

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
P.P.G. BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

**Teresa Del Carmen Gabriel Cofre**

**Transcriptoma (RNA-seq) de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck)  
e Kumquat (*Fortunella* spp.) infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Araraquara

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
P.P.G. BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

**Teresa Del Carmen Gabriel Cofre**

**Transcriptoma (RNA-seq) de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck)  
e Kumquat (*Fortunella* spp.) infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira**  
**Coorientador: Prof. Dr. José Belasque Junior**

Araraquara

2013

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

C675t Cofre, Teresa Del Carmen Gabriel  
Transcriptoma (RNA-seq) de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Kumquat (*Fortunella* spp.) infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Teresa Del Carmen Gabriel Cofre. – Araraquara, 2013  
148 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Henrique Ferreira

Coorientador: José Belasque Júnior

1. Cancro cítrico. 2. Interação planta-patógeno. 3. Expressão gênica . 4. resistência I. Ferreira, Henrique, orient.. II. Belasque Júnior, José, coorient.. III. Título.

**CAPES: 40300005**

**DEDICO**

AS PESSOAS MAIS IMPORTANTES DE MINHA VIDA...

**MINHA 'PEQUENA' GRANDE FAMÍLIA:**

*Minha WONDER MÃE Carmen em quem vou sempre me espelhar;*

*Minha amada avó Therezinha tão cuidadosa com a família;*

*Meus lindos e especiais irmãos Rafael e Roberta, meus melhores amigos;*

*Meus super tios Gabriel e Sheila e minha princesinha priminha Duda;*

*Meu companheiro de todas as horas Ronaldo.*

*Dedico com amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Espero nas próximas linhas expressar a imensa gratidão que tenho por todos que caminharam junto comigo para a conclusão deste trabalho. O conhecimento que adquiri ao longo destes dois anos e meio de mestrado, vão muito além dos experimentos, disciplinas, seminários e artigos, o maior aprendizado foi conhecer dia a dia pessoas tão admiráveis, tantas histórias de vida, tantos exemplos de responsabilidade e comprometimento. “Levarei um pouco de todos e deixarei um pouco de mim”;

À Deus por iluminar meus caminhos;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara, pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao professor José Belasque Júnior pelas muitas oportunidades, orientação, profissionalismo e pela confiança. Obrigada pelos ensinamentos científicos, por sempre me incentivar e acreditar no meu trabalho. Meu crescimento profissional e intelectual dos últimos quatro anos com certeza são frutos de um trabalho em conjunto com você. Obrigada pelo seu otimismo e amizade em todos os momentos em que tive dificuldades;

Ao professor Henrique Ferreira por ter me aceitado como aluna de mestrado, pela orientação, e principalmente pela confiança. Obrigada por toda ajuda e disponibilidade ao longo deste período;

Ao professor Jesus Aparecido Ferro, um agradecimento especial, por ter me dado a oportunidade de participar deste projeto, pela orientação, por tanto aprendizado e conhecimentos científicos compartilhados. Obrigada por ter me acolhido na UNESP Jaboticabal, o Laboratório de bioquímica e biologia molecular (LBM) é uma ‘escola’ na qual tive o imenso prazer de trabalhar e conhecer;

À professora Maria Inês T. Ferro pelo apoio, coordenação do LBM, e por toda ajuda para a realização deste trabalho;

Aos bioinformatas Dr. Roberto Herai e ao Dr. Adriano Ferrasa pelas análises de bioinformática e pelo suporte. Obrigada em especial ao Dr. Roberto Herai, por toda ajuda e incentivo na reta final do trabalho, sempre muito disponível e paciente com todas as dúvidas;

A toda equipe do Centro de Recursos Biológicos e Genômicos (CREBIO), que forneceu o suporte computacional para as análises dos resultados. Agradecimento especial a Renata Tezza por toda ajuda e suporte técnico nesta fase tão importante do trabalho. A Agda, Mariza, Lúcia e Fátima, pelo ótimo convívio durante as análises;

Ao professor Alessandro Varani pela ajuda computacional e pelos esclarecimentos científicos durante as anotações dos dados;

À funcionária do departamento de tecnologia Camila Fernandes, pelo trabalho técnico da construção das bibliotecas de cDNA, pelo sequenciamento das amostras; e por sempre esclarecer nossas dúvidas sobre essas etapas;

Às “Xac Girls”, Mayara Murata e Juliana Cavallini, meus melhores presentes de mestrado. As pessoas com quem mais convivi nos últimos dois anos, e que dia a dia com muitos tijolinhos de aprendizado, desafios, conquistas, alegrias e até mesmo tristezas, construímos uma amizade sólida, de confiança e amor. Amigas com quem partilhei muitos momentos de trabalho intenso, sempre com bom humor e alto astral. O trabalho em equipe foi essencial para o andamento e evolução do projeto, e também para superar as dificuldades. O elo forte do “trio RNA-seq” foi para mim uma ferramenta essencial para a conclusão deste trabalho, obrigada parceiras !;

Aos meus queridos amigos do Fundo de defesa da citricultura (FUNDECITRUS) Fabrício José Jaciani e Tamiris Garcia por toda ajuda e suporte com os materiais para os experimentos. Ao ‘Jaci’ meu amigo tão querido um obrigada especial pela ajuda científica e pelos momentos de descontração, ‘Tami’ obrigada pela amizade e por sempre me acolher em sua casa nas muitas viagens até Araraquara;

Às queridas doutorandas e mestrandas do laboratório de genética de bactérias da FCFAR, Isabel, Amanda, Paula e Júlia, que me auxiliaram nos primeiros meses de disciplinas, e que apesar da distância nunca deixaram de ser pessoas importantes;

A todos os colegas do LBM, Gustavo Peron, Lucília, Claudênia, Flávia Campos, Larissa, Nayara, Rafael, Ana, Aline, Lúcia, Lucas, Flávia Carvalho, Juliana Vantini, Raquel, Gustavo, Miguel, Juan, Sônia e Elaine, por terem contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho e pelo agradável convívio;

Às minhas amigas Camila, Karen e Maya que foram minha família durante os anos que morei em Araraquara, obrigada pelo apoio e incentivo para iniciar o mestrado, amo vocês;

Às amigas Ana Carolina e Vanja de Jaboticabal por me acolherem com tanto amor e carinho nas muitas vezes que precisei, obrigada pela amizade;

Às amigas Vanessa, Isa e Natália pela amizade e apoio quando precisei ficar em Araraquara, foi sempre muito divertido estar na cia de vocês;

Aos meus parceiros, melhores amigos de Faculdade Lis e Danilo, que tive a sorte e prazer de reencontrar na pós-graduação da FCFAR, vocês sempre serão parte de minha história;

Aos amigos e agregados da República Jabuti de Ribeirão Preto onde passei tantos momentos de descontração e alegria;

Ao meu namorado Ronaldo por toda paciência, amor e carinho durante todo o mestrado e principalmente nos últimos meses, obrigada por toda ajuda com as planilhas do Excel, Amo você;

À minha amada mãe que nunca poupou esforços para que eu realizasse este mestrado, você é tudo e mais um pouco;

Aos meus irmãos pela amizade e cumplicidade, vocês são metade de mim;

Aos meus pets Billy, Toy e Melissa, que passaram tantas madrugadas acordados em minha cia enquanto escrevia a dissertação;

Ao FUNDECITRUS pelo auxílio financeiro e material de bancada para a realização dos experimentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa estudos concedida.

“Os momentos em que somos desafiados  
são os momentos que mais produzimos”  
Jesus Aparecido Ferro

## **Transcriptoma (RNA-seq) de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Kumquat (*Fortunella* spp.) infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

**RESUMO** - Dentre as diversas doenças que ocorrem na citricultura, o cancro cítrico é uma das principais, considerada economicamente importante e com impactos diretos e indiretos no setor citrícola mundial. O agente causal do cancro cítrico é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), a qual afeta uma ampla gama de espécies e variedades de citros. A variedade de laranja doce Valência (*Citrus sinensis*) é considerada moderadamente suscetível ao cancro cítrico e a Rutaceae Kumquat (*Fortunella* spp.), por outro lado, é considerada altamente resistente. Objetivando gerar informações acerca dos mecanismos moleculares que resultam em diferenças quanto à suscetibilidade de plantas a patógenos, no presente estudo fez-se uso de uma nova plataforma de sequenciamento de transcriptoma (RNA-seq) para análise da expressão gênica de Valência e Kumquat após infecção por Xac nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Foram identificados 2.953 e 4.111 transcritos induzidos em Valência e Kumquat, respectivamente. Dos transcritos reprimidos Kumquat apresentou 11.041 e Valência 1.930. Na comparação da expressão gênica temporal, Kumquat apresentou muitos transcritos induzidos em comum em todos os tempos de infecção, alguns deles relacionados à percepção de sinais (receptores do tipo quinase) e também envolvidos na defesa de plantas [(como proteínas relacionadas à patogênese (PRs)]. Foram identificados exclusivamente em Kumquat transcritos que codificam para a proteína germin, possivelmente envolvida na resposta de defesa à Xac. Nas comparações entre espécies, em Kumquat observou-se alta expressão de proteínas relacionadas à síntese de metabólitos secundários, como alcaloides e monoterpenos. Em Valência, nos tempos iniciais de 24 e 48 horas após a inoculação de Xac, observou-se alta expressão de cisteína proteinases, as quais comumente estão associadas à degradação e reconstrução de proteínas em resposta a diferentes estímulos. Para ambas as espécies foram identificados transcritos reprimidos que codificam proteínas do sistema de fotossíntese em 24 e 48 horas. No presente estudo demonstraram-se diferenças a nível transcricional na resposta a infecção por Xac entre as espécies Valência e Kumquat. A elucidação dos mecanismos utilizados em respostas de defesa de plantas a patógenos permitirá a identificação de genes candidatos para obtenção de plantas mais resistentes ao cancro cítrico.

**Palavras chave:** Cancro cítrico, interação planta-patógeno, expressão gênica, resistência.



**Transcriptome (RNA-seq) of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and Kumquat (*Fortunella* spp.) infected by *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

**ABSTRACT** - Among the various diseases that occur in *Citrus* spp., citrus canker is a serious disease, considered economically important with direct impact on the citrus sector. The causal agent of citrus canker is the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), and it affects a wide range of *Citrus* spp.. Sweet orange Valencia *Citrus sinensis* is considered moderately susceptible to *Citrus* canker and the Rutaceae Kumquat *Fortunella* spp. is considered highly resistant. To understand the molecular mechanisms that distinguish plant resistance in plant pathogen interaction, the present study used a new transcriptome sequencing platform (RNA-seq) to analyze gene expression of Valencia and Kumquat after infection by Xac post 24, 48 and 72 hours. We identified 2,953 and 4,111 transcripts induced in Valencia and Kumquat, respectively. Among repressed transcripts Kumquat showed 11,041 and Valencia 1,930. In the comparison of temporal expression between the evaluated times, Kumquat presented many transcripts induced in common at all times of infection that are related to signal perception, as receptors kinase and plant defense proteins as pathogenesis related proteins (PRs). Were found exclusively in Kumquat transcripts that encode for protein Germin possibly involved in defense response to Xac. In the analysis between species, for Kumquat were found a high expression of proteins related to the synthesis of secondary metabolites, such as alkaloids and monoterpenes. These products may be mediated by biotic factors such as pathogen attack, so the high expression of genes related to metabolic production of these can be related to plant defense. Valencia presented at 24 and 48 hours high expression of cysteine proteinases. These are involved in reconstruction and degradation of proteins in response to different stimuli and also perform the function of removing misfolded proteins, or act as host defense proteins directly degrading the attacker releasing toxins and enzymes. For both species were identified suppressed transcripts encoding proteins of the photosynthetic system in 24 and 48 hours. This study showed differences in the transcriptional response to infection by Xac between species. The elucidation of the mechanisms used in the defense response may generate information for the identification of potential candidate genes that can be used to generate plants resistance to citrus canker.

**Key-words:** Citrus canker, plant-pathogen interaction, gene expression, resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Sintomas de cancro cítrico na forma de lesões em folha, ramo e fruto de citros.....	22
Figura 2. Etapa da clusterização na plataforma Illumina/Solexa. ....	29
Figura 3. Pipeline para construção de um banco de dados não redundante de transcriptoma de plantas da espécie <i>Citrus</i> spp. para estudos de genotipagem.....	41
Figura 4. Pipeline para análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento...	43
Figura 5. Evolução do processo infeccioso observado em Laranja Valência ( <i>Citrus sinensis</i> ), Kumquat Nagami ( <i>Fortunella margarita</i> ) e Kumquat Meiwa ( <i>F. crassifolia</i> ) após inoculação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> por infiltração dos tecidos foliares com suspensão bacteriana a $10^4$ UFC/mL. ....	46
Figura 6. Gráficos dos eletroferogramas com os picos 18S e 28S e eletroforese capilar com as bandas ribossomais 28S e 18S das amostras de RNA total de Valência .....	48
Figura 7. Gráficos dos eletroferogramas com os picos 18S e 28S e eletroforese capilar com as bandas ribossomais 28S e 18S das amostras de RNA total de Kumquat.....	48
Figura 8. Número de transcritos induzidos e reprimidos diferencialmente expressos (TDEs) nas espécies Laranja Valência (V) ( <i>Citrus sinensis</i> ) e Kumquat (K) ( <i>Fortunella</i> spp.) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após inoculação com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	52
Figura 9. Processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em laranja Valência ( <i>Citrus sinensis</i> ) no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	54
Figura 10. Processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em Kumquat ( <i>Fortunella</i> spp.) no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	55
Figura 11. Processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em laranja Valência ( <i>Citrus sinensis</i> ) no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	56

Figura 12. Processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em Kumquat ( <i>Fortunella</i> spp.) no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	57
Figura 13. Processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em laranja Valência ( <i>Citrus sinensis</i> ) no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	58
Figura 14. Processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em Kumquat ( <i>Fortunella</i> spp.) no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	59
Figura 15. Modelo de interação planta-patógeno com os sistemas PTI e ETI para ativar a imunidade em plantas contra bactérias patogênicas.....	62
Figura 16. Diagramas de Venn da expressão gênica temporal (24, 48 e 72 horas após inoculação com Xac) de Valência (A) e Kumquat (B), ilustrando os transcritos que foram induzidos em comum ou transcritos que são exclusivos de cada tempo.	63
Figura 17. Diagramas de Venn da expressão gênica temporal (24, 48 e 72 horas após inoculação com Xac) de Valência (A) e Kumquat (B), ilustrando os transcritos que foram reprimidos em comum ou transcritos que são exclusivos de cada tempo. .....	63
Figura 18. Diagramas de Venn da expressão gênica dos transcritos induzidos em comum ou exclusivos entre as espécies Valência e Kumquat na comparação tempo a tempo 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) após a inoculação com Xac, e da expressão gênica dos transcritos reprimidos em comum ou exclusivos entre as espécies Valência e Kumquat na comparação tempo a tempo 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F) após a inoculação com Xac.....	69
Figura 19. Esquema de pontos cruzados da via biossintética de vitaminas em plantas.....	72
Figura 20. Via biossintética de relacionamento entre produtos antimicrobianos naturais de plantas.....	73

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES APÊNDICE A

Figura 1. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (572) na espécie Valência 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte ( <i>Cut-off</i> ) de 5 transcritos. ....	105
---	-----

Figura 2. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (622) na espécie Kumquat 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 5 transcritos. .... 106

Figura 3. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (1426) na espécie Valência 48 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 15 transcritos. .... 107

Figura 4. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (1117) na espécie Kumquat 48 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 10 transcritos. .... 108

Figura 5. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (955) na espécie Valência 72 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 10 transcritos. .... 109

Figura 6. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (2342) na espécie Kumquat 72 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 25 transcritos. .... 110

Figura 7. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (178) na espécie Valência 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 5 transcritos. .... 111

Figura 8. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (2202) na espécie Kumquat 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 20 transcritos. .... 112

Figura 9. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (1661) na espécie Valência 48 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 15 transcritos. .... 113

Figura 10. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (3998) na espécie Kumquat 48 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 40 transcritos. .... 114

Figura 11. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (91) na espécie Valência 72 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 1 transcritos. .... 115

Figura 12. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (4841) na espécie Kumquat 72 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 50 transcritos. .... 116

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Amostras de RNA total de Laranja Valência (*Citrus sinensis*) e Kumquat (*Fortunella* spp.) extraídas 24, 48 e 72 horas após inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (VI e KI para Valência e Kumquat, respectivamente) ou infiltração com água (VC e KC para Valência e Kumquat, respectivamente).....37

Tabela 2. Populações bacterianas (Log de UFC/mL) em Laranja Valência (*Citrus sinensis*), Kumquat Nagami (*Fortunella margarita*) e Kumquat Meiwa (*F. crassifolia*) após inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por infiltração dos tecidos foliares com suspensão bacteriana a  $10^4$  UFC/mL. ....46

Tabela 3. Concentração, relação 260/280 e 260/230 e números íntegros de RNAs (RINs) das amostras de RNA total extraídas de folhas de Valência e Kumquat e utilizadas no presente trabalho.....49

Tabela 4. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-seq (Illumina) das bibliotecas de cDNA de tecido foliar de Laranja Valência (*Citrus sinensis*) e Kumquat (*Fortunella* spp.) após inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) por infiltração dos tecidos foliares com suspensão bacteriana a  $10^8$  UFC/mL. ....50

