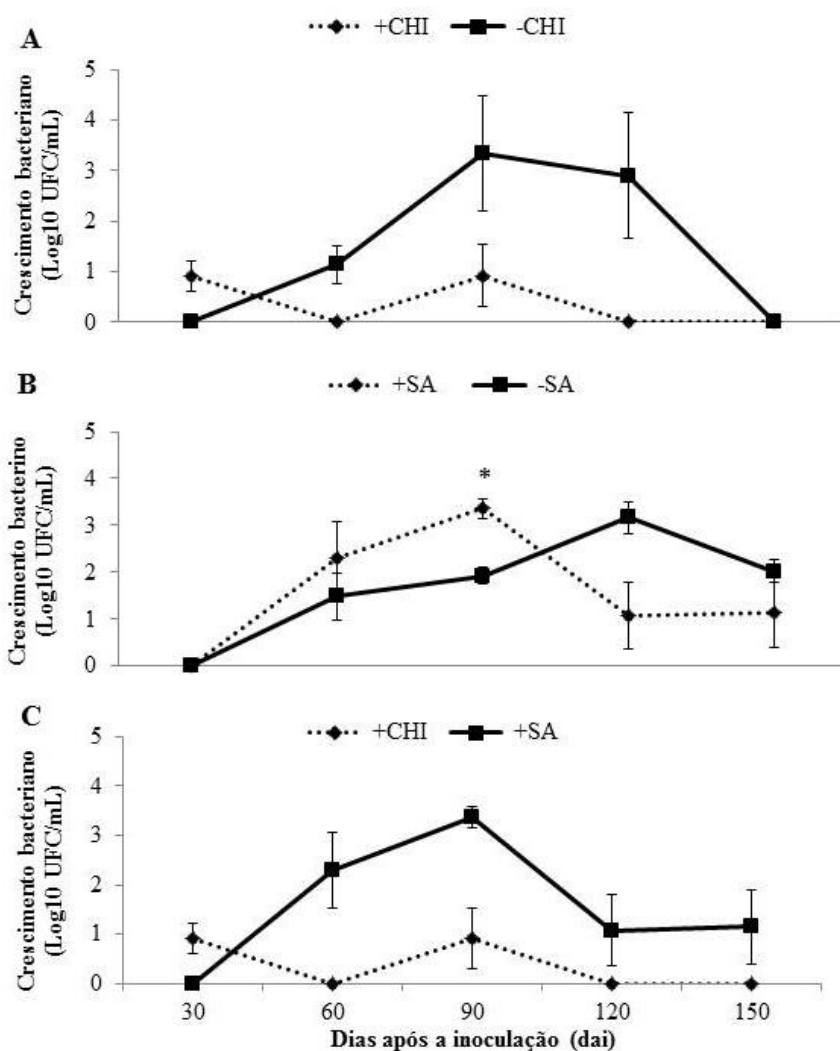


Figura 8: (A) Crescimento de *X. fastidiosa* em amostras foliares de laranja ‘Pera’ após o tratamento com quitosana (+CHI) ou HCl (-CHI) e (B) após o tratamento com ácido salicílico (+SA) ou etanol (-SA). (C) Comparações entre o crescimento bacteriano nos tratamentos +CHI e +SA. Populações são expressas em como log₁₀ ufc/ml. A multiplicação bacteriana foi monitorada por um período de 21 dias. Os pontos representam a média de três repetições e as barras representam o erro padrão. (*) Indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05).

Como a população de *X. fastidiosa* nos segmentos do caule apresentou uma oscilação grande entre as plantas, resultante do movimento dinâmico da *X. fastidiosa* dentro da planta, os resultados gerado no presente estudo são mostrados para plantas individuais ao invés de média por tratamento (Figura 9). Nas três plantas +CHI o título bacteriano esteve baixo até

o segundo segmento do ponto de inoculação, após esse ponto duas plantas mantiveram título baixo e apenas uma delas apresentou uma quantidade elevada no terceiro (~4.000 cópias de *X. fastidiosa*) e quarto segmento (~9.000 cópias de *X. fastidiosa*) (Figura 9A). Apenas uma das plantas -CHI manteve população bacteriana maior do que em plantas +CHI em todos os segmentos avaliados. Também foram observadas concentrações elevadas de bactérias em uma das plantas -CHI no quarto segmento (~12.0000 cópias de *X. fastidiosa*) do ponto de inoculação (Figura 9B).

Uma das plantas +SA manteve a população maior que as demais até o terceiro segmento e essa população atingiu ~1.000 cópias de *X. fastidiosa*. No quarto não foram detectadas grandes quantidades da bactéria em nenhuma das plantas (Figura 9C). Em plantas -SA pelo menos duas plantas mostraram acentuada multiplicação bacteriana até o segundo segmento do ponto de inoculação comparadas a plantas +SA, depois deste ponto uma planta apresentou alto título da bactéria (~4.500 cópias de *X. fastidiosa*) (Figura 9D).

Ao longo dos segmentos avaliados, observou-se que plantas +SA apresentaram populações bacterianas menores que plantas +CHI. A maior quantidade de bactérias recuperadas foi de ~1.000 cópias, em contrapartida plantas +CHI chegaram a apresentar ~9.000 cópias (Figura 9A e 9C).

