

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE LARANJA PÊRA
RIO (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) E LIMA ÁCIDA 'GALEGO'
(*Citrus aurantifolia* Swingle) EM RESPOSTA À INFECÇÃO
POR *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Juliana da Silva Cavallini

Bióloga

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE LARANJA PÊRA
RIO (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) E LIMA ÁCIDA 'GALEGO'
(*Citrus aurantifolia* Swingle) EM RESPOSTA À INFECÇÃO
POR *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Juliana da Silva Cavallini

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Dr. José Belasque Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2013

Cavallini, Juliana da Silva
C377e Expressão gênica diferencial de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e Lima Ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle) em resposta à infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Juliana da Silva Cavallini. -- Jaboticabal, 2013
xi, 117 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Banca Examinadora: Rui Leite Pereira, Poliana Fernanda Gachetto

Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Interação planta-patógeno. 3. RNASeq. 4. Transcriptoma. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

<<< INCLUIR CERTIFICADO DE APROVAÇÃO >>>

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Juliana da Silva Cavallini – nascida em 19 de Fevereiro em 1986, no município de Ribeirão Preto, São Paulo, filha de Clarice da Silva Cavallini e Maurilio Cavallini. Formou-se em Ciências Biológicas em 2009 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. Em Março de 2011 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Genética e Melhoramento de Plantas, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. O trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP, com bolsa da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e Coorientação do Dr. José Belasque Junior, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ESALQ-USP

DEDICO

Á Deus, por reinar em minha vida. Me guarda, protege e ilumina os meus caminhos.

Aos meus incríveis e dedicados pais, Clarice e Maurílio, e meu irmão Thiago, pelo amor, carinho, dedicação, apoio, e por sempre confiarem em mim. Maiores exemplos de trabalho e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Jesus, gostaria de agradecer pela inspiração. Exemplo de perfeccionismo, dedicação e amor à profissão. Pelos ensinamentos e oportunidade.

Ao meu coorientador Belasque, pela disponibilidade e contribuição para o bom desenvolvimento do meu trabalho.

À professora Dra. Maria Inês T. Ferro, pelo apoio e disponibilização das instalações do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) para a realização deste trabalho.

Ao bioinformata Roberto Herai, pela excepcional ajuda no trabalho, por sempre estar disposto a ensinar, pelo incentivo, apoio e confiança.

Aos bioinformatas Adriano Ferrasa, Renata Tezza e Alessandro Varani pela contribuição nesse trabalho.

À Mayara Murata e Teresa Cofre. Quem me dera na vida encontrar sempre pessoas como vocês. Começamos como colegas de trabalho (Trio RNASeq) e, com o tempo, ajudas, companheirismo, alegrias, tristezas, se tornaram comum entre nós. Digo em comum, porque compartilhamos muitas coisas nesses últimos dois anos. Hoje tenho vocês como amigas, pessoas em quem eu posso confiar. Como foi bom conviver com vocês no dia-a-dia. Mesmo quando tudo parecia estar perdido, sempre tínhamos razões para dar boas risadas e tornar o ambiente de trabalho melhor. Vocês me deram forças para concluir essa etapa, me ajudaram a tornar uma pessoa mais forte, mais dedicada e decidida. Vocês conseguiram passar o melhor de vocês para mim e tenho certeza que me tornei uma pessoa melhor convivendo com vocês. Muito obrigada. Amo vocês.

Gostaria de agradecer às meninas do Crebio: Agdinha, Marisa, Lúcia e Fátima pela alegria e pelas sempre palavras de incentivo e apoio.

Aos colegas do LBM: Gustavo, Lucília, Claudênia, Elaine, Flávia Campos, Nayara, Mariane, Flavia Carvalho, Miguel, Gustavo (Vurto), Ruan, Sônia, Ana, Lúcia, Juliana Vantini, Rafael Marini, Julinho, Fernando, Lucas, Gabriela, Raquel, Talitá, Rafael, obrigada por tudo.

Às minhas amigas Rebeca, Roberta, Karina, Amanda, Patrícia, Tauana, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando.

Gostaria de agradecer também a minha amada República Toca da Onça, pois lá aprendi o valor da amizade, companheirismo, aprendi a conviver com a diferença entre as pessoas e a respeitar mais: Onçona, Oncinha, Lesada, Sufrida, Paço-ká, Pintada, Misskenta, Juma, Sortera, Parda, Trotada, Chita e Cantada, vocês fazem parte de mim.

À Capes pelo auxílio financeiro pela bolsa de Mestrado.

Também gostaria de agradecer o meu amado cachorrinho Toddynho, fiel companheiro, sempre presente para me alegrar com suas lambidinhas e com seu amor.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.1 Citricultura	15
2.1.2 Cancro Cítrico e o agente etiológico	16
2.1.3 Aspectos gerais da doença	18
2.1.4 Interação planta-patógeno	21
2.1.5 Transcriptoma	24
2.1.6 RNASeq	25
3 OBJETIVO	31
3.1 Objetivos Gerais.....	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Ensaios biológicos, condições de cultura e inoculação em plantas.	32
4.2 Curva de crescimento da bactéria.....	33
4.3 Extração de RNA total de planta	34
4.4 Isolamento do RNA mensageiro, montagem das bibliotecas de cDNA e ligação dos adaptadores.....	36
4.5 Clusterização das bibliotecas de cDNA e Sequenciamento	37
4.6 Análise dos resultados	37
4.7 Análise dos dados de sequenciamento de citros	39
4.8 Anotação de sequências e localização de domínios protéicos.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Comparação dos sintomas do cancro cítrico e curva de crescimento de Xac em laranja Pêra Rio e Limão Galego.....	43
5.2 Verificação da concentração e integridade do RNA total extraído	45
5.3 Análise do transcriptoma das bibliotecas de cDNA de planta por RNASeq ..	50

5.4	Expressão gênica global e temporal em laranja Pêra Rio e Lima Ácida Galego após a inoculação com Xac.....	53
5.5	Expressão gênica global e temporal em comum em Pêra Rio e Limão Galego 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac.....	60
5.6	Expressão gênica global e temporal em comum entre as espécies Pêra Rio e Limão Galego 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac.....	67
5.7	Caracterização transcricional de Pêra Rio e Limão Galego 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac.....	70
5.8	Fotossíntese e metabolismo.....	71
5.9	Sinalização da planta contra a infecção do patógeno.....	78
5.10	Síntese de hormônios.....	87
5.11	Defesa, resistência a doenças e respostas ao estresse.....	91
5.12	Fatores de transcrição.....	98
6	CONCLUSÃO.....	102
7	REFERÊNCIAS.....	103

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE LARANJA PÊRA RIO (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) E LIMA ÁCIDA ‘GALEGO’ (*Citrus aurantifolia* Swingle) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Resumo – A citricultura é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, porém o aumento de doenças na última década tem causado grandes prejuízos a toda a cadeia produtiva. A doença cancro cítrico, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é um grave problema para o setor, não havendo até o momento método eficaz para o seu controle. Nesse estudo, utilizando RNASeq, foram analisados os perfis transcricionais de dois genótipos hospedeiros contrastantes à doença: laranja doce Pêra-Rio (PR) moderadamente resistente, e Lima Ácida Galego (LG), altamente suscetível, 24, 48 e 72 horas após a infecção com Xac, no intuito de identificar genes das plantas envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. Foram encontrados 6.330, 3.478 e 6.795 genes diferencialmente expressos (GDEs) na espécie moderadamente resistente PR, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac, respectivamente, quando comparados com seus controles. Na espécie altamente suscetível Limão Galego foram identificados 1.491, 5.621 e 2.145 GDEs após 24, 48 e 72 horas da inoculação com Xac, respectivamente. Através do programa Blast2GO, genes e vias metabólicas de fotossíntese, sinalização celular, síntese hormonais, fatores de transcrição, entre outros, foram encontrados. Esse estudo revelou diferenças associadas à resistência e desenvolvimento a nível molecular em PR e LG em resposta ao cancro cítrico, demonstrando que na espécie moderadamente resistente há uma maior ativação dos mecanismos de defesa. Tais estudos podem ser utilizados para o desenvolvimento de plantas de citros com adequado nível de resistência ao cancro cítrico.

Palavras-chave: cancro cítrico, interação planta-patógeno, RNASeq, transcriptoma

RNA-SEQ DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION ANALYSIS IN PERA RIO ORANGE AND MEXICAN LIME IN RESPONSE TO *Xanthomonas citri* subsp. *citri* INOCULATION

Abstract –The citrus agribusiness is very important to the Brazilian economy, but the increase of diseases in the last decade has caused great economic losses to the sector. The citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), is a serious disease that attacks all citrus species economically important worldwide and there is not an effective method for its control. In this study, RNASeq was used to analyze the transcriptional profiles of two contrasting citrus genotypes regarding citrus canker susceptibility: sweet orange Pêra Rio (PR), moderately resistant, and Mexican lime ‘Galego’ (ML), highly susceptible. Gene expression were performed in a HiScanSQ System (Illumina) using total RNA isolated from leaves collected 24, 48 and 72 hours after Xac inoculation, with leaves inoculated with water been used as control. It were found 6,330, 3,478 and 6,795 differentially expressed genes (DGEs) in moderately resistant PR specie at 24, 48 and 72 hours after Xac inoculation, respectively, when compared with their controls. In the specie highly susceptible ML, it was identified 1,491, 5,621 and 2,145 DGEs after 24, 48 and 72 hours after Xac inoculation, respectively. Through the program Blast2GO, genes and metabolic pathways related to photosynthesis, cell signaling, hormone synthesis, transcription factors, among others, were found as involved in plant defense. This study revealed differences at the molecular level between PR and ML in response to citrus canker, showing that in the specie moderately resistant there is a greater activation of host defense mechanisms. Such informations can be used for the development of citrus plants with an adequate level of resistance to citrus canker.

Keywords: citrus canker, interaction plant-pathogen, RNASeq, transcriptome

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma importante cultura produzida em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo e o Brasil, país com características climáticas propícias ao cultivo da laranja, hoje produz aproximadamente 19 milhões de toneladas de laranja e mantem a posição de maior produtor mundial de laranja e maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado (FAO, 2013).

Entre os desafios enfrentados pela citricultura está o cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). O cancro cítrico é uma doença que afeta diversas espécies de citros de importância comercial, resultando em significativas perdas de produção não só no Brasil como no mundo (GUO *et al.*, 2011). Os sintomas da doença incluem lesões de cancro nos frutos e partes aéreas da planta e as infecções podem resultar em abscisão foliar e de frutos, diminuindo desse modo a produtividade de árvores afetadas.

Atualmente, não há uma maneira eficiente de controle do cancro cítrico (AN; MOU, 2012), sendo que a única forma eficaz de contê-lo é por meio de eliminação e queimada das plantas suspeitas ou infectadas com a doença (FU *et al.*, 2013). O desenvolvimento de estratégias para um controle efetivo do cancro cítrico envolve a descoberta de genes alvo que possam ser utilizados para o desenvolvimento de plantas transgênicas ou de droga(s) que interaja(m) com proteína(s) específica(s) da bactéria essencial(ais) para o seu crescimento e/ou sobrevivência. O conhecimento dos mecanismos de defesa das plantas é um passo necessário para se alcançar sucesso nessa direção (ZHANG; ZHOU, 2010), uma vez que estes mecanismos estão sob controle genético. Entender a maneira pelo qual genes de resistência do hospedeiro interagem com genes de virulência do patógeno é de fundamental importância para se interferir eficientemente nesta guerra a favor do hospedeiro.

Há uma diferença em relação à suscetibilidade e resistência das espécies de citros ao cancro cítrico, sendo que a maioria dos citros cultivados comercialmente são hospedeiros suscetíveis à Xac (GOTTWALD *et al.*, 2002).

Neste estudo foram utilizadas as espécies Laranja doce Pêra Rio (PR) (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Lima Ácida Galego ou simplesmente Limão Galego (*Citrus aurantifolium*) (LG), sendo a espécie PR moderadamente resistente, enquanto a espécie LG é altamente suscetível ao cancro cítrico.

Este estudo buscou investigar a expressão gênica temporal e diferencial de espécies cítricas contrastantes em relação à resistência ao cancro cítrico por meio da nova tecnologia de sequenciamento RNASeq (Illumina), no intuito de melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes à resistência a doenças e desvendar os elementos moleculares que são específicos para cada planta (FU *et al.*, 2012).

O advento das novas tecnologias de sequenciamento de DNA de larga escala (*high-throughput*), chamadas de tecnologias de sequenciamento de última geração, possibilitou o uso de um novo método, denominado RNASeq, para o mapeamento e quantificação de transcriptomas. Esta abordagem permite uma compreensão mais abrangente da composição dinâmica e regulação da transcrição em plantas (ZOU *et al.*, 2005, BRECHENMACHER *et al.*, 2008, KIM *et al.*, 2011), podendo revelar transcritos raros e desconhecidos e identificar eventos alternativos de *splicing* (KIM *et al.*, 2011). Por ser um método quantitativo, ele pode ser usado para determinar os níveis de expressão gênica de maneira mais acurada a baixo custo e menor tempo (TANG *et al.*, 2009; FILICHKIN *et al.*, 2010).

De acordo com Cernadas e colaboradores (2008), ainda é limitado o atual conhecimento da função de genes relacionados a resistência ao cancro cítrico. Ainda não há informação disponível sobre uma análise comparativa de transcriptoma entre os genótipos de *Citrus* com diferentes níveis de tolerância ao cancro cítrico pela técnica de RNASeq. O conhecimento do transcriptoma de espécies de citros com fenótipos de resistência contrastantes ao cancro cítrico em resposta à infecção com Xac é uma estratégia que possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à resistência ao cancro cítrico e na identificação de genes de defesa do hospedeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Citricultura

Anualmente, a produção total de citros é estimada como sendo maior que 124,5 milhões de toneladas, com a China, Brasil, Estados Unidos, México e Índia sendo os principais produtores. Dentre os citros, as laranjas, os limões, as tangerinas e as toranjas são os mais cultivados (FAO, 2011).

No ano de 2011, o Brasil produziu aproximadamente 19 milhões de toneladas de laranja e mantém a posição de maior produtor mundial dessa fruta e maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado (FAO, 2013). No cenário nacional, o estado de São Paulo se destaca como maior produtor, respondendo por mais de 70% do total produzido no país (ARAÚJO, 2012).

O gênero *Citrus* pertence à família *Rutaceae*, que apresenta 13 gêneros e 65 espécies, contendo as principais espécies de interesse comercial, como as do gênero *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* (SWINGLE *et al.*, 1967), que são coletivamente chamadas de citros. Os citros são originários de regiões com clima tropical e subtropical do sul e sudeste Asiático (PENA *et al.*, 2008).

As frutas cítricas são altamente apreciadas pelo sabor e demais propriedades, pois são ricas em vitamina C, ácido fólico, potássio e fibras (UNCTAD, 2009). O grupo das laranjas doces é conhecido cientificamente por *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e agrupa as principais espécies: 'Pêra', 'Natal', 'Valência', 'Hamlin', 'Bahia' e 'Baiianinha', 'Westin', 'Rubi', 'Folha Murcha', 'Seleta', 'Lima', 'Piralima' e 'Lima Tardia' (CEAGESP, 2009).

A laranja Pêra é produzida em escala comercial no Brasil, sendo ideal para consumo *in natura* e preparo de sucos. Sua qualidade conquistou a preferência dos produtores e consumidores, atendendo à demanda dos três mercados: indústria, exportação e consumo interno (AMARO, 2001), e também, por apresentar melhores características de sabor, mais doce e menos ácida que as outras espécies (CEAGESP, 2009). Sendo uma espécie moderadamente resistente ao cancro cítrico, ela assegura mais produção aos agricultores.

O Limão Galego, além de destinar-se para o consumo *in natura* e para indústria de suco, destina-se para extração do óleo essencial contido na casca dos frutos, comumente utilizado por indústrias de bebidas de refrigerantes, como também para fabricação de cosméticos, essências aromáticas e na culinária. (DA SILVA *et al.*, 2011). O limão galego, sendo uma espécie altamente suscetível à doença, acarreta considerável perda na produção e prejuízo ao produtor, sendo um dos motivos que tem inviabilizado sua produção em alta escala.

Apesar das condições climáticas e de cultivo serem apropriadas, a produtividade brasileira ainda é baixa quando comparada a de outros países (AMARO *et al.*, 2001). Além disso, o risco desse setor aumentou devido às pragas e doenças que, além de reduzir a produtividade, fazem o custo de produção aumentar consideravelmente (BOVÉ, 2006). Dentre as doenças bacterianas que representam as maiores preocupações para o setor estão a clorose variegada dos citros (CVC), o greening ou huanglongbing (HLB) e o cancro cítrico.

2.1.2 Cancro Cítrico e o agente etiológico

O cancro cítrico foi introduzido no século passado nas Américas do Norte e Sul e Oceania, provavelmente por material infectado, regiões estas que abrigam dois dos mais importantes produtores mundiais de citros, Brasil e Estados Unidos (STALL; SEYMOUR, 1983; SCHOULTIES *et al.*, 1987). A primeira ocorrência de cancro cítrico no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente-SP (BITANCOURT, 1957).

O agente etiológico do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma bactéria gram-negativa, aeróbica e com flagelo polar. Em meio de cultura, as colônias produzem polissacarídeos extracelulares tornando-as viscosas, e com formato côncavo e pigmentação amarela (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Seis diferentes tipos de *Xanthomonas* estão associadas a doenças em citros (SCHOULTIES *et al.*, 1987). O cancro cítrico, também conhecido por cancrose A ou cancro cítrico asiático, é a forma mais severa da doença e a que possui a maior gama de espécies cítricas hospedeiras, sendo que a maioria dos

tipos de citros cultivados comercialmente são hospedeiros suscetíveis à Xac (KHALAF *et al.*, 2011). Este é o tipo mais comum da doença, sendo endêmico em algumas regiões da Ásia e América. O cancro cítrico B, ou cancrose B, possui uma gama mais restrita de hospedeiros. É patogênico somente em *Citrus limon* e *Citrus aurantifolia* e foi relatado apenas na Argentina, Uruguai e Paraguai. O cancro cítrico C, ou cancrose C, é limitado ao Estado de São Paulo e afeta somente *Citrus aurantifolia*. Esses dois últimos tipos de cancro cítrico são causados por *X. fuscans subsp. aurantifolii* tipo B e C, respectivamente. Há também dois outros tipos bacterianos que causam cancro em citros, formados por isolados da espécie *X. citri* com patogenicidade diferenciada e restrita basicamente à *C. aurantifolia*, o primeiro encontrado no sudoeste asiático (tipo A*) (VERNIÉRE *et al.*, 1998) e o segundo na Flórida (tipo A^w) (SUN *et al.*, 2004). Por último tem-se a Mancha bacteriana dos citros, cujo agente causal é a bactéria *X. alfalfae subsp. citrumelonis*. Ocorre em viveiros na Flórida, tendo sido encontrado infectando citrumelo Swingle (*C. paradisi x Poncirus trifoliata*) (HARTUNG; CIVEROLO, 1989).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* tornaram-se modelos importantes para o estudo da interação planta-patógeno e para a compreensão de patogenicidade bacteriana e mecanismos de virulência (BÜTTNER; BONAS 2010). Em 2002, Da Silva e colaboradores publicaram o sequenciamento do genoma completo da Xac, linhagem 306, relatando a presença de um cromossomo circular de 5.175.554 pares de base (pb), e dois plasmídeos: pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb). Isto permitiu evidenciar a considerável versatilidade bioquímica e uma série de mecanismos que a XAC utiliza para a sua sobrevivência e para a infecção da planta hospedeira (DA SILVA *et al.*, 2002).

Bactérias fitopatogênicas modulam a expressão de seu arsenal de infecção, driblam os mecanismos de defesa da planta e propiciam um meio adequado para sua sobrevivência e multiplicação. Dessa forma, o estudo da interação planta-patógeno é um dos principais desafios atuais para o conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam esta interação (BÜTTNER; BONAS, 2009).

2.1.3 Aspectos gerais da doença

A partir do contato com os tecidos jovens de uma planta cítrica sadia, a Xac invade o tecido da planta por aberturas naturais, como estômatos, ou por escoriações e ferimentos provocados por espinhos, insetos ou partículas de solo carregadas pelo vento (LEITE JUNIOR, 1990; AMORIM, 1995; SCHUBERT; SUN, 1996). Com a introdução no Brasil, em 1996, da larva minadora dos citros, *Phyllocnistis citrella*, que forma galerias nas superfícies das folhas ao se alimentar das mesmas, houve um grande aumento da incidência do cancro cítrico, uma vez que estas galerias são portas de entrada para o patógeno (Figura 1A) (FUNDECITRUS 2008).

A doença instala-se nos pomares, preferencialmente, nos órgãos jovens, sobretudo nas folhas de brotações recentes e frutos nas primeiras fases do crescimento. Basicamente, folhas e ramos são mais suscetíveis à doença nas seis primeiras semanas após o início do crescimento. Após esta fase, a planta apresenta maior facilidade em resistir à infecção, o que resulta no aparecimento de poucas lesões (TIMMER *et al.*, 2000).

Sob condições naturais de infecção a disseminação ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas e de chuvas associadas com ventos. A disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado, podendo ser levada de um lugar para o outro nos equipamentos de colheita, em veículos, máquinas e também através de mudas contaminadas. (CIVEROLO, 1985; GOTTWALD *et al.*, 1992).

Os sintomas constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, aspecto eruptivo presentes em folhas, ramos e frutos (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 2001). Nas folhas e frutos é comum o aparecimento de um halo amarelo circundando a área necrosada (Figura 1B, 1D). Em altas severidades pode ocorrer desfolha, queda de frutos e secamento de ramos, sendo mais comuns em hospedeiros mais suscetíveis (GOTTWALD *et al.*, 1989). Plantas cítricas afetadas constituem-se como principal fonte de inóculo do patógeno, já que a sobrevivência da bactéria é curta em qualquer outro substrato (Figura 1C) (GRAHAM *et al.*, 1989; GRAHAM *et al.*, 2000).

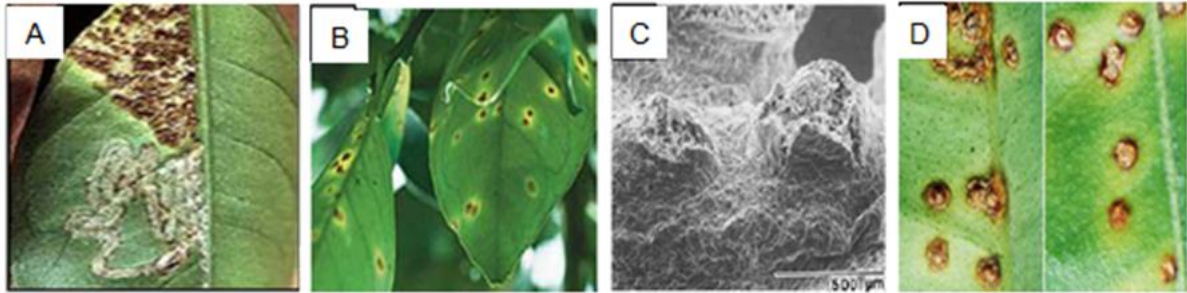


Figura 1 Sintomas de cancro cítrico (A) Lesões em galerias produzidas pela larva minadora dos citros e consequente infecção e formação de cancro por Xac na região previamente lesionada do tecido vegetal (acima). (B) Foto mostrando folhas com lesões circundadas por halo clorótico. (C) Microscopia eletrônica de varredura mostrando a erupção do mesófilo infectado e formação de uma pústula com formato de cratera após 30 dias de inoculação de Xac. (D) Foto mostrando escurecimento da lesão com aspecto corticoso. Fonte: (A e C) GRAHAM *et al.*, 2004; (B e D)

<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>, 2010.

Sintomas mais evidentes do cancro cítrico são decorrentes de hiperplasia e hipertrofia desencadeadas pelo patógeno ao alterar a transcrição de alguns genes do hospedeiro (CERNADAS *et al.*, 2008), porém os sintomas em si não constituem o maior problema ocasionado pela doença, pois raramente mata a planta. Todavia, devido ao estresse biótico, a planta responde produzindo diversas substâncias, dentre elas o etileno, que ocasiona um desequilíbrio hormonal na planta (CROZIER *et al.* 2001). Os impactos desta doença estão relacionados à desfolha de plantas, à depreciação da qualidade da produção pela presença de lesões em frutos, à redução na produção pela queda prematura de frutos e à restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença (FUNDECITRUS, 2013).

No Brasil, o controle do cancro cítrico baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação de plantas e pomares quando afetados pela doença (BARBOSA *et al.*, 2001). No estado de São Paulo, quando é constatada a presença de cancro cítrico em um pomar, as plantas infectadas devem ser eliminadas com a adoção de um raio mínimo de trinta metros a partir das plantas doentes. As plantas contidas no raio, consideradas como suspeitas de infecção, devem ser completamente eliminadas. No Sul do Brasil (estados do Paraná,

Santa Catarina e Rio Grande do Sul) a erradicação de plantas doentes, e das suspeitas de infecção, não é obrigatória e é permitida a adoção de práticas de manejo da doença, como a pulverização de produtos cúpricos e implantação de cortinas quebra-vento (LEITE JÚNIOR; MOHAN, 1990). No entanto, há certas limitações associadas à utilização de tratamento químico, pois além de aumentar os gastos ao produtor, há a possibilidade de contaminação do meio ambiente, podendo assim comprometer a segurança alimentar. Além disso, ao longo do tempo o patógeno pode adquirir resistência ao cobre (BEHLAU *et al.*, 2012).

Dessa forma, a obtenção de cultivares resistentes é o método mais econômico, ambientalmente seguro e efetivo no controle do cancro cítrico (FU *et al.*, 2013). Entretanto, o melhoramento de citros se torna uma prática difícil devido a características relacionadas com a biologia reprodutiva do gênero, como: esterilidade de óvulo e pólen, autoincompatibilidade, poliembrião, alta heterosigosidade e longo período de juvenilidade (GMITTER *et al.*, 1992). Devido a isso, a manipulação genética via transformação de genes relacionados ao estresse, é amplamente utilizada para criar germoplasmas resistentes à doença nos casos em que isso seria impossível de ser obtido via melhoramento clássico, que é o caso em citros (FU *et al.*, 2013).

O gênero *Citrus* apresenta uma ampla variação nos níveis de resistência ao cancro cítrico (GOTTWALD *et al.*, 2002). São classificadas como altamente resistente a espécie Calamondin; como resistente as espécies de laranja doce Folha Murcha, Moro e Shamouti e as tangerinas Ponkan e Satsuma; como moderadamente resistente as espécies Lima Verde, Navelina, Valência e Pêra premunizada, como moderadamente suscetíveis a espécie Natal e Targor Murcott e como suscetíveis as espécies Bahia, Baianinha, Hamlin, Seleta Vermelha, Piralima e Lima Ácida Galego (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005, LEITE JÚNIOR, 1990; TAZIMA *et al.*, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Nível de resistência de genótipos e espécies do gênero *Citrus* e afins em relação ao cancro cítrico (Adaptado de LEITE JÚNIOR, 1990; FEICHTENBERGER *et al.*, 2005; TAZIMA *et al.*, 2008).

Nível de resistência	Genótipos	Espécie
Altamente resistente	'Calamondin' 'Kumquat'	<i>Citrus madurensis</i> <i>Fortunella spp.</i>
Resistente	Tangerina 'Ponkan' Tangerina 'Satsuma' Tangerina 'Sunki' Tangerina 'Cleopatra'	<i>Citrus reticulata</i> <i>Citrus unshiu</i> <i>Citrus sunki</i> <i>Citrus reshni</i>
Moderadamente resistente	Tangerina 'Darcy' Tangerina 'Cravo' Laranja doce 'Folha Murcha' Laranja doce 'Valencia' Laranja doce 'Pera Rio'	<i>Citrus reticulata</i> <i>Citrus reticulata</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Citrus sinensis</i>
Suscetível	Laranja doce 'Hamlin' Laranja doce 'Bahia' Tangerina 'Clementina' Lima ácida 'Tahiti'	<i>Citrus sinensis</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Citrus clementina</i> <i>Citrus latifolia</i>
Altamente suscetível	Pomelos Lima ácida 'Galego' Limão 'Siciliano'	<i>Citrus paradisi</i> <i>Citrus aurantifolia</i> <i>Citrus limon</i>

A forma física da cutícula, o número de estômatos e de tricomas por área de epiderme são fatores importantes na definição do nível de resistência a patógenos por algumas espécies vegetais (AGRIOS, 2005), a chamada resistência mecânica. Porém, a resistência genética deve estar efetivamente envolvida com a ativação de vias de sinalização e mecanismos bioquímicos que englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (PASCHOLATI *et al.*, 2008). Desta forma, é necessário estudos a nível molecular para descobrir os genes responsáveis pela resistência das plantas às principais doenças.