Tabela 5. Transcritos induzidos em comum em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 h) na espécie Kumquat.....64

Tabela 6. Transcritos induzidos em comum em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 h) na espécie Valência. ....67

Tabela 7. Transcritos induzidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 24 horas após a inoculação com Xac. ....70

Tabela 8. Transcritos induzidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 48 horas após a inoculação com Xac. ....76

Tabela 9. Transcritos induzidos, com os menores *p*-valores, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 72 horas após a inoculação com Xac. ....80

Tabela 10. Transcritos reprimidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 24 horas após a inoculação com Xac. ....84

Tabela 11. Transcritos reprimidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 48 horas após a inoculação com Xac. ....85

Tabela 12. Transcritos reprimidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 72 horas após a inoculação com Xac. ....86

### LISTA DE TABELAS APÊNDICE B

Tabela 1. Transcritos relacionados à resistência induzidos em Kumquat (*Fortunella* spp.) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação. .... 118

Tabela 2. Transcritos relacionados à resistência reprimidos em Kumquat (*Fortunella* spp.) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação. .... 119

Tabela 3. Transcritos relacionados à resistência induzidos em Valência (*Citrus sinensis*) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação. .... 121

Tabela 4. Transcritos relacionados à resistência reprimidos em Valência (*Citrus sinensis*) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação. .... 121

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

µL - microlitro

°C - Grau Celsius

ACC - 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase

AFFYM - Affimetrix

AP2/ERF - APETALA2/Ethylene Responsive Factor

BBE- Berberine bridge enzyme

CAGE - cap analysis gene expression

CC - coiled-coil

cDNA – complementary DNA

cm - centímetro

CMV - Cucumber mosaic virus

CREBIO - Centro de Recursos Biológicos e Genômicos

CVC - clorose variegada dos citros

DAI - Dias após inoculação

DNA - deoxyribonucleic acid

ESTs - Expressed Sequence Tags

ETI - effector-triggered immunity

FAPESP - Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo

FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FDR - False Discovery Rate

FUNDECITRUS - Fundo de defesa da Citricultura

g - gramas

Gene avr - gene de avirulência

Gene R - gene de resistência

GO – gene ontology

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HLB - *Huanglonbing*

HR – hypersensitive response

INF - Infinito

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry  
KC - Kumquat controle  
KI - Kumquat infectada  
LBM - Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular  
MAMPs - microbe-associated molecular pattern  
MAPK - Mitogen-activated protein kinases  
ml - mililitros  
MPSS - massively parallel signature sequencing  
mRNA –messenger RNA  
NA - Nutriente Ágar  
NBS-LRR - nucleotide binding central leucine rich repeat  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
ND - Não Detectado  
ND-1000 - NanoDrop  
nm - nanômetros  
PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns  
pb - Pares de base  
PCR - polymerase chain reaction  
pmol - pico mol  
PRGdb - Plant Resistance Gene database  
PRR - Pattern recognition receptors  
PRs - Pathogenesis-related (PR) proteins  
PTI - PAMP-triggered immunity  
pv. - patovar  
RBOH - respiratory burst oxidase homologue  
RIN – RNA integrity number  
RLK - receptor-like kinases  
RLP - receptor-like proteins  
RNA - Ribonucleic acid  
ROS – reactive oxygen species  
Rubisco - ribulose bifosfato carboxilase oxigenase  
SAGE - serial analysis of gene expression  
SNP - single-nucleotide polymorphism  
spp. - espécie



Subsp. - Subespécie

TDEs - Transcritos diferencialmente expressos

TMV - Tobacco mosaic virus

UCSD - University of Califórnia San Diego

UFC- Unidades formadoras de colônia

UNESP - Universidade Estadual Paulista

USDA - United States Department of Agriculture

VC - Valência controle

VI - Valência infectada

Xac - *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Xag - *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES APÊNDICE A .....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE TABELAS APÊNDICE B .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
CAPÍTULO 1 .....	18
1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
2.1 Citricultura .....	20
2.2 Cancro cítrico .....	21
2.3 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	23
2.4 Interação patógeno-hospedeiro e genes de resistência .....	24
2.5 Transcriptoma e RNA-seq .....	26
2.6 Resistência de citros e relativos ao cancro cítrico.....	30
3 OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo geral .....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.1 Ensaio biológicos .....	34
4.1.1 Material vegetal e estirpe bacteriana .....	34
4.1.2 População bacteriana e desenvolvimento de sintomas após inoculação com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	34
4.1.3 Extração de RNA total das folhas .....	35

4.2 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento .....	38
4.3 Análises dos dados.....	39
4.3.1 Construção de um banco de dados de transcriptoma de <i>Citrus</i> spp. ....	40
4.3.2 Análise da expressão gênica .....	42
4.3.3 Anotação de sequências e localização de domínios protéicos.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
5.1 Desenvolvimento do cancro cítrico em Laranja Valência ( <i>Citrus sinensis</i> ), Kumquat Nagami ( <i>Fortunella margarita</i> ) e Kumquat Meiwa ( <i>F. crassifolia</i> ).....	45
5.2 Concentração e integridade do RNA total extraído dos tecidos foliares após infecção por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	47
5.3 Bibliotecas de cDNA e sequenciamento (RNA-seq).....	49
5.4 Expressão gênica global e temporal de Valência e Kumquat após a inoculação com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	51
5.5 Categorização funcional e anotação dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs) .....	53
5.6 Transcritos diferencialmente expressos na comparação tempo a tempo entre Valência e Kumquat.....	68
5.7 Validação dos resultados.....	89
6 CONCLUSÕES .....	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE A.....	104
APÊNDICE B.....	117
CAPÍTULO 2 .....	122
High resolution transcriptome of sweet orange Valencia ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck) plants infected with <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	122

# **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

O citros é uma importante cultura e o suco de laranja destaca-se como uma *commoditie* agrícola. O Estado de São Paulo constitui-se como o maior polo citrícola do mundo, sendo responsável por 53% da produção mundial de suco de laranja (NEVES, 2010). O cancro cítrico é uma doença quarentenária e apresentou em 2012 sua maior incidência na história da citricultura paulista, quando foram detectados 1,39% de talhões com a doença em todo estado (FONSECA, 2012). O agente causal do cancro cítrico, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, encontra-se distribuído em dezenas de países localizados na Oceania, Ásia e América, infectando plantas da família Rutaceae (CIVEROLO, 1984). 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 entanto, alguns estados da região Sul, como o Paraná, adotam práticas de manejo da doença, como a pulverização de cúpricos e a implantação de cortinas quebra-vento (LEITE JÚNIOR & MOHAN, 1990).

Nos programas de melhoramento de citros a transformação genética é uma ferramenta biotecnológica que pode ser empregada para a introdução de genes que possam conferir resistência a fatores bióticos e abióticos em espécies e variedades de copa e de porta-enxerto (MACHADO et al., 2011). A identificação de genes do hospedeiro pela expressão de transcritos pode ser utilizada para esclarecer os mecanismos de resistência das plantas a patógenos (DE SOUZA et al., 2007a; DONG et al., 2010; FORMENT et al., 2005). Estas respostas moleculares podem variar de planta para planta, ao longo do tempo, assim como podem não estar diretamente envolvidas na interação patógeno-hospedeiro. Por isso, é importante identificar alterações transcricionais numa espécie vegetal sob estresse de patogenicidade e desvendar os elementos moleculares que são específicos para a planta (FU et al., 2012). Sequenciadores de nova geração e suas plataformas possibilitam um novo método de sequenciamento em larga escala de transcriptomas, denominado RNA-seq (HASS et al., 2012). Por meio desse método pode-se alcançar níveis sem precedentes de precisão e especificidade na identificação e quantificação de genes diferencialmente expressos em diferentes amostras biológicas (KIM et al., 2011).

O controle de doenças de plantas por resistência varietal constitui-se num dos métodos de controle mais efetivos e de baixo custo que a pesquisa pode oferecer à agricultura moderna. Portanto, a comparação do transcriptoma de variedades com níveis diferentes de resistência ao cancro cítrico, como Kumquat (*Fortunella* spp.) e Valência (*Citrus sinensis*), poderá contribuir na identificação de genes relacionados com as vias de defesa de plantas, facilitando assim a obtenção de variedades que sejam resistentes ao cancro cítrico para uso comercial.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Citricultura

Os citros são cultivados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As áreas de maior produção são encontradas nas Américas, liderada pelo Brasil e em segundo os Estados Unidos da América; na bacia do Mediterrâneo, liderada pela Espanha; e nas regiões sul e leste da Ásia, liderada pela China. Para esses países produtores o suco de laranja é uma importante *commoditie* agrícola (TALON et al., 2008). O Brasil é responsável por mais da metade de todo suco de laranja produzido no mundo (em 2012 produziu aproximadamente 19 milhões de toneladas de laranja) e mantém a posição de maior produtor mundial de laranja e maior exportador de suco de laranja (FAO, 2013). O Estado de São Paulo é responsável por 80% da produção nacional de laranja e 53% da produção mundial de suco, constituindo-se como maior polo citrícola do mundo (NEVES, 2010).

Apesar da cultura de citros ser de grande potencial produtivo, diversas doenças ocorrem nessa cultura limitando a produtividade dos pomares comerciais (FEICHTENBERGER, 2005). No Brasil em 2003, US\$ 141 milhões foram gastos com defensivos agrícolas, além dos prejuízos com queda de produção e perda de frutos (NEVES & LOPES, 2005). O aumento na incidência de pragas e doenças pode comprometer seriamente a economia e a competitividade de um dos setores agroindustriais mais importantes do país. O *Huanglongbing* (HLB ou *Greening*) é considerada uma das piores doenças da citricultura mundial. O parque citrícola

paulista apresentou 0,87% de plantas com HLB em 2009 (BELASQUE et al., 2010). Outras doenças economicamente importantes para a citricultura paulista e brasileira, além do cancro cítrico, são a pinta preta dos citros, a clorose variegada dos citros (CVC) e a leprose (FEICHTENBERGER, 2005).

## 2.2 Cancro cítrico

O cancro cítrico asiático é também conhecido como cancrose A (GOTTWALD et al., 2001; GOTTWALD et al., 2002; STALL & SEYMOUR, 1983). Seu agente causal, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), está distribuída em dezenas de países localizados na Oceania, Ásia e América, infectando plantas da família das Rutaceae (CIVEROLO, 1984). O provável centro de origem dessa doença é a Ásia, onde é endêmica (KOIZUMI, 1985). Trata-se de uma doença quarentenária e o comércio mundial de cítricos é regulado por medidas de exclusão e erradicação que visam impedir a entrada do patógeno em áreas livres da doença (CIVEROLO, 1985; GOTTWALD et al., 2001; SCHOULTIES et al., 1987). A primeira ocorrência dessa doença no Brasil foi em 1957 no município de Presidente Prudente em São Paulo (BITANCOURT, 1957). Medidas de exclusão e erradicação foram adotadas de imediato e foi iniciada uma campanha de erradicação do cancro cítrico (GIMENES-FERNANDES et al., 2000). Apesar dos esforços iniciais, já em 1957 a doença foi encontrada nos Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná (AMARAL, 1957). Atualmente o cancro cítrico está presente nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima.

Plantas infectadas por Xac podem apresentar lesões em todos os órgãos da parte aérea (SCHUBERT & SUN, 1996). Os sintomas constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, aspecto eruptivo e rodeadas por anasarca, presentes em folhas, ramos e frutos (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 2001) (Figura 1). Nas folhas e frutos é comum o aparecimento de um halo amarelo circundando a área necrosada. Em altas severidades pode ocorrer desfolha, queda de frutos e seca de ramos, sendo mais comuns em hospedeiros mais suscetíveis (GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989). A doença pode comprometer a produção e frutos com sintomas têm seu valor comercial

reduzido (RYBAK et al., 2009). Plantas cítricas afetadas constituem-se na principal fonte de inóculo do patógeno já que a sobrevivência da bactéria é curta em qualquer outro substrato (GRAHAM et al., 1987; GRAHAM et al., 1989; GRAHAM et al., 2000).



Figura 1. Sintomas de cancro cítrico na forma de lesões em folha, ramo e fruto de citros. Fonte: FUNDECITRUS.

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). Constatada a presença de cancro cítrico as plantas devem ser eliminadas com a adoção de um raio mínimo de trinta metros a partir das plantas sintomáticas. As plantas contidas no raio, consideradas com risco 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 cúpricos e implantação de cortinas quebra-vento (LEITE JÚNIOR & MOHAN, 1990).



### 2.3 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O agente etiológico do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, bastonetiforme e com flagelo polar. As colônias produzem polissacarídeos extracelulares tornando-as viscosas e possuem formato côncavo com pigmentação amarela (BEDENDO, 1995; BRUNINGS & GABRIEL, 2003). Sob condições naturais de infecção a disseminação da bactéria ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas e de chuvas associadas com ventos, e a disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989). Atividades culturais como poda, colheita e pulverizações podem disseminar a bactéria entre plantas e pomares (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1988). A infecção ocorre em tecidos jovens (GOTO, 1990; GRAHAM et al., 1992). A bactéria penetra na planta por aberturas naturais como estômatos, ou por ferimentos provocados por espinhos ou pragas, como a larva minadora, colonizando os espaços intercelulares, durante períodos de crescimento do hospedeiro (AMORIM, 1995; LEE, 1921).

Três diferentes espécies de *Xanthomonas* estão associadas a doenças dos citros (SCHOULTIES et al., 1987). *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, é a espécie mais comum de *Xanthomonas* em citros, com ampla gama de hospedeiros, sendo endêmica em algumas regiões da Ásia e América. O cancro cítrico B, ou cancrose B, relatado apenas na Argentina, Uruguai e Paraguai, possui uma gama mais restrita de hospedeiros, sendo encontrado, em condições naturais de infecção, somente em *Citrus limon* e *C. aurantifolia*. O cancro cítrico C, ou cancrose C, está limitado ao Estado de São Paulo e é descrito como patogênico apenas à *C. aurantifolia*. Esses dois últimos tipos de cancroses (B e C) são induzidos por *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. Por último tem-se a mancha bacteriana dos citros cujo agente causal é a bactéria *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Essa doença ocorre em viveiros na Flórida comumente em plantas de citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) (HARTUNG & CIVEROLO, 1989). Recentemente essa bactéria foi relatada em plantas de citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) em São Paulo (JACIANI et al., 2009). Há também dois outros tipos bacterianos, formados por isolados da espécie *X. citri* com patogenicidade

diferenciada e restrita basicamente a *C. aurantifolia*; o primeiro encontrado no sudoeste asiático (tipo A\*) (VERNIÈRE et al., 1998) e o segundo na Flórida (tipo A<sup>w</sup>) (SUN et al., 2004).

## 2.4 Interação patógeno-hospedeiro e genes de resistência

Em patossistemas vegetais a defesa basal ou de não hospedeiro, chamada de “*PAMP-triggered immunity*” (PTI), acontece logo após o contato com o patógeno. Padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou a micróbios (MAMPs) são reconhecidos por receptores específicos de padrões (PRR) localizados na membrana das células do hospedeiro. Esse mecanismo é considerado a primeira linha de imunidade inata em plantas (CUI et al. 2009; HAMMOND-KOSACK et al., 2007; ZHANG & ZHOU, 2010). A resistência específica de hospedeiro, chamada de “*effector-triggered immunity*” (ETI), é baseada na interação específica entre efetores do patógeno e produtos de genes de resistência (genes R) de acordo com a Teoria Gene a Gene (BOLLER & FELIX, 2009; CUI et al. 2009).

A interação patógeno-hospedeiro é denominada “incompatível” quando o hospedeiro apresenta mecanismos de defesa ativados e o patógeno não consegue desenvolver-se em seu interior (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996). Essa ação pode ser caracterizada como ETI e no sítio de infecção e tecidos adjacentes ocorre uma reação de hipersensibilidade (HR – *hypersensitive response*). Essa reação resulta em morte celular programada dos tecidos vegetais atacados pelo patógeno, restringindo assim o crescimento do mesmo (CARVALHO, 2006; KHALAF et al., 2011; STASKAWICZ et al., 1995; VANTINI, 2007). Nesse caso não há indução de sintomas da doença. Por outro lado, interações “compatíveis” envolvem tanto a multiplicação do patógeno à custa do hospedeiro quanto, na maioria dos casos, a indução dos sintomas da doença. A ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode ocorrer tanto nas interações compatíveis quanto incompatíveis, mas dá-se em magnitude e velocidade diferentes para cada tipo de interação. A ativação da defesa do hospedeiro ocorre após o reconhecimento do patógeno. Em muitas interações entre plantas e patógenos biotróficos, esse reconhecimento envolve um par de genes complementares presentes nos dois organismos – genes

de resistência (genes R) no hospedeiro e genes de avirulência (*avr*) no patógeno (BOYES et al., 1996; FLOR, 1971; STASKAWICZ et al., 1995).