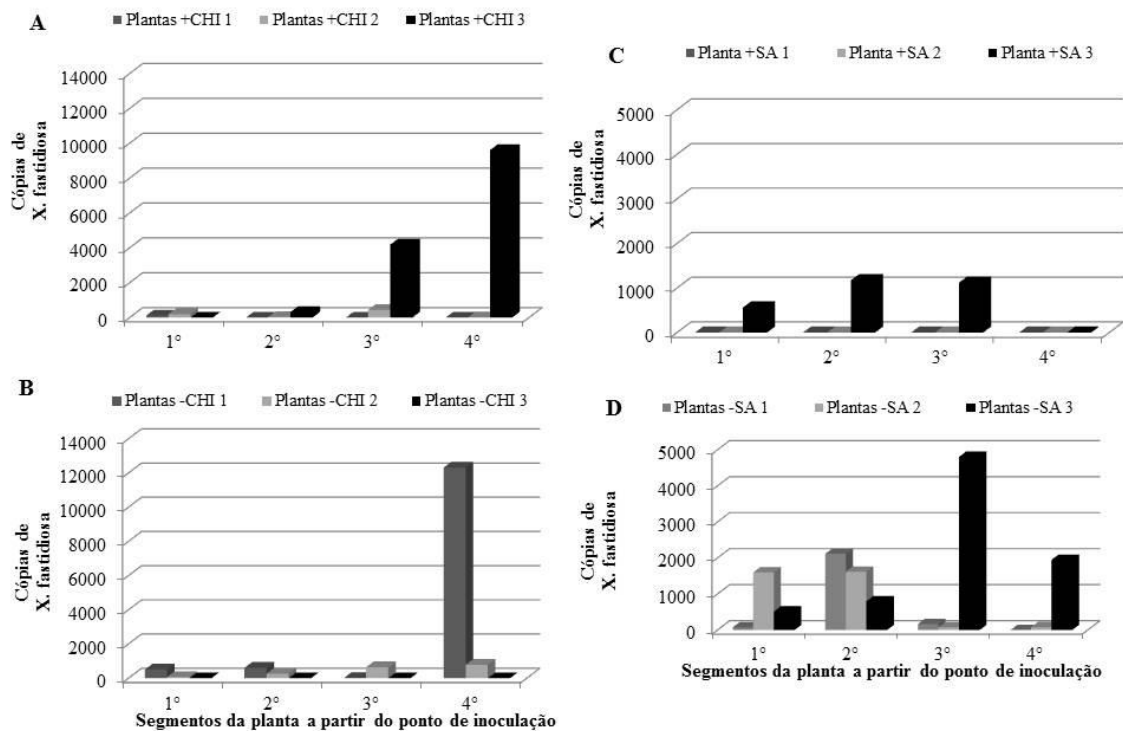


Figura 9: (A) Crescimento de *X. fastidiosa* em amostras do caule de laranja ‘Pera’ após o tratamento com quitosana (+CHI), (B) HCl (-CHI), (C) ácido salicílico (+SA), (D) ou etanol (-SA).

Na avaliação da incidência da doença feita aos sete meses após a inoculação não foi observada redução em plantas +CHI nem em plantas +SA (Tabela 3).

Tabela 5: Incidência da CVC em plantas submetidas aos diferentes tratamentos.

Treatamento	Incidência (%)*
+CHI	22,2±11,8
-CHI	12,2±12,2
+SA	31,1±5,9
-SA	7,8±7,9

*Média ± erro padrão

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos eliciadores sobre o cancro cítrico

A CHI e o SA têm potencial no controle de doenças por induzirem mecanismos de defesa nas plantas e/ou por terem efeito antimicrobiano direto (Hooft Van Huijsduijnen *et*

al., 1986; Raskin, 1992; Palva *et al.*, 1994; Majeti & Kumar 2000; Babu *et al.*, 2003; He & Wolyn, 2005; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Cavalcanti *et al.*, 2007; Faoro *et al.*, 2008; Iriti & Faoro, 2008; Mandal *et al.*, 2009). Em um estudo prévio conduzido com laranja de umbigo o SA foi avaliado contra *X. citri*, entretanto, o estudo foi conduzido com folhas destacadas e se avaliou apenas dois genes envolvidos na defesa de plantas (Wang *et al.*, 2012). No presente estudo, o SA foi aplicado em plantas sob condições de casa de vegetação com a cultivar ‘Pêra’ e foi feito RT-qPCR com vários genes envolvidos na defesa. Além disso, avaliou-se também o efeito da CHI e de acordo com nossos conhecimentos, não há estudos que mostram uma análise comparativa do efeito de tais compostos na interação entre plantas de laranja ‘Pêra’ e *X. citri*. Dessa forma, este estudo demonstrou que CHI e SA foram eficientes na proteção de laranja ‘Pêra’ contra *X. citri*, reduzindo a incidência e severidade do cancro cítrico.

4.1.2 Quitosana (CHI) na interação laranja ‘Pêra’ e *X. citri*

A *X. citri* é capaz de formar biofilme que consiste em comunidades estruturadas de células bacterianas agregadas envolvidas por uma matriz polissacarídica extracelular e que pode se estabelecer na superfície das plantas (Gottig *et al.*, 2010). Este biofilme confere proteção à bactéria e é importante para o estabelecimento do patógeno e desenvolvimento da doença (Davey & O’Toole, 2000). Portanto, compostos que tenham habilidade em interferir na estrutura do biofilme são extremamente importantes para o manejo da doença. Entretanto, no presente estudo observou-se que os resíduos de CHI não reduziram o biofilme de *X. citri* na superfície foliar, pois foram observados intensos agregados bacterianos em plantas +CHI comparadas a -CHI. Está bem documentada a capacidade da CHI de interferir em biofilmes de bactérias, sobretudo aquelas patogênicas a humanos, independentemente do tipo de Gram

(positivo ou negativo) da parede celular (Eaton *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2011; Orgaz *et al.*, 2011). Os efeitos observados após tratamento com CHI dependem do peso molecular (Iriti & Faoro, 2009), do grau de desacetilação (Falcon *et al.*, 2008; Iriti & Faoro, 2009) e da sua concentração (Lizama-Uc *et al.*, 2007). Entretanto, é possível que a CHI se ligue a resíduos presentes na matriz extrapoliassacarídica (EPS) formada pelas bactérias, fique aprisionada, o que pode dificultar a interação da CHI com as bactérias embebidas no biofilme (Rinaudo, 2006; Orgaz *et al.*, 2011). No presente estudo, foi utilizada uma CHI de baixo peso molecular a 4 mg/ml que aparentemente não destruiu a estrutura do biofilme de *X. citri*, já que vários aglomerados foram observados.

Uma vez que a bactéria se estabelece na superfície foliar, ela é capaz de invadir o mesófilo do hospedeiro a partir de aberturas naturais ou através de lesões (Gottwald, 1993, Gottig *et al.*, 2010). Percebeu-se que o tratamento com CHI afetou a interação entre plantas de laranja ‘Pera’ e *X. citri*, pois a detecção de bactérias foi mais tardia em plantas +CHI (3 dpi) do que -CHI (2 dpi). Além disso, até os 3 dpi a população bacteriana foi menor em plantas +CHI quando comparadas a -CHI. Neste caso, a CHI pode não ter destruído o biofilme, mas pode ter formado uma barreira física que dificultou a entrada da bactéria e também pode ter induzido respostas na planta que dificultaram a proliferação bacteriana nos primeiros dias após a infecção. Um fator que contribui com esta hipótese, é a baixa incidência e severidade da doença observadas em plantas +CHI nas duas avaliações feitas (12 e 19 dpi).

A partir do momento que *X. citri* coloniza a planta, ocorre a indução de hiperplasia das células do hospedeiro, a epiderme foliar é rompida resultando na liberação e dispersão da bactéria favorecendo um novo ciclo (Gottig *et al.*, 2010). No presente estudo, quando se compara a última avaliação da curva de crescimento (21 dpi) com a última avaliação da incidência/severidade doença (19 dpi), pôde-se perceber que, embora a população bacteriana

não diferiu entre +CHI e -CHI, o potencial para causar doença foi afetado, pois a incidência/severidade foi significativamente reduzida em plantas +CHI. Dessa forma, as respostas da planta frente ao tratamento com CHI podem ter contribuído para a redução da doença.