2.1.4 Interação planta-patógeno

Nas plantas ocorreu o desenvolvimento de inúmeros mecanismos de respostas de defesa, específicos contra as várias formas de estresses. Isso possibilitou o aparecimento de características que permitem a sobrevivência das atuais espécies, em função da incapacidade de locomoção desses organismos.

Nesse sentido, os vegetais conseguem alterar o plano de desenvolvimento e contornar situações desfavoráveis, como os ataques de pragas ou patógenos, bem como fatores abióticos desfavoráveis (AGRIOS 1997).

As interações entre a planta e patógenos envolvem diferentes maneiras de comunicação. A planta deve ser capaz de reconhecer e se defender contra um patógeno em sua superfície ou no seu interior. Por outro lado, para ser bem sucedido, o patógeno também deve ser capaz de manipular a biologia da planta e criar um ambiente adequado e favorável para seu crescimento e reprodução. Com o tempo, tanto as plantas como os fitopatógenos evoluíram um conjunto de genes que permitem essa comunicação (BOYD *et al.*, 2013).

A defesa basal ou de não hospedeiro, é chamada de “*PAMP-triggered immunity*” (PTI), e acontece logo após o contato com o patógeno. Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a micróbios (MAMPs) são reconhecidos por receptores de reconhecimento específico de padrões (PRR) localizados nas membranas das células do hospedeiro. Este mecanismo é considerado a primeira linha de imunidade inata em planta (ZHANG; ZHOU, 2010).

A resistência específica de hospedeiro, chamada de “*effector-triggered immunity*” (ETI), é baseada na interação altamente específica entre efetores do patógeno (proteínas Avr) e proteínas específicas da planta (proteínas R) . De acordo com esta teoria, denominada de Teoria Gene-a-Gene (CUI *et al.* 2009), a resistência genética é controlada por um gene de resistência (*R*) na planta e um gene de avirulência (*avr*) correspondente no genoma bacteriano. Essa interação é denominada incompatível, e o hospedeiro tem seus mecanismos de defesa ativados e o patógeno não consegue infectar e desenvolver-se em seu interior, não havendo a indução de sintomas da doença (HAMMOND-KOSAK; JONES, 1996, DAURELIO *et al.*, 2013). Essa interação, reconhecida como uma resposta de hipersensibilidade (RH), é caracterizada por sintomas visíveis nas folhas da planta como morte celular localizada, lesões necróticas para limitar e conter o patógeno no local de infecção (OH *et al.*, 2006, MUR *et al.*, 2008), modificações estruturais, produções de espécies reativas de oxigênio (ERO), acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) em espaços intracelulares

e a expressão dos fatores de transcrição que ativam os genes das plantas que caracterizam a resposta do hospedeiro (DAURELIO *et al.*, 2013).

No entanto, se a planta é incapaz de reconhecer o patógeno ou não consegue ativar rapidamente as vias de defesa, como é o caso das plantas suscetíveis, a doença ocorre e esta interação é conhecida como interação compatível (GREWAL *et al.*, 2012). Nesse caso a interação Avr/R não ocorre (FEBRES *et al.*, 2009; DOMINGUES *et al.*, 2011) e se dá a multiplicação do patógeno às custas do hospedeiro (DAURELIO *et al.*, 2013).

O fenômeno de reconhecimento é resultante da evolução conjunta do hospedeiro e do patógeno (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). A maioria dos genes R codifica proteínas citoplasmáticas contendo um sítio de ligação de nucleotídeo (*nucleotide binding site*-NBS) e um domínio carboxil rico em leucina (*leucine rich repeats*-LRR), geralmente denominados genes NBS-LRR (TOR *et al.*, 2004). Alguns genes de resistência apresentam um terceiro domínio variável no N-terminal, com homologia aos receptores Toll e interleucina 1 (TIR) que são fatores envolvidos na imunidade inata em animais, ou um domínio *coiled-coil* (CC) (DEYOUNG; INNES, 2006). Sequências de genes de resistência a doenças de plantas mostram que, apesar de conferirem resistência a patógenos diferentes tais como vírus, bactérias e fungos, os mesmos contêm sequências similares e codificam peptídeos com semelhanças estruturais (KANAZIN *et al.*, 1996).

Há trabalhos que sugerem que várias vias metabólicas são estimuladas após a ativação do sistema imune PTI e ETI das plantas. As vias do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e do etileno resultam na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa (DE SOUZA *et al.*, 2009, AN ; MOU., 2012).

A ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode ocorrer tanto nas interações compatíveis quanto incompatíveis, porém dá-se em magnitude e velocidade diferentes para cada tipo de interação. Para entender esses mecanismos do estabelecimento da interação planta patógeno, estudos do transcriptoma ajudam a prever papéis de genes individuais ou interações mais complexas de vias de sinalização e a interação entre elas (DAURELIO *et al.*, 2013). Este conhecimento deve contribuir para o uso efetivo desse

conhecimento no desenvolvimento de novos métodos para o controle das doenças (PASCHOLATI *et al.*, 2011).

2.1.5 Transcriptoma

O transcriptoma é o conjunto completo de RNAs expressos em um organismo, um grupo de células ou mesmo de uma célula específica em uma determinada condição fisiológica. O RNA é sintetizado do DNA através de um processo conhecido como transcrição. Os RNAs presentes em uma célula indicam quais genes foram expressos e eles podem mudar durante a vida do organismo, diferentemente do DNA, que se mantém estático (ADAMS, 2008), embora possa sofrer mutações.

A síntese de RNA a partir do DNA envolve etapas altamente reguladas através de uma rede complexa que responde rapidamente a alterações ambientais ou perturbações genéticas. Dessa forma, conhecer o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares das células e tecido e também para entender o desenvolvimento e as doenças (WANG *et al.*, 2009)

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, especialmente aquelas relacionadas à genômica funcional, estudos de transcriptoma para o entendimento da interação planta-patógeno foram realizados (CHEN *et al.*, 2011). Nos trabalhos de Forment e colaboradores (2005); Campos e colaboradores (2007) e Guidetti-Gonzalez e colaboradores (2007) foram utilizadas etiquetas de sequências expressas (ESTs) para investigar os mecanismos moleculares de plantas cítricas envolvidos nas vias de resistência induzidos por patógenos. Nos trabalhos de Cernadas e colaboradores (2008), Khalaf e colaboradores (2011) e Fu e colaboradores (2012), a técnica de microarranjo foi utilizada no intuito de fornecer informações para a identificação de genes e vias potencialmente importantes que conferem resistência às plantas.

Entretanto, o microarranjo exhibe vários fatores limitantes, como a baixa sensibilidade de detecção de transcritos, interferência de elevados ruídos nos resultados, restrição de transcritos somente àqueles representados nos chips de

arranjo, além de possíveis erros de interpretação devido a hibridizações não-específicas (MARIONI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; MARTINELLI *et al.*, 2012).

As técnicas de sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de cDNA também possuem desvantagens, pois há uma necessidade de grande quantidade de mRNA, apenas uma parte dos transcritos são analisados e geralmente suas isoformas são indistinguíveis umas das outras (WANG *et al.* 2009). As tecnologias de sequenciamento de nova geração promovem o sequenciamento de cDNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida.

2.1.6 RNASeq

Recentemente, o advento das novas tecnologias de sequenciamento de cDNA de larga escala (*high-throughput*), chamadas de tecnologias de sequenciamento de última geração, possibilitou o uso de um novo método, denominado RNASeq. Essa técnica é considerada pelos pesquisadores um método revolucionário, pois entre várias vantagens, permite alcançar níveis sem precedentes de precisão e especificidade na quantificação de genes diferencialmente expressos e identificar novas regiões transcritas (KIM *et al.*, 2011, PINTO *et al.* 2011).

Oshlack e colaboradores (2010) afirmam que, apesar da análise dos dados ser um aspecto crítico e muitas vezes o mais demorado do RNASeq, essa técnica possibilita uma ótima resolução e um alcance dinâmico na quantificação dos transcritos. Sua alta sensibilidade promove a detecção da expressão substancial de transcritos comparativamente. Além disso, a técnica é capaz de capturar a dinâmica do transcriptoma através de diferentes tecidos e condições. (WANG *et al.*, 2008; OSHLACK *et al.*, 2010). Outra vantagem é a não dependência do conhecimento prévio de um transcriptoma de referência, embora a existência de um ajuda muito. Dessa forma, genes de células específicas podem ser identificados. Além disso, a técnica requer quantidade relativamente pequena de RNA total, pois o sequenciamento é livre de clonagem bacteriana (CARVALHO; SILVA, 2010; STRICKLER, *et al.*, 2012, KOGENARU *et*

al., 2012), embora tenha a desvantagem de não gerar clones físicos para estudos posteriores.

Dentre as novas plataformas de sequenciamento, a plataforma Solexa da Illumina já é muito utilizada (WANG *et al.* 2009). Essa tecnologia promove o sequenciamento de DNA em plataforma capaz de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Assim como no Sequenciador Sanger, o sequenciamento é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. Porém a inovação dessa tecnologia da Illumina consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (TURCATTI *et al.*, 2008; CARVALHO; SILVA, 2010).

Na clonagem *in vitro* é utilizada uma superfície de clonagem denominada *flow cell*, a qual é dividida em oito linhas ou canaletas que são utilizadas para o sequenciamento das amostras. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização.

Os fragmentos de cDNA da amostra também são ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, o que permite sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados (Figura 2 A, B). A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em "ponte" na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em "ponte" (Figura 2 C). No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas (Figura 2 D, E). Esses ciclos são repetidos 35 vezes e assim as cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um cluster de seqüenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010). Esta reação de clonagem em fase sólida dos fragmentos de cDNA ocorre em um equipamento chamado CBot (Illumina) e pode produzir de 100 a 200 milhões de "clusters" separados espacialmente na *flow-cell*, proporcionando extremidades

livres para que um oligonucleotídeo de sequenciamento universal se hibridize para iniciar a reação de sequenciamento (METZKER, 2010).

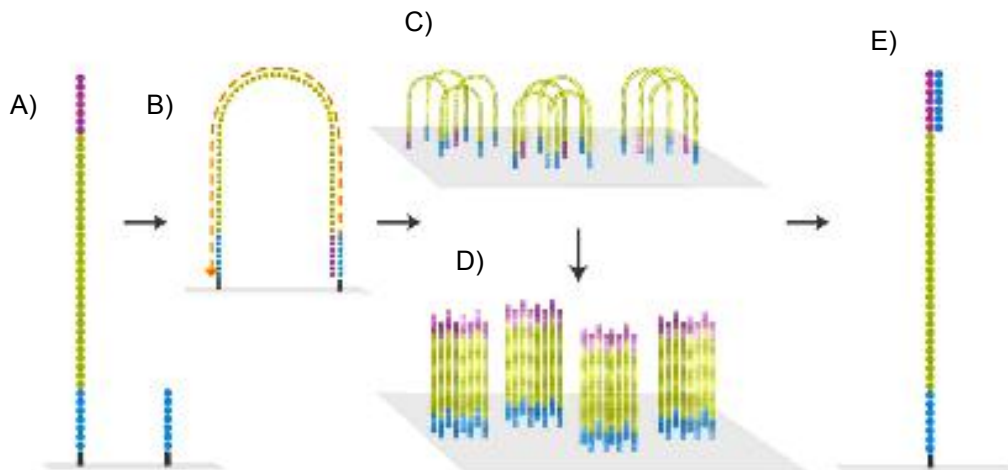


Figura 2. Etapa da clusterização na plataforma Illumina/Solexa: (A) O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades. (B) No primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. (C) As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B. (D) Na etapa de desnaturação a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. (E) Repete-se a etapa de anelamento formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte.

As etapas seguintes são realizadas na plataforma de sequenciamento, através da captura de imagem com a utilização de terminadores reversíveis em um método cíclico que compreende a incorporação de nucleotídeos, imagens de fluorescência e clivagem (METZKER, 2005; METZKER, 2010). Para cada ciclo do sequenciamento, os quatro nucleotídeos acoplados a quatro diferentes fluoróforos são adicionados ao mesmo tempo na *flow-cell* (WILHELM *et al.*, 2010). Uma DNA polimerase se liga aos fragmentos de cDNA de cada “cluster” presente na “flow-cell” e incorpora apenas um nucleotídeo fluorescente que apresenta complementariedade com a fita molde do fragmento. As terminações destes nucleotídeos são reversíveis, ou seja, elas podem apresentar uma extremidade 3’ bloqueada, para impedir a incorporação de mais de uma base

por ciclo, e uma extremidade 3' desbloqueada, para dar continuidade ao sequenciamento (Figura 3). Isto é possível por meio do uso de nucleotídeos modificados, chamados de dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Após a incorporação de um único nucleotídeo, é realizada a lavagem dos nucleotídeos não incorporados. A captura da imagem é então realizada para identificar o nucleotídeo incorporado (METZKER, 2005; METZKER, 2010).

A alta densidade de "clusters" de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata (CARVALHO; SILVA, 2010). O sequenciamento e a captura de imagem utilizam terminadores reversíveis em um método cíclico que compreende a incorporação de nucleotídeos, imagens de fluorescência e clivagem.

Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. No início, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada cluster (SHENDURE; JI, 2008). Atualmente, leituras de 50-150 bases podem ser obtidas.

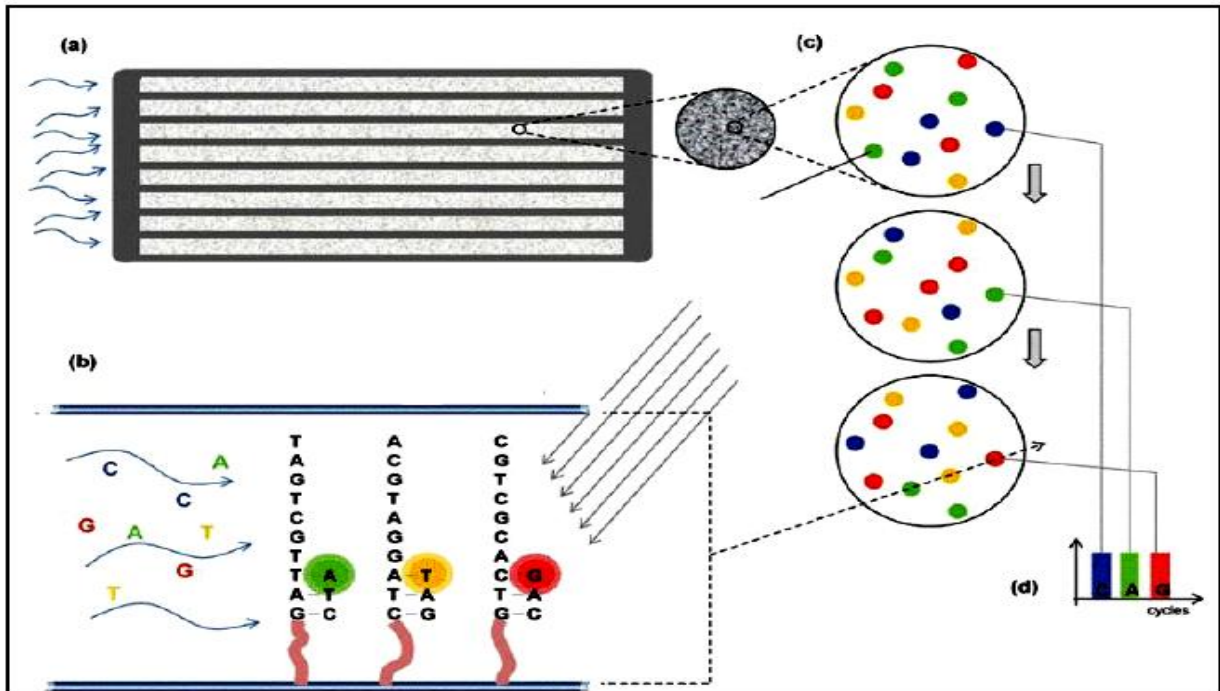


Figura 3. Captura da imagem do sequenciamento na plataforma Illumina/Solexa. A alta densidade de “clusters” de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. As quatro cores são detectadas pela captura de imagem por reflexão de fluorescência interna total (TIRF) com o uso de “lasers”. Fonte: GILCHRIST, 2013.

Cada corrida de sequenciamento produz *terabytes* de dados em imagem. Os sinais de intensidades dos quatro nucleotídeos são extraídos a partir destas imagens e são usados para nomear as bases. As imagens são processadas a fim de extrair os sinais numéricos para cada base (ROUGEMONT *et al.*, 2008; MARGUERAT; BAHLER, 2010). O programa Firecrast (Illumina) de análise de imagens coleta informações para que o programa Bustard converta a informação em uma sequência de DNA de código IUPAC associado com um índice de intensidade e qualidade. Um terceiro programa, chamado Gerald, irá realizar a calibração da qualidade e filtragem dos dados, e finalmente, produzir um arquivo de texto de sequências curtas de leitura em formato FASTQ (WILHELM *et al.*, 2010).

A última etapa é a análise dos dados. Esta etapa é considerada crítica, porque a enorme quantidade de dados produzidos em cada sequenciamento requer uma infra-estrutura adequada para as análises computacionais e locais para armazenamento dos dados. Além disso, devido ao grande número de

sequências, esta etapa é considerada também a mais demorada da tecnologia RNASeq (WILHELM *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, várias ferramentas foram desenvolvidas para analisar a expressão gênica diferencial com base em diferentes algoritmos estatísticos, linguagem de programação, plataformas computacionais e tamanho dos dados. Cufflinks, ALEXA-Seq, DESeq, DEGseq, Myrna, MMSEQ, rQuant, e ERANGE são alguns exemplos de “softwares” desenvolvidos para o perfil de expressão gênica diferencial (GRIFFITH *et al.*, 2010; ANDERS; HUBER, 2010). Esses programas apresentam várias características em comum e características exclusivas para facilitar a medição da expressão de genes em diferentes tipos de conjuntos de dados. No entanto, a utilidade da maior parte dos programas está limitada a comparações aos pares de amostras (JAIN, 2011).

Portanto, a tecnologia do RNASeq tem sido aplicada em vários organismos para revelar suas atividades transcricionais. Dados de sequenciamento que, no passado, levariam anos para serem gerados, podem agora ser produzidas numa questão de dias. A enorme quantidade de dados gerados nesta tecnologia permitiu a criação de boas perspectivas em várias áreas científicas, em particular, nos estudos dos transcriptomas (STRICKER, 2012).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo investigar, utilizando tecnologia de RNASeq, a expressão gênica temporal de espécies do gênero *Citrus* moderadamente resistente e altamente suscetível ao cancro cítrico, no tempo de 24, 48 e 72 horas após a infecção pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, com a finalidade de identificar genes envolvidos na resistência das plantas ao patógeno.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar os genes da espécie laranja doce Pêra Rio (*Citrus sinensis*) e Limão Galego (*Citrus aurantifolia*), moderadamente resistente e altamente suscetível ao cancro cítrico, que são diferencialmente expressos quando as mesmas são infectadas com Xac. Isso permitirá a identificação dos mecanismos de defesa que são ativados nas duas plantas sob o ataque da bactéria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensaio biológico, condições de cultura e inoculação em plantas.

Plantas adultas de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Limão Galego (*Citrus aurantifolia*), enxertadas sobre limão Cravo e livres de patógenos, foram cedidas pelo Fundo de Defesa de Citricultura (Fundecitrus). Os experimentos foram conduzidos em um laboratório de segurança construído especialmente para a manipulação e inoculação de Xac em plantas cítricas, sob condições ótimas de temperatura (28°C), luminosidade e umidade. Este local, pertencente ao Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBM) da FCAV/UNESP, possui um sistema de filtragem absoluta de ar (filtros EPA), além de possuir antecâmara e pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente.

A bactéria Xac isolado 306, cujo genoma foi sequenciado por completo (Da Silva et al., 2002), foi utilizada para inocular folhas das duas espécies cítricas. A bactéria foi cultivada a 28°C em meio sólido NA (5g de peptona, 3g de extrato de carne, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada) por 3 dias para obtenção de massa celular, que foi então ressuspensa em água destilada e ajustada a uma densidade óptica de 0,3 a 600nm, equivalente a 10^8 UFC/mL. O estoque de bactérias utilizado pertence ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da FCAV/UNESP e estava mantido à temperatura ambiente em frascos contendo água de torneira ou tampão fosfato estéreis.

Para o experimento foram selecionadas plantas que apresentavam tamanho uniforme e emissão de folhas jovens. As inoculações foram realizadas por infiltração da suspensão de bactérias com auxílio de seringa hipodérmica para insulina, sem agulha, diretamente no espaço apoplástico, em todo o limbo foliar, na parte abaxial das folhas (Figura 4). Da mesma forma, as folhas controle foram inoculadas com água destilada autoclavada.



Figura 4: Inoculação de Xac em folhas de Pêra Rio e Limão Galego pela técnica de infiltração.

4.2 Curva de crescimento da bactéria

Para a preparação do inóculo, a bactéria Xac 306, armazenada em tampão fosfato, foi plaqueada em meio de cultura sólido NA (5g de peptona, 3g de extrato de carne, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada), e cultivada a 28 °C por 72 horas. Uma colônia isolada foi repicada para o mesmo meio de cultura e após o crescimento a 28°C, por 72 horas, a massa de células foi coletada e diluída em água bi-destilada estéril em tubo Falcon estéril de 50 mL. A suspensão bacteriana de Xac foi ajustada para uma densidade ótica a 600nm igual a 0,3, equivalente a 10^8 UFC/mL, e posteriormente foi ajustada para uma concentração de 10^4 UFC/mL por meio de diluição seriada.

A suspensão a 10^4 UFC/ml de Xac foi infiltrada em folhas jovens pelo método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa para insulina, sem agulha. Foram utilizadas 6 plantas no total, sendo 3 plantas da laranja doce Pêra Rio e 3 plantas de Limão Galego. As inoculações foram realizadas em 20 folhas por planta e cada folha foi inoculada em 6 pontos. Discos foliares foram coletados em diferentes dias (0, 1, 5, 11, 18 e 25). Para cada tempo de coleta, 3 discos foliares com 1 cm^2 recuperados do ponto de inoculação de cada espécie foram desinfetados em álcool 70%, macerados em 1 ml de tampão PBS 1X seguido por diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}). Uma alíquota de 100 μL de três diluições, variáveis para cada dia e variedade, foi plaqueada em meio NA em duplicada. As placas foram mantidas a 28°C por 72 horas, quando então se procedeu a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados

obtidos foram analisados pelo teste de Tukey a 5% (Assistat 7.6 Beta) e os pontos inoculados nas folhas foram fotografados ao longo do tempo para a caracterização dos sintomas.

4.3 Extração de RNA total de planta

As folhas inoculadas com Xac ou água (controle) foram coletadas após 24, 48 e 72 horas da inoculação e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento do isolamento do RNA.

Para extração do RNA total das folhas foi utilizado o kit *PureLink® RNA Mini Kit* da Ambion. De cada amostra, 0,250 gramas de folhas (pool das 3 folhas) foram maceradas em gral contendo nitrogênio líquido até a pulverização total do material vegetal. A amostra macerada foi rapidamente transferida para tubo de eppendorf de 2 mL juntamente com tampão de lise (*Lise buffer*) e β -mercaptoetanol. Imediatamente o tubo foi homogeneizado em vortex por 2 minutos e centrifugado a 2.600g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo eppendorf de 2 mL. Ao sobrenadante foi adicionado metade de seu volume de etanol absoluto (0,5 V) e homogeneizado por vortex em baixa velocidade por 30 segundos.

A solução foi transferida para uma coluna com um tubo de coleta (cedidos pelo kit) para uma centrifugação a 12.000g por 15 segundos a temperatura ambiente. Depois da centrifugação, foi descartada a solução que passou pela coluna e ficou retida no tubo de coleta. Em seguida, utilizando a mesma coluna e o mesmo tubo de coleta, foi adicionado 700 μ L de tampão de lavagem I (*Wash buffer I*) para centrifugar novamente a 12.000 g por 30 segundos a temperatura ambiente, para então descartar o tubo de coleta e inserir outro tubo na coluna.

Foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem II (*Wash buffer II*) na coluna com o tubo de coleta e centrifugado a 12.000g por 30 segundos a temperatura ambiente. Esse procedimento foi realizado duas vezes. O eluído do tubo de coleta foi retirado e foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 2 minutos a temperatura ambiente para secar a membrana.

O tubo de coleta foi descartado e a coluna foi colocada em um tubo de recuperação (*Recovery tube*) para a eluição do RNA em 50 μ L de água livre de

RNase. Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, o conjunto foi centrifugado por 12.000g por 2 minutos a temperatura ambiente.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I a 37°C para remover qualquer contaminação com DNA genômico. Cada amostra foi formada por um pool de folhas. Foram extraídas três repetições biológicas para cada genótipo infectado e seus respectivos controles (não infectados) totalizando 12 amostras distintas (Tabela 2). Este pool foi formado por 9 folhas de três espécies de plantas distintas.

Tabela 2. Amostras de RNA total de planta e sua respectiva legenda.

Amostras	Legenda
PRC24	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Pêra Rio 24 horas após a inoculação (Controle)
PRI24	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Pêra Rio 24 horas após a inoculação (Infectada)
PRC48	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Pêra Rio 48 horas após a inoculação (Controle)
PRI48	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Pêra Rio 48 horas após a inoculação (Infectada)
PRC72	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Pêra Rio 72 horas após a inoculação (Controle)
PRI72	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Pêra Rio 72 horas após a inoculação (Infectada)
LGC24	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Limão Galego 24 horas após a inoculação (Controle)
LGI24	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Limão Galego 24 horas após a inoculação (Infectada)
LGC48	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Limão Galego 48 horas após a inoculação (Controle)
LGI48	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Limão Galego 48 horas após a inoculação (Infectada)
LGC72	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Limão Galego 72 horas após a inoculação (Controle)
LGI72	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Limão Galego 72 horas após a inoculação (Infectada)

A extração de RNA exige cuidados para evitar a contaminação da amostra com RNases, as quais possuem a capacidade de degradação de moléculas de RNA. Desta forma, todo o material utilizado para as manipulações de RNA total foram esterilizados a 180°C para evitar a presença de RNases, e todas as soluções foram preparadas com água ultra pura tratada com

dietilpircarbonato (DEPC), conforme recomendado por Sambrook e colaboradores (1989). No momento de manipulação das amostras foi utilizado o RNaseZap® da Ambion.

Para verificação da presença ou ausência de contaminantes, foi medida a absorvância do RNA extraído em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, a 260,280 e 330 nm. A concentração de RNA total extraído foi quantificada com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit Qubit® RNA HS Assay, e a integridade das amostras de RNA foram avaliadas no *Bioanalyzer* 2100 (Agilent) com o kit RNA 6000 Nano LabChip.

4.4 Isolamento do RNA mensageiro, montagem das bibliotecas de cDNA e ligação dos adaptadores

A partir do RNA total das amostras de planta, o RNA mensageiro (mRNA) foi isolado e purificado pelo kit de preparação de amostras *TruSeq RNA SamplePreparation v2* (Illumina). A quantidade inicial recomendada pela Illumina é de 0,1–4 µg de RNA total.

O processo de purificação de mRNA baseou-se na ligação da calda poli-A das moléculas de mRNA ao oligo(dT) ligado à esferas magnéticas. O mRNA purificado foi fragmentado em sequências de 200 pb por enzimas presentes no kit. A partir da fragmentação dos RNAs mensageiros, a primeira fita de cDNA foi sintetizada por meio da enzima transcriptase reversa e oligonucleotídeos randômicos. O mRNA molde foi removido para a síntese da segunda fita do cDNA. Para a limpeza das amostras, foi utilizado o kit *Agencourt Ampure beads*. As esferas magnéticas deste kit separaram o cDNA dupla fita do restante dos reagentes.

Os cDNAs com extremidades coesivas resultantes da fragmentação, foram convertidas em extremidades cegas pelo *EndRepair Mix*. A atividade da exonuclease 3'-5' deste mix remove os nucleotídeos da extremidade 3'e a ação da polimerase adiciona nucleotídeos na extremidade 5'. Após o reparo das pontas, foi adicionado uma base adenina em cada extremidade 3' dos fragmentos de cDNA para facilitar a ligação dos adaptadores que possuem uma

base timina. Os adaptadores responsáveis por identificar as amostras foram ligados às extremidades dos fragmentos de cDNA.

Foi realizada uma reação de polimerase em cadeia (PCR) com oligonucleotídeos específicos para as sequências dos adaptadores para aumentar o número de fragmentos das bibliotecas que continham adaptadores ligados nas duas pontas. Para validação, as bibliotecas foram quantificadas por meio do fluorômetro Qubit® 2.0 e a qualidade das bibliotecas foi avaliada com o chip *Agilent DNA 1000* no Bionalyzer. Todas as bibliotecas foram normalizadas a 16 pmoles.