A maioria dos genes R codifica para proteínas citoplasmáticas contendo um *nucleotide binding site* (NBS) e um domínio carboxil rico em leucina (*leucine rich repeat-LRR*), geralmente denominados genes NBS-LRR (BAKER et al., 1997; TOR et al., 2004). Sequências de genes de resistência a doenças de plantas mostram que, apesar de conferirem resistência a vírus, bactérias e fungos, os mesmos contêm sequências similares e codificam para peptídeos com semelhanças estruturais (KANAZIN et al., 1996). Na tentativa de identificação de genes R putativos em etiqueta de sequências expressas (ESTs – *Expressed Sequence Tags*) de citros Guidetti-Gonzalez & Carrer (2007) encontraram 1.300 leituras semelhantes a 137 genes R de diferentes classes (NBS-LRR, RLP – *receptor-like proteins*, RLK – *receptor-like kinases* e *cytoplasmic Ser/Thr kinases*). Infelizmente as sequências encontradas por esses autores não foram ainda depositadas em bancos de acesso público.

Muitas vias metabólicas são estimuladas após a ativação do sistema imune inato PTI e ETI das plantas. As vias do ácido salicílico, ácido jasmônico e do etileno resultam da ativação de fatores de transcrição de genes de defesa (GRANT & LAMB 2006). A identificação de genes do hospedeiro, por meio da expressão de transcritos, é fundamental para melhor compreensão dos mecanismos de resistência das plantas a patógenos (DE SOUZA et al., 2007a; DONG et al., 2010; FORMENT et al., 2005). Vários autores, por meio de diferentes técnicas como hibridação subtrativa supressiva, microarranjos e PCR quantitativa em tempo real, utilizaram bibliotecas de cDNA produzidas a partir de RNAs mensageiros (mRNA) isolados de plantas de variedades suscetíveis e resistentes infectadas por um mesmo patógeno. Nesses estudos as diferentes populações de mRNA foram analisadas quanto aos genes que se expressaram mais, ou que se expressaram exclusivamente, em uma população quando comparada com outra, e dessa forma buscou-se identificar genes relacionados à defesa em interações patógeno-hospedeiro compatíveis ou incompatíveis (AN & MOU, 2012; CERNADAS et al., 2008; DE SOUZA et al., 2007b; KHALAF et al., 2011). Portanto, o estudo da expressão gênica diferencial em plantas tem permitido o conhecimento e identificação de genes potencialmente envolvidos com resistência a patógenos e suas respectivas vias metabólicas (KIM et al., 2011).

## 2.5 Transcriptoma e RNA-seq

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos (mRNAs, RNAs não codificados e micro RNAs) em um tecido, e sua quantificação é específica para um estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica (WANG et al., 2009). O processo de evolução das plantas envolve alterações celulares, moleculares, fisiológicas e bioquímicas para se adaptar e sobreviver a condições adversas, como estresse biótico causado por patógenos. As respostas moleculares nos perfis das plantas a nível transcricional têm demonstrado serem cruciais para o estabelecimento de um conjunto de mecanismos de defesa contra patógenos invasores (FU et al., 2012). Como exemplo, no trabalho de Cernadas et al. (2008), foram identificadas alterações no transcriptoma de laranja doce após infecção por Xac, tendo sido observadas mudanças nos perfis transcricionais de defesa, parede celular e genes relacionados ao crescimento celular. A principal mudança transcricional foi observada para genes relacionados à resistência a doenças, defesa e repostas ao estresse. Evidências, como as observadas nos trabalhos de Cernadas et al. (2008) e Fu et al. (2012), tem mostrado que a expressão de um amplo espectro de genes é induzida por invasão microbiana em várias plantas. Os produtos desses genes podem proteger diretamente a planta hospedeira contra danos causados por agentes patogênicos, ou atuar como moléculas reguladoras pela percepção de sinais de estresse e transmissão para os alvos jusantes. Esses genes constituem-se numa rede que desempenha papel-chave no combate contra patógenos. Por isso, é importante identificar alterações transcricionais numa espécie vegetal sob estresse de patogenicidade e desvendar os elementos moleculares que são específicos para a planta (FU et al., 2012).

No estudo de transcriptomas podem ser utilizadas diferentes tecnologias: a) macro e microarranjos, técnicas essas baseadas na hibridização de sondas; b) sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de cDNA (SAGE, CAGE e MPSS); e c) análise de fragmentos de cDNA amplificados via PCR (WANG et al. 2009). Pela técnica de microarranjo Khalaf et al. (2011) compararam os perfis de expressão de folhas de Kumquat (*Fortunella margarita* – espécie resistente a Xac, seis, 24 e 72 horas após inoculação) e os perfis de folhas não inoculadas. Nesse trabalho foram identificados muitos componentes de reações incompatíveis, como

espécies reativas de oxigênio e morte celular programada. Proteínas relacionadas à resistência, como quitinase e PR1, mostraram-se diferencialmente expressas seis horas após inoculação de Xac. Em outro trabalho, Fu et al. (2012) utilizaram microarranjos para comparar os transcriptomas de Kumquat Meiwa (*Fortunella crassifolia*) e laranja doce Newhall (*Citrus sinensis*), espécies com diferenças de suscetibilidade ao cancro cítrico. Foram identificados 794 genes de Meiwa e 1.094 genes de Newhall como envolvidos na resposta à infecção. Esses números foram consistentes com a magnitude do desenvolvimento da doença em cada espécie. Meiwa demonstrou maior expressão de diversos genes envolvidos em resposta a estímulos abióticos (receptores de quinases) e de defesa, comparado com Newhall. Em Newhall muitos genes relacionados à fotossíntese foram significativamente reprimidos.

Algumas limitações na técnica de microarranjos, como a disponibilidade de um banco de dados sólido e a ocorrência de hibridação cruzada, dificultam a análise da expressão gênica. As técnicas de sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de cDNA também possuem desvantagens, pois há uma necessidade de grande quantidade de mRNA, e apenas uma parte dos transcritos é analisada e geralmente suas isoformas são indistinguíveis umas das outras (WANG et al. 2009). Novas tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala (*high-throughput*), denominadas tecnologias de sequenciamento de nova geração, promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de fragmentos em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, as principais são: o pirosequenciamento da Roche/454, sequenciamento por síntese da Illumina/Solexa e sequenciamento por ligação da Life Technologies/SOLiD (JAIN, 2011, WANG et al. 2009). Sequenciadores de nova geração e suas plataformas possibilitaram um novo método de sequenciamento de bibliotecas de cDNA, denominado RNA-seq (HAAS, 2012). As tecnologias de sequenciamento são basicamente divididas nas seguintes etapas: preparação da amostra, sequenciamento, captura da imagem e a análise dos dados. O que distingue uma tecnologia da outra são as combinações específicas de protocolos que determinam o tipo de dados gerados a partir de cada plataforma. Essas diferenças dos dados gerados representam desafios na comparação das plataformas em relação à qualidade das sequências e ao custo benefício (METZKER, 2010).

Essas novas plataformas são mais eficientes que o método de Sanger por possuírem como características comuns o poder de gerar muito mais informações, com uma grande economia de tempo e custo por nucleotídeo sequenciado. Essas tecnologias fazem uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, eliminando as etapas de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis (WANG et al. 2009). O sequenciamento dos fragmentos no protocolo de RNA-Seq da Illumina/Solexa pode ser *single-read* ou *paired-end*, ou seja, uma população de mRNA é convertida em uma biblioteca fragmentada ao acaso de cDNA com adaptadores ligados a uma (*single-read*) ou em ambas (*paired-end*) as extremidades. Em seguida, ocorre uma amplificação por PCR a partir de uma extremidade ou de ambas as extremidades (JAIN, 2011).

A superfície de clonagem (*flow cell*) é dividida em oito linhas, 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 DNA 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. No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. 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". No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. 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 sequenciamento (Figura 2). Etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada cluster. A alta densidade dos 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. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada. 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. Em geral, leituras de 50 a 100 bases são obtidas de cada cluster (SHENDURE & JI, 2008).

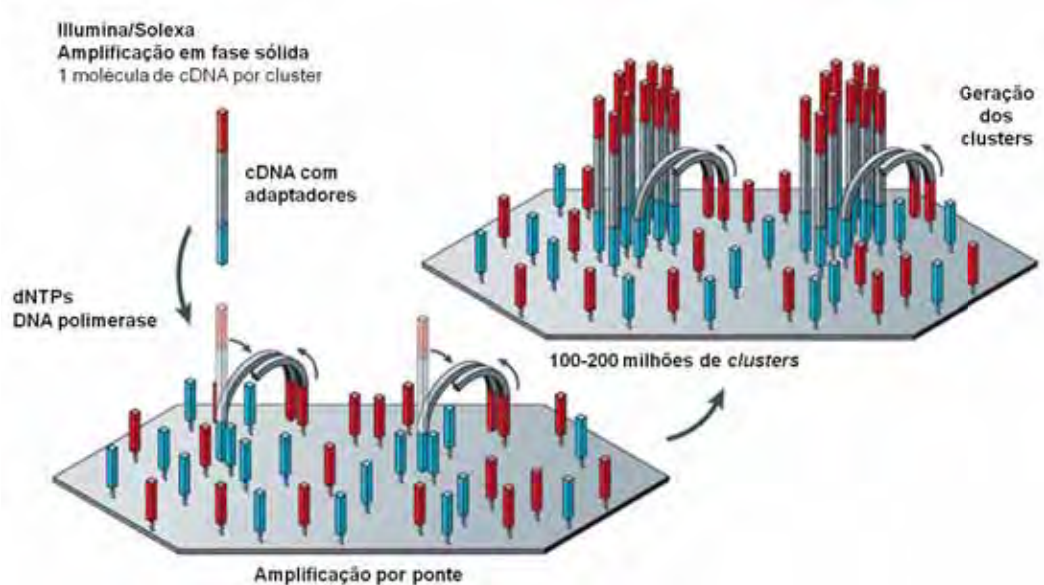


Figura 2. Etapa da clusterização na plataforma Illumina/Solexa. Fonte: Metzker, 2010.

O sequenciamento nesta plataforma pode gerar *terabytes* de dados em imagem. 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. Por fim, o 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. A última etapa é a análise das sequências, considerada demorada e a mais crítica, porque a enorme quantidade de dados produzidos em cada sequenciamento requer infraestrutura para as análises computacionais e locais para armazenamento dos dados (WILHELM et al., 2010).

As sequências obtidas, após passarem por um processo de filtragem, para remoção de sequências de baixa qualidade, são mapeadas utilizando um transcriptoma de referência (disponível em banco de dados). Assim, pode-se obter o número de 'sequências mapeadas' para cada gene, ou seja, quanto mais 'sequências mapeadas' para um determinado gene, mais expresso ele foi. Por esse método pode-se alcançar níveis sem precedentes de precisão e especificidade na quantificação de genes diferencialmente expressos, permitindo a identificação de regiões transcritas e eventos alternativos de *splicing*. Na indisponibilidade de um transcriptoma de referência, são utilizadas técnicas baseadas em sobreposição, conhecidas como "de novo", para reconstruir os transcritos do organismo sequenciado. Tais transcritos passam então a ser utilizados como uma referência para as análises de expressão gênica diferencial entre os transcritos de uma mesma amostra, ou entre diferentes amostras (KIM et al., 2011).

Dessa forma o RNA-seq corresponde a uma ferramenta poderosa para análise do transcriptoma utilizando diretamente sequências de mRNAs. As novas plataformas de sequenciamento revolucionarão o conhecimento sobre o genoma das plantas, principalmente no que concerne ao estudo de variantes alélicas, SNPs, ao desenvolvimento de marcadores para seleção assistida e à clonagem baseada em mapeamento, representando uma importante ferramenta no melhoramento vegetal. Essa revolução será possível com o avanço tecnológico das próprias plataformas de sequenciamento, produzindo leituras maiores, avanço das ferramentas de análise de leituras curtas e montagem de sequências (WANG et al. 2009).

## **2.6 Resistência de citros e relativos ao cancro cítrico**

Em resistência de plantas, há variedades que podem ser mais suscetíveis, enquanto outras menos (AGRIOS, 2005). Entre as variedades de *Citrus* spp. e seus relativos, há uma ampla variação nos níveis de resistência ao cancro cítrico. Alguns autores avaliaram as reações de genótipos (espécies e variedades) de citros usados comercialmente na produção da cultura (GOTTWALD et al., 1993; LEITE JÚNIOR & MOHAN, 1984; ZUBRZYCKI & ZUBRZYCKI, 1981). Nesses estudos demonstrou-se



que limas ácidas e limões são mais suscetíveis ao cancro cítrico, enquanto tangerinas mostram-se mais resistentes (menos suscetíveis). Kumquat encontra-se na posição altamente resistente em contraste com Valência e algumas outras laranjeiras doces que estão classificadas em uma posição intermediária, com diferenças de suscetibilidade entre elas.

A presença de barreiras estruturais e compostos bioquímicos pré e pós-formados são os mecanismos de defesa das plantas contra o estabelecimento do patógeno em seus tecidos (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Como exemplo, Wang et al. (2011) comparou as diferenças estruturais e respostas bioquímicas de plantas resistentes (Meiwa) e suscetíveis (Newhall) ao cancro cítrico. Após infecção com Xac foi constatado que Meiwa apresentou um menor número de bactérias nos sítios de infecção, assim como um menor tamanho de lesão, em relação à Newhall. Em microscópio ficou evidente que após infecção a densidade e tamanho dos estômatos de Meiwa eram significativamente menores do que em Newhall. Ensaios de atividades enzimáticas mostraram que após a inoculação de Xac, Meiwa exibiu significativamente maiores atividades de catalase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase em comparação com Newhall.

Em programas de melhoramento genético convencional faz-se a transferência de regiões do genoma que codificam para resistência a patógenos, regiões essas presentes em espécies cultivadas ou selvagens. Estes genes, quando identificados e clonados, também podem ser utilizados em programas de melhoramento via transgenia (MOURÃO FILHO et al., 2010). A transformação genética oferece um sistema atrativo para a introdução de genes que possam conferir resistência em espécies e variedades de copa e porta-enxerto de citros (FAGOAGA et al. 2001). Como exemplo, Pavan et al. (2007) observaram redução de 70% na severidade do cancro cítrico em híbridos somáticos de laranja doce Hamlin e tangerina Montenegrina, em comparação com plantas de laranja doce Hamlin. Resultados semelhantes também foram observados por Boscariol et al. (2006), mas empregando-se transgenia. Esses autores transformaram laranja doce Hamlin com o gene *Atacina A* que codifica para peptídeos com atividade antibacteriana. Os transformantes mais promissores apresentaram reduções de até 60% na severidade do cancro cítrico. Em outro trabalho, Mendes et al. (2010) transformaram plantas de laranja doce introduzindo o gene *R Xa21*. Esses autores observaram, nos eventos

transformados de laranja doce Hamlin, Natal e Pêra, reduções de até 68% na severidade da doença.

O controle de doenças de plantas por resistência varietal constitui-se num dos métodos de controle mais efetivos e de baixo custo que a pesquisa pode oferecer à agricultura moderna. Não há muitas informações disponíveis quanto à comparação de transcriptomas entre genótipos com diferentes níveis de resistência ao cancro cítrico. Apesar dos mecanismos de defesa serem relativamente conservados nas plantas, os genótipos resistentes e suscetíveis podem variar na sua resposta à infecção por patógenos. Portanto, a investigação usando fenótipos de resistência contrastantes ao cancro cítrico, como Kumquat e Valência, auxiliará na compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à resistência ao cancro cítrico e na identificação de genes de defesa, facilitando assim a transformação genética de variedades e espécies cítricas para uso comercial.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Analisar os transcriptomas de Kumquat (*Fortunella* spp.) e laranja doce Valência (*Citrus sinensis*) ao agente causal do cancro cítrico durante o processo de infecção pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Sequenciar os transcriptomas de plantas de Kumquat e Valência, por meio da tecnologia de RNA-seq, para avaliar a expressão temporal de genes após 24, 48 e 72 horas, após infecção com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em comparação com o de plantas não infectadas (controle);
- Analisar a expressão gênica para detectar genes diferencialmente expressos em cada condição;
- Comparar a expressão gênica entre plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno e também compará-las entre si (Kumquat é altamente resistente enquanto Valência é moderadamente suscetível);
- Estabelecer hipóteses sobre possíveis mecanismos de defesa (vias metabólicas) ativados nas duas espécies.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Ensaios biológicos

#### 4.1.1 Material vegetal e estirpe bacteriana

Para os ensaios biológicos foram utilizadas plantas de laranja doce Valência e plantas de Kumquat enxertadas em limão Cravo, cultivadas em vasos de doze litros e com idades de aproximadamente dois anos. As plantas foram mantidas em ambiente protegido. As plantas foram podadas na mesma época do ano e após 60 dias aproximadamente, quando as folhas atingiram 75% de expansão foliar, iniciaram-se os experimentos.

Neste estudo foi utilizado o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), do estoque do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FCAV/UNESP, mantido em frascos contendo tampão fosfato estéril, à temperatura ambiente. Este isolado 306 é o mesmo sequenciado pelo projeto Genoma/FAPESP (DA SILVA et al., 2002)

#### 4.1.2 População bacteriana e desenvolvimento de sintomas após inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Para a preparação do inóculo, a bactéria Xac 306 armazenada em tampão fosfato foi plaqueada em meio de cultura sólido Ágar Nutriente AN (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 15 g 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 bidestilada estéril em tubo Falcon® estéril de 50 mL. A suspensão foi ajustada para uma densidade ótica a 600 nm igual a 0,3, equivalente a 10<sup>8</sup> unidades

formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Posteriormente, a suspensão foi ajustada para uma concentração de  $10^4$  UFC/mL por diluição seriada.