Diferentes sinalizadores atuam nas plantas em resposta a estresse promovido por patógenos. O etileno, por exemplo, regula uma variedade de resposta a estresse e pode promover resistência a patógenos (Broekaert *et al.*, 2006). Um estudo comparativo mostrou que em laranja ‘Pera’ inoculada com *X. citri* e *X. aurantifolii* a síntese, sinalização e percepção de etileno é mantida nas primeiras horas após a infecção (24 hpi), mostrando que o hormônio está relacionado à resistência a doença nesta cultivar (Cernadas *et al.*, 2008). Entretanto, comparações das respostas promovidas pelos dois patógenos 48 hpi revelaram que os genes ACC sintase, ACC oxidase, envolvidos na síntese do etileno e ERF, envolvido na sinalização do etileno, foram mais induzidos em plantas infectadas com *X. aurantifolii* do que com *X. citri* (Cernadas *et al.*, 2008). No presente estudo, foi observado que *X. citri* (-CHI) promoveu maior indução do *ACS12* 24 hpi do que o tratamento com CHI (+CHI). Em contrapartida, a CHI promoveu uma forte indução do fator de transcrição *ERF5*, envolvido na sinalização por etileno, o que não foi visto em plantas -CHI. Estes resultados também estão de acordo com estudos prévios em que o tratamento de *A. thaliana* com CHI induziu importantes fatores transcricionais da sinalização do etileno, como o *ERF* (Povero *et al.*, 2011). O *ERF5* pode regular positivamente a sinalização por SA e defesa de plantas contra patógenos (Son *et al.*, 2012).

Curiosamente, outros genes com maior expressão em plantas +CHI foram o *BSMT1*, *WRKY70* e *PR9*, comumente relacionados à biossíntese/transporte ou sinalização por SA. O

BSMT1 codifica a enzima responsável por metilar o SA a metil salicilato (MeSA), que desempenha um papel crítico durante a resistência como sinal móvel que percorre longas distâncias durante a resistência sistêmica adquirida (SAR) e, portanto, está envolvido em vários aspectos da sinalização da defesa de plantas (Chen *et al.*, 2003; Dempsey *et al.*, 2011). No presente estudo, o *WRKY70* também foi fortemente induzido por CHI. São conhecidos diversos membros da família de fatores de transcrição que codificam proteínas com a sequência de aminoácidos WRKYGQK conservados na extremidade N-terminal. O *WRKY70* é conhecido por regular positivamente a resistência mediada por SA e indução de genes relacionados à patogênese (PRs), os quais estão implicados na resistência a doenças (Vlot *et al.*, 2009). Dentre estes, o *PR9* induzido por CHI no presente estudo codifica uma peroxidase que também é responsiva ao SA. Esses dados levam a crer que a CHI ativa eventos na planta dependentes de SA. Dessa forma, não houve um aparente antagonismo entre as vias do SA e etileno nas respostas induzidas por CHI, já que importantes membros das duas vias foram induzidos em plantas +CHI. Em contrapartida, genes da via da auxina (*IAA9* e *ARF19*) foram mais induzidos em plantas -CHI do que +CHI. A repressão destes genes envolvidos na sinalização da auxina está associada à resistência antimicrobiana (Navarro *et al.*, 2004). A expressão de genes da sinalização e mobilização da auxina (proteínas GH3, nitrilase IAA) é associada ao desenvolvimento do cancro cítrico em laranja ‘Pera’ (Cernadas *et al.*, 2012). Portanto, a menor expressão de *IAA9* e *ARF19* observada em plantas +CHI no presente trabalho, pode ter contribuído para a defesa de laranja doce contra *X. citri*.

4.1.3 Ácido salicílico na interação laranja ‘Pera’ e *X. citri*

O SA, pertencente ao grupo dos compostos fenólicos, tem um importante papel como sinalizador envolvido na defesa de plantas contra patógenos (Raskin, 1992; Mauch-Mani &

Métraux, 1998). Aplicações exógenas do composto promovem resistência de plantas contra diversos patógenos (Hooft Van Huijsduijnen, *et al.*, 1986; Palva *et al.*, 1994; He & Wolyn, 2005; Mandal *et al.*, 2009). Um estudo prévio com folhas destacada de “laranja de umbigo” demonstrou que o SA foi efetivo no controle do cancro cítrico, promovendo acúmulo de SA endógeno e peróxido de hidrogênio, além de aumentar atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanases e reduzir a população bacteriana até 7 dpi (Wang *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo também indicam a efetividade do tratamento com SA em plantas de laranja ‘Pera’, já que foi observada menor população bacteriana aos 21 dpi e uma forte redução da incidência e sintomatologia.

As imagens obtidas pela microscopia de fluorescência não mostraram aglomerados bacterianos em plantas pré-tratadas, indicando que o SA pode afetar a formação de biofilme na superfície foliar. Estes dados estão de acordo com outros estudos que têm relatado a capacidade do SA em afetar biofilme de bactérias (Da *et al.*, 2010; Chow, *et al.*, 2011). Em *Pseudomonas aeruginosa*, o SA atuou diretamente na supressão de genes de virulência, inibiu a fixação e a formação de biofilme em raízes de *A. thaliana* (Prithiviraj *et al.*, 2005). No presente estudo, a não observação de aglomerados bacterianos pode ter sido a causa da entrada tardia da bactéria na planta, uma vez que a detecção de *X. citri* em plantas pré-tratadas ocorreu um dia depois da detecção no controle, sugerindo que o SA retarda a estabilização da comunidade epifítica bacteriana. No final do experimento (21 dpi) a população de *X. citri* foi menor do que no controle, indicando que o SA pode ter exercido efeito antimicrobiano em plantas, como já demonstrado em estudo prévio com folhas destacadas (Wang & Liu, 2012). Outros dados que suportam esta hipótese foram a baixa incidência e a severidade da

doença ao longo do experimento. Tais resultados indicam que o tratamento de laranja ‘Pera’ com SA foi efetivo na proteção contra *X. citri*.

A indução de resistência promovida por aplicações exógenas de SA geralmente está associada a um aumento artificial do conteúdo endógeno de SA (Wang *et al.*, 2012; Babu *et al.*, 2013). Wang & Liu (2012) demonstraram que em brotações novas destacadas de laranja de umbigo tratadas com SA por 3 dias, houve acúmulo de SA endógeno após infecção com *X. citri*. No presente estudo não foi feita dosagem do SA nas folhas, porém os genes envolvidos na biossíntese do SA (*ICS* e *EDSI*) foram menos expressos em plantas +SA, presumindo que houve um aumento artificial do conteúdo endógeno de SA, o que levou à regulação negativa dos genes da sua biossíntese. Entretanto, os mecanismos de defesa pelos quais o SA atuou sobre a laranja ‘Pera’, quando aplicado 24h antes da inoculação, não foram completamente elucidados por meio das análises feitas neste estudo, pois os genes conhecidos por serem expressos na presença de SA (*NPRI-3*; *WRKY70*, *TGAI* e *PR1*), não foram mais induzidos em plantas +SA 24 hpi. Somente o *CSD2* apresentou maior indução em plantas +SA. Este gene codifica uma superóxido dismutase que promove detoxificação de radicais superóxido e o aumento na sua expressão também foi relatada em *A. thaliana* tratada com análogos de SA (Kliebenstein *et al.*, 1999). Os resultados do presente estudo sugerem que o controle da doença promovido pelo SA deve-se em grande parte ao efeito antimicrobiano deste composto.