4.5 Clusterização das bibliotecas de cDNA e Sequenciamento

Nesta etapa as bibliotecas foram inseridas na *flowcell* para formação de *clusters* para posterior seqüenciamento. Para a clusterização foi utilizado o kit *TruSeq SR Cluster Kit v3 – HS* (cBot) seguindo as recomendações do fabricante. Após procedeu-se o sequenciamento na plataforma *HiScanSQ System* (Illumina) pertencente à Facility de sequenciamento da FCAV/UNESP, seguindo as instruções do fabricante para o RNASeq. Na *flow-cell*, que é a lâmina que acontece a PCR em fase sólida para o sequenciamento, foram utilizadas cinco amostras por canaleta com diferentes “*barcode*” para diferenciar as amostras. Foi realizado o sequenciamento “*single read*”.

4.6 Análise dos resultados

Os dados seqüenciados foram preparados e analisados para calcular o perfil de expressão gênica de cada amostra estudada, além da variação de expressão existente entre elas. A análise de expressão foi baseada em um método de alinhamento dos fragmentos (“sequências”) contra um transcriptoma de referência devido à alta qualidade e quantidade de dados genéticos de diferentes espécies de Citrus disponíveis em bases de dados públicos. A metodologia de análise foi subdividida em dois pipelines. O primeiro envolveu a construção de um banco de dados de sequências de *Citrus sp.* O segundo a aplicação de um pipeline para análise de expressão gênica das bibliotecas seqüenciadas, descrito nas seções seguintes. A construção do banco de dados

de transcriptoma de citros foi feito com base no pipeline simplificado da Figura 5. Neste pipeline foi feito um levantamento de bancos de dados públicos de transcriptomas de espécies do gênero *Citrus*, e foram identificadas seis bases de dados, formadas por sequências reais e preditas, geradas por grupos de pesquisa independentes: AFFYM, NCBI, UNIGENE, USDA, CITRUSGDB e PHYTOZOME.

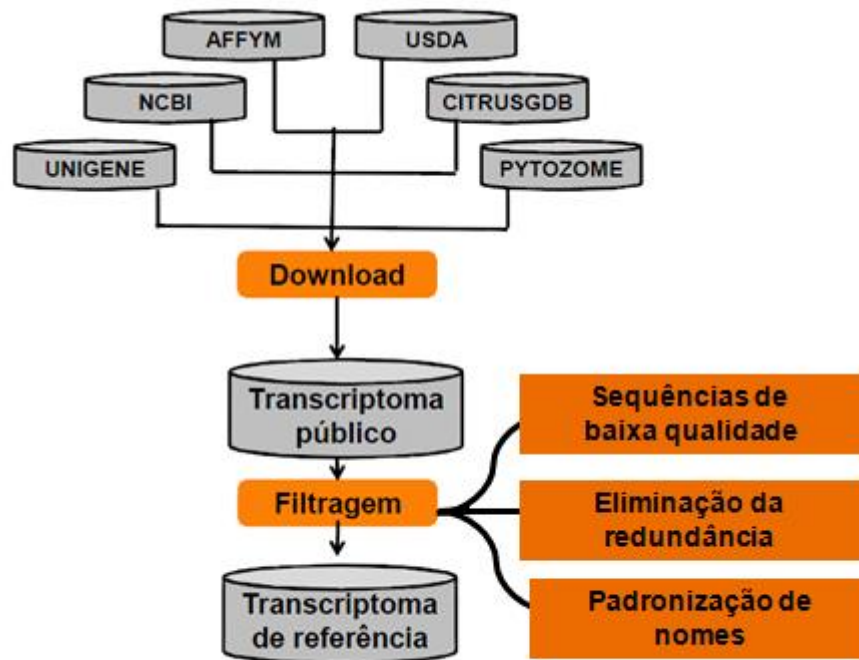


Figura 5. *Pipeline* para construção de um banco de dados não redundante de transcriptoma de plantas da espécie *Citrus ssp.* para estudos de genotipagem. Fonte: Roberto Herai e Adriano Ferrasa.

O banco de dados AFFYM da Affimetrix (GeneChip Citrus Genome Array) possui uma base de dados com 33.879 transcritos que foram utilizados como referência para construção de um “chip” de microarranjo para genotipagem de 11 espécies do gênero *Citrus*, incluindo *Citrus sinensis*, *Citrus unshui*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus medica*, *Citrus reticulata* e *Citrus reshni*, dentre outros. Por se tratar, atualmente, do melhor método disponível para genotipagem em larga escala de plantas da espécie *Citrus ssp.*, este “chip” foi utilizado no trabalho desenvolvido recentemente por Fu e colaboradores (2012) para estudar a doença cancro cítrico.

A base de dados do NCBI, contendo 173.112 transcritos, foi produzida a partir de uma pesquisa da doença HLB que ocorre em plantas do género *Citrus*, causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (MARTINELLI *et al.*, 2012). Os dados são de transcriptoma de *C. sinensis* e foram depositados no NCBI.

O banco de dados UNIGENE, contendo 101.686 transcritos, utiliza uma base de dados genéticos de *C. clementina* armazenada no portal UNIGENE do NCBI, que foi gerado por grupos de pesquisa independentes.

O banco de dados USDA, contendo 31.863 transcritos, utiliza uma base de dados de *Citrus ssp.* gerada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Este banco de dados possui dados de transcriptoma das espécies *C. sinensis* e *Poncirus trifoliata*.

O banco de dados CITRUSGDB, contendo 46.147 transcritos, é resultado de uma pesquisa em *C. sinensis* coordenada por diversos grupos de pesquisa internacionais. E, por fim, o banco de dados PHYTOZOME, contendo 33.929 transcritos, contem dados gerados por um consórcio internacional chamado *International Citrus Genome Consortium* (GMITTER *et al.*, 2012), para produzir informações genéticas do genoma e do transcriptoma das espécies de *C. sinensis* e *C. clementina*.

As bases de dados foram agrupadas em uma base centralizada. Em seguida, ela passou por um processo de filtragem, que envolveu a remoção de sequências com baixa qualidade (composição com falhas ou com conteúdo parcial em sua composição). Posteriormente, foi realizada uma padronização na nomenclatura das sequências, seguindo o critério TRANSCRITO_N, onde N indica um código único do transcrito na base de dados, originando um total de 204.550 transcritos.

4.7 Análise dos dados de sequenciamento de citros

O pipeline desenvolvido para análise de expressão gênica é ilustrado na Figura 6. Inicialmente, os dados brutos foram filtrados com base na qualidade dos fragmentos sequenciados, cuja nota média no padrão PHRED foi de no mínimo 20 para o fragmento inteiro. Esta análise foi realizada com a ferramenta

NGS QC Toolkit (PATEL; JAIN, 2012). As sequências repetitivas não foram removidas pela impossibilidade em se estimar a origem das mesmas, pois não é possível definir se estas sequências representam artefatos oriundos da amplificação das amostras sequenciadas ou se correspondem a fragmentos repetidos reais dentro da amostra biológica.

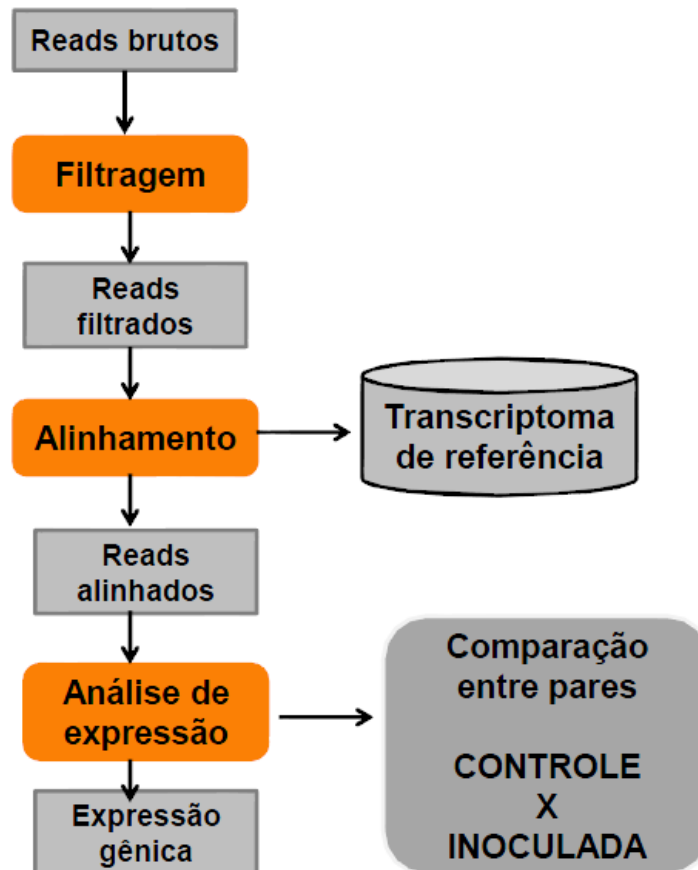


Figura 6. Pipeline para análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento. Fonte: Roberto Herai e Adriano Ferrasa.

Os dados filtrados foram então clusterizados utilizando um método baseado em matriz de distâncias euclidianas, o que permite verificar o agrupamento entre as amostras.

Os dados filtrados foram alinhados contra o transcriptoma de referência criado com a ferramenta de alinhamento Bowtie 2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), sem permitir a ocorrência de inserções, deleções ou mutações maiores do que 1 nucleotídeo, considerando o fragmento inteiro. Esta estratégia permite levar em consideração as mutações existentes entre indivíduos de uma mesma espécie, as mutações oriundas de alterações decorrentes da ploidia e

zigozidade celular ou as mutações causadas por falhas de equipamentos de sequenciamento.

Os alinhamentos foram analisados e, para cada transcrito da base do transcriptoma de referência, foi feita a contagem da quantidade absoluta de fragmentos que alinharam em cada transcrito, para cada uma das amostras consideradas. O pacote de ferramentas DESeq (ANDERS; HUBER, 2010), disponível para o ambiente R – *Bioconductor*, foi usado para realizar o cálculo da variação da expressão gênica diferencial entre pares de amostras, por meio de uma metodologia de análise de expressão gênica baseada em contagem de fragmentos. O cálculo da expressão normaliza as amostras com base no tamanho de cada uma para permitir a comparação da expressão de um mesmo transcrito entre bibliotecas de diferentes tamanhos. A partir dos dados normalizados, foi feito o cálculo do *Fold-Change*, Log base 2 do *Fold-Change* e a significância estatística (p-valor). O *Fold-Change* indica a variação de expressão normalizada de fragmentos por transcrito entre duas amostras. Estes valores são controlados por erros estatísticos do tipo 1 (probabilidade de falso positivos), calculados pelo método conhecido por False Discovery Rate (FDR) e ajustados com o uso de testes múltiplos desenvolvido por Benjamin-Hochberg (1995). Neste trabalho, as variações em que o p-valor foi inferior a 0,05 foram consideradas com alta significância estatística e, assim, o transcrito é diferencialmente expresso.

As correlações entre os genes diferencialmente expressos que são comuns a várias amostras ou exclusivas entre pares de amostras são visualmente representadas por diagramas de Venn (OLIVEROS, 2007).

4.8 Anotação de sequências e localização de domínios protéicos

Para obter uma descrição funcional de cada transcrito diferencialmente expresso entre as amostras, foi feito o uso da ferramenta Blast2GO (CONESA *et al.*, 2005). A anotação de ontologias gênicas baseia-se em mineração de dados oriundos de sequências públicas com anotação disponível, com homologia mínima de 60% entre as sequências. Ao final, as moléculas diferencialmente expressas são classificadas em 3 domínios: a) processo biológico, que indica as

operações ou os conjuntos de eventos moleculares com início e fim definidos em que o produto do gene estudado participa e que são fundamentais para o funcionamento de uma célula, tecido, órgãos ou organismo; b) função molecular, que indica as atividades elementares do produto do gene a nível molecular; e c) componente celular, que indica a parte da célula ou o ambiente extracelular em que o produto do gene desempenha sua função.

A identificação de domínios proteicos foi feita com base numa metodologia comparativa, implementada pela ferramenta InterProScan (CASTRO *et al.*, 2006). A identificação é feita a partir de uma sequência de nucleotídeos e permite verificar em detalhes as características de um determinado domínio, seja ele envolvido diretamente ou indiretamente com funções biológicas quaisquer, como aquelas descritas pelas ontologias gênicas: componente celular, processo biológico ou função molecular.

Os pipelines desenvolvidos para a construção dos bancos de dados não redundante de transcriptoma de plantas da espécie *Citrus ssp* (Figura 5) e de análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento (Figura 6), foram desenvolvidos por Roberto Herai (School of Medicine, UCSD – University of Califórnia San Diego, Califórnia, USA e Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, São Paulo, Brasil) e Adriano Ferrasa (Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil). Outros dois bioinformatas estiveram envolvidos no projeto: Alessandro Varani (Departamento de Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Jaboticabal-SP) e Renata Izabel Dozzi Tezza (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, UNESP – Univ Estadual Paulista, Jaboticabal-SP). Os recursos computacionais utilizados foram os do Laboratório Multiusuário de Bioinformática da Embrapa Informática Agropecuária, em Campinas-SP, e os do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, em Jaboticabal-SP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação dos sintomas do cancro cítrico e curva de crescimento de Xac em laranja Pêra Rio e Limão Galego

Estudos comparativos são estratégias efetivas e importantes para análise de genótipos com comportamentos contrastantes à tolerância ao estresse (FU *et al.*, 2012). Pesquisas anteriores demonstraram que a espécie PR é moderadamente resistente à doença cancro cítrico, enquanto que a espécie LG é altamente suscetível (LEITE JUNIOR, 1990; TAZIMA *et al.*, 2008). Para confirmar os níveis de resistência ao cancro cítrico das espécies utilizadas neste trabalho, foi realizada a observação temporal dos sintomas de cancro cítrico e avaliação do crescimento de Xac em folhas inoculadas com suspensão bacteriana por meio de infiltração por pressão.

Folhas das espécies PR e LG foram inoculadas com uma suspensão de Xac e periodicamente fotodocumentadas para observação do fenótipo (Figura 7). Na espécie LG, 5 dias após a inoculação (DAI) já começaram a aparecer os primeiros sintomas de cancro, com o surgimento de pequenas lesões, enquanto na espécie PR não houve a manifestação da doença neste período. Transcorridos 25 DAI, nas folhas de LG os sintomas evoluíram e as lesões espalharam-se rapidamente pelo tecido foliar, aumentando de diâmetro e tornando-se mais escuras, com aspecto corticoso e saliente; já nas folhas da espécie PR os sintomas ficaram mais contidos, restritos ao ponto de inoculação, demonstrando menor multiplicação e propagação da bactéria (Figura 7).

A curva de crescimento de Xac nas plantas de laranja doce Pêra Rio e Limão Galego aos 0, 1, 5, 11, 18 e 25 dias após a inoculação, revelou que a bactéria se multiplica de maneira semelhante em ambas as espécies até o 11^o DAI. Porém, no 19^o DAI, na espécie PR o valor de log foi 7,2, enquanto que na espécie LG o valor de log foi 8,5 (Figura 8), apresentando diferença estatística significativa nesse ponto. No 25^o DAI o crescimento da Xac na espécie LG ainda

continuou maior do que na espécie PR, embora não tenha havido diferença estatística (Figura 8).

Sendo assim, pode-se sugerir que na espécie moderadamente resistente PR os mecanismos de defesa ativados pela planta foram mais eficientes em conter a bactéria e os sintomas da doença do que aqueles ativados pela espécie altamente suscetível Limão Galego. Esta diferença pode estar relacionada tanto à velocidade e/ou intensidade da resposta como à diferença nos mecanismos ativados, uma vez que nas duas espécies a barreira física de entrada da bactéria foi sobrepujada pela inoculação por pressão.

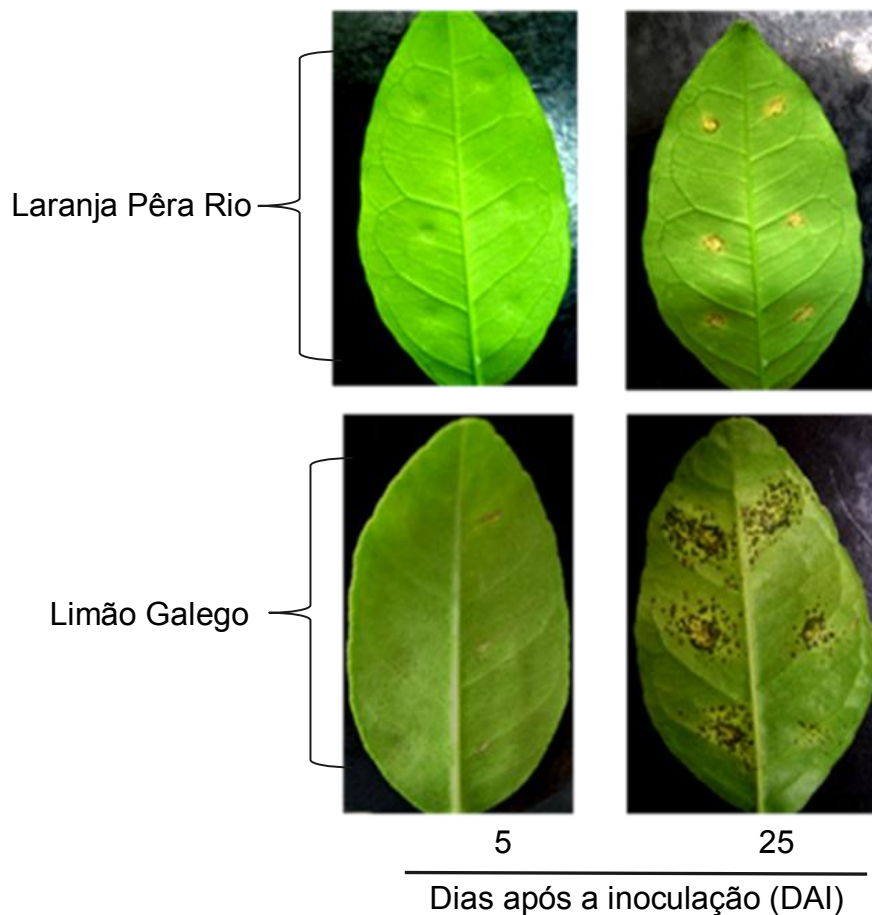


Figura 7. Comparação dos sintomas de cancro cítrico na espécie moderadamente resistente Laranja Pêra Rio e na espécie altamente suscetível Limão Galego 5 e 25 dias após inoculação com suspensão a 10^4 UFC/ml de Xac.

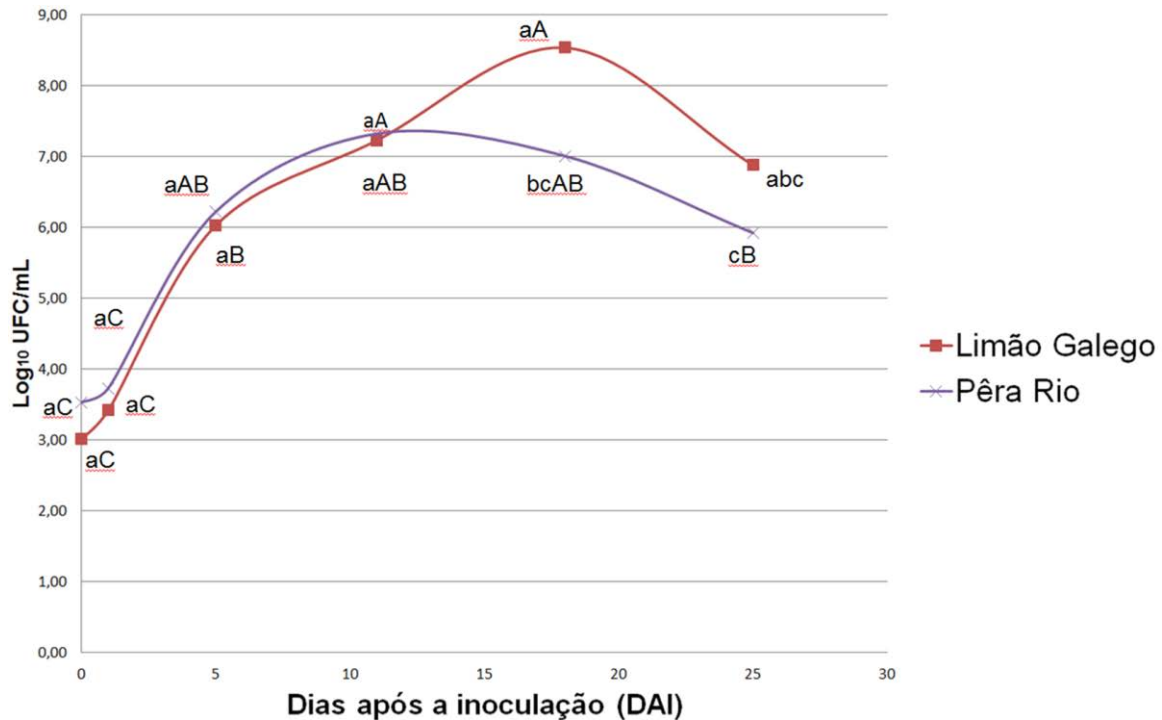


Figura 8. Curva de crescimento de Xac nas espécies Laranja Pêra Rio e Limão Galego até o 25º dia após a inoculação. Valores em Log₁₀ UFC/ml. Pontos acompanhados de letras minúsculas iguais não se diferem estatisticamente dentro de cada tempo e pontos acompanhados de letras maiúsculas iguais não se diferem estatisticamente entre os tempos no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2 Verificação da concentração e integridade do RNA total extraído

A pureza das amostras de RNA total extraídos de planta foram avaliadas através da determinação da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 330 nm em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. A relação $A_{260}/A_{280\text{nm}}$ ficou entre 1,80 e 2,0, que indica não contaminação por proteína ou fenol, a relação $A_{260}/A_{230\text{nm}}$ ficou entre 1,52 e 1,95, com a maioria igual ou maior do que 1,7 o que indica não contaminante nas amostras. As concentrações de RNA total (ng/μl) variaram de 250 a 1.000 ng/μL (Tabela 3). A montagem da biblioteca de cDNA necessita de, no mínimo, 1 μg de RNA total, segundo o protocolo TruSeq RNA Sample Preparation v2 (Illumina), utilizado neste experimento. Portanto todas as amostras de RNA extraídas apresentaram concentração de RNA suficientes.

Para avaliar a integridade do RNA total isolado, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes (Figura 9). A partir do gel de agarose é possível inferir sobre a integridade do RNA por meio da visualização das bandas de RNA ribossomal (rRNA). A presença de rastros (“smear”) abaixo das bandas de rRNA indicam degradação e, acima delas, pode indicar contaminação por DNA genômico. Portanto, um RNA de boa qualidade deve apresentar bandas bem definidas e sem rastros. Além disso, a banda referente ao rRNA 28S deve apresentar o dobro da intensidade da banda do rRNA 18S, no caso de organismos eucariotos.

Entretanto, uma maneira menos subjetiva para avaliar a integridade do RNA é a eletroforese capilar realizada no equipamento Bioanalyzer. Esta técnica exige uma pequena quantidade de RNA e utiliza um corante fluorescente que permite avaliar tanto a integridade quanto a concentração de RNA na amostra. O princípio é o mesmo de uma eletroforese em gel de agarose, porém a corrida é realizada em um capilar contendo o polímero e é gerado um eletroferograma, o qual é analisado automaticamente pelo aparelho que detecta qualquer traço de degradação. O resultado é exibido na forma de um gráfico, que calcula a razão 28S/18S (eucarioto) ou 23S/16S (procarioto) com maior precisão a partir dos respectivos picos. Além disso, o equipamento possui um programa que utiliza um algoritmo para analisar os resultados obtidos e atribuir à amostra uma pontuação (*RNA Integrity Number* - RIN) que varia de 1 a 10. A técnica de RNASeq exige um RNA de alta qualidade. Uma amostra satisfatória e sem degradação deve apresentar um RIN acima de 8. A integridade do RNA total extraído das folhas das espécies PR e LG utilizadas neste trabalho apresentou uma média de RIN de 8,45 (mínimo 8,0 e máximo 8,9) (Figuras 10 e 11). Portanto, todas as amostras de RNA utilizadas no presente trabalho para a obtenção do transcriptoma de PR e LG apresentavam a qualidade necessária para tal análise.

Tabela 3. Avaliação da concentração e pureza das amostras de RNA

Amostra	Legenda	Concentração (ng/ μ L)	A260/A280	A260/230
PRC24	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Pêra Rio 24 horas após a inoculação (Controle)	843.32	1,90	1,52
PRI24	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Pêra Rio 24 horas após a inoculação (Infectada)	672.00	1,87	1,60
PRC48	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Pêra Rio 48 horas após a inoculação (Controle)	286.00	1,92	1,80
PRI48	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Pêra Rio 48 horas após a inoculação (Infectada)	266.00	1,85	1,70
PRC72	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Pêra Rio 72 horas após a inoculação (Controle)	392.00	1,95	1,70
PRI72	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Pêra Rio 72 horas após a inoculação (Infectada)	421.28	2,00	1,92
LGC24	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Limão Galego 24 horas após a inoculação (Controle)	206.19	1,92	1,63
LGI24	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Limão Galego 24 horas após a inoculação (Infectada)	213.60	2,00	1,90
LGC48	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Limão Galego 48 horas após a inoculação (Controle)	210.00	1,90	1,60
LGI48	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Limão Galego 48 horas após a inoculação (Infectada)	250.00	2,00	1,95
LGC72	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Limão Galego 72 horas após a inoculação (Controle)	220.09	2,00	1,94
LGI72	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Limão Galego 72 horas após a inoculação (Infectada)	1.000	1,94	1,80

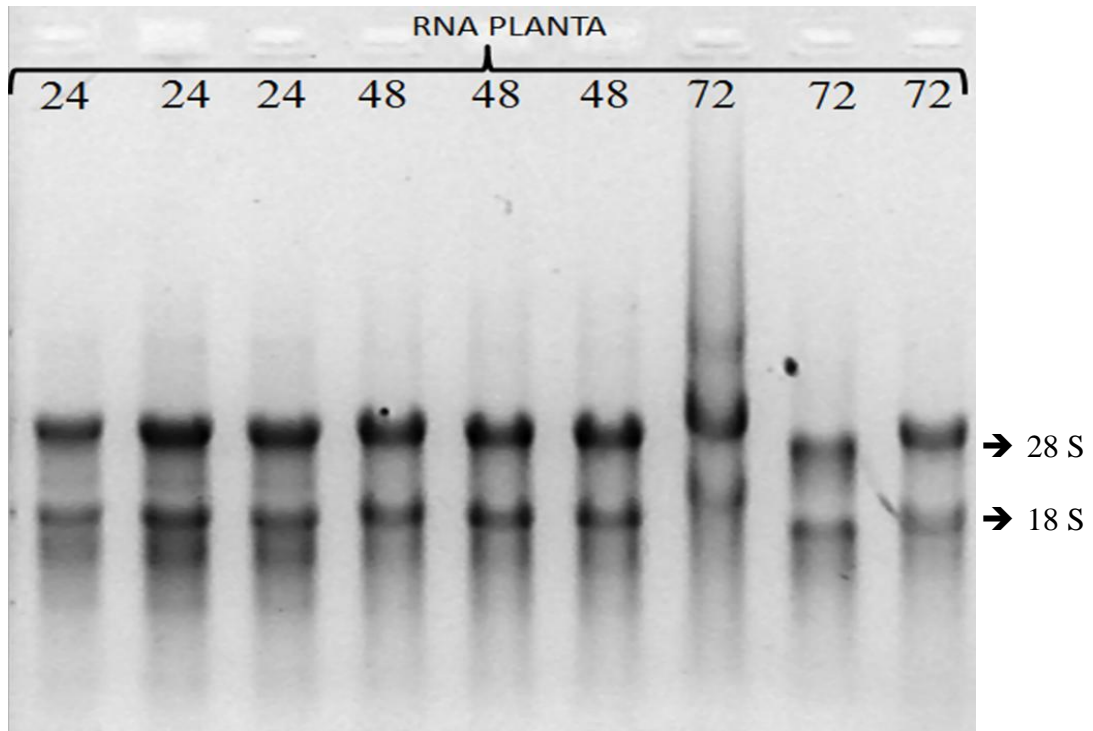


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes das amostras de RNA total de planta de Laranja Pêra Rio extraídas pelo kit *PureLink® RNA Mini* (Ambion) a partir de folhas coletadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação com suspensão de *Xac* 10^8 UFC/mL. A concentração do gel foi de 1,0%, a corrida foi feita a 80V e a quantidade de amostra aplicada em cada poço foi de 1,0 μ g.