A inoculação da suspensão bacteriana nas folhas foi feita pelo método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa sem agulha. As inoculações foram feitas em quatro pontos por folha. Foram utilizadas três plantas por espécie, três vasos de *Citrus sinensis* variedade Valência, e representando as Kumquats dois vasos da espécie *Fortunella crassifolia* e um vaso da espécie *Fortunella margarita*. Foram inoculadas as 20 folhas mais homogêneas por planta e as folhas inoculadas foram coletadas a 0, 1, 5, e 18 dias após a inoculação.

Para cada tempo de coleta, três discos foliares com 1 cm de diâmetro foram recuperados do ponto de inoculação de cada espécie. Os discos foliares foram esterilizados em álcool 70% por um minuto e enxaguados em água destilada estéril por um minuto. Em seguida, cada disco foi macerado em 1 mL de tampão fosfato salino PBS 1X estéril, seguido por uma diluição seriada de 10 vezes, que variou de  $10^1$  a  $10^8$  UFC/mL. Uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada diluição foi plaqueada em meio AN em duplicata. As placas foram mantidas em estufa a 28° C por 72 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias. Os pontos inoculados foram fotografados para a caracterização dos sintomas até 31 dias após a inoculação (DAI). Durante todo o experimento as plantas foram mantidas em um laboratório de segurança para a manipulação e inoculação de Xac em plantas cítricas, sob condições ótimas de temperatura (28° C) e luminosidade (fotoperíodo de 12 horas). Este laboratório de segurança, localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, possui um sistema de filtragem absoluta de ar (filtros HEPA), além de possuir antecâmara de pressão negativa, impedindo, dessa maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente.

#### **4.1.3 Extração de RNA total das folhas**

Para o preparo de suspensão bacteriana, a Xac 306 foi plaqueada em meio de cultura AN, e cultivada em estufa a 28°C por 72 horas. Após este período, uma massa de células foi coletada e diluída em água destilada estéril em tubo Falcon®

estéril de 50 mL. A suspensão foi mensurada em Biofotômetro e ajustada para uma densidade ótica a 600 nm igual a 0,3, equivalente a  $10^8$  UFC/mL.

Para o experimento foram utilizadas três plantas de Kumquat (dois vasos da espécie *Fortunella crassifolia* e um vaso da espécie *Fortunella margarita*) e três plantas de Valência (*Citrus sinensis*), cada uma tendo sido inoculada com Xac (infecção) e com água (controle). Nove folhas jovens (por planta) foram inoculadas com a suspensão bacteriana a  $10^8$  UFC/mL de Xac 306 por infiltração da suspensão em todo limbo foliar com seringa hipodérmica de tuberculina sem agulha. Como controle, outras nove folhas jovens das mesmas plantas inoculadas com Xac foram infiltradas com água destilada estéril. As coletas das folhas, inoculadas com Xac e infiltradas com água, foram feitas 24, 48 e 72 horas após inoculação. Para cada tempo foram coletadas três folhas infectadas e três folhas controle (uma de cada vaso), as quais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a  $-80$  °C (ultrafreezer) até o momento da extração de RNA. Para garantir a integridade do RNA extraído foram necessários cuidados para evitar a contaminação das amostras com enzimas que degradam o RNA. Dessa forma todo material livre dessas enzimas é denominado *RNAse free*. Os micropipetadores, a superfície da bancada e equipamentos utilizados, como por exemplo centrífugas, foram tratados com RNaseZap® (Life Technologies), uma solução que elimina as enzimas que degradam o RNA, tornando toda superfície tratada *RNAse free*.

Para extração de RNA total das folhas utilizou-se o *PureLink™ RNA Mini Kit* da Ambion®. Fez-se uso de três repetições biológicas para cada genótipo infectado e seus respectivos controles (não infectados) totalizando 12 amostras distintas (Tabela 1). O protocolo utilizado para extração do RNA foi de acordo com as recomendações do fabricante, cujo processo consiste basicamente em: lise da membrana celular pela adição de solução tampão, filtração em colunas providas de micro filtros para retenção dos detritos do lisado e centrifugações, até a obtenção do RNA total. Detalhadamente o protocolo utilizado consistiu de: para cada amostra empregou-se 250 microgramas de folhas (*pool* de 3 folhas), as quais foram maceradas em Graal de porcelana contendo nitrogênio líquido até a dissolução do material vegetal. A amostra macerada foi rapidamente transferida para tubo plástico de 2 mL juntamente com tampão de lise (*Lise buffer*) e  $\beta$ -mercaptoetanol. Imediatamente o conteúdo dos tubos foi homogeneizado com vortex por 2 minutos e centrifugado a 2.600 g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Tabela 1. Amostras de RNA total de Laranja Valência (*Citrus sinensis*) e Kumquat (*Fortunella* spp.) extraídas 24, 48 e 72 horas após inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (VI e KI para Valência e Kumquat, respectivamente) ou infiltração com água (VC e KC para Valência e Kumquat, respectivamente).

<b>Biblioteca</b>	<b>Descrição da amostra</b>
<b>VC24</b>	RNA total extraído de folhas de Valência 24 horas após infiltração com água (Controle)
<b>VC48</b>	RNA total extraído de folhas de Valência 48 horas após infiltração com água (Controle)
<b>VC72</b>	RNA total extraído de folhas de Valência 72 horas após infiltração com água (Controle)
<b>VI24</b>	RNA total extraído de folhas de Valência 24 horas após inoculação com Xac (Infectado)
<b>VI48</b>	RNA total extraído de folhas de Valência 48 horas após inoculação com Xac (Infectado)
<b>VI72</b>	RNA total extraído de folhas de Valência 72 horas após inoculação com Xac (Infectado)
<b>KC24</b>	RNA total extraído de folhas de Kumquat 24 horas após infiltração com água (Controle)
<b>KC48</b>	RNA total extraído de folhas de Kumquat 48 horas após infiltração com água (Controle)
<b>KC72</b>	RNA total extraído de folhas de Kumquat 72 horas após infiltração com água (Controle)
<b>KI24</b>	RNA total extraído de folhas de Kumquat 24 horas após inoculação com Xac (Infectado)
<b>KI48</b>	RNA total extraído de folhas de Kumquat 48 horas após inoculação com Xac (Infectado)
<b>KI72</b>	RNA total extraído de folhas de Kumquat 72 horas após inoculação com Xac (Infectado)

O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo plástico de 2 mL. Ao sobrenadante foi adicionado metade de seu volume de etanol absoluto (0,5 V) e em seguida fez-se a homogeneização com vortex em baixa velocidade por 30 segundos. A solução foi transferida para uma coluna com um tubo de coleta (cedidos pelo fabricante) para uma centrifugação a 12.000 g 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, adicionou-se 700 µL de tampão de lavagem I (*Wash buffer I*) para nova centrifugação 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 µL de tampão de lavagem II (*Wash buffer II*) na coluna com o tubo de coleta e centrifugado a 12.000 g 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 tubo de recuperação (*Recovery tube*) para a eluição do RNA em 40 µL de água livre de RNase. Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, o conjunto foi centrifugado por 12.000 g por 2 minutos a temperatura ambiente. O volume final de 40 µL de RNA total foi aliquoteado em dois tubos de 1,5 mL.

A absorvância da solução de RNA a 260 nm e 280 nm foi feita em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, para verificação da presença de contaminantes. A concentração de RNA total extraído foi quantificada com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit *Qubit® RNA HS Assay*. As amostras de RNA foram avaliadas quanto a sua integridade no Bioanalyzer 2100 (Agilent) com o kit *RNA 6000 Nano LabChip*.

#### **4.2 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento**

Para sequenciamento as amostras foram preparadas com o kit *TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 LT* seguindo as recomendações do fabricante. Os RNAs mensageiros (mRNAs) das amostras de RNAs totais foram purificados utilizando esferas magnéticas com oligo poli-T. Estas esferas anelaram-se a calda poli-A dos mRNAs separado-os uns dos outros. Após purificados os mRNAs foram fragmentados com enzimas para a síntese do cDNA. Os RNAs fragmentados foram copiados para a primeira fita de cDNA, utilizando uma transcriptase reversa e oligonucleotídeos randômicos. A segunda fita de cDNA foi sintetizada com a DNA polimerase I e RNase H. Estes fragmentos de cDNA sofreram o processo de reparação das pontas coesivas para pontas abruptas, nestas ocorreu a adição da base “A” (adenilação), e por fim ligação dos adaptadores (estes adaptadores continham *barcodes* identificadores para cada biblioteca) em uma das extremidades dos fragmentos, para o sequenciamento do tipo *single read*. Esses adaptadores foram ligados as pontas dos cDNAs para que na etapa de clusterização as bibliotecas de cDNAs fossem hibridizadas na lâmina (*flow cell*). Foi realizada uma reação de polimerase em cadeia (PCR) com oligonucleotídeos específicos para as sequências dos adaptadores, aumentando assim o número de fragmentos das



bibliotecas que continham adaptadores ligados nas 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 pmol.

Antes do sequenciamento as bibliotecas de cDNA passaram por um processo denominado de clusterização, para isto foi utilizado o kit *TruSeq SR Cluster Kit v3 – HS (cBot)* seguindo as recomendações do fabricante. As 12 bibliotecas normalizadas, junto com os reagentes para PCR de fase sólida e a lâmina *flow cell* (superfície para a clonagem *in vitro*), foram colocados no equipamento de automação cBot (Illumina). Em cada linha da *flow cell* foram adicionadas seis amostras diferentes, as amostras continham um *barcode* de identificação (ligado aos adaptadores) para que o equipamento pudesse diferenciar as amostras. O equipamento de automação cBOT adicionou as bibliotecas de cDNA na lâmina onde ocorreram as reações de hibridização e PCR em fase sólida, que resultou em *clusters* (milhões de cópias de uma única molécula de molde de DNA) gerados simultaneamente para cada fragmento das bibliotecas ligados na lâmina. Após cinco horas de clusterização das bibliotecas de cDNA, os *clusters* presentes na lâmina foram sequenciados, na “Facility” de sequenciamento da FCAV/UNESP utilizando a plataforma HiScanSQ System (Illumina), seguindo as instruções do fabricante para o RNA-Seq.

### 4.3 Análises dos dados

Os dados sequenciados foram preparados e analisados para calcular o perfil de expressão gênica de cada amostra estudada. A análise de expressão foi baseada em um método de alinhamento dos fragmentos (*reads*) contra um transcriptoma de referência devido à alta qualidade e quantidade de dados genéticos de diferentes espécies de *Citrus* disponíveis em bases de dados públicas. As metodologias de análise foram subdivididas em dois pipelines. O primeiro envolveu a construção de um banco de dados de sequências de *Citrus spp.*, e o segundo a aplicação de um pipeline para análise de expressão gênica das bibliotecas sequenciadas, descritos nas seções seguintes.

Os pipelines desenvolvidos para a construção dos bancos de dados não redundantes de transcriptoma de plantas da espécie *Citrus* spp. e de análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento, foram desenvolvidos por Roberto Herai (School of Medicine, UCSD – University of Califórnia San Diego, 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 estão envolvidos no projeto: Alessandro Varani (Departamento de Tecnologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP) e Renata Izabel Dozzi Tezza (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, UNESP – Universidade 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.

#### **4.3.1 Construção de um banco de dados de transcriptoma de *Citrus* spp.**

Para a construção do banco de dados de transcriptoma de citros (pipeline Figura 3) foi feito um levantamento de bancos de dados públicos de transcriptomas de plantas da espécie *Citrus* spp., e foram identificadas 6 bases de dados de transcriptomas, formadas por sequências reais e preditas, geradas por grupos de pesquisa independentes, conforme descrição abaixo:

- AFFYM: O banco de dados 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* spp., incluindo *Citrus sinensis*, *Citrus unshui*, *Citrus aurantium*, *Citrus medica*, *Citrus reticulata*, *Citrus reshni*, dentre outros. Por se tratar, atualmente, do melhor método disponível para genotipagem em larga escala de plantas da espécie *Citrus* spp., este *chip* foi utilizado pelo trabalho desenvolvido recentemente por Fu et al. (2012) para estudo das diferentes respostas transcricionais a Xac entre Kumquat e laranja doce.
- NCBI: esta base de dados, contendo 173.112 transcritos, foi produzida a partir de

uma pesquisa da doença *Huanglongbing* que ocorre em *Citrus* spp., causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (MARTINELLI et al., 2012). Os dados são de transcriptoma de *C. sinensis* e foram depositados no NCBI;

- UNIGENE: esta base de dados, contendo 101.686 transcritos, utiliza uma base de dados genético de *C. clementina* armazenada no portal UNIGENE do NCBI, que foi gerado por grupos de pesquisa independentes.
- USDA: esta base de dados, contendo 31.863 transcritos, de *Citrus* spp., foi gerada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos com dados de transcriptoma das plantas *C. sinensis* e *P. trifoliata*;
- CITRUSGDB: esta base de dados, contendo 46.147 transcritos, foi produzida a partir de uma pesquisa em *C. sinensis* coordenada por diversos grupos de pesquisa internacionais;
- PHYTOZOME: esta base de dados, contendo 33.929 transcritos, gerados a partir de 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*.

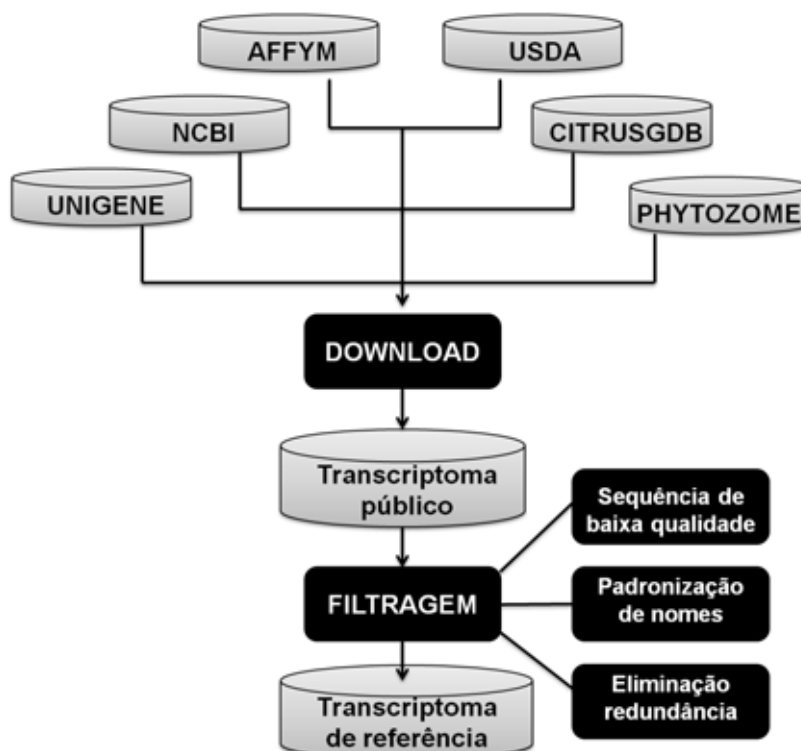


Figura 3. Pipeline para construção de um banco de dados não redundante de transcriptoma de plantas da espécie *Citrus* spp. para estudos de genotipagem.

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) e posteriormente foi realizada uma padronização na nomenclatura das sequências, seguindo o critério TRANSCRIPT\_N, em que N indica um código único do transcrito na base de dados, originando um total de 204.550 transcritos.

#### **4.3.2 Análise da expressão gênica**

Para análise da expressão gênica o pipeline desenvolvido é ilustrado na Figura 4. Os dados brutos do sequenciamento 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 NS 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. 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 com 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 zigosidade celular ou as mutações causadas por falhas de equipamentos de sequenciamento.

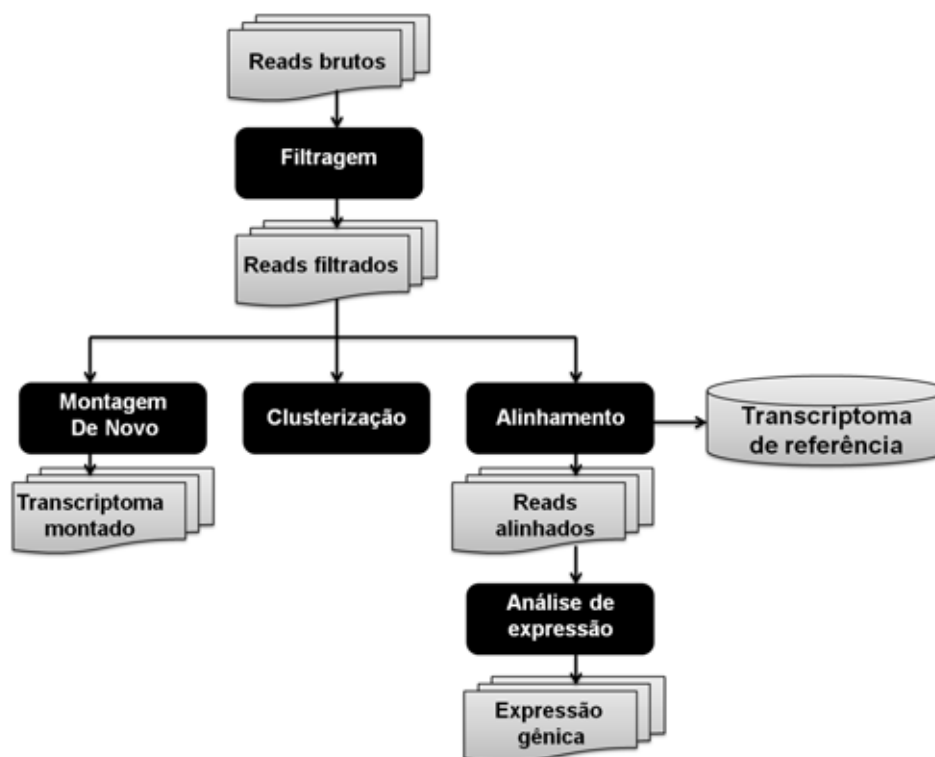


Figura 4. Pipeline para análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento.