4.1.4 Quitosana vs. ácido salicílico na interação laranja ‘Pera’ e *X. citri*

Conforme discutido anteriormente, a CHI e SA são indutores de resistência e também apresentam efeito antimicrobiano, inclusive demonstrado para espécies do gênero *Xanthomonas* (Li *et al.*, 2008; Coqueiro *et al.*, 2011; Wang & Liu, 2012). Análises

comparativas do uso isolado da CHI e SA revelam um modo de atuação diferenciado dos compostos, mas que resultou, em ambos os casos, no controle da doença. A CHI parece não interferir diretamente na formação do biofilme, entretanto, pode ter dificultado a multiplicação de *X. citri* na planta, sobretudo na primeira semana após a infecção. O SA retardou a entrada da bactéria na planta e, aparentemente, inibiu mais a formação de aglomerados epifíticos bacteriano do que a CHI, como observado na Figura 2. Outro dado que suporta a hipótese de maior efeito antibacteriano do SA comparado à CHI, foi que após a segunda semana de infecção a população de *X. citri* em plantas +SA foi significativamente menor do que +CHI (Figura 3C). Portanto, percebeu-se que a CHI teve o seu melhor desempenho nos primeiros dias após a infecção (até 7 dpi), atuando em respostas de defesa da planta. Isto pode ser explicado pelo aumento na expressão de importantes genes envolvidos na defesa da planta (*ERF5*, *BSMT1*, *WRKY70* e *PR9*) avaliados 24 hpi, que não foram observados em plantas +SA. Já o SA teve um efeito inicial sobre a comunidade epifítica, retardando entrada da bactéria e um efeito mais tardio reduzindo a população bacteriana entre 7 a 21 dpi, tendo maior ação antimicrobiana do que de indução de resistência. Estes achados podem ser explicados pela reduzida indução dos genes de defesa avaliados. Comparações da expressão gênica entre os eliciadores reforçam a ideia de que a CHI tem maior potencial de induzir resistência, já que genes como *ICS* e *WRKY70* foram mais expressos nessas plantas. Apenas o *ACS12* foi mais induzido em plantas +SA (Figura 5C). Cumpre salientar que as respostas de defesa foram avaliadas apenas 24 hpi e, portanto, é importante que estudos adicionais sejam conduzidos para avaliações *time course* do efeito dos eliciadores na interação entre laranja ‘Pera’ e *X. citri*. Em suma, a CHI e SA mostraram-se efetivos no controle do cancro cítrico em laranja ‘Pera’, reduzindo a sintomatologia de

maneira similar, seja por efeito antimicrobiano sobre *X. citri* ou pela indução de respostas associadas à resistência da planta.

4.2 Efeito dos eliciadores sobre a clorose variegada dos citros

4.2.1 Respostas de laranja ‘Pera’ ao tratamento com eliciadores

Há um interesse crescente pela busca de métodos de manejo de doenças que não sejam agroquímicos. A CHI e SA vêm sendo pesquisados como indutores de resistência em diversas culturas (Hooft Van Huijsduijnen *et al.*, 1986; Raskin, 1992; Romanazzi *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Lizama-Uc *et al.*, 2007; Faoro *et al.*, 2008; Mandal *et al.*, 2009; Rappussi *et al.*, 2009; Coqueiro *et al.*, 2011). Na citricultura, ainda são encontrados poucos estudos sobre uso de eliciadores para o controle de doenças. No patossistema CVC não há relatos sobre o efeito da CHI e SA na indução de respostas de defesa em citros. Dessa forma, o presente estudo foi conduzido para contribuir com os estudos sobre o papel da CHI e SA na indução de mecanismos de defesa em uma cultivar suscetível à *X. fastidiosa*, sendo observada forte indução de genes envolvidos com defesa 24 hpi em plantas submetidas aos tratamentos (CHI e SA).

Os estudos conduzidos com CHI mostram o seu potencial em induzir diferentes respostas de defesa em plantas (Khan *et al.*, 2003; Xiangyang *et al.*, 2004; Faoro & Iriti, 2007; Iriti & Faoro, 2008). Entretanto, o verdadeiro mecanismo de atuação deste polissacarídeo como indutor de resistência ainda não está muito bem definido, existindo controvérsias quanto à via de sinalização envolvida (Doares *et al.*, 1995; Iriti *et al.*, 2010; Coqueiro *et al.*, 2011). No presente estudo com laranja ‘Pera’ realizado no presente estudo, observou-se um padrão de expressão gênica atípico, com expressão de genes envolvidos na via do SA e etileno. Como foi evidenciado, plantas +CHI apresentaram maiores induções dos

NPR1 do que -CHI. Os *NPR1* constituem uma família de importantes fatores transcricionais que são normalmente expressos na presença de SA e são importantes reguladores da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Vlot *et al.*, 2008). Além disso, fatores de transcrição *TGA* apresentaram maior expressão em plantas +CHI, e esses genes tendem a interagir com *NPR1* na expressão de genes *PRs* (Vlot *et al.*, 2008). Por outro lado, o gene *PR-1*, induzido na presença de SA, não teve maior expressão em plantas +CHI. Foi observado que o gene *PR-4* apresentou maior expressão em plantas +CHI e este gene é induzido por etileno. Pieterse *et al.*, (1998) reportaram que a resistência mediada pela rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* WCS417r segue uma via de sinalização com participação de etileno e jasmonato e, assim como a SAR, é regulada por *NPR1*. Entretanto, os processos que culminam com a indução de resistência são diferentes da SAR, indicando que *NPR1* regula diferencialmente as respostas de defesa, de acordo com sinais pelas quais são induzidas durante a indução de resistência (Lawton *et al.*, 1994; Divi *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2010). A repressão de *PR-1* verificada em plantas +CHI pode estar atrelada ao aumento de *SNI-1* observado, já que o mesmo codifica uma proteína que normalmente reprime a expressão de genes de defesa dependentes de *NPR1*, como é o caso do *PR-1*.

O aparente sinergismo entre SA e etileno mediante tratamento com CHI também pode ser observado pela indução do *EDS1* e *EIN-3*. O gene *EDS1* está envolvido na biossíntese de SA e o *EIN-3* é essencial na sinalização do etileno na ativação de respostas de defesa (Wang *et al.*, 2002). Portanto, o presente trabalho suporta a hipótese de que o efeito da aplicação de CHI em plantas de laranja ‘Pera’ inoculadas com *X. fastidiosa* está relacionado a um aumento na expressão de *NPR1*, e de importantes genes da síntese/sinalização do SA e etileno.