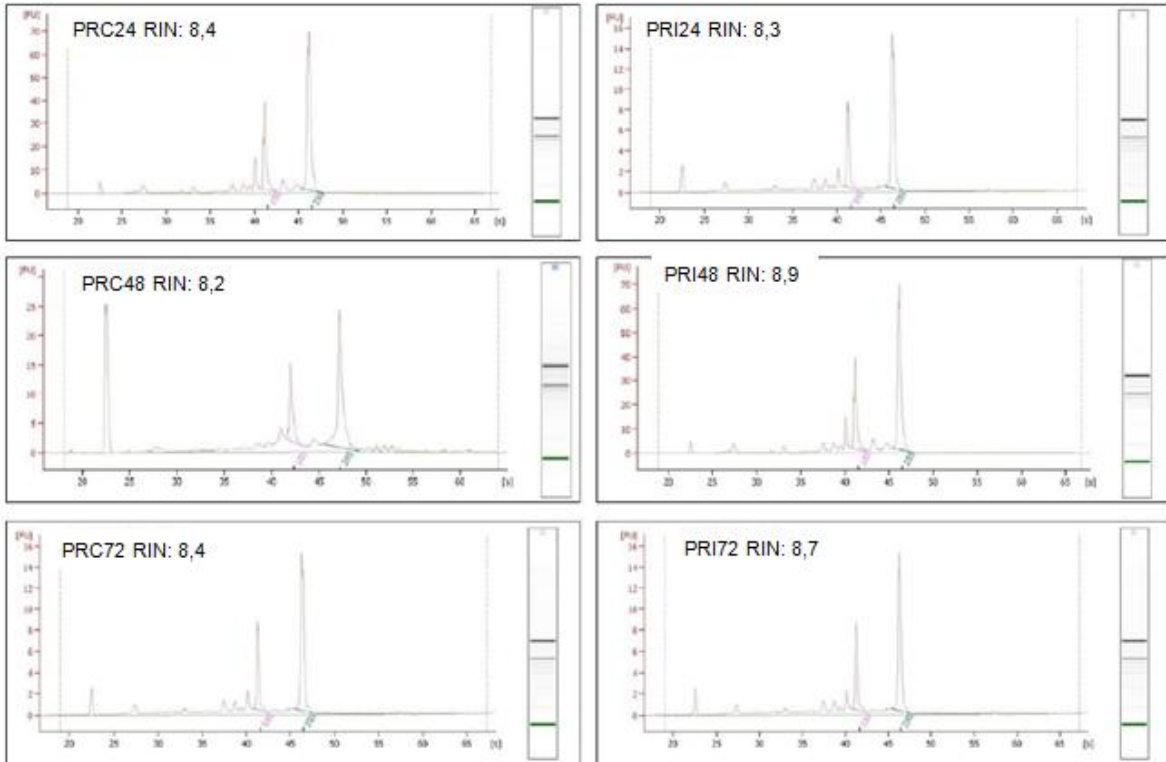


Figura 10. Eletroferograma e RIN obtidos no Bioanalyzer das amostras de RNA total extraídas de tecido foliar da espécie Pêra Rio.

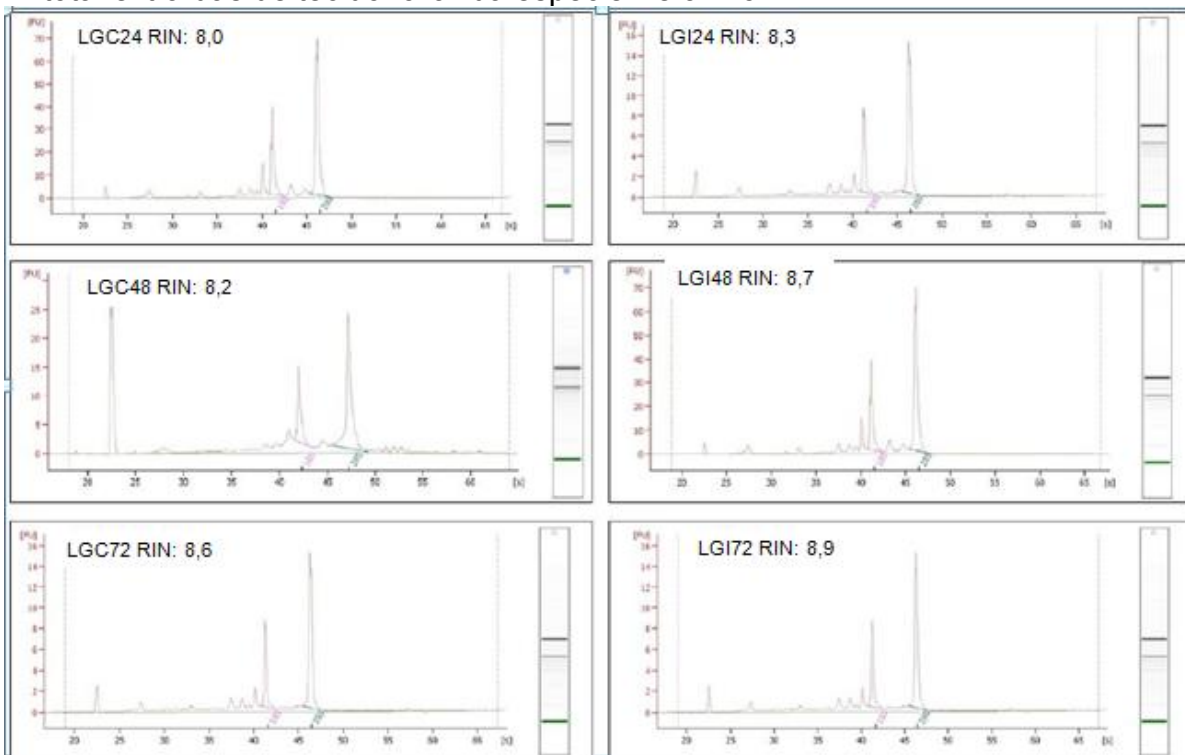


Figura 11. Eletroferograma e RIN obtidos no Bioanalyzer das amostras de RNA total extraídas de tecido foliar da espécie Limão Galego.

5.3 Análise do transcriptoma das bibliotecas de cDNA de planta por RNASeq

No presente trabalho a tecnologia RNASeq foi utilizada para o sequenciamento em larga escala dos transcritos de RNA (transcriptoma) presentes nas folhas de laranja doce Pêra Rio (PR), moderadamente resistente ao cancro cítrico, e do Limão Galego (LG), altamente suscetível, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após inoculação da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal da doença cancro cítrico. O objetivo foi verificar as diferenças nos mecanismos moleculares de resposta utilizados por estes dois hospedeiros que apresentam diferenças de suscetibilidade ao patógeno.

Um total de 166.238.688 sequências (*reads*) foram geradas a partir de sequências de 50 pares de base sequenciadas de 12 bibliotecas de cDNA provenientes de *pools* de amostras de folhas de três plantas de cada espécie (Tabela 3). Deste total, 140.718.933 (84,65%) foram de alta qualidade (escore superior a 20), sendo que quando foi feito o alinhamento destas sequências de alta qualidade com o transcriptoma de referência, a percentagem de alinhamento foi de 93,51 a 96,77% (Tabela 3). Este alto índice de sucesso de alinhamento contra o transcriptoma de referência, conferindo uma alta cobertura, torna possível uma análise de transcriptoma adequada e de alta qualidade.

Seis comparações em pares foram realizadas entre as 12 bibliotecas de cDNA para gerar o maior número de informações possíveis e comparar as diferenças transcricionais dentro da mesma espécie (Controle vs. Infectada) e entre as espécies.

Tabela 3. Dados gerados pelo sequenciamento RNASeq (Illumina) das bibliotecas de cDNA produzidas a partir de tecido foliar de Pêra Rio (PR) e Limão Galego (LG) infectado e não infectado com Xac nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação com suspensão de Xac contendo 10^8 UFC/ml.

Amostra	Total de sequências	Sequências de Alta Qualidade	No. de Sequências alinhadas*	Alinhamento com o transcriptoma referência (%)
PRC24	23.514.890	21.273.051	20.586.793	96,77%
PRI24	24.994.811	21.464.943	20.734.595	96,60%
PRC48	12.321.596	7.201.878	6.841.820	95,00%
PRI48	14.946.072	13.917.923	13.384.106	96,16%
PRC72	6.151.560	4.917.948	4.703.785	95,65%
PRI72	14.963.871	10.022.602	9.547.431	95,26%
LGC24	13.915.986	13.059.090	12.489.186	95,63%
LGI24	6.307.092	4.976.989	4.686.530	94,16%
LGC48	6.269.801	4.926.664	4.607.057	93,51%
LGI48	7.984.937	6.212.125	5.870.768	94,50%
LGC72	15.234.172	14.301.971	13.630.829	95,31%
LGI72	19.633.900	18.443.749	17.541.128	95,11%
TOTAL	166.238.688	140.718.933	134.624.028	

*Mapeadas uma única vez no transcriptoma de referência

PRC24, PRC48 e PRC72: RNA de folhas de Pêra Rio inoculadas com água estéril (controle) e extraídas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

PRI24, PRC48 e PRC72: RNA de folhas de Pêra Rio inoculadas com Xac e extraídas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

LGC24, LGC48 e LGC72: RNA de folhas de Limão Galego inoculadas com água estéril (controle) e extraídas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

LGI24, LGC48 e LGC72: RNA de folhas de Limão Galego inoculadas com Xac e extraídas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

5.4 Clusterização das amostras

Todos os transcritos com valores de p-valor significativos e a expressão de variação entre as amostras em pelo menos uma condição foram isolados num subgrupo de transcritos para a análise de agrupamento. O agrupamento foi baseado na matriz de distâncias, em que é calculada a distância euclidiana entre cada par de amostras. Para criar o dendrograma, a matriz de distância foi

analisada e, utilizando o método de ligação única, as amostras de distâncias foram agrupadas. Além disso foi criado um *heatmap* que se baseia na distância matriz. Cada valor a partir da matriz, que representa a distância entre duas amostras, é convertida para uma cor, na qual a cor branca, representa as amostras que são muito diferentes, até a cor vermelha, que representa as mesmas amostras. O dendograma representando as amostras da espécie laranja PR são representadas na figura 12, e o dendograma representando as amostras da espécie LG são representadas na figura 13.

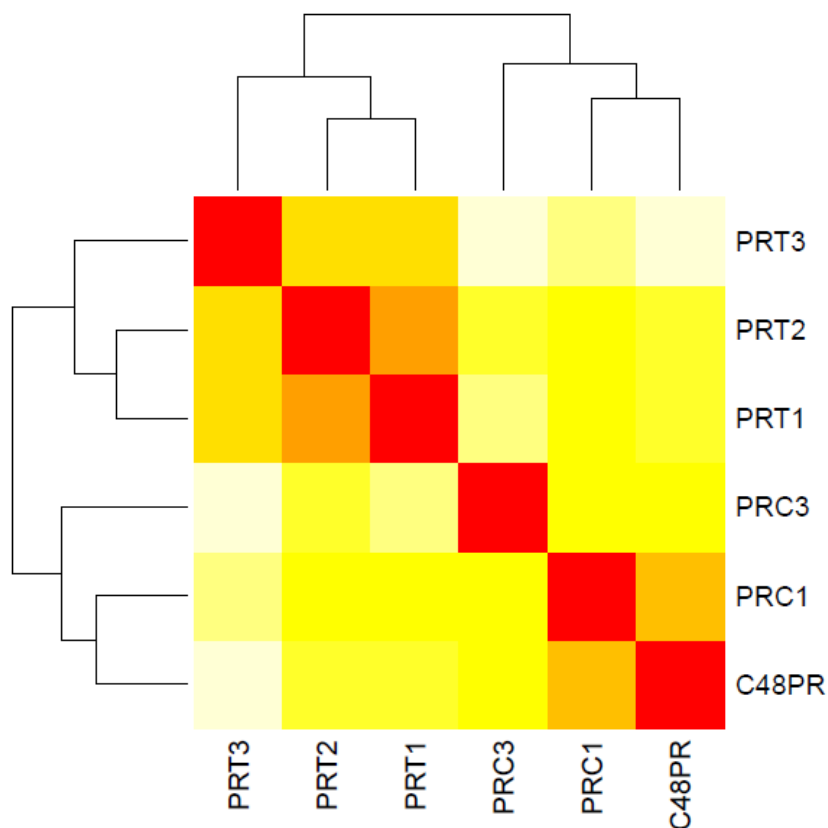


Figura 12. Dendograma das amostras da espécie laranja Pêra Rio PRC1, C48PR e PRC3: RNA de folhas de Pêra Rio inoculadas com água estéril (controle) e extraídos às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. PRT1, PRT2 e PRT3: RNA de folhas de Pêra Rio inoculadas com Xac e extraídos às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

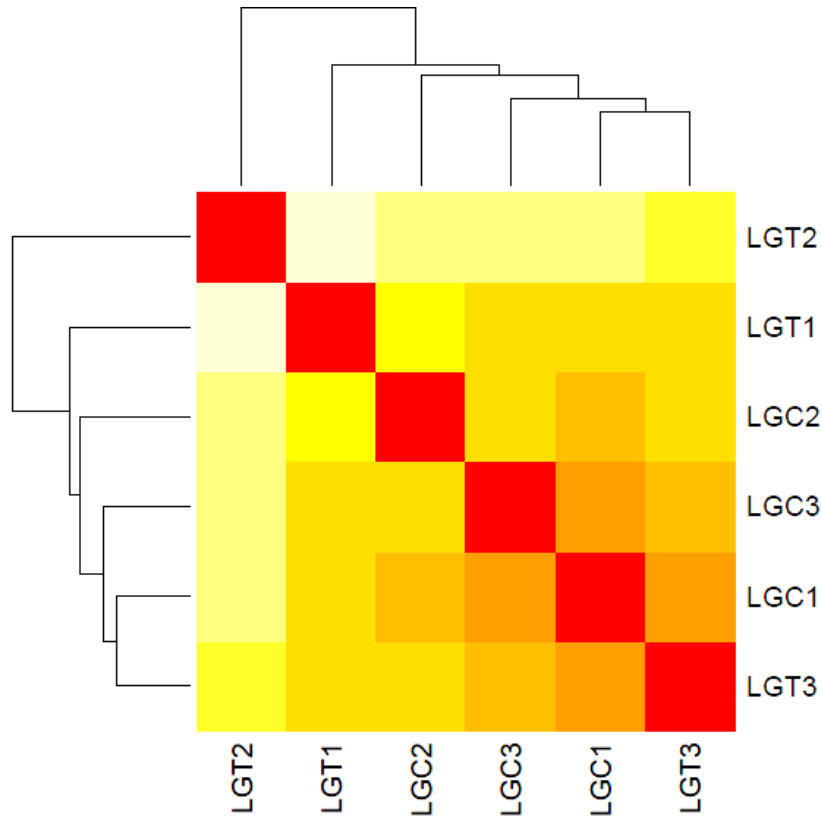


Figura 13. Dendrograma das amostras da espécie Limão Galego LGC1, LGC2 e LGC3: RNA de folhas de Limão Galego inoculadas com água estéril (controle) e extraídas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. LGT1, LGT2 e LGT3: RNA de folhas de Limão Galego inoculadas com Xac e extraídas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

5.5 Expressão gênica global e temporal em laranja Pêra Rio e Lima Ácida Galego após a inoculação com Xac

Neste trabalho, genes considerados diferencialmente expressos (GDEs) foram aqueles que apresentaram significância estatística (p-valor) menor ou igual a 0,05. Dessa forma, após análises estatísticas, foram identificados 6.330, 3.478 e 6.795 GDEs na espécie moderadamente resistente Pêra Rio 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac, respectivamente, quando comparados com seus controles. E na espécie altamente suscetível Limão Galego foram identificados 1.491, 5.621 e 2.145 GDEs após 24, 48 e 72 horas da inoculação com Xac, respectivamente, quando comparados com seus controles.

Além do p-valor, foi adotado o valor de alteração absoluta (*Fold-change*) de pelo menos duas vezes (≥ 2 ou $\leq 0,5$) para considerar um transcrito induzido

ou reprimido. Os transcritos com uma expressão maior no tecido infectado de duas vezes ou mais (*Fold-change* ≥ 2) foram denominados genes induzidos e os transcritos com uma expressão maior no tecido controle de duas vezes ou mais (*Fold-change* $\leq 0,5$) foram denominados genes reprimidos.

Em Pêra Rio, no tempo de 24 horas após a inoculação com a Xac, foram encontrados 1.783 genes induzidos, enquanto 4.547 genes foram reprimidos. No tempo de 48 horas, 1.139 genes foram induzidos e 2.339 genes foram reprimidos, e no tempo de 72 horas foram encontrados 1.995 genes induzidos e 4.800 genes reprimidos (Figura 14). Por outro lado, na espécie Limão Galego, foram encontrados 519 genes induzidos e 972 genes reprimidos no tempo 24 horas após a inoculação com a Xac. No tempo 48 horas, 2.029 genes foram induzidos e 3.592 genes foram reprimidos, e no tempo 72 horas, foram encontrados 957 genes induzidos e 1.188 genes reprimidos (Figura 14).

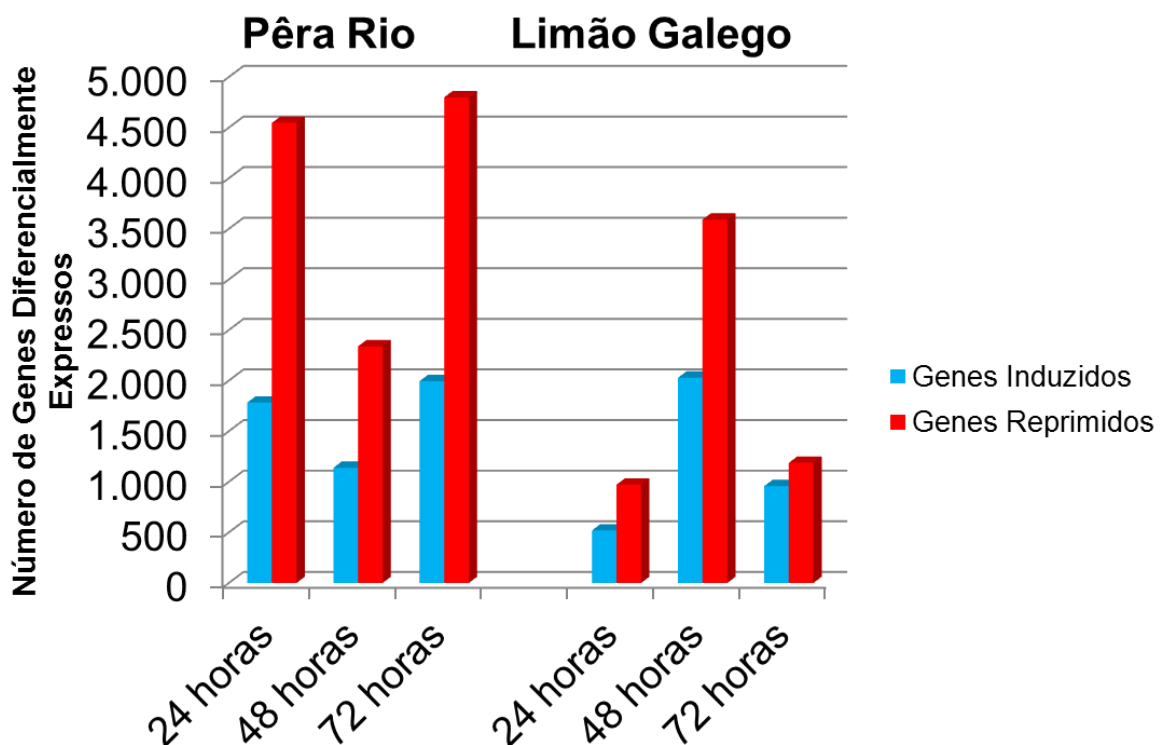


Figura 14. Distribuição dos genes diferencialmente expressos (GDEs) na espécie moderadamente resistente Pêra Rio e na espécie altamente suscetível Limão Galego, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac. As barras em azul indicam a quantidade de genes induzidos e as barras vermelhas indicam a quantidade de genes reprimidos.

Estes resultados revelam que o perfil transcricional de PR é diferente do apresentado por LG em resposta à infecção por Xac. Enquanto que na espécie PR foi identificado um maior número de GDEs induzidos e reprimidos 24 e 72 horas após a inoculação com Xac, na espécie LG foi no tempo de 48 horas que foram identificados maior quantidade de GDEs induzidos e reprimidos. Chama a atenção o fato da quantidade de genes induzidos ou reprimidos (GDEs) na espécie PR moderadamente resistente 24 horas após a inoculação com Xac (6.330) ser 4,25 maior do que na espécie altamente suscetível LG (1.491). No tempo de 48 horas, o LG apresentou 1,6 vezes mais GDEs do que a PR, mas no tempo de 72 horas a PR apresentou novamente 3,17 vezes mais GDEs do que o LG. Na soma dos três períodos estudados, PR apresentou 1,79 vezes mais GDEs do que LG. A diferença na quantidade de genes diferencialmente expressos por PR em resposta à infecção com Xac, principalmente no início da infecção, pode estar relacionada com o maior sucesso desta espécie em resistir ao ataque do patógeno.

Fu e colaboradores (2012), através da técnica de microarranjo, observaram que a espécie Newhall (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), suscetível ao cancro cítrico, quando infectada com Xac exibiu maior quantidade de transcritos em comparação com a espécie resistente Kumquat Meiwa (*Fortunella crassifolia*). Este resultado é diferente do encontrado no presente trabalho, onde a espécie moderadamente resistente PR apresentou maior quantidade de GDEs do que a espécie altamente suscetível LG. Entretanto, enquanto no presente trabalho as análises foram feitas nos períodos de 1, 2 e 3 dias após a infecção em comparação com seus respectivos controles, no trabalho de Fu e colaboradores (2012) esta análise foi feita apenas no 5º dia após a infecção em comparação com o dia zero. A novidade do presente trabalho é a análise da respostas das plantas nos períodos iniciais da infecção. Nesse trabalho, os GDEs que apresentaram uma alta significância estatística foram analisados para se obter uma descrição funcional de cada transcrito. Os GDEs em cada espécie foram categorizados de acordo com sua ontologia em relação à função na anotação gênica relacionada ao processo biológico, função molecular e componente celular baseado nos resultados das ferramentas BLASTX e Gene

Ontology (GO) inseridas no software Blast2GO. Os resultados obtidos para a espécie PR estão apresentados nas Figuras 15 a 17 e os obtidos para a espécie LG estão apresentados nas Figuras 18 a 20.

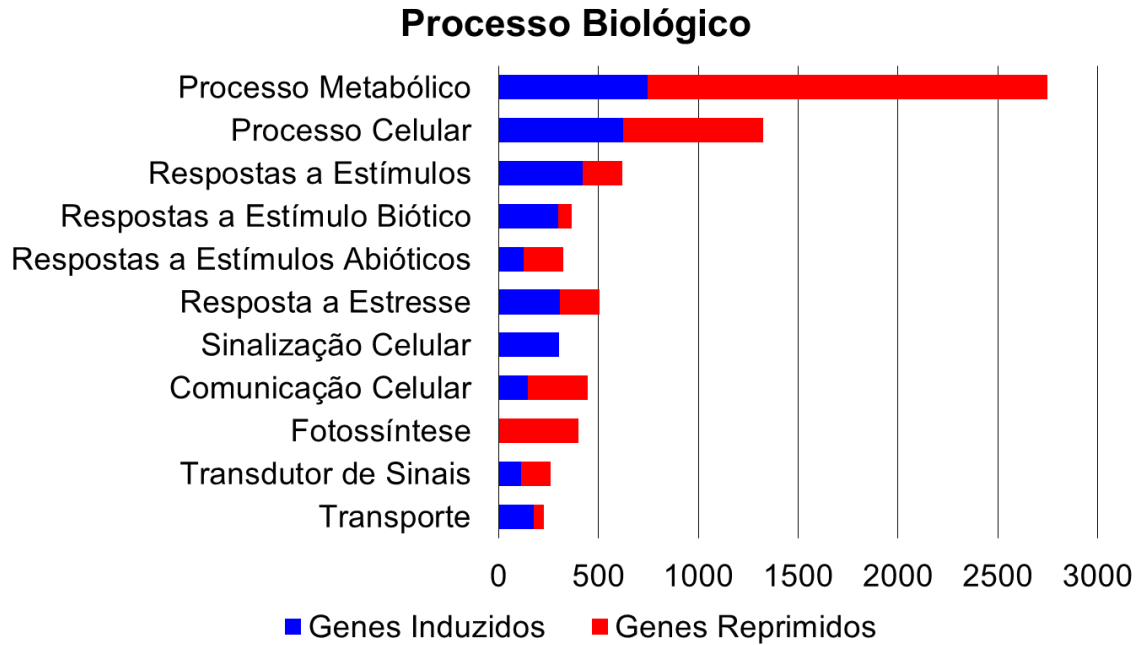


Figura 15: Categorização dos genes induzidos e reprimidos em Pêra Rio no tempo de 24 horas após a infecção com a Xac. Os genes foram categorizados de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

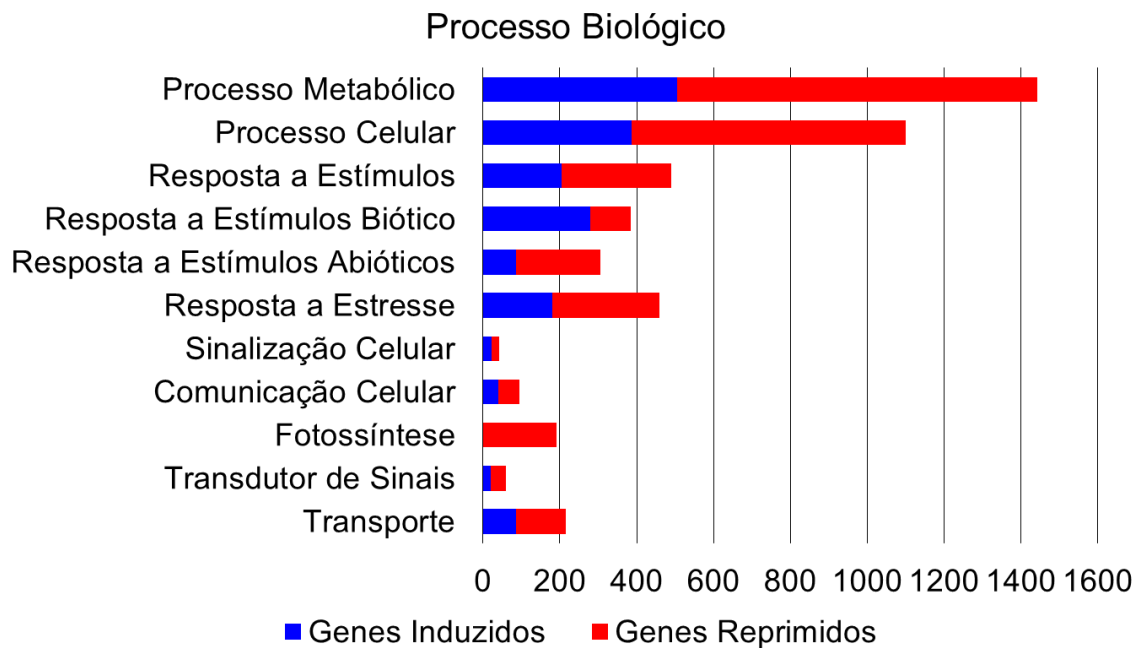


Figura 16: Categorização dos genes induzidos e reprimidos em Pêra Rio no tempo de 48 horas após a infecção com a Xac. Os genes foram categorizados de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

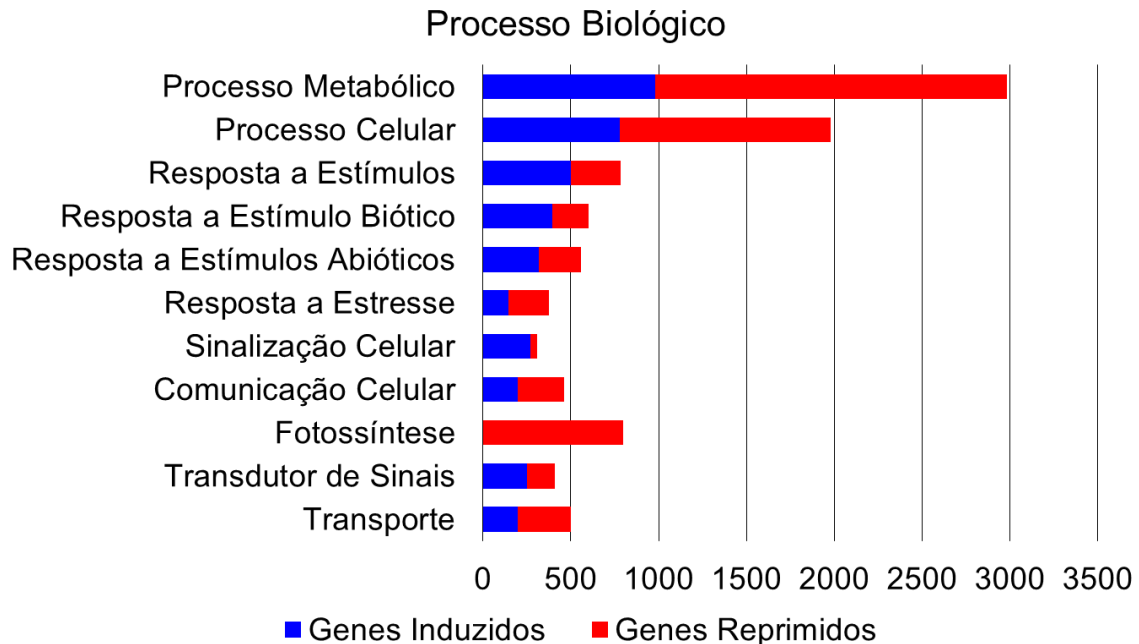


Figura 17: Categorização dos genes induzidos e reprimidos em Pêra Rio no tempo de 72 horas após a infecção com a Xac. Os genes foram categorizados de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

A categorização dos transcritos com expressão diferencial significativa de acordo com o GO revelou que a maioria dos genes induzidos e reprimidos na espécie laranja doce Pêra Rio nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção com a Xac, apresentou similaridade com proteínas envolvidas com o processo metabólico, com o número de reprimidos sendo maior do que o de induzidos (Figuras 15, 16 e 17). A segunda categoria mais representada, tanto em genes induzidos como reprimidos, foi a de processo celular, seguida por transcritos que possuem similaridade com proteínas de respostas a estímulos.