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. Utilizando uma metodologia de análise de expressão gênica baseada em contagem de fragmentos, implementada pelo pacote de ferramentas DESeq (ANDERS & HUBER, 2010), disponível para o ambiente R - Biocomductor, foi feito então o cálculo da variação de expressão gênica diferencial entre pares de amostras. O cálculo da expressão, em termos gerais, 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 (diferentes quantidades de fragmentos sequenciados). 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 (controle e tratamento), ou seja, é feita a divisão do valor de expressão de um determinado transcrito na amostra infectada pelo valor de expressão do mesmo transcrito na amostra controle. Sendo assim, quando um transcrito é mais expresso no tecido infectado, o *Fold-change* será maior que um, e se o transcrito for expresso somente no tecido infectado o *Fold-change* será infinito (INF). Na situação contrária,

se um transcrito for mais expresso no tecido controle, o *Fold-change* será menor que um ou igual a zero caso este transcrito seja expresso apenas no tecido controle. 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 Benjamini-Hochberg (1995). No presente trabalho as variações em que os  $p$ -valores foram inferiores a 0,05 foram consideradas com significância estatística e, portanto, o transcrito foi considerado como diferencialmente expresso.

#### **4.3.3 Anotação de sequências e localização de domínios protéicos**

Para obter uma descrição funcional de cada transcrito diferencialmente expresso (TDE) entre as amostras fez-se uso da ferramenta Blast2GO (CONESA et al., 2005). Esse programa integra os sistemas Blast do NCBI com os sistemas de categorização funcional do Gene Ontology Consortium e Go Slim Viewr. 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 foram classificadas de acordo com três domínios: a) Processo biológico: operações ou conjuntos de eventos moleculares com início e fim definidos e fundamentais para o funcionamento de uma célula, tecido, órgãos ou organismo a que ela pertence; b) Função molecular: atividades elementares do produto de um gene a nível molecular; c) Componente celular: partes da célula ou seu ambiente extracelular.

A identificação de domínios protéicos foi feita com base numa metodologia comparativa, implementada pela ferramenta InterProScan (DE CASTRO et al., 2006). A identificação é feita a partir de uma sequência de aminoácidos, 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.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do cancro cítrico em Laranja Valência (*Citrus sinensis*), Kumquat Nagami (*Fortunella margarita*) e Kumquat Meiwa (*F. crassifolia*)

Para identificar diferenças de resistência nos fenótipos de Valência, Kumquat Meiwa e Kumquat Nagami em resposta a Xac, folhas das três espécies foram inoculadas com suspensão bacteriana de Xac ( $10^4$  UFC/mL) por infiltração por pressão. Discos foliares coletados em diferentes dias após inoculação (DAI) permitiram a recuperação e contagem de Xac (Tabela 2) e o desenvolvimento dos sintomas de cancro cítrico foi registrado por fotodocumentação periódica durante o ensaio biológico (Figura 5). O aparecimento dos sintomas nas espécies Valência e Kumquat Nagami deu-se a partir do 11<sup>o</sup> DAI, com o surgimento de pequenas lesões na região inoculada na parte abaxial das folhas. Em contrapartida, na espécie Kumquat Meiwa os sintomas surgiram a partir do 5<sup>o</sup> DAI e no 11<sup>o</sup> DAI as lesões encontravam-se relativamente espalhadas na área inoculada. Também aos 11 DAI as folhas de Kumquat Meiwa apresentavam necrose do sítio de inoculação. Aos 18 DAI os sintomas nas espécies Valência e Kumquat Nagami tinham evoluído para lesões eruptivas e salientes, embora diminutas em Kumquat Nagami, mas bastante distintos dos sintomas presentes nas folhas de Kumquat Meiwa, os quais se caracterizavam pela necrose do limbo foliar em quase toda a área infiltrada.

Como apresentado na Figura 5, as três espécies avaliadas revelaram fenótipos distintos entre si quanto a resistência ao cancro cítrico e apenas a laranja doce Valência apresentou sintomas como necrose e encharcamento (*water soaking*) em relativa extensão da área infiltrada, característicos da infecção por Xac em genótipos mais suscetíveis ao cancro cítrico. No entanto, diferentemente do observado quanto aos sintomas, as populações bacterianas foram semelhantes nas três espécies avaliadas (Tabela 2). Essas populações, expressas em Log de UFC, apresentaram valores entre 3,0 e 7,6 no período avaliado (de 0 a 18 DAI), similares entre si nas comparações entre as espécies.

Tabela 2. Populações bacterianas (Log de UFC/mL) em Laranja Valência (*Citrus sinensis*), Kumquat Nagami (*Fortunella margarita*) e Kumquat Meiwa (*F. crassifolia*) após inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por infiltração dos tecidos foliares com suspensão bacteriana a  $10^4$  UFC/mL.

Espécie	Dias após inoculação (DAI)				
	0	1	5	11	18
Valência ( <i>Citrus sinensis</i> )	3,1 (2,0)*	3,4 (2,6)	5,9 (5,6)	5,6 (5,3)	7,4 (7,0)
Kumquat Nagami ( <i>Fortunella margarita</i> )	3,2 (1,2)	3,1 (2,0)	5,5 (4,8)	5,4 (4,7)	7,6 (0,0)
Kumquat Meiwa ( <i>F. crassifolia</i> )	3,2 (2,0)	3,0 (2,2)	6,6 (5,5)	7,5 (7,2)	7,6 (7,4)

\* entre parênteses estão apresentados o erro padrão da média

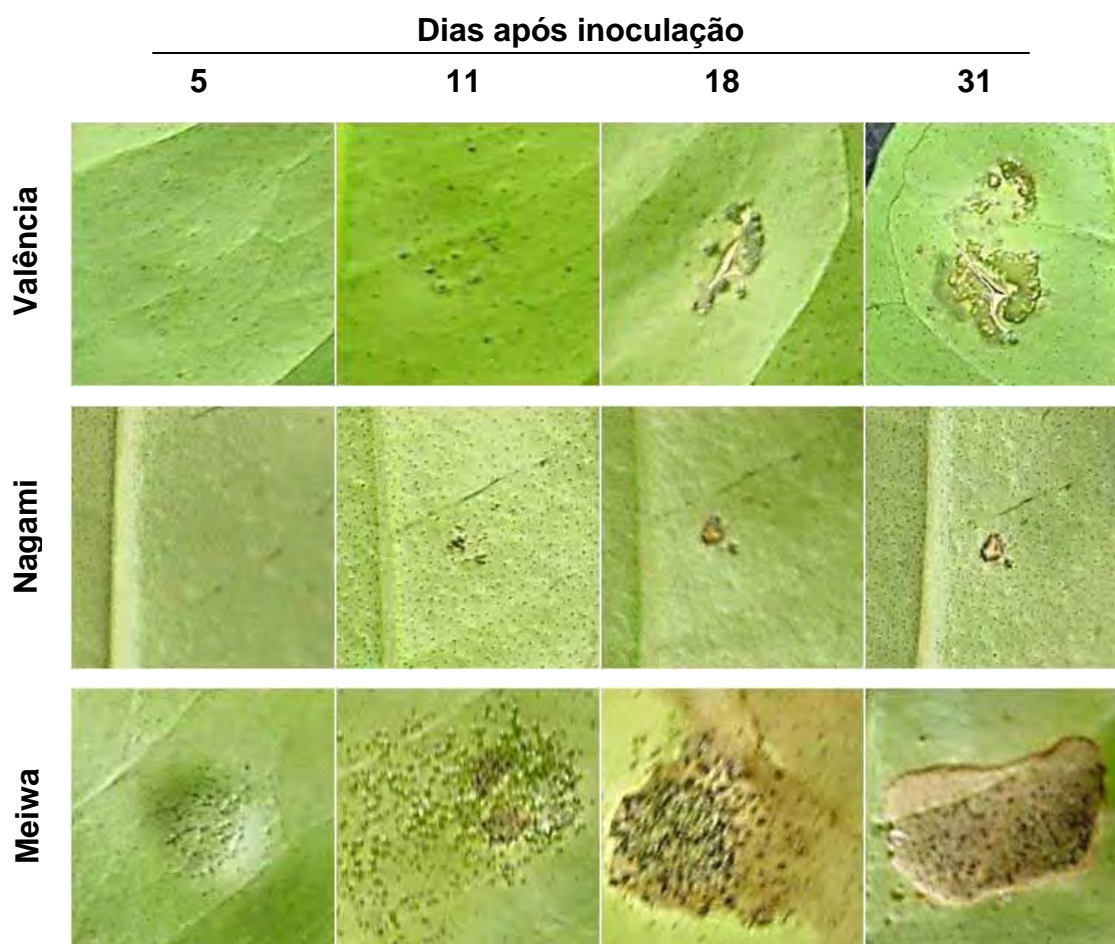


Figura 5. Evolução do processo infeccioso observado em Laranja Valência (*Citrus sinensis*), Kumquat Nagami (*Fortunella margarita*) e Kumquat Meiwa (*F. crassifolia*) após inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por infiltração dos tecidos foliares com suspensão bacteriana a  $10^4$  UFC/mL.



## 5.2 Concentração e integridade do RNA total extraído dos tecidos foliares após infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A concentração de RNA total final, assim como a presença de contaminantes, foi verificada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e estão apresentadas na Tabela 3. Contaminantes, como proteínas, apresentam um pico de absorvância a 280 nm e outros contaminantes, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos apresentam pico de absorvância em torno de 230 nm. A razão da absorvância 260/280 nm de uma amostra livre de proteínas tem valor de referência igual a 2,0. As amostras de RNA extraídas de plantas de Kumquat e Valência apresentaram valores entre 1,75 e 2,14 em relação à absorvância da solução de RNA a 260/280 nm, e foram consideradas como adequadas para sequenciamento. A razão da absorvância 260/230 nm também é utilizada para avaliar a contaminação por outros compostos, apresentando um valor de referência em torno de 2,0. As amostras de RNA total de Kumquat apresentaram um valor abaixo de 2,0, para a razão 260/230 nm, no entanto, esta característica não interferiu na qualidade e integridade dessas amostras como apresentado a seguir.

A qualidade do RNA foi verificada no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Após leitura das amostras, empregando-se o software *Agilent 2100 Expert*, foi gerado um eletroferograma o qual foi analisado pelo aparelho para detecção de qualquer traço de degradação. Os resultados são exibidos na forma de um gráfico, que calcula a razão 28S/18S ou 23S/16S com maior precisão a partir dos respectivos picos (Figuras 6 e 7) e ainda é possível visualizar as bandas ribossomais 28S e 18S pela imagem gerada através de uma eletroforese capilar (Figura 6 e 7). O equipamento possui um programa que utiliza um algoritmo para analisar os resultados obtidos e atribuir valores qualitativos por meio dos números íntegros de RNAs (RINs). Os RINs são classificados em uma escala de zero a dez, na qual zero é o RNA completamente degradado e dez é o RNA totalmente íntegro, por isso só foram consideradas as amostras de RNA total com RIN igual ou maior a oito (SCHROEDER et al. 2006). As concentrações das 12 amostras de RNAs totais de folhas de Kumquat e Valência variaram entre 52 e 1.500 ng/ $\mu$ L com valores de RIN mínimo 8,0 e máximo 9,4 (Tabela 3).

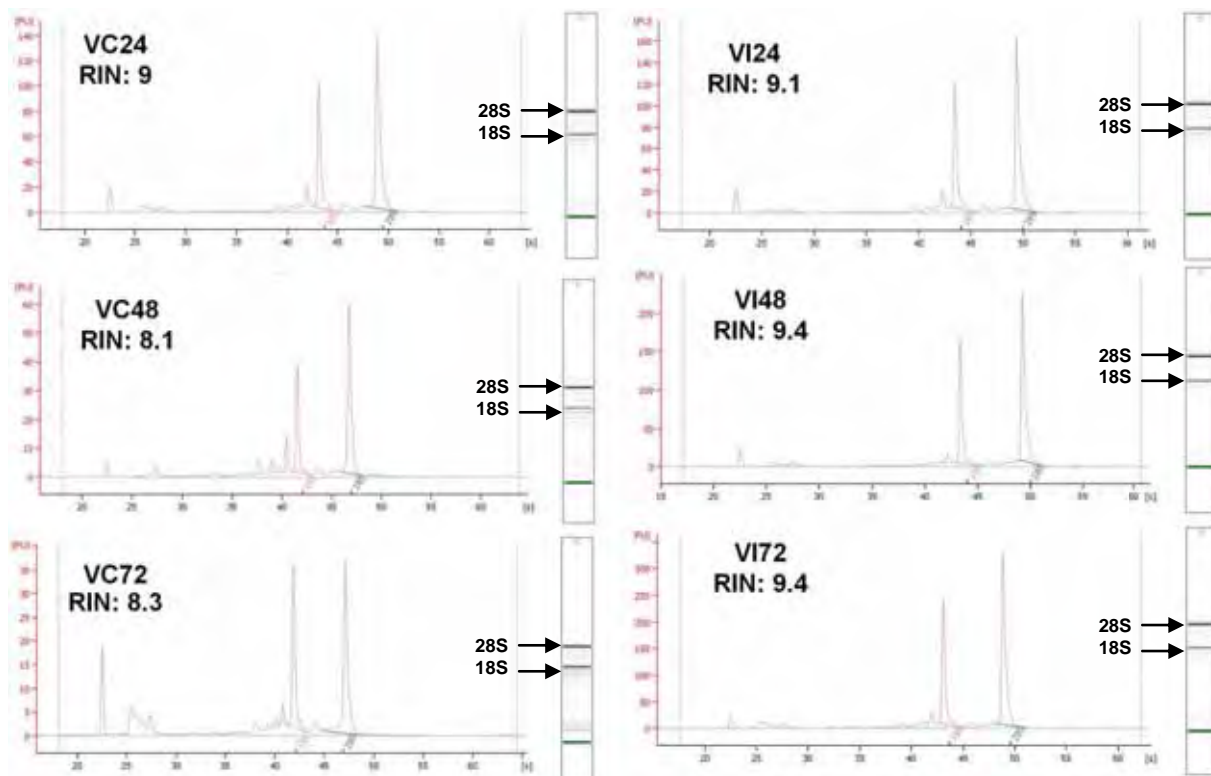


Figura 6. Gráficos dos eletroferogramas com os picos 18S e 28S e eletroforese capilar com as bandas ribossomais 28S e 18S das amostras de RNA total de Valência.

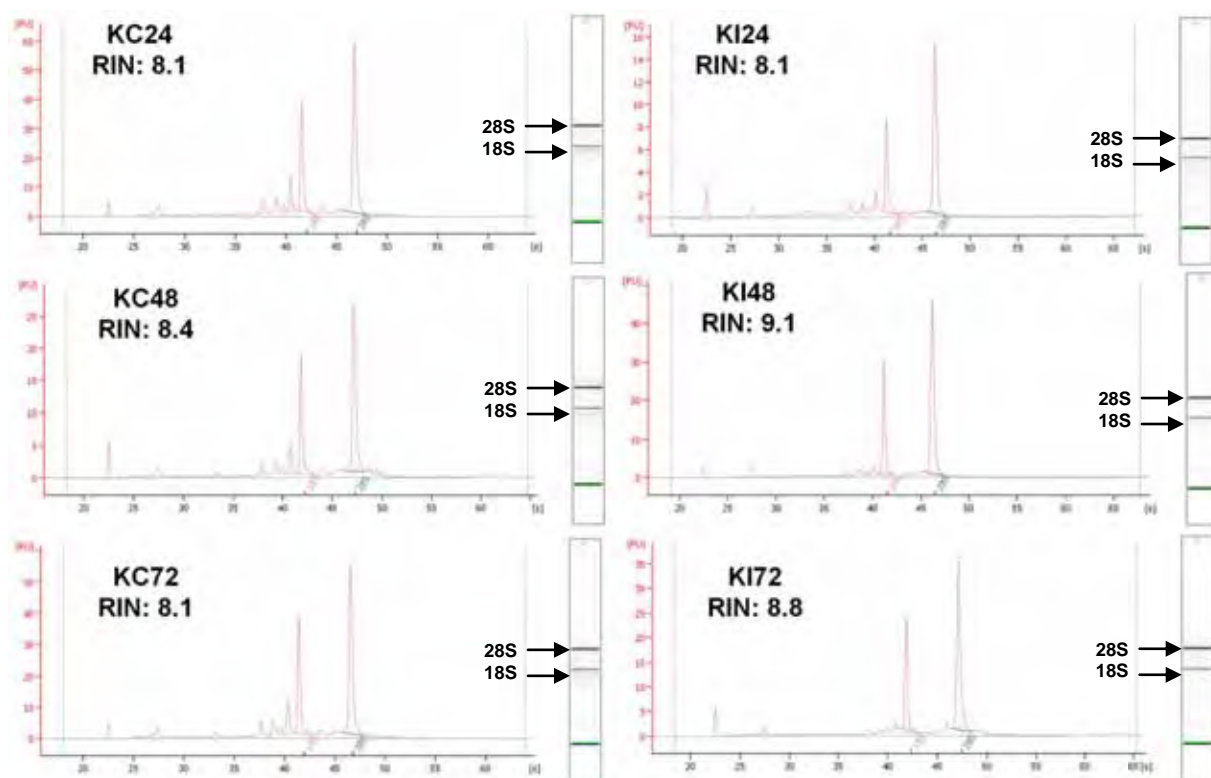


Figura 7. Gráficos dos eletroferogramas com os picos 18S e 28S e eletroforese capilar com as bandas ribossomais 28S e 18S das amostras de RNA total de Kumquat.