Nos estudos com SA, alguns trabalhos demonstram que aplicações exógenas contribuem para induzir SAR contra diferentes tipos de patógenos. A SAR é geralmente

acompanhada pelo aumento na expressão dos genes *EDS-1* que estimula a biossíntese de SA (Vlot *et al.*, 2009). Após sua biossíntese ou o acúmulo endógeno artificial, o SA atua sobre proteínas NPR1, estimulando o seu transporte para o núcleo onde se associam com proteínas TGA e promovem a expressão de genes de defesa como *PRs* (Vlot *et al.*, 2009). No presente estudo, foi observada uma resposta característica para a sinalização com SA, mostrando que a aplicação exógena do elicitor pode favorecer o aumento de respostas de defesa numa espécie de citros suscetível à *X. fastidiosa*. Houve aumento na expressão de dois *NPR1* em plantas +SA comparadas a -SA e dois fatores de transcrição *TGA* também apresentaram maior expressão em planta. É possível que o aumento na expressão de tais genes estimulou a expressão de *PRs*, já que em plantas +SA os genes *PR-2* e *PR-9* foram mais expressos. O *PR-2* codifica para glucanase e o *PR-9* peroxidase, ambas envolvidas em respostas por SA (Babu *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2009).

A contribuição na expressão de importantes genes de defesa quando se aplica SA em laranja ‘Pera’ pode se dar devido ao acúmulo endógeno deste composto. Portanto, neste trabalho foi possível observar que a aplicação de SA potencializa o seu efeito endógeno o qual está relacionado com ativação de *NPR1*, *TGA* e *PRs*.

4.2.2 Multiplicação da *X. fastidiosa* em laranja ‘Pera’ tratada com eliciadores

Embora tenha sido observada indução de importantes genes de defesa 24 hpi no presente estudo, na maioria das avaliações não foi observada uma redução significativa da multiplicação da *X. fastidiosa* em amostras foliares e de caule em plantas +CHI e +SA, comparadas aos respectivos controle. Apenas aos 90 dai foi observada população bacteriana menor em amostras foliares de plantas -SA. Na avaliação do movimento e colonização pelo caule, plantas +SA mantiveram uma população bacteriana menor que -SA. Estudos de

movimento e multiplicação de *X. fastidiosa* são frequentemente conduzidos para avaliar diferenças entre cultivares resistentes e suscetíveis de uva e os resultados têm mostrado que em poucas semanas após a inoculação a população bacteriana é baixa, mas com o tempo aumenta em cultivares suscetíveis e reduz naquelas que são resistentes. Além disso, plantas resistentes tendem a apresentar menor população bacteriana no caule comparado a plantas suscetíveis (Fry & Milholland, 1990; Krivanek & Walke, 2005; Baccari & Lindow, 2011). Em plantas +SA houve uma menor população bacteriana no caule comparado ao controle, é possível que o elicitor tenha proporcionado a formação de barreiras que limitassem a proliferação de *X. fastidiosa* pelo caule da planta.

De maneira geral, não foi possível estabelecer uma relação clara entre a multiplicação bacteriana e o uso dos eliciadores nas plantas. Com base nestes resultados, supõe-se que as respostas da planta observadas por meio da expressão de importantes genes de defesa sejam rápidas, já que o padrão de expressão gênica mostrou importantes genes de defesa induzidas pelo tratamento (+CHI ou +SA) 24 hpi; porém não foi possível observar reduções significativas da população bacteriana a partir de 30 dai. Além disso, a avaliação da incidência da doença feita aos sete meses após aplicação dos eliciadores não mostrou reduções de folhas sintomáticas em plantas tratadas com os eliciadores, mostrando que essas respostas não foram suficientes para impedir a colonização bacteriana até esta avaliação. Em plantas de tabaco submetidas ao tratamento com benzotiadiazole (BTH), um análogo do SA, não foi possível observar redução de sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Martinati *et al.*, 2007).

Uma vez implementado o uso de eliciadores dentro do manejo da CVC, sugere-se que sejam feitas mais de uma aplicação dos eliciadores no ciclo da cultura. Dessa forma, é

importante que estudos adicionais sejam conduzidos para se avaliar as estratégias de aplicação destes produtos em campo.

5 Referências

- Adie, B., Chico, J. M., Rubio-Somoza, I., & Solano, R. (2007). Modulation of plant defenses by ethylene. *Journal Plant Growth Regulation* 26, 160-177.
- Agrios, G. N. (2004). *Plant Pathology*. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Albrech, U., & Bowman, K. D. (2012). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant science*, 185, 118-130.
- Almeida, L. C. C., & Coêlho, R. S. B. (2006). Efeito de indutores químicos no controle da antracnose do maracujá amarelo pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira*, 31(3), 318.
- Alonso, J. M., & Stepanova, A. S. (2004). The ethylene signaling pathway. *Science*, 306: 1513-1515.
- Artico, S., Nardeli, S. M., Brilhante, O., Grossi-De-Sa, M. F., Alves-Ferreira, M. (2010). Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology*, 21, 10-49.
- Avni, A, Bailey, B. A., Mattoo, A. K., & Anderson, J. D. (1994). Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. *Plant Physiology*, 106, 1049-1055.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D. L., & Santos, A. A. (2007) *Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: ONG Mamiraua.

- Babu, R. M., Sajeena, A., Vijaya Samundeeswari A., Sreedhar, A., Vidhyasekaran, P., Seetharaman, K., & Reddy, M. S. (2003). Induction of systemic resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by salicylic acid in *oryza sativa* (L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110:419-431.
- Baccari, C., & Lindow, E. (2011). Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. *Phytopathology*, 101, 77-84.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M. G., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25, 108-118.
- Baysal, O., Soyly, E. M., & Soyly, S. (2003). Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* sp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, 52, 747-753.
- Belasque Júnior, J., Bassanezi, R.B., Spósito, M.B., Ribeiro, L.M., Jesus Junior, W.C. & Amorim, L. (2005). Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 387-393.
- Ben-Shalom, M., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., & Fallik, E. (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22, 285-290.
- Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A. C., & Ayoubi, P. (2007). *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. *Functional Integrative Genomics*, 7, 69-77.

- Bhaskara Reddy, M. V., Arul, J., Angers, P., & Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1208-1216.
- Boava, L. P., Cristofani-Yaly, M., Mafra, V S., Kubo, K., Kishi, L. T., Takita, M. A., Ribeiro-Alves, M., Machado, M. A. (2011). Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*, London, 12, 39-51
- Brisset, M., Cesbron, S., Thomson, S. V., & Paulin, J. (2000). Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 529–536.
- Broekaert, W. F., Delauré, S. L., De Bolle, M. F., & Cammue, B. P. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 393-416.
- Brunings, A. M., & Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surfasse. *Molecular Plant Pathology*, 4, 141-157.
- Campos, A. D., Hampe, M. V., Ferreira, G., Antunes, I. F., & Castro, L. A. S. (2008). Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 15-21.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88, 57-63.
- Cavalcanti, F. R., Resende, M. L. V., Carvalho, C. P. S., Silveira J. A. G., & Oliveira J. T. A. (2007). An aqueous suspension of *Crinipellis pernicioso* mycelium activates

- tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Protection*, 26, 729-738.
- Cavalcanti, F. R., Resende, M. L. V., Pereira, R. B., Costa, J. C. B., & Carvalho, C. P. S. (2006). Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1721-1730.
- Cernadas, R. A., Camillo, L. R., & Benedetti, C. E. (2008). Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*, 9, 609-631.
- Chakravarthy, S., Tuori, R. P., D'Ascenzo, M. D., Fobert, P. R., Després, C., & Martin, G. B. (2003). The Tomato Transcription Factor Pti4 Regulates Defense-Related Gene Expression via GCC Box and Non-GCC Box cis Elements. *The Plant Cell*, 15, 3033-3050.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89, 1133-1144.
- Chen, F., D'Auria, J. C., Tholl, D., Ross, J. R., Gershenzon, J., Noel, J. P., & Pichersky, E. (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant Journal*, 36, 577-588.
- Chen, C., Bélanger, R. R., Benhamou, N., & Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 13-23.

- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.
- Chow, S., Gu, K., Jiang, L., & Nassour, A. (2011). Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 15, 22-29.
- Chuaqui, R. F., Bonner, R. F., Best, C. J. M., Gillespie, J. W., Flaig, M. J., Hewitt, S. M., Phillips, J. L., Krizman, D. B., Tangrea, M. A., Ahram, M. W. M. L., Knezevic, V., & Emmert-Buck, M R. (2002). Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature Genetics Supplement*, 32, 509-514.
- Chujo, T., Kato, T., Yamada, K., Takai, R., Akimoto-Tomiyama, C., Minami, E., Nagamura, Y., Shibuya, N., Yasuda, M., Nakashita, H., Umemura, K., Okada, A., Okada, K., Nojri, H., & Yamane, H. (2008). Characterization of an elicitor-induced rice WRKY gene *OsWRKYT1*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 71, 240-245.
- Cia, P. (2005). *Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (Colletotrichum gloeosporioides) em mamão (Carica papaya)*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, USP, Piracicaba, SP, Brasil.
- Coletta Filho, H. D., Pereira, E. O., Souza, A. A., Takita, M. A., Cristofani-Yaly, M., & Machado, M. A. (2007). Analysis of the resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange and Murcott tangor. *Plant Pathology*, 56, 661-668.

- Coqueiro, D. S. O., Maraschin, M., & Di Piero, R. M. (2011). Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 159, 488-494.
- Coram, T. E., & Pang, E. C. K. (2006). Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to *Ascochyta rabiei*. *Plant Biotechnology Journal*, 4, 647-666.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Science*, 92, 4114-4119.
- Da, M. L., Heroux, A. K., Pakzad, Z., & Schiffmacher, K. F. E. S. (2010). Salicylic acid attenuates biofilm formation but not swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 14, 69-73.
- Danner, A. A., Sasso, S. A. Z., Medeiros, J. G. S., Marchese, J. A. M., & Mazaro, S. M. (2008). Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 793-799.
- Das, A. K. (2003) Citrus canker – A review. *Journal of Applied Horticulture*, 5, 52-60
- Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- Davis, M.J., French, W.J., & Schaad, N.W (1981). Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology*, 6, 309-314.
- De Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Carlos, E. F., Locali-Fabris, E. C., Amaral, A. M., Astua, J. F., Silva-Pinhati, A. C. O., Boscariol-Camargo, R. L., Berger, I. J., Rodrigues, C. M., Reis, M. S. & Machado, M. A. (2007).

- Analysis of expressed sequence tags of *Citrus sinensis* L. Osb. infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetic and Molecular Biology*, 30, 957-964.
- De Souza, A., Takita, M. A., Coletta-Filho, E. D., Caldana, C., Yanai, G. M., Muto, N. H., Oliveira, R. C., Nunes, L. R., & Machado M. A. (2004). Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 341-353.
- Delaney, T. P., Friedrich, L., & Ryals, J. A. (1995) Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science*, 92, 6602-6606.
- Dempsey, D. A., Vlot, C., Wildermuth, M. C., & Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book* 9, e0156. Recuperado em 5 janeiro, 2013, de <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1199/tab.0156>.
- Di Piero, R.M., & Pascholati, S.F. (2004). Effect of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* mushrooms on the interaction tomato-*Xanthomonas vesicatoria*. *Summa Phytopathologica*, 30, 58-63.
- Ditt, R. F., Kerr, K. F., De Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., & Nester, E. W. (2006). The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 665–681.
- Divi, U. K., Rahman, T., & Krishna, P. (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology*, Recuperado em 10 junho, 2013, de <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-10-151.pdf>.

- Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W., & Ryan, C. A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4095-4098.
- Donadio, L. C., & Moreira, C. S. (1998). Clorose Variegada dos citros. Estação Experimental de Citricultura, Bebedouro, SP.
- Dong, J., Chen, C., & Chen, Z. (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology*, 51, 21-37.
- Duga, D. V., Monaco, M. K., Olson, A., Klein, R. R., Kumari, S., Ware, D., & Klein, P. E. (2011). Functional annotation of the transcriptome of *Sorghum bicolor* in response to osmotic stress and abscisic acid. *BMC Genomics*, 12, 1-21.
- Eaton, P., Fernandes, J. C., Pereira, E., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108, 1128-1134.
- El Ghaouth, A.; & Ahmad, A (1994). Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reaction. *Phytopathology*, 84, 313-320.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., & Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5, 199-206.
- Falcón, A., Cabrera, J. C., Costales, D., Ramírez, M. A., Cabrera, G., Toledo, V., & Martínez-Téllez, M.A. (2008). The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 103-112.
- Fan, J., Chen, C., Yu, Q., Khalaf, A., Achor, D. S., Brlansky, R. H., Moore, G. A., Li, Z. G., & Gmitter, F. G. Jr. (2012). Comparative transcriptional and anatomical analyses of

- tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1396-1407.
- Faoro, F., & Iriti, M. (2007). Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. *Caryologia*, 60, 121-124.
- Faoro, F., Maffi, D., Cantu, D., & Iriti, M. (2008). Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. *Biological Control*, 53, 387-401.
- Fernandes, J. C., Tavaría, F. K., Soares, J. C., Ramos, O. S., Monteiro, M. J., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*, 25, 922-928.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R. (2009). (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5, 344-350.
- Food Agricultural Organization, (2011). Statistical - database. Recuperado em 21 julho, 2013, de <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Franzener, G., Martinez-Franzener, A. S., Stangarlin, J. R., Czepak, M. P. Schwan-Estrada, K. R. F., & Cruz, M. E. S. (2007). Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina: Ciências Agrárias*, 28, 29-38.
- Fry, S. M., & Milholland, R. D. (1990). Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathology*, 80, 61-65.

- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, A., Ohme-Takagi, M. B. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell*, 12, 393-404.
- Fundecitrus (2005). Recuperado em 21 julho, 2013, de <http://www.fundecitrus.com.br>.
- Gachon, C., Mingam, A., & Charrier, B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55, 1445-1454.
- Ghosh, S., Ranebennur, T. K., & Vasan, H. N. (2011). Study of antibacterial efficacy of hybrid chitosan-silver nanoparticles for prevention of specific biofilm and water purification. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. Recuperado em 23 junho, 2013, de <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2011/693759/>.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43, 205-227.
- Gomes, E. C. S. (2009). *Indução de resistência em videira (Vitis labrusca L.) no município de Natuba, Paraíba: produtividade e perfil de maturação*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.
- Goodman, R.N., Kiraly, Z., Wood, K.R. (1986). *The biochemistry and physiology of plant disease*. Columbia: University of Missouri Press.
- Gottig, N., Garavaglia, B. S., Garofalo, C. G., Zimaro, T., Sgro, G. G., Ficarra, F., Dunger, G., Daurelio, L. D., Thomas, L., Gehring, C., Orellano, E. G., & Ottado, J. (2010). Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 196-204.