Um resultado que chama a atenção é o fato de que nos 3 tempos após a infecção com Xac houve uma grande repressão de genes relacionados à fotossíntese na espécie PR (Figuras 15, 16 e 17). Por outro lado, houve uma predominância na indução de genes relacionados à sinalização celular e resposta a estímulos bióticos, que serão discutidos mais adiante.

Outro fato observado é que no tempo de 24 horas após a inoculação com a Xac, proteínas relacionadas à categoria transporte foram predominantemente induzidas, e ao passar do tempo, 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac, houve agora a predominância da repressão de proteínas relacionadas ao transporte.

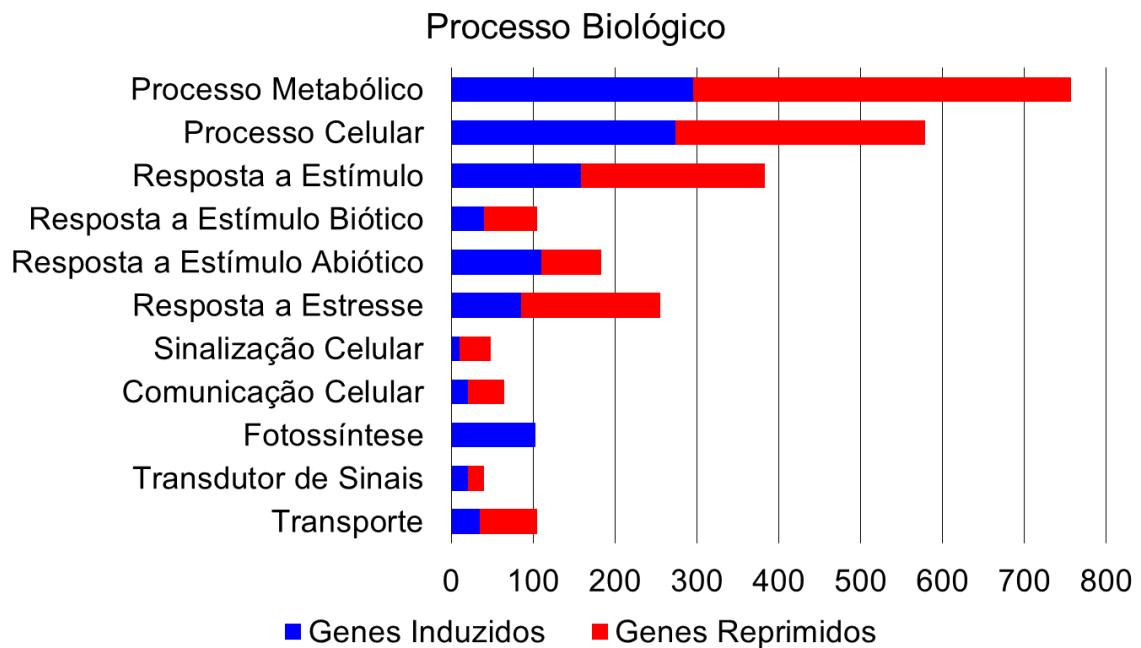


Figura 18: Categorização dos genes induzidos e reprimidos em Limão Galego no tempo de 24 horas após a infecção com a Xac. Os genes foram categorizados de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

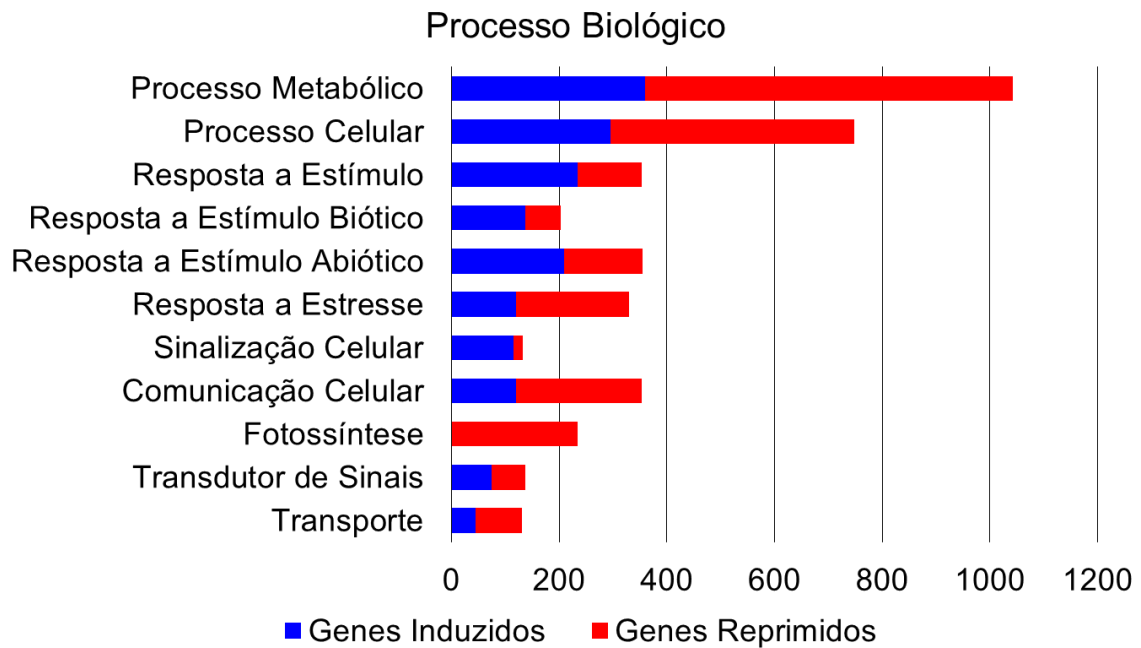


Figura 19: Categorização dos genes induzidos e reprimidos em Limão Galego no tempo de 48 horas após a infecção com a Xac. Os genes foram categorizados de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

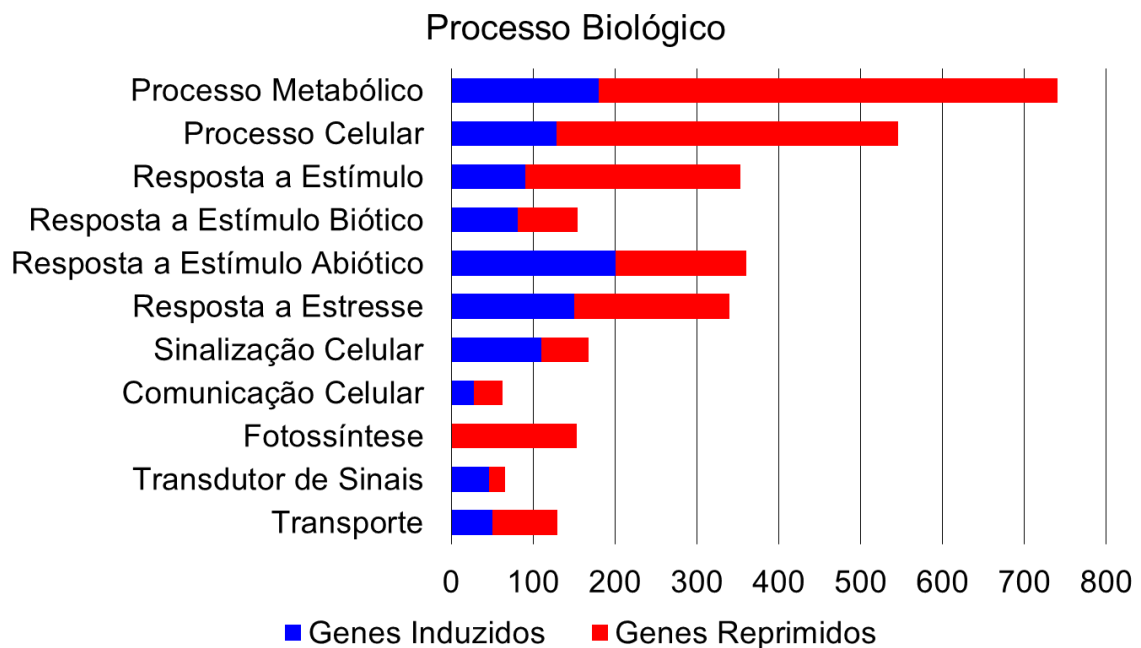


Figura 20: Categorização dos genes induzidos e reprimidos em Limão Galego no tempo de 72 horas após a infecção com a Xac. Os genes foram categorizados de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

Na espécie Limão Galego, após categorização dos transcritos com expressão diferencial significativa de acordo com o GO, foi verificado que a maioria dos genes induzidos apresentou similaridade com proteínas envolvidas com o processo metabólico. A segunda categoria mais representada foi a de resposta a estímulos e a terceira categoria foi a de genes possuem similaridade com proteínas ao processo celular (Figuras 18, 19 e 20).

Diferentemente do observado para a espécie PR, na espécie LG genes relacionados à fotossíntese foram induzidos no tempo de 24 horas após a inoculação com a Xac e foram reprimidos apenas nos tempos de 48 e 72 horas (Figuras 18, 19 e 20). Em relação aos genes relacionados à sinalização celular e a estímulos bióticos, há uma predominância de genes reprimidos às 24 horas e uma predominância de genes induzidos às 48 e 72 horas, o inverso do que ocorre com os genes relacionados à fotossíntese.

Outro fato observado são as proteínas relacionadas à categoria transporte, que foram, em sua maioria, reprimidos nos tempos 24, 48 e 72 após a infecção com a Xac.

5.6 Expressão gênica global e temporal em comum em Pêra Rio e Limão Galego 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac.

Na análise da expressão gênica temporal, foram identificados 176 genes que foram induzidos em comum nos 3 tempos após a infecção com Xac na espécie moderadamente resistente PR, enquanto que na espécie altamente suscetível LG não foram encontrados genes em comum nos 3 tempos após a infecção (Figura 21).

Em relação aos genes reprimidos, na espécie PR foram encontrados 438 genes reprimidos nos 3 tempos após a infecção com a Xac, enquanto que na espécie LG, foram encontrados 18 transcritos reprimidos em comum nos 3 tempos após a infecção com a Xac (Figura 22).

Na espécie PR foram encontrados 138 genes induzidos e 657 genes reprimidos em comum entre os tempos de 24 e 48 horas após a infecção com a Xac, enquanto que na espécie LG foram encontrados apenas 3 genes induzidos e 83 genes reprimidos em comum (Figuras 21 e 22). Já entre os tempos de 24 e

72 horas foram encontrados 305 genes induzidos e 701 genes reprimidos em comum na espécie PR e na espécie LG foram encontrados apenas 1 gene induzido e 24 genes reprimidos em comum (Figuras 21 e 22). Quando a comparação foi feita entre os tempos de 48 e 72 horas após a infecção com a Xac, foram encontrados 102 genes induzidos e 213 genes reprimidos em comum na espécie PR, enquanto que na espécie LG foram encontrados 83 genes induzidos e 193 genes reprimidos em comum (Figuras 21 e 22).

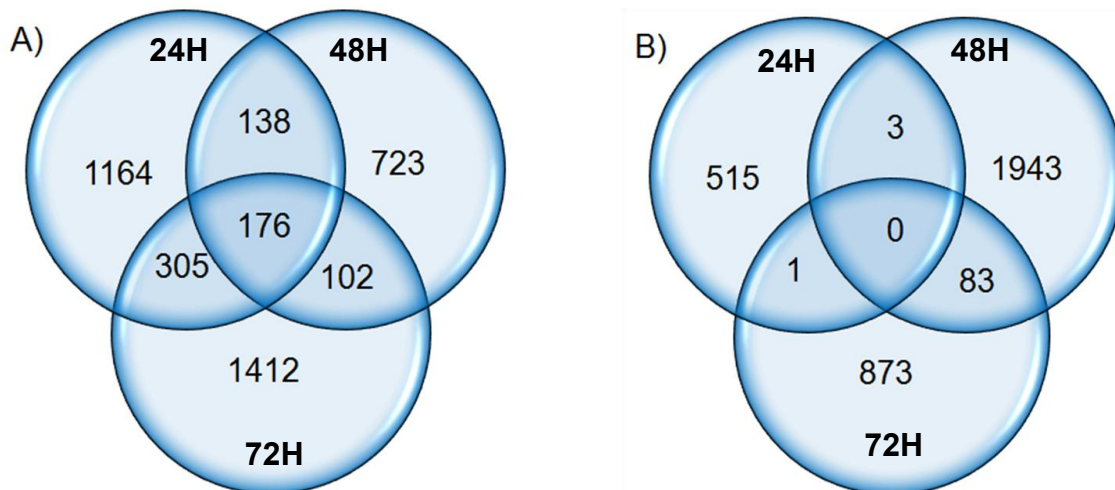


Figura 21. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos na espécie Pêra Rio (A) e Limão Galego (B) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/mL de Xac. Os diagramas mostram o número de genes induzidos em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou que são exclusivos de cada tempo.

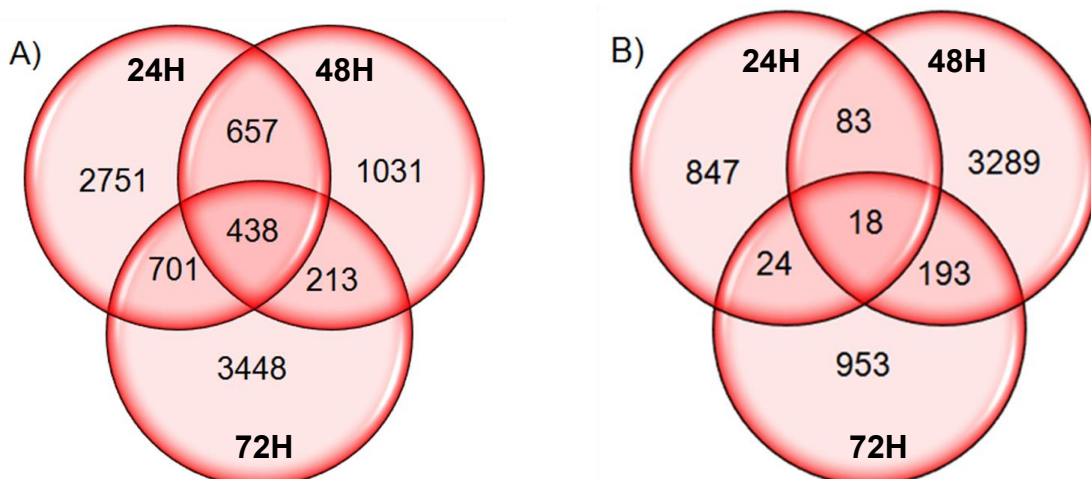


Figura 22. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram reprimidos na espécie Pêra Rio (A) e Limão Galego (B) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/mL de Xac. Os

diagramas mostram o número de genes reprimidos em cada tempo e o número de genes reprimidos em comum ou que são exclusivos de cada tempo.

Entre os 176 GDEs induzidos em comum nos 3 tempos após a infecção com a Xac na espécie moderadamente resistente PR, foram encontradas proteínas beta-galactosidase, quitinases, proteínas relacionadas à patogênese 1, taumatina, proteína alergênica (Pru ar 1) (Tabela 4). Essas proteínas são relatadas na literatura como relacionadas ao estresse biótico. Fatores de transcrição também foram induzidos nos 3 tempos após a infecção com a Xac, como WRKY, os quais tem a função de ativar a síntese de proteínas necessárias para uma resposta ao ataque do patógeno. Os envolvimento e papel dos fatores de transcrição em plantas na resposta a patógenos será discutido mais adiante.

Uma proteína denominada Inositol Oxigenase também foi induzidas nos 3 tempos após a infecção. Em *Arabidopsis thaliana* esta enzima está envolvida na biossíntese de nucleotídeos açúcares precursores da matrix de polissacarídeos da parede celular. Esta enzima pertence a uma das vias que levam à síntese do ácido UDP glucurônico (UDP-GlcA), que é o principal precursor dos resíduos de ácido galacturônico, xilose, apiose e arabinose necessários para a síntese dos polímeros da parede celular da planta. (KANTER *et al.*, 2005, SIDDIQUE *et al.*, 2009). A remodelagem da parede celular é um dos mecanismos utilizados pelas plantas para se defender do ataque de patógenos invasores (HUCKELHOVEN, 2007).

Tabela 4. GDEs induzidos em comum na espécie PR após 24, 48 e 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10⁸ UFC/ml de Xac.

Transcrito	Fold-change Pêra Rio 24 horas	Fold-change Pêra Rio 48 horas	Fold-change Pêra Rio 72 horas	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10461526	16,2647			0,01308	Beta-galactosidase
Transcrito 10461526		26,9698		0,0099	Beta-galactosidase
Transcrito 10461526			54,7016	0,00152	Beta-galactosidase
Transcrito 8270211	46,0835			0,0123	Proteínas relacionadas à patogênese 1
Transcrito 8270211		38,5283		0,0217	Proteínas relacionadas à patogênese 1
Transcrito 8270211			Inf	0,0069	Proteínas relacionadas à patogênese 1
Transcrito 7739684	60,8303			0,00183	Proteína Quitinase
Transcrito 7739684		36,6936		0,00521	Proteína Quitinase
Transcrito 7739684			13,7091	0,00024	Proteína Quitinase
Transcrito 6590905	10,2535			0,035734	Proteína alergênica (Pru ar 1)
Transcrito 6590905		52,01326		0,00266	Proteína alergênica (Pru ar 1)
Transcrito 6590905			19,1455	0,03560	Proteína alergênica (Pru ar 1)
Transcrito 2636475	32,7851			0,004962	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 2636475		Inf		0,01230	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 2636475			inf	0,00073	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 2479615	11,4813			0,02830	Inositol Oxigenase
Transcrito 2479615		45,29374		0,00388	Inositol Oxigenase

Transcrito 2479615		40,2495	0,0037	Inositol Oxigenase
Transcrito 2412647	26,7284		0,0052	Taumatina
Transcrito 2412647		29,29759	0,0068	Taumatina
Transcrito 2412647		86,2732	0,0105	Taumatina

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Entre os 438 genes reprimidos nos 3 tempos após a infecção com a Xac na espécie moderadamente resistente PR, houve a repressão de muitas proteínas denominadas Lectinas (Tabela 5).

Lectinas são proteínas capazes de se ligarem aos resíduos de carboidratos de macromoléculas, tais como glicoproteínas e polissacarídeos. Foram primeiramente encontrados em sementes de *Ricinus communis* há mais de um século (STILLMARK, 1888). Algumas funções das lectinas são bastante conhecidas, como a ação como proteína de armazenamento em sementes, no processo de reconhecimento e compatibilidade do pólen durante a fertilização e na defesa de plantas contra patógenos (PINTO *et al.*, 2011). O efeito tóxico das lectinas sobre o desenvolvimento de patógenos, como nematóides (GAOFU *et al.* 2008) e fungos fitopatogênicos (RIBEIRO *et al.* 2007) já foi comprovado.

O fato desta proteína estar reprimida na espécie moderadamente resistente PR é curioso mas não único. Paparu e colaboradores (2009) também encontraram que um cultivar de banana tolerante ao nematóide cavernícola (*Radopholus similis*) teve a expressão do gene da lectina suprimida quando inoculada com o nematóide. A repressão do gene da lectina pode ser um dos mecanismos utilizados pelo patógeno para vencer as defesas da planta.

Na espécie altamente suscetível LG, entre os 18 genes reprimidos nos 3 tempos após a infecção com a Xac, houve a repressão de proteínas relacionadas ao metabolismo celular como peptidase, enzima glucose desidrogenase e superóxido dismutase (Tabela 6). A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que atua na conversão de radicais superóxido, produzidos durante a respiração celular, em peróxido de hidrogênio, o qual é posteriormente degradado pela catalase, eliminando o estresse oxidativo.

Tabela 5. GDEs reprimidos em comum na espécie PR após 24, 48 e 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10⁸ UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio 24 horas	<i>Fold-change</i> Pêra Rio 48 horas	<i>Fold-change</i> Pêra Rio 72 horas	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 9682086	0,04388			0,0200	Lectina leguminosa
Transcrito 9682086		0,0162		0,0021	Lectina leguminosa
Transcrito 9682086			0	0,0021	Lectina leguminosa
Transcrito 9682912	0,07937			0,0299	Lectina leguminosa
Transcrito 682912		0,0352		0,0163	Lectina leguminosa
Transcrito 9682912			0	0,0124	Lectina leguminosa
Trancrito 6052056	0,06583			0,0169	Lectina leguminosa
Trancrito 6052056		0,0447		0,0142	Lectina leguminosa
Trancrito 6052056			0	0,0042	Lectina leguminosa
Transcrito 684423	0,03711			0,0085	Lectina leguminosa
Transcrito 684423		0,0125		0,0026	Lectina leguminosa
Transcrito 684423			0,01477	0,0075	Lectina leguminosa
Transcrito 9682498	0,06020			0,0186	Lectina leguminosa
Transcrito 9682498		0,0637		0,0377	Lectina leguminosa
Transcrito 9682498			0	0,0070	Lectina leguminosa
Transcrito 1150649	0,0730792			0,0191	Lectina leguminosa
Transcrito 1150649		0,05115		0,0134	Lectina leguminosa

Transcrito 1150649		0,0046346	0,00053	Lectina leguminosa
Transcrito 8385600	0,07139		0,0196	Lectina leguminosa
Transcrito 8385600		0,05153	0,0175	Lectina leguminosa
Transcrito 8385600		0,01313	0,00535	Lectina leguminosa
Transcrito 8385070	0,04118		0,0069	Lectina leguminosa
Transcrito 8385070		0,02730	0,0064	Lectina leguminosa
Transcrito 8385070		0,01313	0,00544	Lectina leguminosa
Transcrito 1535702	0,06181		0,0136	Lectina leguminosa
Transcrito 1535702		0,04266	0,0098	Lectina leguminosa
Transcrito 1535702		0	0,0003	Lectina leguminosa
Transcrito 9683641	0,0322		0,00450	Lectina leguminosa
Transcrito 9683641		0,04879	0,016077	Lectina leguminosa
Transcrito 9683641		0	0,00515	Lectina leguminosa

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

Tabela 6. GDEs reprimidos em comum na espécie LG após 24, 48 e 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego 24 horas	<i>Fold-change</i> Limão Galego 48 horas	<i>Fold-change</i> Limão Galego 72 horas	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 2836829	0,0114			0,00101	Peptidase
Transcrito 2836829		0,0042		0,000038	Peptidase

Transcrito 2836829		0,0114	0,1148	Peptidase
Transcrito 5058160	0		0,0357	Enzima glucose desidrogenase
Transcrito 5058160	0		0,0264	Enzima glucose desidrogenase
Transcrito 5058160		0	0,0264	Enzima glucose desidrogenase
Transcrito 5314821	0,03141		0,0012	Enzima superóxido dismutase
Transcrito 5314821		0,0229	0,0014	Enzima superóxido dismutase
Transcrito 5314821		0,0580	0,0051	Enzima superóxido dismutase

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

5.7 Expressão gênica global e temporal em comum entre as espécies Pêra Rio e Limão Galego 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac

Apesar de ambas as espécies PR e LG apresentarem milhares de GDEs, foram encontrados apenas 7 genes induzidos e 11 genes reprimidos em comum entre as duas espécies 24 horas após a inoculação com Xac. No tempo de 48 horas após a infecção com a Xac, foram encontrados 121 genes induzidos e 178 genes reprimidos em comum entre ambas as espécies. Já no tempo 72 horas após a inoculação com Xac, foram encontrados 317 genes induzidos e 322 genes reprimidos em comum entre as espécies PR e LG após a inoculação com a Xac (Figuras 23 e 24). É notável que com o passar do tempo as duas espécies apresentaram maiores quantidades de GDEs em comum, tanto genes induzidos como genes reprimidos.

Os GDEs identificados em comum entre as duas espécies podem estar relacionados com a resposta basal das plantas e podem representar os mecanismos básicos de defesa contra a Xac (FU *et al.*, 2012).

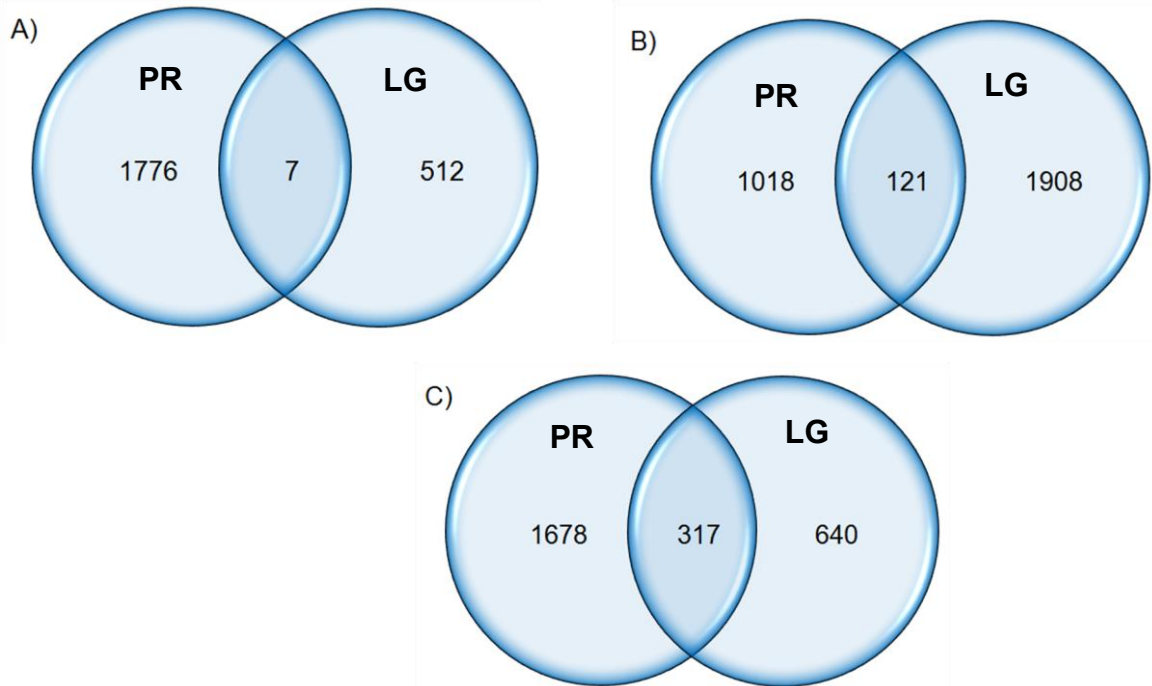


Figura 23. Diagramas de Venn mostrando os GDEs induzidos em comum nas espécies Pêra Rio e Limão Galego (A) 24, (B) 48 e (C) 72 horas após a inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

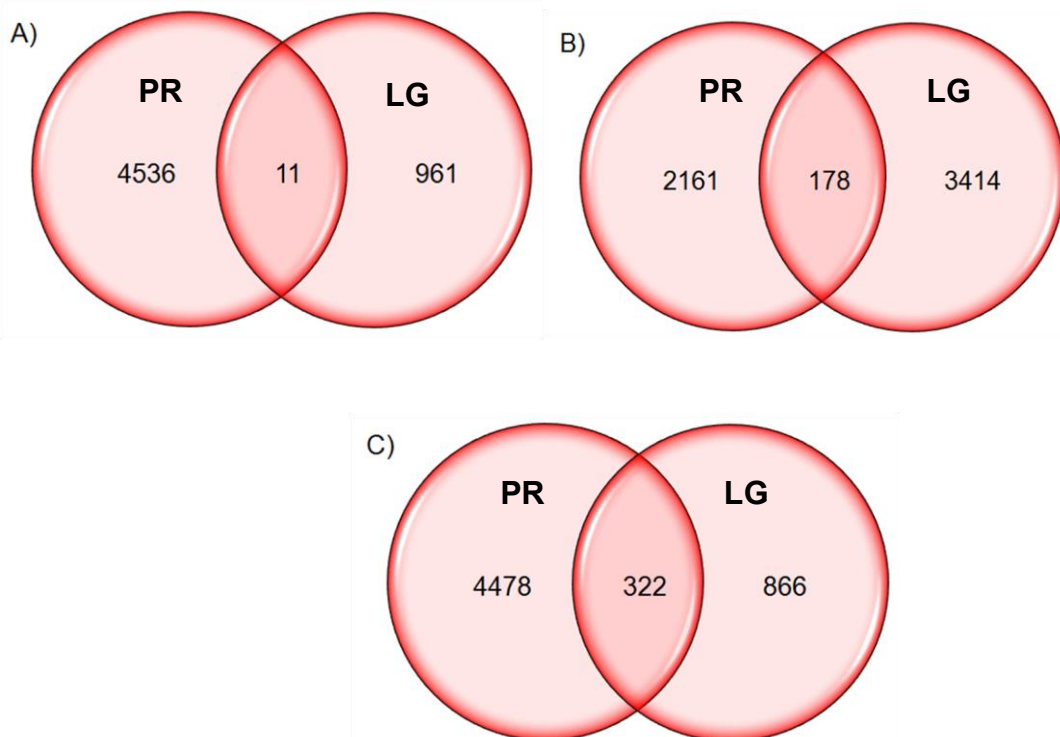


Figura 24. Diagramas de Venn mostrando os GDEs reprimidos em comum nas espécies Pêra Rio e Limão Galego (A) 24, (B) 48 e (C) 72 horas após a inoculação com suspensão a 10^8 UFC/ml de Xac.