Tabela 3. Concentração, relação 260/280 e 260/230 e números íntegros de RNAs (RINs) das amostras de RNA total extraídas de folhas de Valência e Kumquat e utilizadas no presente trabalho.

Espécie	Amostra de RNA total	Concentração (ng/ $\mu$ l)	Relação 260/280	Relação 260/230	RIN
Valência	VC24	855	2,14	2,32	9,0
	VC48	800	2,11	2,34	8,1
	VC72	400	2,05	2,30	8,3
	VI24	829	2,13	2,41	9,1
	VI48	1500	2,13	2,41	9,4
	VI72	1500	2,14	2,43	9,4
Kumquat	KC24	176	1,96	0,36	8,1
	KC48	52	1,91	0,20	8,4
	KC72	168	1,75	0,50	8,1
	KI24	70	2,10	0,67	8,1
	KI48	170	2,07	0,37	9,1
	KI72	60	2,06	0,41	8,8

Para a construção de uma biblioteca de cDNA é necessário, no mínimo, 1  $\mu$ g de RNA total, segundo o protocolo *TruSeq RNA Sample Preparation v2* (Illumina), utilizado neste experimento. Portanto, todas as amostras de RNA extraídas apresentaram concentrações de RNAs suficientes e com uma qualidade de RIN satisfatórias para as etapas posteriores.

### 5.3 Bibliotecas de cDNA e sequenciamento (RNA-seq)

Para o estudo da expressão gênica das espécies de plantas Laranja Valência e Kumquats Meiwa e Nagami, com diferentes níveis de suscetibilidade ao cancro cítrico, utilizou-se de uma nova tecnologia de sequenciamento de transcriptoma denominada RNA-seq (plataforma Illumina). O sequenciamento resultou em um total de 140.425.222 sequências geradas a partir de fragmentos de 50 pares de bases originados de 12 bibliotecas de cDNA (Tabela 4). Essas bibliotecas foram construídas a partir de RNA extraído de folhas coletadas 24, 48 e 72 horas após inoculação com água (amostras Controle – VC e KC para Valência e Kumquat, respectivamente), e após inoculação com Xac (amostras Infectadas – VI e KI para

Valência e Kumquat, respectivamente). As amostras de Kumquat Meiwa e Nagami formaram um único *pool* de folhas (amostras) e foram analisadas conjuntamente. Dessa forma, formaram-se 12 bibliotecas de cDNA – seis de Valência (amostras Controle coletadas 24, 48 e 72 horas após infiltração com água e amostras Infectadas coletadas nesses mesmos tempos após inoculação com Xac) e seis de Kumquat (infiltradas com água e Xac nesses mesmos tempos).

Tabela 4. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-seq (Illumina) das bibliotecas de cDNA de tecido foliar de Laranja Valência (*Citrus sinensis*) e Kumquat (*Fortunella* spp.) após inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) por infiltração dos tecidos foliares com suspensão bacteriana a  $10^8$  UFC/mL.

Espécie	Biblioteca de cDNA*	Número de sequências	Número de sequências com alta qualidade	Sequências alinhadas (%)
<b>Laranja Valência</b> <b>(<i>Citrus sinensis</i>)</b>	VC24	7.186.521	3.500.912	75,11
	VC48	6.283.185	5.054.378	96,87
	VC72	22.010.728	19.877.201	96,62
	VI24	12.501.163	10.652.019	96,96
	VI48	25.315.317	22.889.459	97,44
	VI72	25.263.671	22.785.329	97,39
<b>Subtotal</b>		<b>98.560.585</b>	<b>84.759.298</b>	<b>93,40</b>
<b>Kumquat</b> <b>(<i>Fortunella</i> spp.)</b>	KC24	6.059.764	4.927.163	94,70
	KC48	7.162.323	5.813.941	94,30
	KC72	7.393.773	6.013.318	94,54
	KI24	7.310.576	5.978.623	94,59
	KI48	6.236.919	5.098.391	94,78
	KI72	7.701.282	6.200.005	94,66
<b>Subtotal</b>		<b>41.864.637</b>	<b>34.031.441</b>	<b>94,60</b>
<b>Total</b>		<b>140.425.222</b>	<b>118.790.739</b>	<b>94,05</b>

\*As amostras foram coletadas 24, 48 e 72 horas após a infiltração com água (VC e KC para Valência e Kumquat, respectivamente) e Xac (VI e KI para Valência e Kumquat, respectivamente).

Do total de sequências geradas pelas 12 bibliotecas, 84,59 % (118.790.739) foram consideradas de alta qualidade para análise dos resultados. A quantidade mínima de fragmentos de sequenciamento que foi considerada válida para análise da expressão gênica para cada biblioteca foi de cinco milhões de sequências de 50 pares de bases (pb). Essas sequências de alta qualidade foram utilizadas para o alinhamento com o transcriptoma de referência, e obteve-se uma média de 94,05%

de alinhamento das mesmas. Essa alta cobertura permitiu uma análise consistente e de qualidade dos dados de transcriptoma. Em relação aos 5,95% dos transcritos que não alinharam com o transcriptoma de referência, uma estratégia interessante seria alinhar esses transcritos com bancos de dados de outras espécies de plantas e organismos, por exemplo *Arabidopsis*, objetivando gerar informações de transcritos ainda desconhecidos em citros e também de sequências desconhecidas em plantas. Kim et al. (2011) utilizaram essa estratégia para analisar transcritos diferencialmente expressos de soja após inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag). O banco utilizado foi o *Plant Resistance Gene database* (PRGdb, <http://prgdb.cbm.fvg.it>). Eles identificaram genes de soja que foram diferencialmente expressos após infecção com Xag que eram homólogos a genes R conhecidos, como por exemplo RPP1, RPP4 e RPP5.

#### **5.4 Expressão gênica global e temporal de Valência e Kumquat após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Para comparar as diferenças transcricionais dentro da mesma espécie (Controle vs. Infectada) e entre os gêneros (Valência vs. Kumquat), foram realizadas seis comparações aos pares entre as 12 bibliotecas de cDNA sequenciadas. Como critério para a seleção de transcritos diferencialmente expressos (TDEs) foram considerados aqueles com significância estatística (*p*-valor) menor que 0,05. Além disso, também foi adotado o valor de variação da expressão dos transcritos com base no *Fold-change*. Os transcritos com uma expressão superior no tecido infectado (*Fold-change* >2) foram denominados transcritos induzidos e os transcritos com expressão maior no tecido controle (*Fold-change* <0,5) foram denominados transcritos reprimidos.

Após as análises estatísticas foram identificados 750, 3.087 e 1.046 TDEs em folhas da espécie Valência 24, 48 e 72 horas após inoculação com Xac, respectivamente, quando comparados aos seus controles (Figura 8). Nas folhas da espécie Kumquat, foram identificados 2.824, 5.115 e 7.213 TDEs 24, 48 e 72 horas após inoculação com Xac, respectivamente. Em Valência, no tempo 24 horas, 572 transcritos foram induzidos, enquanto 178 transcritos foram reprimidos. No tempo 48

horas, foram identificados 1.426 transcritos induzidos e 1.661 transcritos reprimidos e no tempo 72 horas, 955 transcritos induzidos e 91 transcritos reprimidos (Figura 8). Em contraposição, nas espécies de Kumquat, 622 transcritos foram induzidos e 2.202 transcritos foram reprimidos no tempo de 24 horas. No tempo 48 horas, foram identificados 1.117 transcritos induzidos e 3.998 transcritos reprimidos e no tempo 72 horas, 2.372 transcritos foram induzidos e 4.841 foram reprimidos (Figura 8). Estes dados demonstram que as espécies Valência e Kumquat apresentaram uma diferença significativa em resposta a infecção por Xac a nível transcricional.

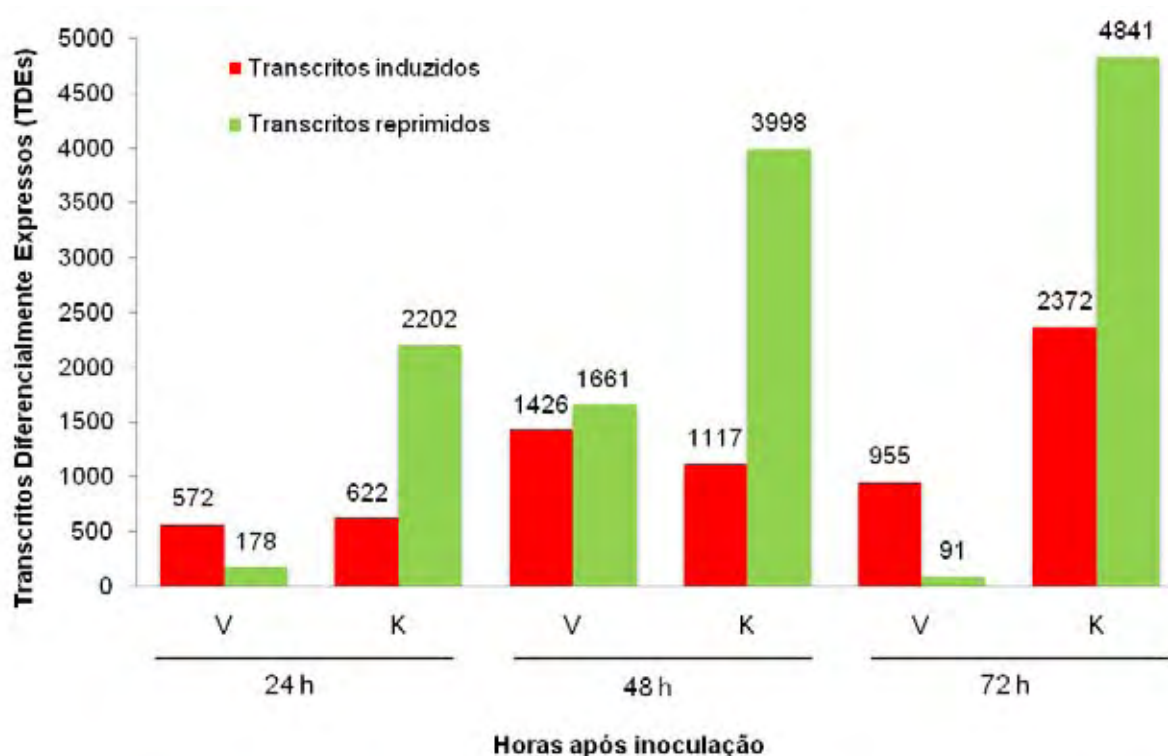


Figura 8. Número de transcritos induzidos e reprimidos diferencialmente expressos (TDEs) nas espécies Laranja Valência (V) (*Citrus sinensis*) e Kumquat (K) (*Fortunella* spp.) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Em qualquer dos tempos avaliados (24, 48 e 72 horas após a inoculação) foram identificados mais TDEs em Kumquat do que em Valência. Essa maior proporção de transcritos pode ter ocorrido em razão de ter-se analisado conjuntamente as duas espécies de Kumquat (Meiwa e Nagami), em comparação com amostras foliares de Valência. Como apresentado na Figura 5, as espécies de Kumquat diferiram entre si quanto aos sintomas resultantes da inoculação com Xac.

Essas diferenças na infecção e colonização pelo patógeno podem ser resultantes da expressão de genes distintos. Além disso, são duas espécies botânicas diferentes, sendo razoável supor uma expressão gênica diferencial entre as Kumquats Meiwa e Nagami. No entanto, comparando o número de TDEs induzidos e reprimidos em cada tempo, em Kumquat foram identificados mais transcritos reprimidos (78,0%, 78,2% e 67,1% 24, 48 e 72 horas, respectivamente), enquanto em Valência o número de transcritos induzidos foi superior em 24 e 72 horas (76,3%, 46,2% e 91,3% 24, 48 e 72 horas, respectivamente). Independentemente da espécie, as plantas de Kumquat revelaram-se menos suscetíveis que Valência, como demonstrado por outros autores (FU et al., 2012 KHALAF et al., 2011). Khalaf et al. (2011) também estudou a expressão gênica de Kumquat infectada com Xac, mas empregando a técnica de microarranjo, e observou um maior número de transcritos reprimidos nos tempos de 6, 24 e 72 horas após inoculação.

### **5.5 Categorização funcional e anotação dos transcritos diferencialmente expressos (TDEs)**

Com ferramentas de bioinformática as sequências de TDEs foram analisadas objetivando uma descrição funcional dos mesmos. O programa Blast2GO foi utilizado para categorizar os TDEs de acordo com sua ontologia em relação a processo biológico, função molecular e componente celular, baseado nos resultados das ferramentas Blastx e Gene Ontology (GO) inseridas no programa Blast2GO. Essas categorizações funcionais foram feitas para cada espécie e em cada tempo de avaliação. A distribuição baseada no Gene Ontology (GO) foi feita por nível (nível 2) afim de reduzir a sobreposição na classificação e os dados estão apresentados nas Figuras 9 a 14.

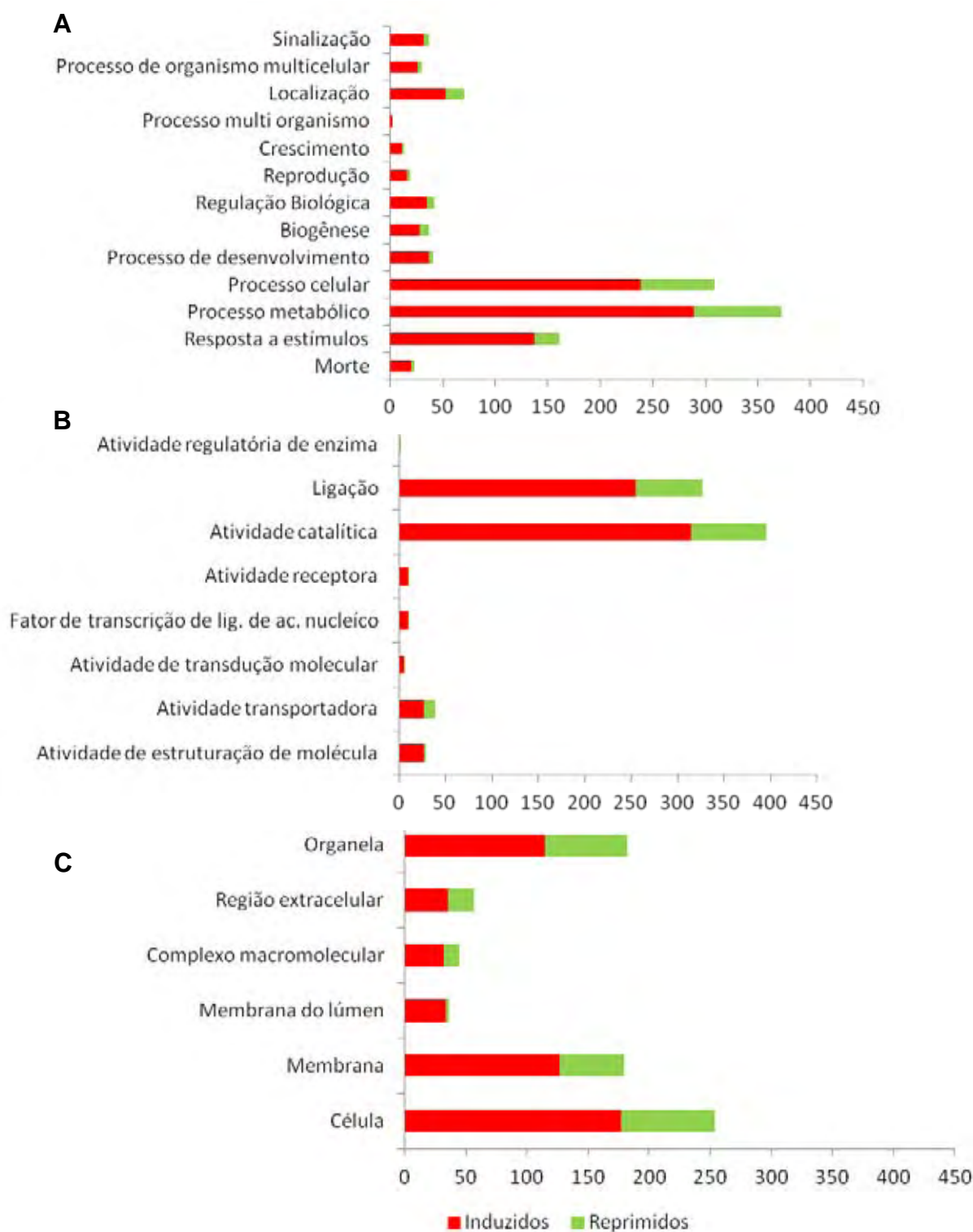


Figura 9. (A) Processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em laranja Valência (*Citrus sinensis*) no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).