- Gottwald, T. R. (1993). Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Disease*, 77, 1004-1009.
- Gottwald, T. R. (2000). Citrus canker. Recuperado em 20 junho, 2013, <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/CitrusCanker.aspx>.
- Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., & Achor, D. S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, 5, 1-15.
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 414-420.
- Gu, Y. Q., Yang C., Thara, V. K., Zhou J., & Martin, G. B. (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *The Plant Cell*, 12, 771-785.
- Guzzo, S. D. (2004). *Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra Hemileia vastatrix*. Tese de Doutorado, Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, SP, Brasil.
- Hammerschmidt, D. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 77-84.
- Han, Q., Feng, H., Zhao, H., Huang, L., Wang, X., Wang, X., & Kang, Z. (2013). Effect of a benzothiadiazole on inducing resistance of soybean to *Phytophthora sojae*. *Protoplasma*, 250, 471-481.
- He, C. T., & Wolyn, D. J. (2005). Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi*. *Plant Pathology*, 54, 227-232.

- Heid, C., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
- Hoofst Van Huijsduijnen, R. A. M., Alblas, S. W., De Rijk, R. H., & Bolr J. F. (1986). Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. *Journal of General Virology*, 67, 2135-2143.
- Illumina® Systems & Software (2006). DNA Sequencing with Solexa® Technology. Recuperado em 5 janeiro, 2013, de http://www.plantsciences.ucdavis.edu/bit150/2006/JD_Lecture/Lecture%201%20Databases/Solexa_DNAsequencing.pdf.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2011). Recuperado em 21 julho, 2013, de <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2011/default.shtm>.
- Irey, M. S., Gast, T., & Gottwald, T. R. (2006) Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 119, 89-93.
- Iriti, M., & Faoro, F. (2008). Abscisic acid mediates the chitosan-induced resistance in plant against viral disease. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 1106-1111.
- Iriti, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 66-68.
- Iriti, M., Giulia, C., Sara, V., Ilaria, M., Soave, C., Fico, G., & Faoro, F. (2010) Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. *Biological Control*, 54, 241-247.

- Kazan, K., & Manners, J. M. (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiology*, 146, 1459-1468.
- Khan, W., Prithiviraj, B., & Smith, D. I. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160, 859-863.
- Kliebenstein, D. J., Dietrich, R. A., Martin, . C., Last, R. L., & Dangl, J. L. (1999). LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 1022-1026.
- Koo, A. J., & Howe, G.A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70, 571-1580.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., DenOtter, F. C., VanLoon, L. C., & Pieterse, C. M. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology*, 147, 1358-1368.
- Krivanek, A. F., & Walke, M. A. (2005). Vitis resistance to pierce's disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. *Phytopathology*, 95, 44-52.
- Kunkel, B. N., & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 3250-331.
- Labanca, E. R. G. (2002). *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus) contra Colletotrichum langenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP, Brasil.

- Laranjeira, F. F. (1997). *Dinâmica temporal e espacial da Clorose Variegada dos Citros*.
Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP,
Piracicaba, SP, Brasil.
- Lawton, K. A., Potter, S. L., Uknes, S., & Ryals, J. (1994). Acquired resistance signal
transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell*, 6, 581-588.
- Levéé, V., Major, I., Levasseur, C., Tremblay, L., Mackay, J., & Séguin, A. (2009).
Expression profiling and functional analysis of *Populus* WRKY23 reveals a
regulatory role in defense. *New Phytologist*, 184, 48-70.
- Li, S., Zhang, P., Zhang, M., Fu, C., Zhao, C., Dong, Y., Guo, A., & Yu, L. (2012).
Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate.
BMC Genomics, 2012, 13, 295. Recuperado em 5 julho, 2013, de
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2164-13-295.pdf>.
- Li, B., Wang, X., Chen, R., Huangfu, W., & Xie, G. (2008). Antibacterial activity of chitosan
solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia*
pulcherrima. *Carbohydrate Polymers*, 72, 287–292.
- Liu, X., Bai, X., Wang, X., & Chu, C. (2007). Os WRKY71, a rice transcription factor, is
involved in rice defense response. *Journal of Plant Physiology*, 164, 969-979.
- Lizama-UC, G., Estrada-MOTA, I. A., Caamal-Chana, M. G., Souza-Perera, R., Oropeza-
Salínb, C., Islas-Flores, I., & Zúñiga-Aguilara, J. J. (2007). Chitosan activates a
MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli
of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70, 130–141.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez- Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). ETHYLENE
RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in
plant defense. *The Plant Cell*, 15, 165–178.

- Majeti, N. V., & Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Mandal, S., Mallick, N., & Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 642–649.
- Martinati, J. C., Lacava, P. T., Miyasawa, S. K. S., Guzzo, S. D., Azevedo, J. L., & Tsai, S. M. (2007) Redução dos sintomas causados pela *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* por meio de aplicação de benzotiadiazole e silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 1083-1089.
- Martinez, L. R., Mihui, M. R., Han, G., Frases, S., Cordero, R. J. B., Casadevall, A. Friedman, A. J., Friedman, J. M., & Nosanchuk, J. D. (2010). The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials*, 31, 669–679.
- Mauch-Mani, B., & Métraux, J. (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82, 535-540.
- McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Schenk, P. M., Edgar, C. I., Maclean, D. J., Scheible, W. R., Udvardi, M. K., & Kazan, K. (2005). Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, 139, 949–959.
- Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, 70, 1560–1570.
- Miron, M., Woody, O. Z., Marcil, A., Murie, C., Sladek, R., & Nadon, R. A. (2006). A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 7, 1-17.

- Misaghi, L. J. (1982). *Physiology and Biochemistry of plant – Pathogen interactions*. New York: plenum Press.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., & Jones, J.D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology*, 135, 1113-1128.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F. 3rd, & Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37, 579–609.
- Ogihara, Y., Kawaura, K., & Mochida, K. (2008) Large scale analysis of expressed genes in common wheat. Publicação online <http://ses.library.usyd.edu.au>.
- Oliveira, A.R.R. (2009). *Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real*. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Oliveira, A. C., Vallim, M. A., Semighini, C. P., Araújo, W.L., Goldman, G.H., & Machado, M.A (2002) Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 92,1048-1054.
- Orgaz, B., Lobete, M. M., Puga, C. H., & San Jose, C. (2011). Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 817-828.
- Osiro, D., Colnago, L. A., Otoboni, A. M. M. B., Lemos, E. G. M., De Souza, A. A., Coletta Filho, H. D., & Machado, M. A. (2004). A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 313-318.