Foram identificados somente 7 genes induzidos em comum entre ambas as espécies depois de 24 horas após a infecção com Xac, como proteínas ricas em repetições de leucina, proteína contendo domínio CCT (Constans, Constans-like, TOC1) e 4 genes denominados receptor do transdutor de sinal histidina, representados na tabela 7. Receptores e transdutores de sinal histidina são transdutores de sinais de dois componentes constituídos por uma parte sensora na membrana celular que detecta estímulos externos e outra que transduz o sinal para ativação de proteínas para respostas de defesa (WOLANIN *et al.*, 2002).

Tabela 7. GDEs induzidos em comum entre as espécies PR e LG após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor Pêra Rio	P-valor Limão Galego	Descrição da sequência
Transcrito 2463513	14,3115	31,569	0,01855	0,0364	Proteínas ricas em repetições de leucina
Transcrito 124914	10,7967	15,34626	0,0464	0,0197	Proteína contendo domínio CCT (Constans Constans- like, TOC1)
Transcrito 2736349	11,7513	8,4994	0,0288	0,0499	Receptor do transdutor de sinal histidina
Transcrito 2736307	18,1262	9,95941	0,0129	0,0341	Receptor do transdutor de sinal histidina
Transcrito 10322260	15,2734	21,0463	0,0252	0,0169	Receptor do transdutor de sinal histidina
Transcrito 30329265	10,1266	6,4994	0,7952	0,0329	Receptor do transdutor de sinal histidina
Transcrito 6248441	18,4334	24,9924	0,0422	0,02316	Receptor do transdutor de sinal histidina

Já no caso dos genes reprimidos, entre os 25 encontrados, a proteína expansina foi expressa negativamente em ambas as espécies no tempo de 24 horas após a inoculação com a Xac (Tabela 8). Essa proteína tem a função de promover relaxamento e extensão da parede celular em plantas (MCQUEEN-MASON *et al.*, 2007). Quando ocorre o afrouxamento da parede celular as plantas tornam-se mais vulneráveis ao ataque dos patógenos, dessa forma, é importante que as plantas não expressem essa proteína, pois quanto mais rígida for a parede celular da espécie vegetal, melhor será para a contenção ao ataque dos patógenos.

Tabela 8. GDEs reprimidos em comum entre as espécies PR e LG após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/mL de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor Pêra Rio	P-valor Limão Galego	Descrição da sequência
Transcrito 10998317	0		0,017913		Proteína Expansina
Transcrito 10998317		0		0,031281	Proteína Expansina

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

5.8 Caracterização transcricional de Pêra Rio e Limão Galego 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac

Este trabalho apresentou grandes quantidades de GDEs que estão relacionados à resistência a doença, defesa e respostas de estresse. Como a espécie Pêra Rio é mais resistente ao cancro cítrico do que a espécie Limão Galego, GDEs na PR podem fornecer informações valiosas em termos moleculares, visto a possibilidade de desempenhar um papel importante na luta da planta contra o patógeno do cancro cítrico. Uma diferença notável foi em relação ao número de GDEs relacionados à defesa (estresse) na PR. Isso também foi observado no trabalho de Fu e colaboradores (2012), que encontraram uma maior expressão de genes relacionados à defesa na espécie resistente ao cancro cítrico Meiwa em relação à espécie Newhall, que é suscetível.

De acordo com anotações e classificações funcionais dos GDEs e estudos anteriores relatados na literatura, como em Cernadas e colaboradores (2008) e Fu e colaboradores (2013), grande quantidade de genes relacionados a defesa de plantas, fotossíntese, sinalização de vias metabólicas, fatores de transcrição e sinalizações hormonais foram encontrados entre os genes induzidos ou reprimidos no tecido infectado da espécie moderadamente resistente ou na espécie altamente suscetível após 24, 48 e 72 horas de infecção com a bactéria fitopatogênica *Xac*, sendo, portanto, interesse do nosso estudo devido a prováveis participações na resistência das plantas ao cancro cítrico, como será mostrado nas próximas seções:

5.9 Fotossíntese e metabolismo

A fotossíntese desempenha um papel central na biologia das plantas, uma vez que é a partir dela que é fornecida a energia para o crescimento e reprodução das plantas. Entretanto, sua regulação sob estresses bióticos e abióticos ainda não está claro (MARTINELLI *et al.*, 2012). Contudo, sabe-se que mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorrem quando plantas são expostas a patógenos (SAIBO *et al.*, 2009).

Nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação com a *Xac*, houve a repressão respectivamente de 433, 167 e 837 genes relacionados à fotossíntese na espécie laranja doce PR, como: enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco), enzima 3-fosfoglicerato quinase, proteína fotossistema de reação subunidade cloroplasto, entre outros. Foram encontrados genes que foram reprimidos em comum entre os tempos 24, 48 e 72 horas (Tabela 9) e genes que foram reprimidos exclusivamente em cada tempo (Tabelas 10, 11 e 12).

Em contrapartida, na espécie LG no tempo de 24 horas após a inoculação com a *Xac* houve a indução de 125 genes relacionados à fotossíntese, como proteína fotossistema I *ycf3*, proteína clorofila A-B e enzima ribulose bifostato carboxilase (Rubisco) (Tabela 13). Um dos transcritos da enzima Rubisco (transcrito 8305267) apresentou o maior *fold-change* e o menor *p*-valor, ou seja, foi mais diferencialmente expresso dentre os transcritos induzidos na espécie suscetível LG no tempo de 24 horas.

Já no tempo de 48 e 72 horas após a inoculação com a bactéria, na espécie altamente suscetível LG, houve a repressão respectivamente de 234 e 187 genes relacionados à fotossíntese. Houve a repressão de genes como proteína clorofila A-B, proteína fotossistema I e enzima ribulose bifostato carboxilase (Rubisco) (Tabelas 14 e 15).

Há dados na literatura que indicam que plantas, quando expostas a estresse biótico, apresentam uma repressão dos seus genes fotossintéticos, pois elas direcionam o metabolismo para a produção de proteínas para a defesa contra o patógeno (HERMSMEIER *et al.*, 2001, ZOU *et al.*, 2005, BILGIN *et al.*, 2012, FU *et al.*, 2012).

A repressão de genes envolvidos no processo fotossintético durante a interação com Xac representa um custo para a adaptação da planta quando sua energia é redirecionada para a resposta de defesa (KHALAF *et al.*, 2011). Há uma relocação do nitrogênio na rota fotossintética, o qual pode ser direcionado para a produção de proteínas para o sistema de defesa da planta (ZOU *et al.*, 2005, BILGIN *et al.*, 2012).

Repressão de genes da via fotossintética também foi encontrada em estudos do transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* logo após 3 horas do desafio com o patógeno *Pseudomonas syringae* (BONFIG *et al.*, 2006). Khalaf e colaboradores (2011) também verificaram que a maioria dos genes relacionados à fotossíntese foram reprimidos 6 horas após a inoculação de Xac em folhas do hospedeiro resistente Kumquat Meiwa, sugerindo que as plantas reduzem seu potencial fotossintético para induzir a reação de hipersensibilidade (RH) nas plantas que sofreram injúrias do patógeno.

Tabela 9. GDEs reprimidos em comum na espécie moderadamente resistente PR após 24, 48 e 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac relacionados à fotossíntese.

Transcrito	Fold-change Pêra Rio 24 horas	Fold- change Pêra Rio 48 horas	Fold- change Pêra Rio 72 horas	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 6029061	0,0910			0,0431	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)

Transcrito 6029061	0,015289		0,0038	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 6029061		0,0281	0,00696	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8301796	0,0970		0,0485	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8301796	0,06949		0,0459	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8301796		0	0,0061	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8301587	0,05421		0,0462	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8301587	0		0,0108	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8301587		0	0,02936	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 2924079	0,04962		0,01342	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 2924079	0,0289		0,0062	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 2924079		0,02306	0,0050	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8302501	0,0317		0,0300	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8302501	0,0241		0,0258	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8302501		0	0,0074	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)

Transcrito 495540	0,0649		0,02031	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)	
Transcrito 495540		0,0590	0,02200	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)	
Transcrito 495540			0,01454	0,003249	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)
Transcrito 10727747	0,0464			0,00985	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)
Transcrito 10727747		0,0692		0,02845	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)
Transcrito 10727747			0	0,0008	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)
Transcrito 2850412	0,0255			0,00288	Anidrase Carbônico
Transcrito 2850412		0,0598		0,020391	Anidrase Carbônico
Transcrito 2850412			0,0053	0,00076	Anidrase Carbônico
Transcrito 5970266	0,03315			0,00712	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)
Transcrito 5970266		0,0398		0,01337	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)
Transcrito 5970266			0	0,0006	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

Tabela 10. GDEs reprimidos na espécie moderadamente resistente PR após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac relacionados à fotossíntese

Transcrito	Fold-change Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 8603766	0,0917	0,0344	Enzima 3-fosfoglicerato kinase
Transcrito 10281272	0,0864	0,0309	Enzima fotossistema de reação subunidade cloroplasto
Transcrito 2924079	0,0496	0,0134	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8540861	0,1026	0,0392	Enzima Putativa rubisco ativase
Transcrito2937735	0,02038	0,0076	Proteína Clorofila A-B binding

Tabela 11. GDEs reprimidos na espécie moderadamente resistente PR após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac relacionados à fotossíntese

Transcrito	Fold-change Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito465546	0,0950	0,0497	Proteína Clorofila A-B binding
Transcrito10413478	0,0395	0,01024	Anidrase Carbônico
Transcrito141121	0,0291	0,0037	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito5556616	0	0,0182	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 10129955	0,0278	0,0317	Cloroplasto psbB (Fotossistema II)

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

Tabela 12. GDEs reprimidos na espécie moderadamente resistente PR após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac relacionados à fotossíntese

Transcrito	Fold-change Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito465546	0,0950	0,0497	Proteína Clorofila A-B binding
Transcrito10413478	0,0395	0,01024	Anidrase Carbônico
Transcrito141121	0,0291	0,0037	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 10281272	0,04574	0,0244	Fotossistema I
Trancrito 10446736	0,0798	0,0329	Fotossistema II
Transcrito5556616	0	0,0182	Enzima ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco)

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

Tabela 13. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	Fold-change Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 7360786	11,180	0,0374	Proteína Clorofila A-B binding
Transcrito 9077751	Inf	0,0334	Fotossistema I proteína ycf3
Transcrito 141121	8,92101	0,0285	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 8305267	48,6695	0,0015	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 1535748	9,52526	0,0323	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 3423415	13,1539	0,0466	Fotossistema I
Transcrito 5449915	9,3089	0,04629	Fotossistema II

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 14. GDEs reprimidos na espécie suscetível LG após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	Fold-change Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10446771	0	0,0371	Fotossistema I proteína ycf3
Transcrito 1042567	0	0,0433	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito 10350749	0,1014	0,0166	Enzima cloroplasto like
Transcrito 1011597	0	0,0437	Fotossistema I
Transcrito 10388195	0,0567	0,04351	Fotossistema II

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

Tabela 15. GDEs reprimidos na espécie suscetível LG após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	Fold-change Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito7766819	0	0,02023	Proteína Clorofila A-B binding
Transcrito8645786	0,1120	0,03525	Proteína Clorofila A-B binding
Transcrito667835	0,1197	0,0388	Proteína Clorofila A-B binding
Transcrito2684570	0,1563	0,0486	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito5140585	0,1343	0,0364	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito5876845	0,0295	0,0075	Enzima Ribulose bifostato carboxilase (Rubisco)
Transcrito2696750	0,136994	0,0425	Fotossistema I
Transcrito3024298	0,1160	0,03994	Fotossistema II

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

5.10 Sinalização da planta contra a infecção do patógeno

A resistência ou a suscetibilidade à infecção de um determinado genótipo do hospedeiro em uma espécie é determinada por reações induzíveis pela presença do patógeno (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 2003), pois as plantas desenvolveram estratégias para detectar estímulos através da utilização de um grande número de receptores na superfície e dentro das células (GOMEZ-GOMEZ; BOLLER, 2002, ZHANG; ZHOU, 2010).

Genes relacionados à sinalização celular foram induzidos na espécie moderadamente resistente Pêra Rio. Foram encontrados 72, 24 e 92 genes nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção respectivamente. Na espécie altamente suscetível Limão Galego, foram encontrados 7, 115 e 57 genes relacionados à sinalização celular (Figura 25), como receptor rico em repetições leucina, proteína serina/treonina quinase e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Tabelas 16 a 21).

Interessantemente, um transcrito de sinalização celular denominado *Bifunctional inhibitor/plant lipid transfer protein* (proteína de transferência lipídica de planta) chamou a atenção, pois na espécie moderadamente resistente PR houve fortemente a indução desse gene, pois um de seus transcritos apresentou o maior *Fold-change* e o menor p-valor (272,405 e 0,000036, respectivamente), ou seja, foi o mais diferencialmente expresso dentre todos os genes na espécie moderadamente resistente Pêra Rio no tempo 24 horas após a inoculação com a Xac, e esse mesmo transcrito apresentou o maior *Fold-change* e o menor p-valor baixo no tempo 48 horas (169,0966 e 0,0002572, respectivamente) e no tempo 72 horas esse gene só foi expresso no tecido infectado (p-valor 0,00025) após a inoculação com a Xac (Tabelas 16, 17 e 18). Porém, na espécie altamente suscetível LG esse transcrito só foi induzido no tempo 72 horas após a infecção com a Xac, com o valor de p-valor igual a 0,00958 e nenhum desse transcrito foi encontrada na planta não infectada (Tabela 19, 20 e 21). Os valores e expressões desta proteína nas plantas PR e LG nos diferentes tempos após infecção com Xac estão apresentados nas Figuras 26 e 27.

A proteína de transferência lipídica de planta são proteínas ricas em cisteínas secretadas pelas células de plantas. Segundo Blein e colaboradores (2002), apesar de trabalhos e esforços para entender o papel dessa proteína a nível genético e estrutural, sua função precisa ainda não está clara. Porém, recentemente essa proteína foi relatada por Li e colaboradores (2012) em *Arabidopsis thaliana* e foi caracterizada por possuir funções de proteger as plantas contra danos celulares em condições de estresse contra baixa temperatura, estresse salinos e contra patógenos. Ainda, também caracterizaram essa proteína como sendo um componente potencial que conecta a sinalização celular à defesa das plantas.

Na espécie PR, já nas primeiras 24 horas após a infecção com a Xac, genes relacionados à sinalização celular contra patógeno apresentaram valores baixos de p-valor, ou seja, foram mais diferencialmente expressos. Em contrapartida, na espécie altamente suscetível Limão Galego, somente no tempo de 72 horas após a inoculação com a Xac é que foram encontrados transcritos relacionados à sinalização celular que apresentaram menor p-valor dentre todos os transcritos, como a Proteína contendo o domínio Lob (*Lateral organ boundaries* Lob) (p-valor 0,00012) (Figura 29).

Dessa forma, pode-se inferir que na espécie altamente suscetível LG houve a percepção do patógeno, porém, em intensidade diferente do encontrado na espécie moderadamente resistente PR, que já 24 horas após a infecção apresentou fortemente a indução desses genes de sinalização celular para a ativação de genes contra patógenos e uma maior expressão desses genes, como ilustrado na figuras 27 e 28.

Dentre os mecanismos de defesa das plantas contra a infecção por patógenos, aqueles mediados pelos genes R são os melhores caracterizados (ELVIRA *et al.*, 2008), como os receptores ricos em repetições leucina. Estes genes de reconhecimento são bem estudados e são denominados genes “R” de resistência que expressam proteínas cuja estrutura básica apresenta uma região rica em seqüências repetitivas de leucina denominadas LRRs e outra região denominada NBS (nucleotide binding site), por ser uma sequência que se liga a nucleotídeos (MENEZES *et al.*, 2009).

Houve a indução de genes relacionados às proteínas quinases na laranja doce PR às 24, 48 e 72 horas, como a MAP quinase (MPKs). Wang e colaboradores (2006) relataram a expressão de muitos genes relacionados a essa proteína quando culturas de arroz foram expostos ao patógeno *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Na espécie LG essa proteína foi reprimida no tempo de 24 horas e induzida nos tempos 48 e 72 horas após inoculação com a Xac.

As MPKs são módulos de sinalização importantes em células eucarióticas que convertem os sinais gerados a partir dos receptores/sensores de respostas celulares aos quais irão ativar outros fatores de transcrição, como WRKY, para a síntese de proteínas contra os patógenos (KIM *et al.*, 2004), que será visto mais adiante.

Quando o patógeno não reconhece e dribla os sistemas de reconhecimento da planta, então ele consegue se estabelecer e colonizar a planta em menor ou maior grau dependendo dos genes envolvidos no sistema do hospedeiro e a rapidez com que o patógeno é reconhecido e seus mecanismos são ativados, cujos efeitos somados se traduzem em maior ou menor severidade da doença (GREWAL *et al.*, 2012).

Desse modo, podemos observar que a sinalização nos tecidos infectados da laranja doce Pêra Rio foi muito mais efetiva devido a rápida (dentro de 24 horas), e elevada transcrição desses genes encontrados nessa espécie, comparado aos tecidos infectados de Limão Galego, que apresentou maiores quantidades de proteínas relacionadas à sinalização somente 48 e 72 horas após a infecção, o que pode não ter sido suficiente para uma resposta eficiente para a ativação dos mecanismos de defesa contra o patógeno (discutido mais à frente), resultando em maior desenvolvimento da doença, como observado com maior multiplicação da bactéria Xac nos tecidos e sintomas mais severos da doença.

Foi observado que genes relacionados à fotossíntese foram reprimidos a partir do tempo de 48 horas após a inoculação com a Xac na espécie altamente suscetível LG e pelos resultados encontrados, foi visto que nessa espécie foram encontrados genes relacionados à sinalização celular em um intervalo de 48

horas após a inoculação com a Xac e, dessa forma, a partir desse momento, essa espécie pode ter ativado seu arsenal para mecanismos de defesa contra o patógeno. Diferente do encontrado na espécie moderadamente resistente PR, que já em 24 horas após a inoculação com a Xac, ocorreu a repressão de genes fotossintéticos.

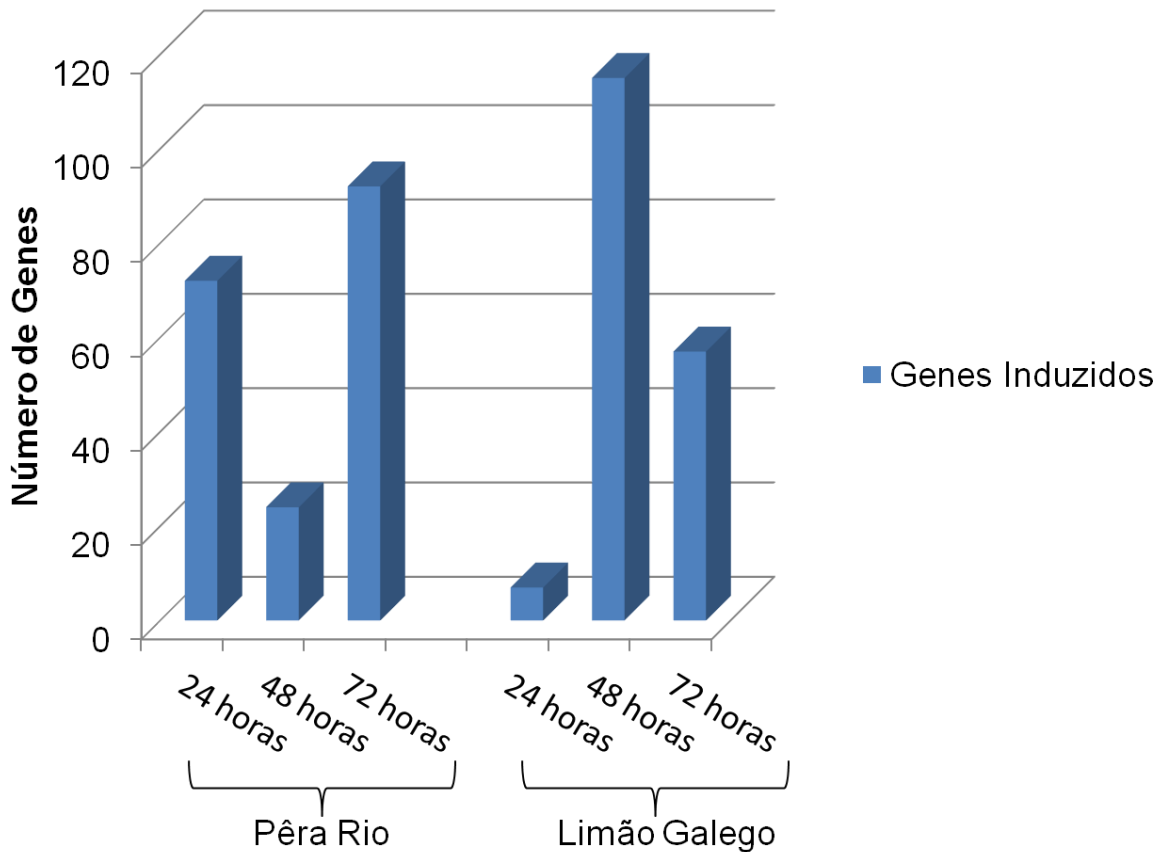


Figura 25: Número de genes induzidos relacionados à sinalização celular na espécie moderadamente resistente PR e na espécie altamente suscetível LG, depois de infectadas 24, 48 e 72 horas com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Tabela 16. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	Fold-change Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 2463513	14,3115	0,01855	Receptor rico em repetições leucina

Transcrito 2562155	9,6566	0,04072	Proteína serina/treonina quinase
Transcrito 2627617	Inf	0,03050	Receptor Toll
Transcrito 10535322	13,166	0,040047	Proteínas quinases ativadas por mitógenos MAPK
Transcrito 2612883	15,207	0,018853	Proteína de transferência lipídica de planta de planta
Transcrito 11049044	272,405	0,0000368	Proteína de transferência lipídica de planta de planta

Tabela 17. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 11049044	169,0966	0,0002572	Proteína de transferência lipídica de planta
Transcrito 11062541	26,39905	0,007030	Proteínas ricas em prolina
Transcrito 10622678	21,90153	0,017517	Proteína serina/treonina quinase
Transcrito 2516967	45,25551	0,005110	Proteína serina/treonina quinase
Transcrito 11033914	21,901530	0,01751754	Proteína serina/treonina quinase
Transcrito 2707874	45,86707	0,0157786	Proteína rica em repetições cisteínas

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 18. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 2636044	23,1637	0,02751	Receptor cisteína quinase
Transcrito 2378333	Inf	0,0048	Receptor serina treonina quinase
Transcrito 2542407	Inf	0,01525	Receptor serina treonina quinase
Transcrito 11049044	Inf	0,00002	Proteína de transferência lipídica de planta
Transcrito 10633805	11,5943	0,0370	Receptor serina treonina quinase

Transcrito 166877	43,49117	0,0077	Receptor rico em leucina
Transcrito 6666734	17,8061	0,0329	Receptor serina treonina
Transcrito 2628629	30,7274	0,0339	Proteínas ricas em leucina quinase

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 19. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 24 horas da inoculação com suspensão a 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 7356103	31,5696	0,0364	Receptor rico em repetições leucina
Transcrito 5708508	39,4618	0,0233	Receptor proteína quinase
Transcrito 9683879	10,0448	0,0470	Receptor lectina proteína quinase
Transcrito 2358914	14,4693	0,0208	Receptor serina treonina proteína quinase
Transcrito 7067802	31,5694	0,0355	Receptor serina treonina proteína quinase
Transcrito 2916441	40,7772	0,0071	Receptor lectina proteína quinase
Transcrito 7369011	14,7324	0,0248	Proteína tipo cc-nbs-Irr <i>resistance</i>

Tabela 20. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 48 horas da inoculação com suspensão a 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10784442	Inf	0,00220	Proteína tipo cc-nbs-Irr <i>resistance</i>
Transcrito 2822544	70,1465	0,0005	Receptor rico em cisteínas proteína quinase
Transcrito 10782817	5,6017	0,0050	Receptor lectina proteína quinase
Transcrito 2886636	4,5893	0,00193	Receptor serina treonina proteína quinase
Transcrito 10791566	10,2521	0,0227	Receptor rico em leucina
Transcrito 2425726	13,3817	0,0111	Receptor quinase

Transcrito 6949885	18,5761	0,0391	Receptor lectina proteína quinase
--------------------	---------	--------	-----------------------------------

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 21. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 72 horas da inoculação com suspensão a 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10748165	306,3268	0.0001	Proteínas <i>lob domain-containing</i> (Lob)
Transcrito 9653593	184,8482	0,0000094	Proteínas <i>lob domain-containing</i> (Lob)
Transcrito 2129752	8,3418	0,0267	Receptor serina treonina proteína quinase
Transcrito 11049044	Inf	0.0095	Proteína de transferência lipídica de planta
Transcrito 2818727	31,0520	0,0019	Proteína Quinase
Transcrito 361904	7,7746	0,0390	Receptor serina treonina proteína quinase
Transcrito 10656160	11,6075	0,0202	Proteínas quinases ativadas por mitógenos MAPK

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

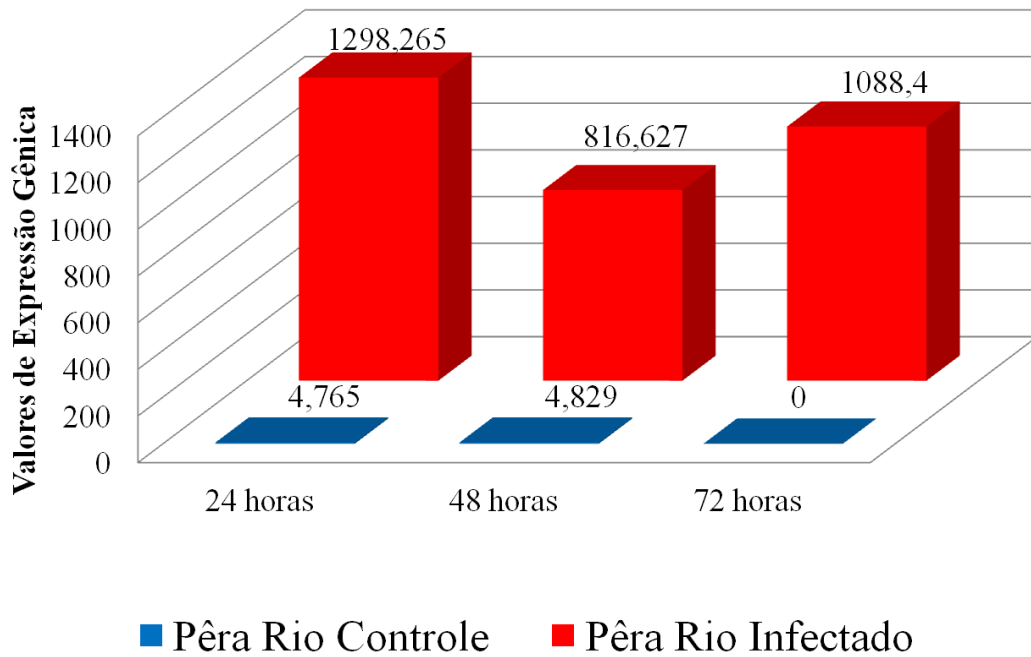


Figura 26: Análise da expressão gênica. Valores de expressão da proteína de transferência lipídica de planta nos tecidos controle e infectado na espécie Pêra Rio 24, 48 e 72 horas após inoculação de água (controle) e da bactéria Xac (infecção).