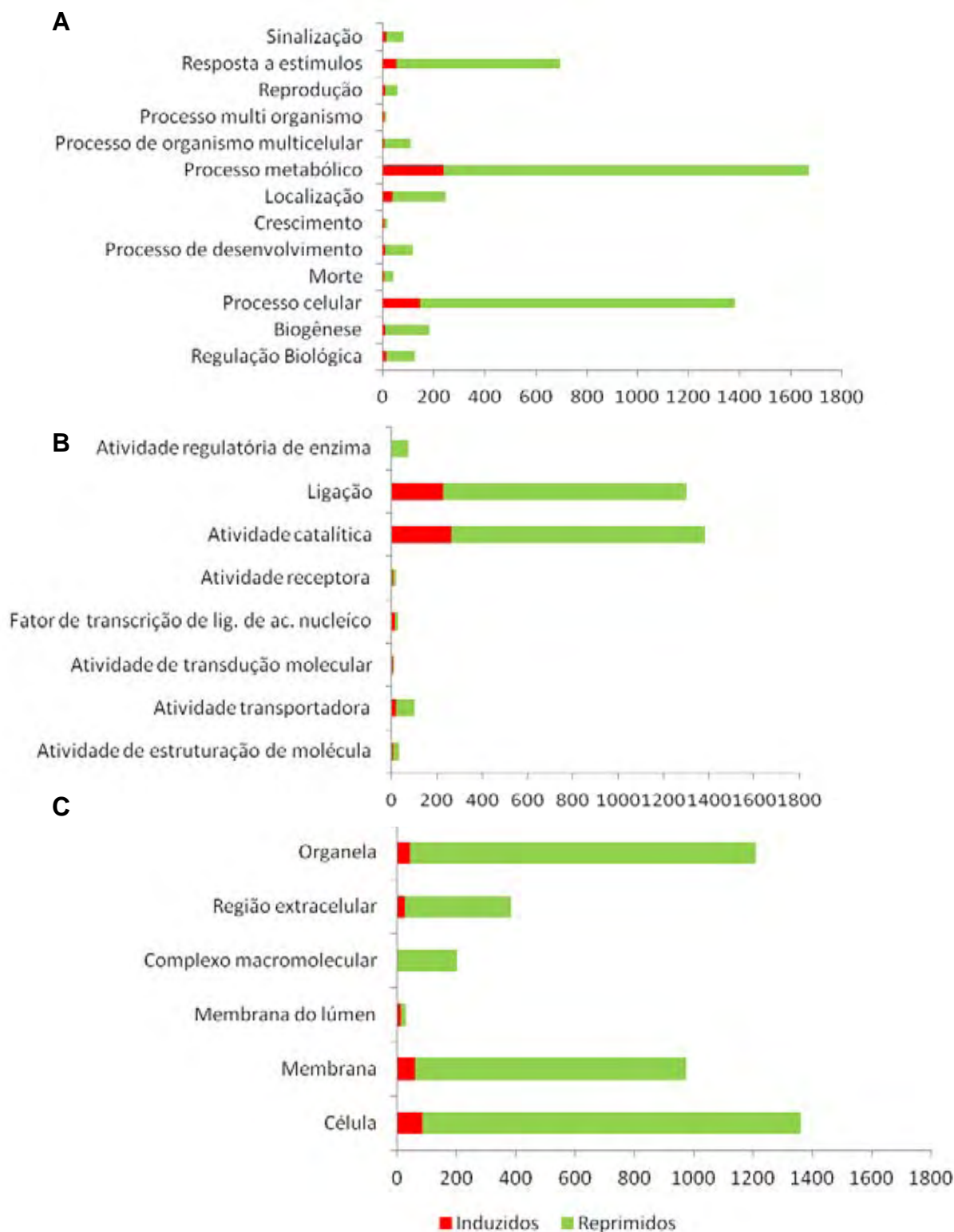


Figura 10. (A) Processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em Kumquat (*Fortunella* spp.) no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).



Figura 11. (A) Processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em laranja Valência (*Citrus sinensis*) no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).



Figura 12. (A) Processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em Kumquat (*Fortunella* spp.) no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).



Figura 13. (A) Processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em laranja Valência (*Citrus sinensis*) no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

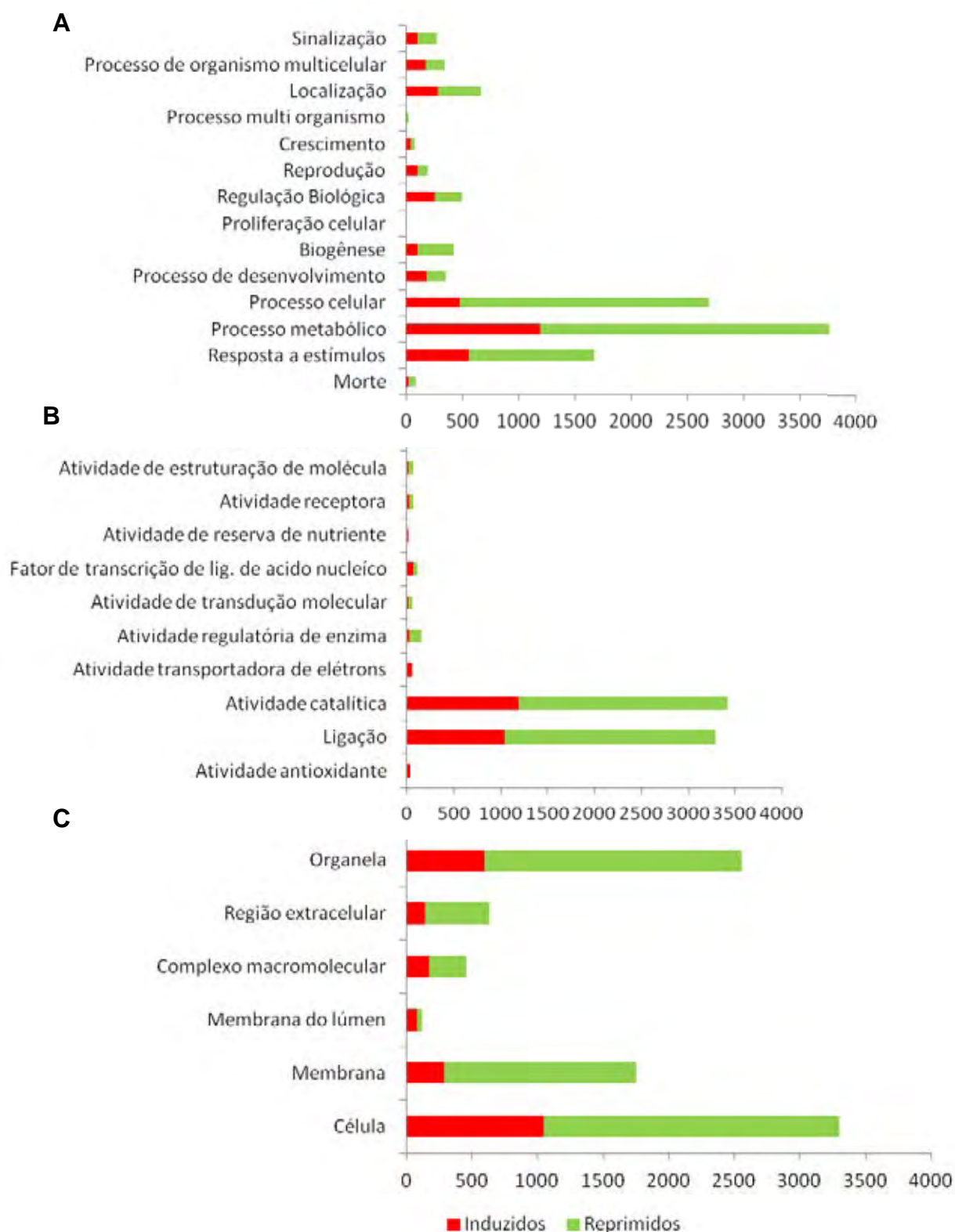


Figura 14. (A) Processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular dos transcritos diferencialmente expressos em Kumquat (*Fortunella* spp.) no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

Tanto para Valência quanto para Kumquat, em todos os tempos analisados, as principais categorias relacionadas aos processos biológicos foram: processo metabólico, processo celular e resposta a estímulos. O que diferenciou uma espécie da outra foi o fato de Kumquat sempre ter apresentado mais transcritos reprimidos do que induzidos. Ao contrário, Valência sempre apresentou mais transcritos induzidos em cada uma dessas categorias, com exceção do tempo de 48 horas. As funções moleculares mais representativas foram às categorias de atividade catalítica e ligação. Para componentes celulares os transcritos encontrados estão associados à célula, organela e membrana, resultados esses similares entre as espécies nos três tempos analisados.

No entanto, em Valência nos tempos 24 e 48 horas ocorreram mais transcritos com função molecular de atividade catalítica do que ligação, tendo ocorrido o inverso no tempo 72 horas. Em relação ao processo biológico, uma segunda categorização foi realizada para identificar as subcategorias presentes em cada categoria do nível 2 (APÊNDICE A). Essas caracterizações estão apresentadas em gráficos multinível ilustrando somente transcritos induzidos ou reprimidos, para cada tempo analisado de cada espécie. Devido a grande quantidade de subcategorias, foi determinado um corte de sequências (*cut-off*) de acordo com o número de TDEs. Para os transcritos induzidos na espécie Valência nos três tempos, as principais categorias observadas (APÊNDICE A Figuras 1, 3 e 5) foram: resposta a estresse, resposta a estímulos bióticos, processo metabólico de carboidratos e processo biossintético. As mesmas categorias foram encontradas para os transcritos induzidos em Kumquat (APÊNDICE A Figuras 2, 4 e 6). No entanto, Valência apresentou a categoria de fotossíntese induzida no tempo 72 horas (APÊNDICE A Figura 5), enquanto Kumquat não apresentou esta categoria induzida em qualquer um dos tempos analisados e além disso, a fotossíntese foi identificada como a categoria mais reprimida nos três tempos em Kumquat (APÊNDICE A Figuras 8, 10 e 12). Interessantemente, Valência também demonstrou uma repressão da categoria fotossíntese, mas apenas nos tempos 24 e 48 horas (APÊNDICE A Figuras 7 e 9).

Após a categorização funcional dos transcritos, foram realizadas anotações de alguns TDEs induzidos e reprimidos em Valência e Kumquat. Um dos critérios adotados foi identificar transcritos que codifiquem para possíveis proteínas de resistência (R) nas espécies avaliadas. Em Kumquat foram identificados transcritos

induzidos (APÊNDICE B Tabela 1) e transcritos reprimidos (APÊNDICE B Tabela 2) que codificam para proteínas R como por exemplo, proteína de resistência CC-NBS-LRR, proteína de resistência TIR-NBS-LRR e proteína de resistência TMV (domínio TIR). Apesar de Kumquat ter induzido 29 transcritos que codificam prováveis proteínas R nos três tempos, foram identificados 101 transcritos reprimidos, sendo 92 no tempo de 72 horas. Esses dados revelam que Kumquat induz transcritos que codificam possíveis proteínas R, no entanto ocorreu uma alta repressão desses TDEs no tempo de 72 horas. Essa repressão pode ter contribuído para a reduzida expressão dos sintomas, como apresentado na Figura 5. Também foram identificados em Valência treze transcritos induzidos que codificam para proteínas R como por exemplo: proteína de resistência CC-NBS-LRR, proteína de resistência TIR-NBS-LRR e a proteína de resistência a doenças RPM1 (APÊNDICE B Tabela 3). Diferente de Kumquat, Valência reprimiu somente dois transcritos que codificam para proteína de resistência CC-NBS-LRR e proteína de resistência TMV (domínio TIR) (APÊNDICE B Tabela 4). Cernadas et al. (2008) também identificaram a expressão de proteínas de resistência a doenças com domínio CC-NBS-LRR em plantas de laranja doce 48 horas após inoculação com Xac.

Considerando que plantas possuem dois tipos de imunidade a patógenos, PTI “*PAMP-triggered immunity*” e ETI “*effector-triggered immunity*” (Figura 15), uma peça chave para ativação do sistema PTI de defesa de plantas é a ativação de PRRs (receptores de percepção de reconhecimento específico de padrões do patógeno), localizadas na membrana das células do hospedeiro. As PRRs geralmente consistem em um domínio extracelular rico em repetições de leucina e um domínio quinase intracelular (DODDS & RATHJEN, 2010). A ativação do sistema ETI dá-se pelo reconhecimento de uma molécula de virulência do patógeno através de receptores específicos da planta como os genes R. A maioria dos genes R clonados codifica para uma proteína que apresenta um domínio central de ligação a nucleotídeos (NBS), ou com regiões repetidas ricas em leucina (LRR), a qual permite o reconhecimento de diversos efetores de todas as classes de patógenos de plantas, e um terceiro domínio variável no N-terminal que pode ser TIR (*Toll-interleucina*) ou CC (*coiled-coil*) (DEYOUNG & INNES, 2006). Além das classes TIR e CC das proteínas R, existem outras classes que se destacam. Uma delas é a LRR quinase que codifica para proteínas com receptores LRR extracelulares e domínios quinases serina/treonina citoplasmáticos (AFZAL et al., 2008).

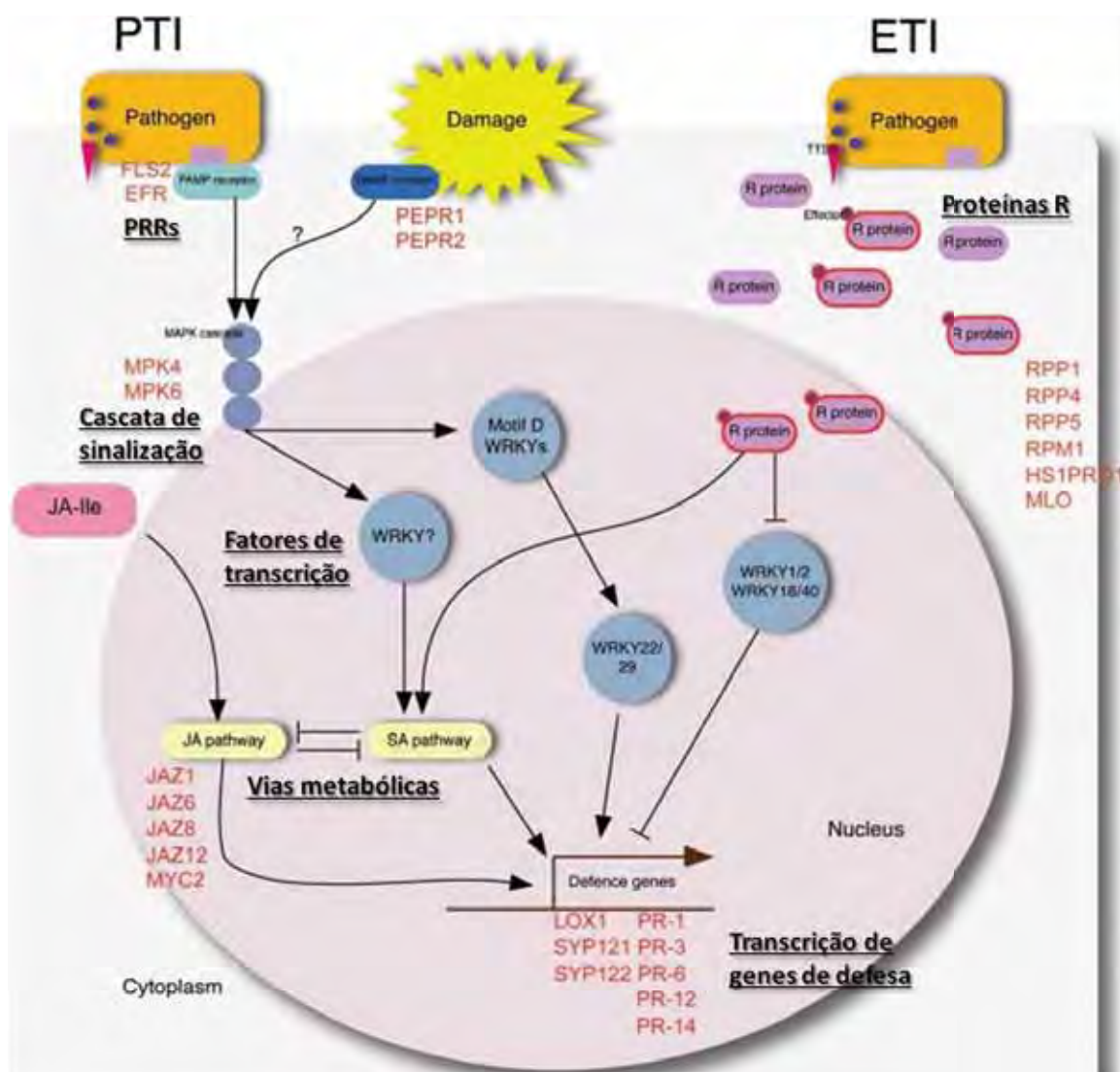


Figura 15. Modelo de interação planta-patógeno com os sistemas PTI e ETI para ativar a imunidade em plantas contra bactérias patogênicas. Fonte: adaptado de KIM et al. (2011).