- Palva, T. K., Hurtig, M., Saindrenan, P., & Palva, E. T. (1994). Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7, 356-363.
- Pascholati, S. F., & Cia, P. (2005). Mecanismos bioquímicos na resistência de plantas às doenças. In: Cavalcanti, L. S., Di Piero, R. M., Cia, P., Pascholati, S. F., Resende, M. L. V., Romeiro, R. S. (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba, SP: FEALQ.
- Pascholati, S.F., & Leite, B. (1995). Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., & Amorim L., (Ed). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. Piracicaba, SP: Agronomia Ceres.
- Pascholati, S.F., & Leite, B. (1994). Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 2, 1-52.
- Peleman, J., Boerjan, W., Engler, G., Seurinck, J., Botterman, J., Alliotte, T., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1989). Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. *The Plant Cell* 1:81–93.
- Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J.P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer, 332 pp.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., & Van Loon, L. C. A. (1998). Novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10, 1571-1580.
- Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggese, A., & Perata, P. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Research*, 124, 619-629.

- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C. M., & Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 147, 1347-1357.
- Prithiviraj, B., Bais, H. P., Weir, T., Suresh, Najarro, E. H., Dayakar, B. V., Schweizer, H. P., & Vivanco, J. M. (2005). Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 73, 5319-5328.
- Rajeevan, M. S., Ranamukhaarachchi, D. G., Vernon, S. D., & Unger, E. R. (2001). Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, 25, 443-451.
- Ramírez, V., Van Der Ent, S., García-Andrade, J., Coego, A., Pieterse, C. M. J., & Vera, P. (2010). OCP3 is an important modulator of NPR1-mediated jasmonic acid-dependent induced defenses in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10, 1-13.
- Rappussi, M. C. C., Pascholati, S. F., Benato, E. A., & Cia, P. (2009). Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 513-521.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 43, 439-463.
- Resende, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., Andrade, G. C. G., Carvalho, G. A., & Castro, R. M. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar- S -methyl (ASM). *Plant Pathology*, 51, 621-628.
- Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P. S., Qüesta, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A., & Marano, M. R. (2007). Biofilm

- formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 1222–1230.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603–632.
- Rodrigues, A. A. C., Neto, E. B., & Coelho, R. S. B. (2006). Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 492-499.
- Rojó, E., Leon, J., & Sanchez-Serrano, J. J. (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 20, 135–142.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., & Saler, D. M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67, 1862-1867.
- Salzman, R. A., Brady, J. A., Finlayson, S. A., Buchanan, C. D., Summer, E. J., Sun, F., Klein, P. E., Klein, R. R., Pratt, L. H., Cordonnier-Pratt, M., & Mullet, J. E. (2005). Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiology*, 138, 352-368.
- Santos Filho, H. P. S., Barbosa, C. J., Laranjeira, F. F., & Silva, S. X. B. (2010) *Clorose Variegada dos Citros ameaça a citricultura do recôncavo sul*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2008). Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. In. Schaller (ed.). *Induced Plant Resistance to Herbivory*, Springer.

- Silva, S. X. B. (2010). Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do recôncavo sul. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.
- Somssich, I. E., Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 86-90.
- Son, G. H., Wan, J., Kim, H. J., Nguyen, X. C., Chung, W. S., Hong, J. C., & Stacey, G. (2012) Ethylene-Responsive Element-Binding Factor 5, ERF5, is involved in chitin-induced innate immunity response. *MPMI*, 25, 48–60.
- Stahlberg, E., Zhou, B., Li, H., Kim, H., Yu, Y, Dean, R. A., Wing, R. A., Soderlund, C., & Wang, G. (2005). Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. *Plant Physiology*, 138, 105-115.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., & Fritig, B. (1993). Plant ‘pathogenesis-related’ proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75, 687-706.
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, 2013, 1-10.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G. H., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., & Browse, J.(2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF-COII complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661-665.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 15107-15111.

- Toffano, L. (2005). *Doenças pós-colheita em citros: potencial de Lentinula edodes, Agaricus blazei, ácido jasmônico, albedo (Citrus sinensis var. Valência) e flavedo (Citrus aurantifolia var. tahiti) no controle e na indução de resistência*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, USP, Piracicaba, SP, Brasil.
- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, Supplement, S153–S164.
- Van Der Fits, L., & Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289, 295-297.
- Van Loon, L.C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3:1–11.
- Verhage, A., Van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2010). Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiology*, 154, 536-540.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 436-442.
- Walters, D. R., & Fountaine, J. M. (2009). Practical application of induced resistance to plant diseases: An appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science*, 147, 1-13.

- Wang, Y., & Liu, J. (2012). Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Journal of Plant Physiology*, 169, 1143-1149.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10, 57-63.
- Wang, K. L. C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, S131-S151.
- Xiangyang, H., Neill, S. J., Jianying, F., Weiming, C., & Zhangcheng, T. (2004). Mitogen-activated protein kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *Panax ginseng*. *Science in China Ser. C Life Sciences*, 47, 303-312.
- Xu, L., Zhu, L., Tu, L., Liu, L., Yuan, D., Jin, L., Long, L., & Zhang, X. (2011). Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany*, 62, 5607-5621.
- Yafei, C., Yong, Z., Xiaoming, Z., Peng, G., Hailong, A., Yuguang, D., Yingrong, H., Hui, L., & Yuhong, Z. (2009). Functions of oligochitosan induced protein kinase in *Tobacco mosaic virus* resistance and pathogenesis related proteins in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 724-731.
- Yamamoto, P. T., Bassanezi, R., & Lopes, S. (2009). *Manual técnico CVC*. Recuperado em 20 março, 2013, de <http://www.fundecitrus.com.br>.
- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D., & Wu, K. (2006). An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 448, 123-132.

- Yu, D., Chen, C., Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* Gene Expression. *The Plant Cell*, 13, 1527–1539.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005a). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005b). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, 12, 1045-1062.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados do presente estudo, observou-se que a CHI e o SA induz diferentes genes envolvidos em respostas de defesa em plantas de laranja ‘Pera’. A Tecnologia de sequenciamento Illumina possibilitou investigar o transcriptoma de plantas laranja doce tratadas com os eliciadores, identificando 2.243 genes diferencialmente expressos. As análises mostraram alterações significativas de genes envolvidos na sinalização, estresse biótico (estágio redox, metabolismo secundário e genes *PRs*) e interações hormonais. Entretanto, pôde-se notar que essas respostas podem ser moduladas diferencialmente dependendo do patógeno que afeta a planta. Observou-se que os eliciadores foram eficientes no controle da *X. citri*, um patógeno que coloniza o mesófilo da planta, promovendo redução dos sintomas do cancro cítrico e aumentando a expressão de genes relacionados à defesa. Por outro lado, CHI e SA não foram efetivos no controle da *X. fastidiosa*, um patógeno que coloniza o xilema da planta, mesmo que respostas de defesa tenham sido expressas em momentos iniciais (24h) após a inoculação.