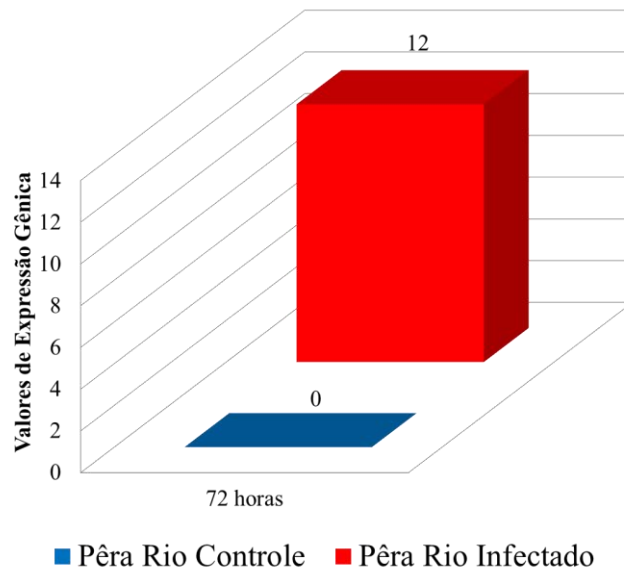


Figura 27: Análise da expressão gênica. Valores de expressão da Proteína Transferência Lipídica nos tecidos controle e infectado na espécie Limão Galego 72 horas após inoculação de água (controle) e da bactéria Xac (infecção).

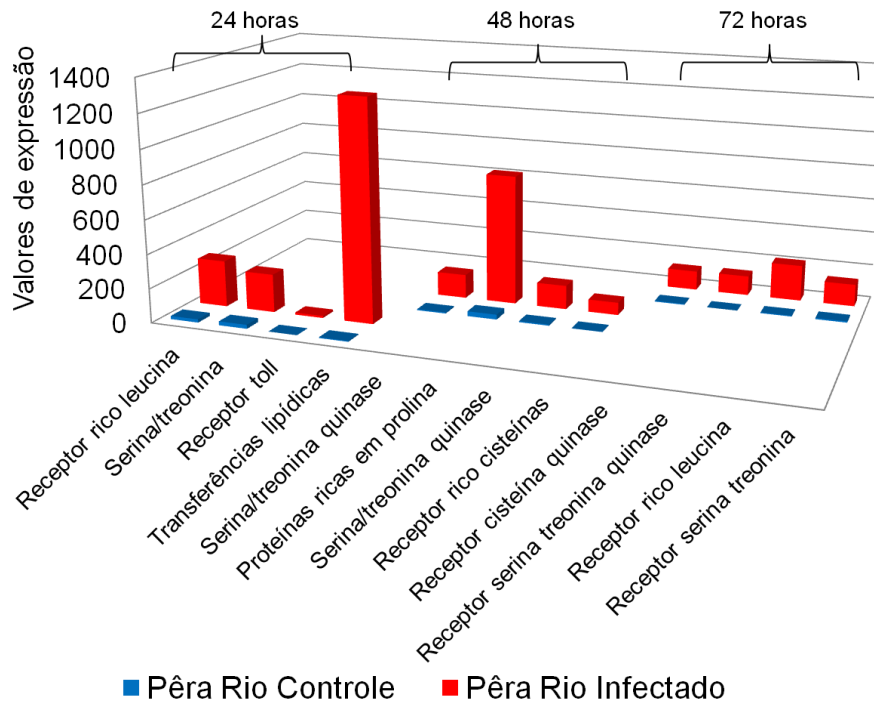


Figura 28: Valores de expressão de genes relacionados à sinalização celular nos tecidos controle e infectado na espécie Pêra Rio 24, 48 e 72 horas após inoculação de água (controle) e da bactéria Xac (infecção).

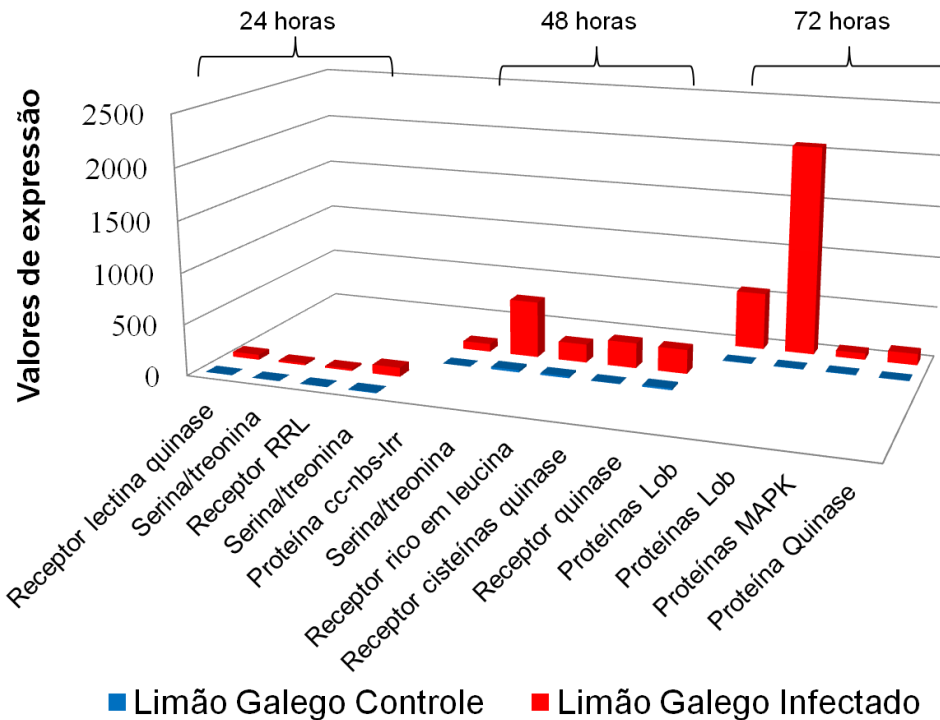


Figura 29 Valores de expressão de genes relacionados à sinalização celular nos tecidos controle e infectado na espécie Limão Galego 24, 48 e 72 horas após inoculação de água (controle) e da bactéria Xac (infecção).

5.11 Síntese de hormônios

Quando a planta detecta a presença do agente agressor, através da sinalização celular presente nas membranas das células, ela transmite sinais que ativam seus mecanismos de defesa no intuito de contenção do patógeno. Essa ação envolve sinais através de mensageiros secundários hormonais como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET), para a ativação de fatores de transcrição de genes de defesa e, subsequentemente, resistência das plantas (GRANT; LAMB, 2006; SOUZA *et al.*, 2009). Atualmente muitos trabalhos têm demonstrado o *crosstalk* entre as vias de sinalização hormonais desenvolvidas pelas plantas como mecanismo de defesa (ROBERT-SEILANIANTZ *et al.*, 2011).

O etileno é um hormônio importante que regula vários processos de desenvolvimento na planta, como o alongamento das células, germinação de sementes, senescência, amadurecimento de frutos e respostas de defesa contra estresse (CERNADAS *et al.*, 2008). Porém, nos últimos anos, vários estudos comprovam que a via do ET atua na regulação e ativação de genes relacionados a processos como o reforço da parede celular, produção de fitoalexinas, ativação de transcrição de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PRs), as quais tem função de conter e restringir a ação e a colonização de patógenos (ADIE *et al.*, 2007, GUPTA *et al.*, 2010).

Apesar de na literatura constar que o gene apétala, domínio relacionado à ativação de respostas de defesa via etileno (ET) (GLAZEBROOK *et al.*, 2005; CERNADAS *et al.*, 2008, ROBERT-SEILANIANTZ *et al.*, 2011) é uma das respostas mais tardias da planta à infecção (DE SOUZA *et al.*, 2007), na espécie laranja doce PR foram induzidos esses fatores que fazem parte do domínio ERF/AP2 (apétala 2) e enzimas como 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) oxidase, metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina(AdoMet), 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO) nos 3 tempos (24, 48 e 72 horas) após a inoculação com a Xac (Tabelas 22, 23 e 24).

Por outro lado, na espécie altamente suscetível LG proteínas contendo o domínio ERF/AP2 (apétala 2) e enzimas 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) oxidase foram reprimidas (Tabela 25) no tempo de 24 horas após a

inoculação com Xac e induzidos nos tempo de 48 e 72 horas após a inoculação com Xac (Tabela 26 e 27).

A ACC sintase converte a S-adenosil metionina (AdoMet ou SAM) em ácido 1 aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). O ACC é degradado pela ACC oxidase (ACO) resultando na formação do etileno (LIN et al., 2009). Essa via vem sendo descrita na literatura como uma das mais importantes e é analisada como alvo de engenharia genética (GRENNAN et al., 2007, AN et al., 2012, FU et al., 2012).

Recentemente, Martinelli e colaboradores (2012), fazendo uso de RNASeq, também encontraram fatores de transcrição AP2 quando plantas de citros foram desafiadas com o patógeno do *Huanglongbing*. Robert-Seilaniantz e colaboradores (2011) também verificaram a indução do fator de transcrição AP2 em tangerina Ponkan em resposta à infecção por *Xylella fastidiosa*.

Pode-se sugerir que a repressão dos genes relacionados à síntese de hormônios na espécie altamente suscetível LG somente no tempo de 24 horas após a inoculação com a Xac, tem relação, como dito anteriormente, com o fato de ter havido a indução de genes relacionados à fotossíntese e pouca indução de genes relacionados à sinalização no tempo 24 horas após a inoculação com a Xac, e assim, conseqüentemente, pode-se sugerir que não houve a indução dos hormônios para a ativação dos genes de defesa nesse tempo relatado, só então havendo a indução dos genes relacionados à síntese de hormônios nos tempos 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac, na espécie altamente suscetível LG.

Tabela 22. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 4874191	10,138	0,0383	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 6020368	Inf	0,0036	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase

Transcrito 2651	43,933	0,0060	Enzima metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina
Transcrito 11170783	37,261	0,0034	Fator de transcrição AP2
Transcrito 1464966	23,9634	0,0251	Fator de transcrição AP2
Transcrito 1773702	Inf	0,0120	Domínio AP2/ERF

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 23. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 5947484	12,0783	0,047333	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 8153212	14,9526	0,034251	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 2477621	Inf	0,0330161	Fator de transcrição AP2
Transcrito 2477372	Inf	0,030479094	Fator de transcrição AP2
Transcrito 2832990	13,8174	0,032163	Fator de transcrição AP2
Transcrito 10762901	15,6865	0,031465	Domínio AP2/ERF

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 24. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 3173023	21,7455	0,0179	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 5184013	19,3031	0,0184	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase

Transcrito 5947484	22,2183	0,0174	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 8681624	27,1819	0,0120	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase
Transcrito 11170783	173,4919	0,0003	Fator de transcrição AP2
Transcrito 5912572	Inf	0,0197	Fator de transcrição AP2
Transcrito 2477621	Inf	0,0027	Fator de transcrição AP2
Transcrito 2221944	29,9592	0,0068	Receptor de etileno
Transcrito 8394359	Inf	0,0224	Receptor de etileno
Transcrito 10762901	15,6865	0,0314	Domínio AP2/ERF

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 25. GDEs reprimidos na espécie suscetível LG após 24 horas da inoculação com suspensão a 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 8681673	0	0,0022	Enzima acc sintase
Transcrito 314444	0	0,0219	Enzima acc sintase
Transcrito 229508	0	0,0096	Enzima acc sintase
Transcrito 2477372	0,0965	0,0469	Domínio ERF/AP2 (apétala 2)
Transcrito 2486878	0	0,0390	Domínio ERF/AP2 (apétala 2)
Transcrito 4989584	0	0,0246	Domínio ERF/AP2 (apétala 2)
Transcrito 10687759	0,0931	0,0390	Receptor de etileno
Transcrito 2221944	0,1119	0,0373	Receptor de etileno

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle.

Tabela 26. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 310274	6,8487	0,0333	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 2851883	6,7240	0,0357	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
Transcrito 8681624	7,4912	0,0282	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase
Transcrito 4841130	7,4103	0,04213	Receptor de etileno
Transcrito 1334636	Inf	0,0419	Fator de transcrição AP2

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 27. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 592046	20,4610	0,0094	Receptor de etileno
Transcrito 3305353	Inf	0,0037	Receptor de etileno
Transcrito 1464966	20,9125	0,0050	Fator de transcrição AP2
Transcrito 303166	7,8739	0,0442	Fator de transcrição AP2
Transcrito 489131	30,1648	0,0050	Fator de transcrição AP2
Transcrito 11170783	22,2033	0,0023	Domínio AP2/ERF

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

5.12 Defesa, resistência a doenças e respostas ao estresse

As plantas conseguem sobreviver ao ataque de seus predadores e patógenos não somente por meio de seus componentes moleculares constitutivos, mas porque podem aumentar a concentração de determinadas moléculas pré-existentes e sintetizar novas moléculas que não estavam presentes antes do ataque. As chamadas proteínas de defesa são componentes moleculares relacionados com este tipo de estresse, sendo expressas a partir de um grupo específico de genes relacionados. Os processos de expressão de

proteínas de defesa em resposta à herbivoria e ação de patógenos são bem conhecidos, porém, muitas etapas das vias ainda não foram totalmente elucidadas (PINTO *et al.*, 2011) Tais proteínas exercem vários papéis na resistência e sobrevivência da planta, podendo agir de forma direta, combatendo o agente agressor, ou de forma indireta, mantendo a estrutura e as funções celulares (MYSORE; RYU 2004, JONES; DANGL 2006).

Dentre as principais alterações ocasionadas pelo contato do patógeno com o hospedeiro, há a indução, através de fatores de transcrição, de um grande número de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese ou proteínas PR (“PR-Proteins”), que são proteínas que se acumulam no hospedeiro durante a infecção por patógeno (KAWAHARA *et al.*, 2012). Elas foram reunidas em diferentes grupos, totalizando 17 famílias, de acordo com suas características físico-químicas e imunológicas, assim como grau de similaridade (STINTZI *et al.*, 1993) (Tabela 28).

Tabela 28: Grupos das famílias das proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR).

Família	Membros	Atividades
PR-1	Fumo PR-1	Anti-fúngica
PR-2	Fumo PR-2	B-1,3 Glucanase
PR-3	Fumo P, Q	Quitinase
PR-4	Fumo R	Quitinase
PR-5	Fumo S	Taumatina
PR-6	Tomate Inibidor I	Inibidor de Protease
PR-7	Tomate P 69	Endoproteinase
PR-8	Quitinase Pepino	Quitinase
PR-9	Peroxidase Formadora de Lignina, fumo	Peroxidase
PR-10	Salsinha PR-1	Ribonuclease-like
PR-11	Quitinase Classe V Fumo	Quitinase
PR-12	Defensinas	Antifúngica
PR-13	Tioninas	Antifúngica
PR-14	LTP4 Cevada	Proteína tranferidora de lipídeo
PR-15	Cevada	Oxalato oxidase
PR-16	Cevada	Oxalato oxidase-like
PR-17	Fumo	Desconhecida

Fonte: VAN LOON *et al.*, 2006

Proteínas similares às proteínas PR foram induzidas na laranja doce PR, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção com a Xac, tais como a proteína relacionada à patogênese 1, a proteína relacionada a patogênese 2, a proteína relacionada a patogênese 10, a peroxidase e outras proteínas tais como a proteína induzida por ferimento (“wound induced protein”), e a proteína alergênica Bet v 1 (Tabelas 29, 30 e 31). Por outro lado, na espécie altamente suscetível Limão Galego, essas proteínas foram reprimidas no tempo 24 horas, e nos tempos 48 e 72 horas houve a indução dos genes relacionados à defesa contra patógenos (Tabelas 32, 33 e 34).

As proteínas peroxidases são pertencentes à família PR-9 e são glicoproteínas antioxidantes capazes de catalisar um grande número de reações como produção ou catálise de H_2O_2 , formação de lignina, suberização e cicatrização de ferimentos (ALVAREZ *et al.*, 1998), sugerindo a ativação de explosão oxidativa. Uma das respostas mais rápidas de defesa das plantas contra o ataque de patógenos é a explosão oxidativa, a qual consiste na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente de O_2 e HO_2 no local da tentativa de invasão (AMRIT *et al.*, 2010). Segundo Dangl e colaboradores (2001), o desencadeamento das vias de defesa por genes R gera fluxo de íons celulares massivos, levando ao acúmulo de superóxidos e peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, resposta de hipersensibilidade (RH) e a produção de metabólitos antimicrobianos (PINTO *et al.*, 2011).

As proteínas taumatina (TLPs) são da família PR-5 e se acumulam quando as plantas são atacadas por agentes patogênicos para conter a infecção. Resultados encontrados por Fu e colaboradores (2012) mostraram a expressão de TLPs na espécie resistente ao cancro cítrico de kumquat Meiwa, sugerindo que a indução de genes TLPs pode fazer parte da maquinaria de defesa na espécie PR estudada no presente trabalho. Da mesma forma, proteínas da família PR-10, denominada domínio Bet v 1, são conhecidas em citros por serem induzidas após ataque dos patógenos (CAMPOS *et al.*, 2007).

Essas proteínas contribuem para a lignificação da parede celular, propiciando uma barreira física ao avanço do fitopatógeno, impedindo que as enzimas hidrolíticas secretadas por estes dissolvam as paredes das células vegetais. A indução da lignificação tem sido relacionada como uma resposta de defesa (STICHER *et al.*, 1997, CERNADAS *et al.*, 2008 e FU *et al.*, 2012).

No caso da espécie altamente suscetível LG, com a repressão desses genes de defesa no tempo 24 horas após a infecção, pode-se sugerir que a sinalização celular do hospedeiro citada anteriormente não foi suficiente para ativar, neste período. A maquinaria de genes relacionados à defesa acima e, quando o hospedeiro detectou o patógeno, este já havia se instalado e colonizado a planta, causando maior severidade da doença.

Dessa forma, os altos níveis de expressão de genes relacionados à defesa, resistência a doenças e respostas ao estresse no local de defesa da planta, podem desempenhar papéis importantes na manutenção das funções de resistência em plantas. Sugere-se que as proteínas PR atuam acelerando, em geral, as respostas de defesa do hospedeiro.

Tabela 29. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10024241	9,7194	0,0464	Proteína relacionada a patogênese 1
Transcrito 4367479	Inf	0,0107	Proteína relacionada a patogênese 2
Transcrito 265733	8,7829	0,0470	Proteína relacionada a patogênese 10
Transcrito 10579616	50,0001	0,0369	Proteína Peroxidase
Transcrito 2261306	10,9476	0,0313	Proteína alergênica Bet v 1
Transcrito 10263888	16,0374	0,0337	Proteína Taumatina
Transcrito 5323239	17,9721	0,0492	Proteína Tiredoxina
Transcrito 10211592	45,1619	0,0173	Citocromo 450
Transcrito 2774699	Inf	0,0011	Proteína induzida por ferimento

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 30. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito4921957	11,2119	0,039995	Proteína endo-beta glucanase
Transcrito 739815	11,3648	0,04716	Proteína endo-beta glucanase
Transcrito 7739745	14,2187	0,0476240	Proteína Quitinase
Transcrito 6268691	43,5227	0,002981	Proteína alergênica Bet v 1
Transcrito 5416760	Inf	0,0009911	Proteína Taumatina
Transcrito 4625046	Inf	0,0431738	Proteína Taumatina
Transcrito 10237064	16,4357	0,025293404	Quitinase

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 31. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 20819	Inf	0,001340	Proteína relacionada a patogênese 1
Transcrito 429318	Inf	0,02960	Proteína relacionada a patogênese 2
Transcrito 4367725	Inf	0,0170434	Proteína relacionada a patogênese 4
Transcrito 5361822	Inf	0,0431140	Proteína Peroxidase
Transcrito 6385802	39,70933	0,0201137	Proteína Peroxidase
Transcrito 10263922	23,400144	0,02775	Proteína induz senescência
Transcrito 7877267	Inf	0,040245	Proteína induz senescência
Transcrito 3274735	Inf	0,00537587	Proteína endo-beta glucanase
Transcrito 43463	Inf	0,01715	Protease Aspártica
Transcrito 10761002	Inf	0,009103	Protease Aspártica

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 32. GDEs reprimidos na espécie suscetível LG após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10024241	0,01978	0,00404	Proteína relacionada a patogênese 1
Transcrito 5340955	0,0832	0,02619	Proteína relacionada a patogênese 4
Transcrito 5787274	0,0900	0,0233	Peroxidase
Transcrito 5372480	0	0,001978	Proteína relacionada a patogênese 2
Transcrito 7989722	0,02721505	0,002212	Quitinase
Transcrito 5477172	0,081364	0,014187	Proteína induz senescência
Transcrito 4936934	0	0,03014	Proteína induz senescência
Transcrito 3267072	0	0,00248	Proteína Taumatina
Transcrito 5882354	0	0,00048	Proteína induzida por fermento

*0: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido controle

Tabela 33. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 20819	Inf	0,00020	Proteína relacionada a patogênese 1
Transcrito 4513087	21,5834	0,04314	Proteína relacionada a patogênese 2
Transcrito 60306	24,0963	0,00120	Proteína relacionada a patogênese 4
Transcrito 2848503	7,19446	0,044027	Peroxidase
Transcrito 5371195	6,4553	0,04325	Proteína Peroxidase
Transcrito 2261306	17,1947	0,00455	Proteína alergênica Bet v 1
Transcrito 10007161	26,3151	0,0011	Proteína Taumatina

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 34. GDEs induzidos na espécie suscetível LG após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 322244	263,49857	0,00003876	Proteína relacionada a patogênese 1
Transcrito 10185949	85,93171	0,000072	Proteína endo-beta glucanase
Transcrito 5967920	117,1104	0,00048	Proteína relacionada a patogênese 1
Transcrito 6124675	Inf	0,01316	Proteína endo-glucanase
Transcrito 5276841	Inf	0,019067	Proteína endo-betagalactosidase
Transcrito 2443862	9,10648	0,02198	Proteína alergênica Bet v 1

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

5.13 Fatores de transcrição

As proteínas sinalizadoras das cascatas de MAP quinases (MAPK's), proteínas que foram induzidas nas duas espécies estudadas nesse trabalho, podem culminar em ativação de genes relacionados a defesa. Isto envolve a produção de ERO e morte programada de células para eliminação dos patógenos nas folhas no local da infecção (JAYARAJ; PUNJA, 2007)

As MAPK's (proteínas quinases ativadas por mitógenos – “Mitogen-activated protein kinases”) mostram interação e ativam as vias de fatores de transcrição (GECHEV; HILLE, 2005, MIAO *et al.*, 2007) (Figura 30). Vários genes pertencentes à família de fatores de transcrição WRKY, como WRKY5, WRKY17, WRKY22, WRKY28, WRKY33 e WRKY41 foram induzidos na espécie moderadamente resistente PR nos 3 tempos após a infecção com Xac (Tabelas 35, 36 e 37). Em contrapartida, somente o fator de transcrição WRKY41 foi induzido na espécie suscetível LG no tempo 24 horas após a infecção, e nos tempos 48 e 72 horas houve a indução de outros fatores de transcrição como WRKY22, WRKY28 e WRKY70 (Tabelas 38, 39 e 40).

Foi relatado por Chen e colaboradores (2002) que plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando fatores de transcrição WRKY18 aumentaram os níveis de resistência contra o agente patogênico bacteriano *Pseudomonas syringae*. Existe uma rede de ativadores e repressores que realizam a expressão dos genes em determinado momento. Segundo Berri e colaboradores (2009) são grandes as famílias de fatores de transcrição responsáveis por essa modulação, em particular a presença de elementos cis em suas próprias regiões promotoras, que indicam a existência de um sistema de regulação cruzada entre os WRKY.

Proteínas do tipo WRKY são fatores de transcrição bem distribuídos no reino vegetal. Sua estrutura é marcada por um domínio (WRKY - triptofano; arginina; lisina; tirosina) de aproximadamente 60 aminoácidos com atividade de ligação ao DNA e, em especial, uma sequência denominada W-BOX (C/T) TGAC(T/C) (EULGEM *et al.*, 2000). O domínio WRKY possui como alvo principal de ligação, elementos cis do tipo “W-boxes”, e há sítios alternativos identificados recentemente, os quais refletem uma grande variação entre os aminoácidos adjacentes ao motivo conservado (PANDEY *et al.*, 2009). A transcrição de genes

WRKY é ativada pela ocorrência de ferimentos, infecção por patógenos e condições de estresse abiótico (ZHANG *et al.*, 2008).

De acordo com Berri e colaboradores (2009), embora as funções regulatórias dessas proteínas não estejam ainda bem definidas, inúmeros estudos realizados nos últimos anos têm mostrado evidências de sua participação em respostas à infecção contra patógenos. Estas proteínas foram, ainda, observadas como reguladores positivos ou negativos da expressão de genes em diferentes respostas de defesa de plantas (EULGEM *et al.*, 2006).

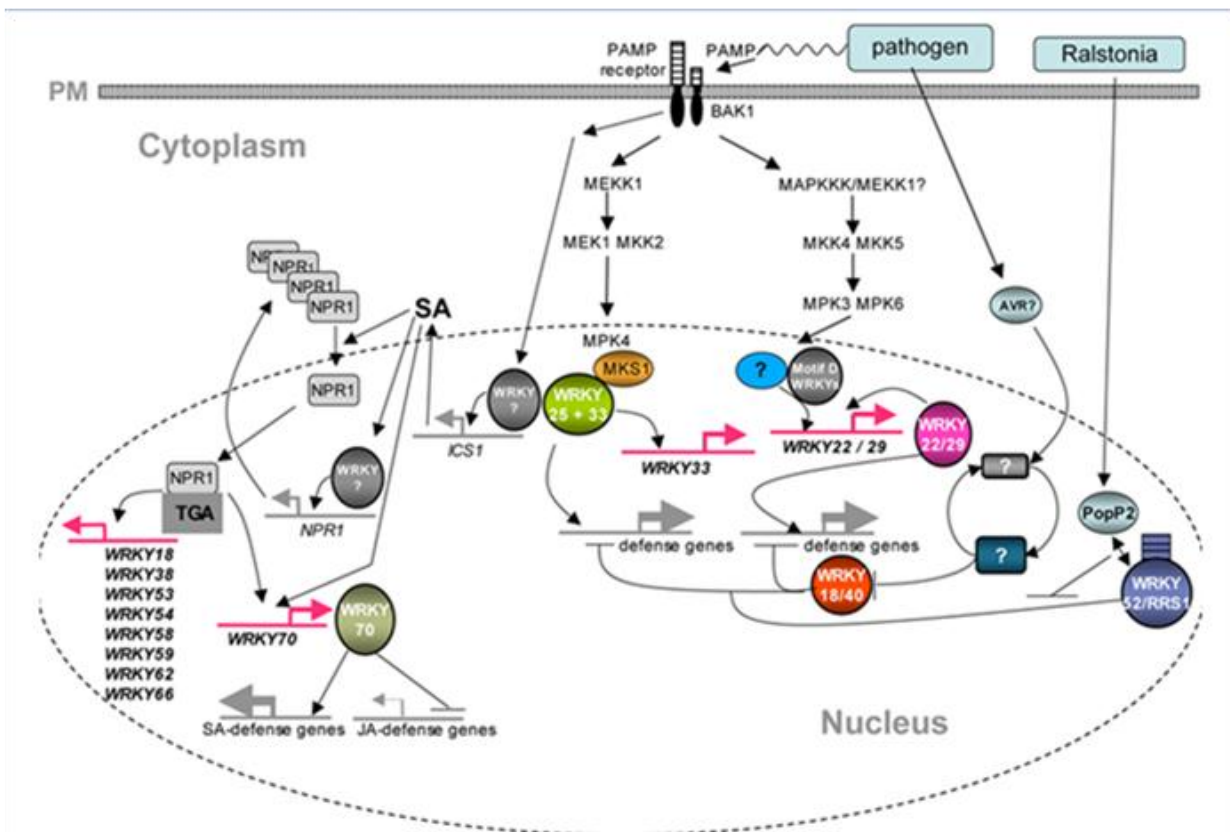


Figura 30: Rede de interação dos fatores de transcrição WRKY. Fonte: EULGEM *et al.*, 2006.

