

**TITULO: DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE CITROS RESISTENTES
AO CANCRO CÍTRICO**

Responsável: Maria Luiza Peixoto de Oliveira e Celso E. Benedetti

RESUMO

A transformação genética de plantas com genes endógenos visando resistência a fitopatógenos é uma estratégia interessante para diminuir as perdas na produção agrícola devido ao ataque de bactérias. Este trabalho terá como objetivo a super-expressão de um fator de transcrição denominado de CCR4 em laranja doce visando o desenvolvimento de plantas de citros resistentes à *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, agente causador do cancro cítrico. Para isso, tecidos juvenis de laranja germinadas *in vitro* serão transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* carreando em seu plasmídeo Ti o gene CCR4, descrito como sendo um fator importante no controle da transcrição e degradação de mRNA em diferentes espécies. Sua super-expressão em tomate e *Arabidopsis* aumentou a resistência à fungos e bactérias. Portanto, este projeto será desafiador visto que para citros ainda não se tem nada descrito sobre a super-expressão de um fator de transcrição envolvido na resposta de defesa a fitopatógenos.

INTRODUCAO

A indústria dos citros é de grande importância econômica e social para o Brasil, que é considerado o maior produtor e exportador de suco concentrado de laranja do mundo. Porém, sérios problemas relacionados a doenças têm afetado a produção e qualidade dos citros. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Xac), se destaca como uma das maiores ameaças à citricultura brasileira uma vez que afeta a maioria das espécies de citros comerciais e é facilmente disseminada. Como forma alternativa de controle do cancro cítrico, pretendemos obter plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*) resistentes à Xac. Inicialmente testaremos a super-expressão de um fator denominado CCR4 de laranja doce, ativado na resposta de defesa induzida pela cepa não patogênica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*, patotipo C (Xaa), identificado em trabalho prévio em nosso laboratório (Cernadas et al., 2008).

A proteína CCR4 pertence ao complexo CCR4-NOT, que é um complexo de proteínas evolutivamente conservado e desempenha um papel importante no controle da transcrição e degradação de mRNA em *Drosophila*, leveduras, mamíferos e milho (Watkins et al., 2007; Azzouz et al., 2009; Gaillard et al., 2009; Deshpande et al., 2009; Temme et al., 2010). Trabalhos publicados envolvendo a super-expressão desta proteína em tomate e *Arabidopsis* demonstraram um aumento da resistência destas espécies contra fungos e bactérias (Sarowar et al., 2007; Liang et al., 2009). Pouco se sabe sobre a atuação desta proteína na resposta de defesa contra patógenos em citros, apenas que a sua expressão é ativada durante a resposta de defesa contra a cepa não patogênica de *Xanthomonas*. Nosso grupo tem focado na caracterização funcional e

estrutural de proteínas envolvidas no processo de resistência a Xac, bem como a obtenção de plantas de citros resistentes ao cancro cítrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste projeto, o aluno terá a oportunidade de aprender diferentes técnicas de biologia molecular, como clonagem e análise de expressão gênica, bem como aprender técnicas de cultura de tecidos e transformação genética de plantas. A clonagem do gene *CitCCR4* já foi finalizada mas o estudante terá a oportunidade de subclonar outros genes de interesse. Portanto, o estudante envolvido neste projeto irá (1) obter plantas geneticamente modificadas pela transformação de tecidos juvenis de laranja doce e porta-enxerto citrange via transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, (2) regeneração e enraizamento do material vegetal transformado e (3) análise molecular das plantas transformadas.

PERSPECTIVAS

Uma vez obtidas plantas transformadas e confirmadas por PCR, PCR em tempo real e Werten blot, as mesmas serão propagadas em casa-de-vegetação e desafiadas com diferentes fitopatógenos. Para a citricultura brasileira, a obtenção de plantas de laranja doce resistentes a doença implicará em uma redução acentuada nas perdas de produção pelo ataque de fitopatógenos que por ano é estimativa em milhares de reais.

REFERÊNCIAS

- Azzouz, N.; Panasenko, O.O.; Deluen, C.; Hsieh, J.; Theiler, g.; Collart, M.A. Specific roles for the CCR4-Not complex subunits in expression on the genomes. **RNA**, **15**: 377-383, 2009.
- Cernadas, RA, Camillo LR, Benedetti, CE. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv.citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii. **Mol. Plant Pathol.** 9: 609-631, 2008
- Deshpande, G.P.; Hayles, J.; Hoe, K-L.; Kim, D-U.; Park, H-O.; Hartsuiker, E. Screening a genome wide *S. pombe* deletion library identifies novel genes and pathways involved in the DNA damage response. **DNA Repair**, **8**: 672-679, 2009.
- Gaillard, H.; Tous, C.; Botet, J.; Gonzalez-Aguilera, C.; Quintero, M.J.; Viladevall, L.; Garcia-Rubio, M.L.; Rodriguez-Gil, A.; Marin, A.; Arino, J.; Revuelta, L.; Chavez, S.; Aguilera, A. Genome-wide analysis of factor affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and CCR4-Not in transcription-coupled repair. **PLoS Genetics**, **5**: 1-15, 2009.
- Liang, W.; Li, C.; Liu, F.; Jiang, H.; Li, S.; Li, C. The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. **Cell Research**, **19**: 307-316, 2009.
- Sarawar, S; Oh, H.W.; Cho, H.S.; Baek, K.H.; Seong, E.S.; Joung, Y.H.; Choi, G.J.; Lee, S.; Choi, D. Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. **The Plant Journal**, **51**: 792-802, 2007.
- Temme, C.; Zhang, L.; Kremmer, E.; Ihling, a.c.; Sinz, A.; Simonelig, M.; Wahle, E. Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their role in mRNA deadenylation. **RNA**, **16**: 1356-1370, 2010.

Watkins, K.P.; Kroeger, T.S.; Cooke, A.M.; Willians-Carrier, R.; Friso, G.; Belcher, S.E.; Wijk, K.J.; Barkan, A. A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. **The Plant Cell**, **19**: 2606-2623, 2007.