Tabela 35. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 1939973	11,3233	0,0493	Fator de transcrição WRKY 5
Transcrito 10830813	10,9832	0,0448	Fator de transcrição WRKY17
Transcrito 2636475	32,7851	0,0049	Fator de transcrição WRKY22
Transcrito 10893873	10,5992	0,0381	Fator de transcrição WRKY28
Transcrito 10610676	8,9862	0,0456	Fator de transcrição WRKY33
Transcrito 10189812	9,3793	0,0459	Fator de transcrição WRKY41

Tabela 36. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Pêra Rio	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 2387518	27,7495	0,0186	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 9111694	Inf	0,0450	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 2636475	Inf	0,0123	Fator de transcrição WRKY22
Transcrito 7449978	19,7228	0,0274	Fator de transcrição WRKY28

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 37. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente PR após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 2699597	Inf	0,0053	Fator de transcrição WRKY28
Transcrito 10610676	12,6691	0,0454	Fator de transcrição WRKY33
Transcrito 10762214	28,3638	0,0175	Fator de transcrição WRKY40
Transcrito 10053980	Inf	0,0471	Fator de transcrição WRKY71
Transcrito 2387518	14,1819	0,0379	Fator de transcrição WRKY72

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 38. GDE induzido na espécie suscetível LG após 24 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 9065893	10.0842	0.0380	Fator de Transcrição WRKY41

Tabela 39. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente LG após 48 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 10141369	24,8209	0,010	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 96342	14,74865	0,0241	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 2636475	40,4688	0,0010	Fator de transcrição WRKY22
Transcrito 1797717	Inf	0,0255	Fator de transcrição WRKY28
Transcrito 510017	25,3604	0,0039	Fator de transcrição WRKY75

*Inf: Representam os genes que foram detectados apenas no tecido infectado.

Tabela 40. GDEs induzidos na espécie moderadamente resistente LG após 72 horas da inoculação com suspensão contendo 10^8 UFC/ml de Xac.

Transcrito	<i>Fold-change</i> Limão Galego	P-valor	Descrição da sequência
Transcrito 2387518	22,6236	0,0119	Fator de transcrição WRKY
Transcrito 2636475	25,9506	0,0176	Fator de transcrição WRKY22
Transcrito 2702939	9,5575	0,02854	Fator de transcrição WRKY70

6 CONCLUSÃO

A utilização de RNASeq possibilitou verificar a expressão gênica diferencial que existe entre Pêra Rio e Limão Galego em resposta à infecção a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno.

A laranja doce Pêra Rio apresentou repressão de genes relacionados à fotossíntese, uma elevada e rápida transcrição de genes relacionados à sinalização celular e indução de mecanismos de resistência. Esses processos biológicos parecem agir cooperativamente na tentativa de conter e limitar a penetração e multiplicação bacteriana, conferindo maior resistência, porém não suficiente para bloquear a doença. Uma proteína, denominada proteína de transferência lipídica, pode estar potencialmente envolvida na resistência contra o patógeno.

No Limão Galego, no tempo de 24 horas, houve a indução de genes relacionados à fotossíntese, e nos tempos de 48 e 72 horas após a inoculação com a Xac, houve repressão. Nessa espécie foi encontrada menor expressão de proteínas relacionadas à sinalização celular nas primeiras 24 horas após a inoculação do patógeno, o que pode não ter sido suficiente para a ativação dos mecanismos de defesa logo no início do processo de infecção.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, J. Transcriptome: connecting the genome to gene function. **Nature Education**, v. 1, p. 1, 2008.

ADIE, B.; PEREZ-PEREZ, J.; MANUEL, M.; SANCHEZ-SERRANO, SCHMELZ, E.; A, SOLANO ROBERTO (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* May. 19(5):1665-81.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press. 5 ed. Amsterdam, 2005.

ALVAREZ ME, PENNELL RI, MEIJER P-J, ISHIKAWA A, DIXON RA, LAMB C.(1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*92, 773–784.

AMARO, A.A.; Vicente, M.C.M.; Baptistella, C.S.L. Citricultura paulista: tecnologia e mão de obra. **Laranja**, v.22, n.1, p.1-37, 2001.

AMRIT, N.K.; ANDRIO, E.; MARINO, D.; PAULY, N.; DUNAND, C. (2010) Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. *J Integr Plant Biol*, v.52, n.2, p.195-204.

AMORIM, L. Ciclos de doença. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. eds. **Manual de Fitopatologia**. v. 1. Princípios e conceitos, 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 325-330, 1995.

AN, C. AND MOU, Z. NON-host defense response in a novel *Arabidopsis-Xanthomonas citri subsp. citri* pathosystem. (2012) **Plos one**, 7(1): e31130.

ANDERS, S.; HUBER, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**. v. 11.

APEL, K. & HIRT, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Ann Plant Biotechnol**, v.55, p.373-99.

ARAÚJO, L. G. Cresce produção de laranja em São Paulo. 2012. Disponível em: <<http://portal.mercadoaberto.com.br>>. Acesso em dezembro 2012.

BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A.; AYRES, A. J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 30-35, 2001.

BEHLAU F, JONES JB, MYERS ME, GRAHAM JH Monitoring for resistant populations of *Xanthomonas citri subsp citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated with copper or streptomycin using a new semi-selective medium. **European Journal of Plant Pathology** 132: 259–270, 2012.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, v. 57, p. 289-300, 1995.

BERRI, S.; ABBRUSCATO, P.; FRAIVE-RAMPANT, O., BRASILEIRO, M.C.; FUMASONI, I.; SATOH, K.; KIKUSHI, S.; MIZZI, L.; MORANDINI, P.; PIFANELLI, P.; (2009) Characterization of *WRKY* co-regulatory networks in rice and *Arabidopsis*. **BMC Genomics**.

BLEIN, J.P., P. COUTOS-THÉVENOT, D. MARION, AND M. PONCHET. (2002). From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci.* 7:293-296.

BILGIN, D.D.; ZAVALA, J.A.; ZHU, J.; CLOUGHT, S.J.; ORT, D.R. (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell and Environment*, v. 33, p. 1596-1613.

BITTANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOVÉ JM (2006) Huanglongbing: a destructive newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.

BONFIG KB, SCHREIBER U, GABLER A, ROITSCH T, BERGER S: (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves.

BOSACARIOL, R. L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E. K.; CHABREGAS, S. M.; VIEIRA, M. L.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; CARDOSO, S. C.; CHRISTIANO, R. S. C.; BERGAMIN FILHO, A.; BARBOSA, J. M.; AZEVEDO, F. A.; MENDES, B. M. J. (2006) *Attacin A* gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. *J Amer Soc Hort Sci*, v. 13, p. 530-536.

BOYD, L.A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D.M.; LEACH, J.E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interaction: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, p. 233-240, 2013.

BRECHENMACHER L, LEI Z, LIBAULT M, FINDLEY S, SUGAWARA M, SADOWSKY MJ, SUMNER LW, STACEY G. Plant Physiol. Aug;153(4):1808-22. doi: 10.1104/pp.110.157800 (2008).

BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 141–157, 2003.

BÜTTNER, D., AND BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev.* 34:107-133, 2010.

BULLARD JH, PURDOM E, HANSEN KD, DUDOIT S (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. **BMC Bioinformatics** 11: 94.

CAMPOS, M.A.; RESENDE, M.L.V.; SILVA, M.S. Interações moleculares planta-patógeno. In: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M. de; Reis Jr., F. B. (2007) (Ed.)(Org.). *Biotecnologia aplicada à agropecuária*. p.355-377. 1 ed. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2010, v. , p.355-377.

CASTRO, E.; SIGRIST, C.J.; GATTIKER, A.; BULLIARD, V.; LANGENDIJK-GENEVAUX P.S.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; HULO, N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 1, p. 34, 2006.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, p.735-744, 2010.

CERNADAS, R. A., CAMILLO, L. R. AND BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 609–631. 2008.

CHEN X, RONALD PC (2011) Innate immunity in rice. *Trends Plant Sci* 16: 451–459.

CHEN C, CHEN Z. (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiology* 129, 706–716.

CIVEROLO, E.L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: **Citrus canker**: An international perspective. Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred. p.11-17, 1985.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. Ficha da laranja Péra. (2009). Disponíveis em: <http://www.ceagesp.gov.br/hortiescolha/anexos/ficha_laranja_pera.pdf>. Acesso em: 20 fev.2012.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, v. 18, p. 3674-3676, 2005.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan, B. B.; Grisse, W.; Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Maryland USA: American Society of Plant Physiologists, Estados Unidos, p. 850-829, 2001.

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

DA SILVA, R.A., COSTA, A., ALEIXO, D., NÓBREGA, V., DANTAS, E.A, *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* v.6, n.3, p. 39 - 48 julho/setembro de 2011

DAS, A.K. (2003) Citrus canker – A review. *Journal Appl. Hort.*,5(1):52-60. 2003.

DAURELIO, LD.; ROMEROE, M.; PETROCELLI, S.; MERELO, P.; CORTADI, A.; TALÓN, M.; TADEO, F.; ORELIANO, E.; Characterization of *Citrus sinensis* transcription factors closely associated with the non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J Plant Physiol**. 2013.

DE CASTRO E, SIGRIST CJ, GATTIKER A, BULLIARD V, LANGENDIJK-GENEVAUX PS, GASTEIGER E, BAIROCH A, HULO N. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*. Jul 1;34(Web Server issue):W362-5.

DE SOUZA, A.A., Takita, M.A.; Coletta Filho, H.D.; Campos, M.A.; Teixeira, J.E.C.; Targon, M.L.P.N.; Carlos, E.F.; Ravasi, J.R.; Fischer, C.N.; & Machado, M.A. (2009) Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetic and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.965-971.

DEYOUNG BJ, INNES RW (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nat Immunol** 7: 1243–1249

DOMINGUES, M. N. Caracterização de proteínas de *Citrus sinensis* que interagem com a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico, 2011. UNICAMP.

EULGEM, T., RUSHTON, P. J., ROBATZEK, S., SOMSSICH, I. E. (2006) Title: The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends in plant science.

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINANEJOS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PENA, L. (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. Molecular Breeding, v. 7, p. 175-185.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: 1962-2007. (2011) Disponível em: <http://apps.fao.org/>

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: core production data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>. Acesso em: 12 mar. 2013.

FEBRES VJ, KHALAF A, GMITTER JR FG & MOORE GA. Production of disease resistance in *Citrus* by understanding natural defense pathways and pathogen interactions. **Tree and Forestry Science and Biotechnology** 3:30-39, 2009.

FEITCHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN Filho, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: 4 Agronômica Ceres, 2005. P.239-269.

FIETTO, L.G.; COSTA, M.D.L.; CRUZ, C.D.; SOUZA, A.A.; MACHADOO, M.A.; FONTES, E.P.B. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.881-887.

FILICHKIN, S.A.; PRIEST, H.D.; GIVAN, S.A.; SHEN, R.; BRYANT, D.W.; FOX, S.E.; WONG, W.K.; MOCKLER, T.C. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Res.**, v.20, p.45-58, 2010.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol, v. 9, p. 275-276, 1955.

FORMENT, J. et al. Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. **Plant Mol Biol**, v. 57, n. 3, p. 375-391, 2005.

FU X-Z, GONG X-Q, ZHANG Y-X, WANG Y, LIU J.-H. Different Transcriptional Response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kumquat and Sweet Orange with Contrasting Canker Tolerance. **PLoS ONE** 7(7): e41790. doi:10.1371/journal.pone.0041790, 2012.

FU XZ, LIU JH. Transcriptional profiling of canker-resistant transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) constitutively overexpressing a spermidine synthase gene. **BioMed Research International**, 2013. doi:10.1155/2013/918136

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 07 fev. 2008.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em: 01 Julho, 2013.

GALÁN, J. E. & COLLMER, A.(1999) Type III Secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284: 1322-1328.

GLAZEBROOK C, ELLIOTT D, LYONS J, TREMBLAY L. (2005). Crossmodal inhibition of return in adults with and without Down syndrome. *Adapted Physical Activity Quarterly* 22(3):277-290.

GAOFU, Q.; MÃO, S.; FAYIN, Z.; ZNINIU, Y.; XIUYUN, Z. In vitro assessment of plant lectins with anti-pinwood nematode activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 98, p. 40-45, 2008

GILCHRIST, M. Next-generation sequencing technology and you. Disponível em: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/mill-hill-essays/bringing-it-all-back-home-next-generation-sequencing-technology-and-you>. Acesso em: 10/02/13.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; CUBERO, J.; DROUILLARD, D.L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of asiatic citrus canker (ACC). In: **International Citrus Canker Research Workshop**, Fort Pierce, 2000.<<http://www.doacs.state.fl.us/canker>> Proceedings, Fort Pierce. 2000.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CIVEROLLO, E.L.; MCGUIRE, R.G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, v. 73, p. 423-427, 1989

GRENNAN AK. Protein S-nitrosylation: potential targets and roles in signal transduction. *Plant Physiology* 2007 ;144:1237-1239.

- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*, v.9, p.414-20. 2006.
- GREWAL, R.K.; GUPTA, S.; DAS, S. *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice. **BMC Genomics**, v. 13,p. 49 -61, 2012.
- GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.
- GOTTWALD, T.R., GRAHAM, J.H., CIVEROLO, E.L., BARRETT, H.C. AND HEARN, C.J. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Disease*, v. 77, p. 1004–1009, 1992.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV, 2002
- GÓMEZ-GÓMEZ L, BOOLER T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci*. Jun;7(6):251-6.
- GRIFFITH, M.; GRIFFITH, O.L.; Mwenifumbo, J.; Goya, R.; Morrissy, A.S.; Morin, R.D.; Corbett, R.; Tang, M.J. Alternative expression analysis by RNA sequencing. **Nature Methods**, v. 7, p. 843-847, 2010.
- GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H. Putative resistance genes in the CitEST database. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 931-942, 2007.
- GUO, J, YANG, X.; WESTON, D.; CHEN, J.; Abscisic Acid Receptors: Past, Present and Future, 2011.
- HAAS BJ, CHIN M, NUSBAUM C, BIRREN BW, LIVNY J. (2012) How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? **BMC Genomics**, v. 13.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.
- HARTUNG, J.S.; CIVEROLO, E.L. Restriction fragment length polymorphism distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X.c.* pv. *citri*. **Phytopathology**, v. 79, p. 793-799, 1989.
- HAAS BJ, CHIN M, NUSBAUM C, BIRREN BW, LIVNY J. (2012) How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? *BMC Genomics*, v. 13.

HERBERS K, TAKAHATA Y, MELZER M, MOCK HP, HAJIREZAEI M, ET AL. (2000) Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. **Mol Plant Pathol** 1: 51–59.

HERMSMEIER D., SCHITTKO U. & BALDWIN I.T. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology* 125, 683–700. Howard Investe São Paulo. Disponível em <http://www.investimentos.sp.gov.br>. Acesso em: 21 de Julho de 2012.

HÜCKELHOVEN, R. (2007) Cell wall-Associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101-127

JAIN, M. Next generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. *Briefings in functional genomics*, v. 2, p. 63-70, 2011. doi: 10.1093/bfgp/elr038.

JAYARAJ, J, AND Z. PUNJA. (2007) Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 26:1539-1546. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-007-0368-x>

KANAZIN V, MAREK LF, SHOEMAKER RC. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11746–11750, 1996.

KANTER U, USADEL B, GUERINEAU F, LI Y, PAULY M, TENHAKEN R. The inositol oxygenase gene family of Arabidopsis is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. *Planta*. 2005;221:243–254.

KAWAHARA Y, OONO Y, KANAMORI H, MATSUMOTO T, ITOH T, (2012) Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLoS ONE* 7(11): e49423. doi:10.1371/journal.pone.0049423

KHALAF, A.A. GMITTER, F. G., CONESA, A., DOPAZO, J., MOORE, G.A., *Fortunella margarita* Transcriptional Reprogramming Triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Plant Biology*, v. 11, n.159, 2011.

KIM S, PARK J, PARK S-Y, MITCHELL TK, LEE Y-H Identification and analysis of in planta expressed genes of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics* 11: 104, 2011.

KOGENARU, S.; QING, Y.; GUO, Y.; WANG, N. RNA-Seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC Genomics**, v. 13, p. 629, 2012. doi10.1093/bfgp/elr038.

LAIA, M. L. (2007) Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

LANGMEAD B, SALZBERG S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012, 9:357-359.

LEITE, JR., R.P.; MOHAN, S.K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v. 9, p. 3-7, 1990.

LEITE JR., R. P. (1990) Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná (Circular nº 61). Londrina: IAPAR.

LI, LAN.; ZHANG, C.; XU, D.; SCLAPP,; XU, Z.; (2012) Expression of recombinant EARL11, a hybrid proline-rich protein of *Arabidopsis*, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the growth of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*, Elsevier. Volume 506, Issue 1, 10 Pages 50–61.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. (2007) Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol*, v.85, p.843-847.

LIN H, DODDAPANENI H, BAI XJ, YAO JQ, ZHAO XL, (2009) Acquisition of uncharacterized sequences from Candidatus Liberibacter, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. *Molecular and Cellular Probes* 22: 30–37.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. *Rev Bras Frutic*, v. 33, n. 1, p. 158-172, 2011.

MANUAL DE FITOPATOLOGIA. v.2, 4 ed. São Paulo SP. Editora Ceres. (2005) pp. 333-349.

MARIONI JC, MASON CE, MANE SM, STEPHENS M, GILAD Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *2008*. 18: 1509–1517.

MAOR, R.; HASKIN, S.; LEVI-KEDMI, H.; SHARON, A.(2004) In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl Environ Microbiol*, v.70, p.1852-1854.

MARTINELLI, F.; URATSU, S.L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R.L.; PHU, M.L.; BRITTON, M.; BUFFALO, V.; FASS, J.; LEICHT, E.; ZHAO, W.; LIN, D.; D'SOUZA, R.; DAVIS, C.E.; BOWMAN, K.D.; DANDEKAR, A.M.(2012) Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. *PLoS ONE*, v.7, e3803. doi:10.1371/journal.pone.0038039.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D.M.; COSGROVE, D.J. (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. ***Plant Cell***, v.4, p.1425-1433.

MCQUEEN-MASON, S. AND COSGROVE, D.J. (1995) Expansin mode of action on cell walls (analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). ***Plant Physiology***, 107: 87–100.

MENEZES, M.D.; CURI, N.; MARQUES, J.J.; MELLO, C.R. & ARAÚJO, A.R. Levantamento pedológico e sistema de informações geográficas na avaliação do uso das terras em sub-bacia hidrográfica de minas gerais. *Ci. Agrotec.*, 33:1544-1553, 2009.

METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. ***Genome Research***, v. 15, p. 1767–1776, 2005.

METZKER, M.L. Sequencing Technologies – the next generation. ***Nature reviews***, v.11, p. 31-46, 2010. doi:10.1038/nrg2626.

MIAO Y, LAUN T, SMYKOWSKI A, ZENTGRAF U (2007) Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. ***Plant Mol Biol*** 65: 63–76

MUR LA, KENTON P, LLOYD AJ, OUGHAM H, PRATS E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 2008;59:501–20.

NEVES, M. F. (Coord.). O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto:MARKESTRAT (2011).

OH Y, DONOFRIO N, PAN H, COUGHLAN S, BROWN DE, ET AL. Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol* 9: R85, 2008.

OLIVEROS, J.C. Venny An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Web-server: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, 2007.

OSHLACK, A., M. D. ROBINSON ; M. D. YOUNG . 2010. From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology* 11 : 220.

PASCHOALATI, S.F.; LIETE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. 2008. Piracicaba: FEALQ.

PAVAN, A.; CALIXTO, M.C.; CARDOSO, S.C.; MENDES, B.M.J.; BERGAMIN FILHO A.; LOPES, J.R.S.; CARVALHO, C.R.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. *Scientia Horticulturae*, v. 113, p. 278-285, 2007.

PANDEY, S. P., AND SOMSSICH. I. E. (2009). The role of WRKY transcriptional factors in plant immunity. *Plant physiology* 150, 1648-1655.

PAPARU, P. DUBOIS, T. COYNE, (2009). Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*/ *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 71, Issues 4-6, October-December 2007, p. 149-157, ISSN 0885-5765

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627 p.

PATEL RK AND JAIN M (2012) NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLoS ONE* 7(2): e30619. doi:10.1371/journal.pone.0030619

PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. (2007) Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos, *RAPP*, v.15, p.129-198.

PENA, M.R., J.D. VENDRAMIM, A.L. LOURENÇÃO, N.M. SILVA, P.T. YAMAMOTO & M.S. GONÇALVES. 2008. Ocorrência da mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus*

woglumi Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) no Estado de São Paulo. **Revista de Agricultura**. 83: 61-65.

QUIRINO BF, NOH YS, HIMELBLAU E, AMASINO RM: (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci*, **5**(7):278-282

REINEKE, G.; HEINZE, B.; SCHIRAWSKI, J.; BUETTNER, H.; KAHMANN, R.; BASSE, C.W. (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. **Mol Plant Pathol**, v.9, p.339-355.

REINA-PINTO JJ, YEPHREMOV A (2009) Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol Biochem* 47: 540–549. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.01.004.
Resende, L.V.; Barreti, P.B.; MedeirosS, F.C.L.; Silva, D.D.; Pereira, R.B.; Lins, S.R.O.;

RIBEIRO, S. F. F.; AGIZZIO, A. P.; MACHADO, O. L. T.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; OLIVEIRA, M. A.; FERNANDES, K. V. S., CARVALHO, A. O.; PERALES J. E. A.; GOMES, V. M. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticulturae*, Maryland Heights,v. 111, p. 399-405, 2007.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G.(2011) Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE SALICYLATE Antagonism. **Annu Rev Phytopathol**, v.49,p.317-43.

ROUGEMONT, J.; AMZLLAG, A.; ISELI, C.; FARINELLI, L.; XENARIOS, I.; NAEF, F. Probabilistic base calling of Solexa sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 431-443, 2008. doi:10.1186/1471-2105-9-431

ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba. Fealq/Fundecitrus. 2001.

RUMBLE, S.M.; LACROUTE, P.; DALCA, A.V.; FIUME, M.; SIDOW, A.; BRUDNO, M. SHRIMP: accurate mapping of short color-space reads. **PLoS Computational Biology**, v. 5, e1000386, 2009.

SAIBO, J.M. N. NELSON J. M. SAIBO, TIAGO LOURENÇO, MARIA MARGARIDA OLIVEIRA ANN BOT. (2009) February; 103(4): 609–623. Published online November 13. doi: 10.1093/aob/mcn227

SCHOULTIES, C.L.; CIVEROLO, E.L.; MILLER, J.W.; STALL, R.E.; KRASS, C.J.; POE, S.R.; DUCHARME, E.P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease**, v. 71, p. 388-395, 1987.

SCHUBERT, T. S.; SUN, X. (2003). Bacterial citrus canker. Plant Pathology, Circular 377. Florida Department of Agriculture and Conservation Services. Division of Plant Industry. 1996.

SCHININA, M. E., BARRA, D., BOSSA, F., CALABRESE, L., MONTESANO, L., CARRI, M. T., MARIOTTINI, P., AMALDI, F. AND ROTILIO, G. (1989) Primary structure from amino acid and cDNA sequences of two Cu, Zn superoxide dismutase variants from *Xenopus laevis*. Arch. Biochem. Biophys. 272, 507-515.

SILVA, A. C. R. da et al. Comparison of the genomes of two xanthomonas pathogens with differing host specificities. Nature, v. 417, n. 6887, p. 459-463, May 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/417459a>.

STALL, R.E., SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, v. 67, p. 581-585, 1983.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B. & METRAUX, J. P.(1997) Systemic acquired resistance. Ann Ver Phytopathol, v.35, p.235- 270.

STRICKLER, S.R.; BOMBARELY, A.; MUELLER, L.A. Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a non model plant species. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 257-266, 2012. doi: 10.3732/ajb.1100292

STOCK JB (2002) Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA.

STILLMARK, P. H. (1988). *Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. undeinigen anderen Euphorbiaceen.* (R. Kobert, Ed.). University of Dorpat, Estonia.

SIDDIQUE, S., ENDRES, S., ATKINS, J.M., SZAKASITS, D., WIECZOREK, K., HOFMANN, J., BLAUKOPF, C., URWIN, P.E., TENHAKEN, R., GRUNDLER, F.M.W., KREIL, D.P. AND BOHLMANN, H. (2009) Myo-inositol oxygenase genes are involved in the development of syncytia induced by *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. **New Phytologist**, 184, 457.

SUJON, S.; YOUFU, Z.; RUTH, E.; SORIA-GUERRA, S.; DANMAN, Z.; S. KORBAN (2011) Expression profiles of differentially regulated genes during the early stages of apple flower infection with *Erwinia amylovora* Advance Access publication

SUN, X.; STALL, R.E.; JONES, J.B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; DIXON, W.D.; SCHUBERT, T.S.; CHALOUX, P.H.; STROMBERG, V.K.; LACY, G.H.; SUTTON, B.D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease**, v. 88p. 1179-1188, 2004.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. **The botany of *Citrus* and its wild relatives**. In: Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (Ed.). The citrus industry. Berkeley: University of California, p. 190-430, 1967.

TAIZA, L. AND ZEIGER, E. (2009) Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed. 819p.

TANG, F. ; ABREU, V. K. G. ; SILVA, E. M. C. DA, Fatty acid profile and proximal composition of meat from rabbits fed diets containing coconut meal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (4): 778-784, 2009.

TAZIMA, Z.H.; NEVES, C.S.V.J.; YADA, I.F.U.; LEITE JR., R.P. Comportamento de clones de laranja 'Valência' na região norte do Paraná. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, p. 970-974, 2008.

THORDAL-CHRISTENSEN H (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*;6:351-357.

TOR, M., GORDON, P., CUZICK, A., EULGEM, T., SINAPIDOU, E., MERT-TURK, F., CAN, C., DANGL, J.L., AND HOLUB, E.B. (2004). Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 14, 993–1003

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. Compendium of citrus diseases. 2. ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, 2000. 92p.

TURCATTI, G.; ROMIEU, A.; FEDURCO, M.; TAIRI, A.P. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic acids research**, v. 36, p.25, 2008. doi: 10.1093/nar/gkn021.

UNCTAD United Nations Conference on Trade and Development. Citrus Fruit Market information in the commodities area. 2009. Disponível em: <http://unctad.org/infocomm/anglais/orange/characteristics.htm>. Acesso em: 15 ago.2011

VAN LOON LC, REP M, PIETERSE CM. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135–62.

VERNIÈRE, C.J; HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.; CIVEROLO, E.L.; ALVAREZ, A.M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 477-487, 1998.

XING-ZHENG FU, AND JI-HONG LIU (2013) Transcriptional Profiling of Canker-resistant Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* Osbeck) Constitutively Overexpressing a Spermidine Synthase Gene. Hindawi Publishing BioMed Research International. Article ID 918136.

ZHANG, J.; ZHOU, J-M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Mol Plant*, v.3, n.5, (2010) p.783-793.

ZUO, X. A., ZHAO, H. L., ZHAO, X. Y., GUO, Y. R., YUN, J. Y., WANG, S. K., AND MIYASAKA, T.: Vegetation pattern variation, soil degradation and their relationship along a grassland desertification gradient in Horqin Sandy Land, Northern China, *Environ. Geol.*, 58, 1227–1237, 2005

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.(2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Review Genetics*, v.10, p. 57–63. doi:10.1038/nrg2484.

WILHELM, B.T.; Marguerat, S.; Goodhead, I.; Bahler, J. Defining transcribed regions using RNA-Seq. **Nature protocols**, v. 5, p. 255-266, 2010.

WOLANIN P.M., THOMASON P.A., STOCK J.B. Histidine protein kinases: Key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 2002;3:REVIEWS3013. doi: 10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013.

YANG, S.; ZHANG, Q.; GUO, J.; CHARKOWSI, A.O.; GLICK, B.R.; IBERWE, A.M.; COORSEY, D.A.; YANG, C.H. (2007) Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Appl Environ Microbiol*, v.73, p.1079-1088.

YINPING G., FRANCISCO F. J.J.; AND NIAN WANG (2011) HrpG and HrpX Play Global Roles in Coordinating Different Virulence Traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* *MPMI* Vol. 24, No. 6. pp. 649–661. doi:10.1094/MPMI -09-10-0209. © 2011 The American Phytopathological Society