Na avaliação da expressão gênica temporal, em Kumquat foram observados 143 transcritos induzidos em todos os tempos, enquanto Valência apresentou somente três transcritos induzidos nessa mesma condição (Figura 16). Em relação aos transcritos reprimidos, na espécie Valência nenhum transcrito foi reprimido em todos os tempos de infecção, já na espécie Kumquat 1.060 transcritos foram reprimidos em todos os tempos de infecção (Figura 17). Do total de TDEs para cada espécie, notou-se que a porcentagem de TDEs induzidos em comum nos três tempos de infecção na espécie Valência (Figura 16A) foi de 0,1% enquanto para Kumquat (Figura 16B) esse valor foi de 3,47%. Diante disso, pode-se supor que Kumquat mantém a expressão de muitos transcritos durante os primeiros dias de infecção, o que pode ser importante para reposta de defesa a Xac.



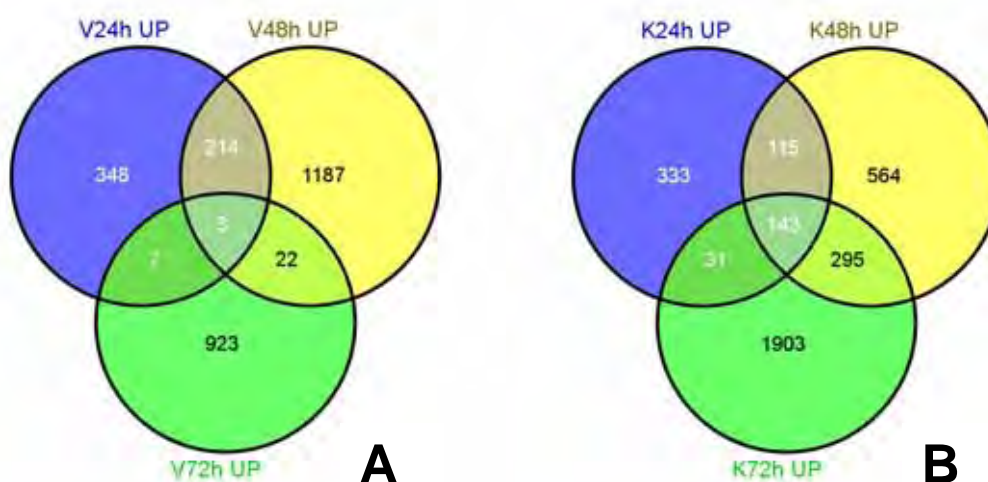


Figura 16. Diagramas de Venn da expressão gênica temporal (24, 48 e 72 horas após inoculação com Xac) de Valência (A) e Kumquat (B), ilustrando os transcritos que foram induzidos em comum ou transcritos que são exclusivos de cada tempo.

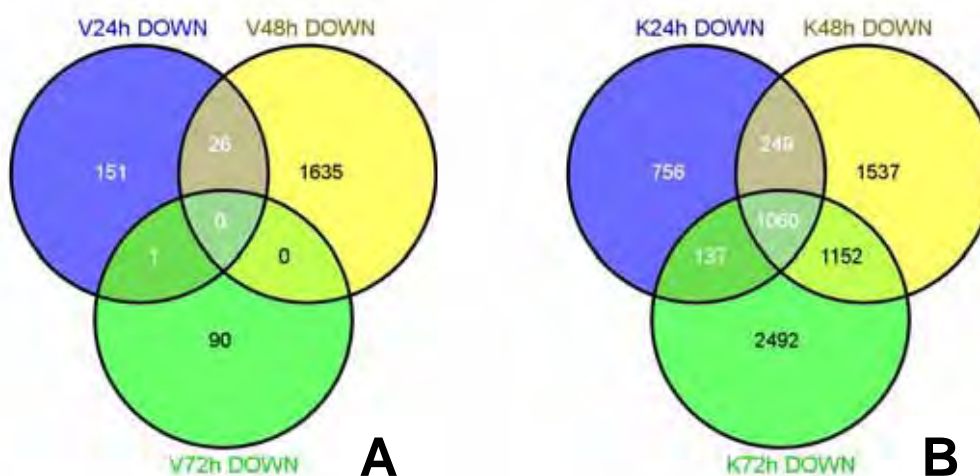


Figura 17. Diagramas de Venn da expressão gênica temporal (24, 48 e 72 horas após inoculação com Xac) de Valência (A) e Kumquat (B), ilustrando os transcritos que foram reprimidos em comum ou transcritos que são exclusivos de cada tempo.

A espécie Kumquat apresentou nos três tempos de infecção alta expressão de onze transcritos (Tabela 5) que codificam para, por exemplo, receptor com repetições ricas em leucina (LRR) proteína serina/treonina quinase. Aparentemente, a percepção do patógeno em Kumquat se mantém ativa durante os primeiros dias de infecção para a efetiva transdução e tradução do sinal para defesa.

Tabela 5. Transcritos induzidos em comum em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 h) na espécie Kumquat.

Transcrito	Função putativa	Fold-change		
		24 h	48 h	72 h
transcript2271466	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	61,04418049	36,08888049	24,5827822
transcript10666517	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	45,88033947	32,50780661	23,62936192
transcript144678	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	64,54352841	INF	61,68886853
transcript11033914	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	30,93250759	122,5561693	31,38556469
transcript2745659	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	39,65927649	42,76428035	718,6212053
transcript355310	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	42,76980798	INF	133,6592152
transcript2745060	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	31,33860476	77,18431087	14,82697366
transcript10646388	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	31,66076695	41,98200693	20,02182575
transcript280311	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	19,12976866	INF	31,92669512
transcript2378629	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	47,43560522	20,16527041	43,50688623
transcript2425726	Receptor LRR proteína serina/treonina quinase	INF	INF	29,22104299
transcript2735263	Oxidase de explosão respiratória	25,73257869	14,52793496	26,51539086
transcript315437	Oxidase de explosão respiratória	23,84740809	29,72639	INF
transcript305063	Fator de transcrição NAC	41,21454224	50,58701456	56,27756427
transcript293391	Fator de transcrição NAC	23,58819713	34,07235345	67,64130321
transcript10825571	Fator de transcrição NAC	28,77241628	18,07920795	35,7146081
transcript1097985	Fator de transcrição NAC	INF	INF	62,77112938
transcript10883487	Fator de transcrição WRKY	45,1027066	17,73153088	24,62143437
transcript2375657	Fenilalanina amônia-liase	16,65430402	58,93126438	16,92262422
transcript3173564	ACC Oxidase	22,25974097	29,8567689	26,40716477
transcript5947484	ACC Oxidase	16,05583166	18,7745621	16,92262422
transcript1186203	ACC Oxidase	21,38490399	74,05521719	76,84052045
transcript310274	ACC Oxidase	11,71561774	29,86862153	19,13914532
transcript2267691	ACC Oxidase	INF	64,66793613	132,0358239
transcript10143900	ACC Oxidase	INF	56,32368631	INF
transcript2244405	ACC Oxidase	INF	41,72124912	103,8970417
transcript2221944	Receptor de etileno	47,82442165	374,9697265	91,7757202
transcript10687718	Receptor de etileno	36,28953405	410,9543038	153,9516061
transcript2477372	Fator de transcrição domínio AP2/ERF	INF	INF	INF
transcript281435	Proteína relacionada à patogênese PR 1	INF	INF	1193,733719
transcript60306	Proteína relacionada à patogênese PR 1	37,1708513	150,891851	32,46782554
transcript10024241	Proteína relacionada à patogênese PR 1	38,49282719	406,7821789	24,17049235
transcript1219734	Proteína relacionada à patogênese PR 2	INF	31,81245245	INF
transcript4367725	Proteína relacionada à patogênese PR 4	INF	81,35643578	87,66312897
transcript5372480	Proteína relacionada à patogênese PR 4	INF	26,0757807	61,32811491
transcript2412647	Proteína relacionada à patogênese PR 5 (taumatina)	36,36104052	197,8914703	43,29043406
transcript2610466	Proteína relacionada à patogênese PR 5 (taumatina)	INF	INF	INF
transcript5416760	Proteína relacionada à patogênese PR 5 (taumatina)	INF	INF	971,8702446
transcript5200628	Proteína relacionada à	INF	INF	225,1102571

	patogênese PR 5 (taumatina)			
transcript276175	Proteína relacionada à patogênese PR 5 (taumatina)	31,88294777	63,97258198	570,3514687
transcript10677480	Peroxidase PR 9	14,00664924	45,91533258	15,79836877
transcript457132	Peroxidase PR 9	14,14022223	37,49274414	12,62951359

INF: representa expressão somente no tecido infectado

Os mecanismos de sinalização das plantas envolvidos na interação planta-patógeno podem ser divididos em três etapas básicas: a) percepção de sinal, ou reconhecimento, realizada por receptores celulares específicos (ETI - proteínas R) ou inespecíficos que reconhecem um determinado sinal (PTI- PRRs); b) a transdução de sinal, que consiste na transmissão desse sinal para o sítio de ação dentro da célula; e c) a tradução de sinal, que é a conversão dos sinais em repostas celulares específicas como, por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e de certas enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas (CAMPOS et al., 2010).

Em Kumquat foram identificados dois transcritos (Tabela 5) que codificam para uma proteína homóloga a Oxidase de Explosão Respiratória (RBOH) que tem um papel de suma importância na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS *Reactive Oxygen Species*) durante a resposta da planta a estresses abióticos e bióticos (CLAY et al., 2009; ZIPFEL et al., 2009). No começo do processo infeccioso moléculas de ROS podem se acumular rapidamente em um fenômeno conhecido como explosão oxidativa. Essas moléculas podem agir causando danos diretos aos patógenos, através de seu efeito tóxico ou inibindo seu desenvolvimento, ou agindo como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa (TORRES et al., 2005). Sabe-se também que o acúmulo de ROS está associado à ativação da resposta de hipersensibilidade (HR) associada à morte celular (GECHEV & HILLE, 2005).

Genes MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) envolvidos na cascata de sinalização são componentes *downstream* em PTI. Foram identificados transcritos induzidos de MAPK no tempo de 72 horas após inoculação em Kumquat. Segundo Rudrabhatla et al. (2006) as MAPKs fosforilam fatores de transcrição, os quais desempenham papel de suma importância no sistema imunológico da planta como resposta a estresses abióticos e bióticos (EULGEM et al., 2007; PANDEY et al., 2009), e estão envolvidos em vários pontos das vias de sinalização que regulam essas respostas. Foram identificados quatro transcritos que codificam para o fator de

transcrição NAC e um que codifica para o fator de transcrição WRKY (Tabela 5) induzidos em todos os tempos em Kumquat. Genes da família de fatores de transcrição NAC são específicos de plantas e atuam em processos diversos como no desenvolvimento e no reconhecimento de estímulos ambientais (OLSEN et al., 2005). A transcrição de genes WRKY é ativada pela ocorrência de ferimentos, infecção por patógenos e também em condições de estresse abiótico (ZHANG et al., 2010).

Em Kumquat, nos três tempos de infecção, também foi verificada a expressão de um transcrito que codifica para o gene fenilalanina amônia liase (Tabela 5). O ácido salicílico é uma molécula que participa da transdução de sinal na defesa de plantas e é derivado do ácido benzóico ou ácido cumárico na rota dos fenilpropanóides. A principal enzima que catalisa a síntese do ácido salicílico é a fenilalanina amônia liase (WILDERMUTH, 2006). O ácido salicílico está envolvido na defesa de plantas, sozinho ou em conjunto com outros sinalizadores endógenos como metil jasmonato, etileno e ácido abscísico (PIETERSE et al., 2005). Em Kumquat, entre os transcritos expressos nos três tempos de infecção (Tabela 5), também foram identificados vários genes envolvidos na síntese de etileno, como 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC oxidase), receptores de etileno e fatores de transcrição AP2/EFR (*apetala2/ethylene responsive factor*), esse último tendo se expressado somente no tecido infectado.

O fitohormônio etileno é um dos principais moduladores em muitos processos de desenvolvimento e resposta ao estresse, como germinação de sementes, alongação celular, senescência, amadurecimento de frutos e ainda na reação de plantas a patógenos (BROEKART et al., 2006). No trabalho de Cernadas et al. (2008) foram descritos resultados que demonstram alterações transcricionais em plantas de *Citrus sinensis*, entre 6 e 48 horas após inoculação com Xac, na expressão de genes chaves na síntese de etileno incluindo 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sintase e ACC oxidases, receptores de etileno e vários fatores de transcrição AP2/ERF.

Como apresentado na Tabela 6, Valência manteve uma alta expressão durante os três tempos de infecção de dois genes do fator de transcrição AP2/ERF. Também foi identificado um transcrito expresso pertencente à família das lipoxigenases de plantas, gene esse relacionado à síntese do ácido jasmônico que é um hormônio vegetal que induz a expressão de diversos genes relacionados à

defesa contra estresses (SOARES et al., 2007). Interessantemente o etileno e o ácido jasmônico podem atuar sinergisticamente para induzir proteínas relacionados à patogênese (PR) em reações de defesa na interação planta-patógeno (BROEKAERT et al., 2006).

Tabela 6. Transcritos induzidos em comum em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 h) na espécie Valência.

Transcrito	Função putativa	Fold-change		
		24 h	48 h	72 h
transcript11170761	Fator de transcrição domínio AP2/ERF	INF	10,25260326	13,1976968
transcript11170783	Fator de transcrição domínio AP2/ERF	11,19065941	51,47484693	8,336557493
transcript9881844	Lipoxigenase de planta	16,49757005	10,08313874	4,395498407

INF: representa expressão somente no tecido infectado

Foram identificadas em Kumquat, nos três tempos de infecção, proteínas relacionadas à patogênese das famílias PR-1, PR-2, PR-4, PR-5 e PR-9 (Tabela 5). A indução de proteínas PR pode ser considerada como uma tradução de sinais emitidos pela célula após a infecção (CAMPOS et al., 2010). Utiliza-se o termo proteínas PR para todas aquelas proteínas, com função enzimática ou não, que são produzidas após uma infecção por fitopatógenos. Atualmente estão agrupadas em 17 famílias as quais são numeradas de acordo com a ordem que foram descobertas (VAN LOON et al., 2006). As peroxidases pertencem à família PR-9 e são glicoproteínas antioxidantes capazes de catalisar um grande número de reações como produção ou catálise de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formação de lignina, suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos (ALVAREZ et al., 1998).

Em relação aos transcritos reprimidos em comum em todos os tempos de infecção de Kumquat, foram encontrados muitos genes relacionados à fotossíntese como: enzima ribulose bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), proteína de ligação de clorofila AB, e proteínas dos fotossistemas I e II. Esses dados demonstram que a repressão de genes envolvidos no processo fotossintético durante a interação planta-patógeno representa um custo para a adaptação da planta quando sua energia é redirecionada para a resposta de defesa (KHALAF et al., 2011). A repressão de genes relacionados à fotossíntese também foi identificada por Fu et al. (2011) em plantas de Newhall após infecção por Xac. Khalaf et al.

(2011) também relataram a repressão de genes da maquinaria fotossintética de Kumquat seis horas após inoculação com Xac. Em outro estudo Bonfig et al. (2006) identificaram a repressão de genes da via fotossintética do transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* três horas após infecção por *Pseudomonas syringae* e, em outro trabalho, Lu et al. (2012), após análise do transcriptoma de *Nicotiana tabacum* infectado com *Cucumber mosaic virus* (CMV), relataram a inibição da via da fotossíntese em vários estágios de desenvolvimento da doença. Plantas, quando expostas a estresse biótico, apresentam uma repressão dos seus genes fotossintéticos, pois provavelmente há um direcionamento do metabolismo para a produção de proteínas para a defesa contra o patógeno, como por exemplo a realocação do nitrogênio da via fotossintética na maquinaria de defesa (FU et al., 2012).

## **5.6 Transcritos diferencialmente expressos na comparação tempo a tempo entre Valência e Kumquat**

A análise da expressão gênica temporal após a infecção pode revelar genes que são expressos logo no início da infecção e os que são expressos tardiamente, podendo assim revelar as diferenças nos mecanismos de defesa da interação planta-patógeno. A análise dos transcritos diferencialmente expressos tempo a tempo entre Valência e Kumquat permitiu a identificação de um pequeno número de TDEs em comum, tanto para transcritos induzidos quanto para transcritos reprimidos (Figura 18). Em razão do grande número de transcritos diferencialmente expressos, a anotação dos transcritos foi realizada para aqueles que apresentaram os menores  $p$ -valor. Nas Tabelas 7, 8 e 9 estão apresentados os transcritos induzidos identificados exclusivamente em Kumquat (ND em Valência) e exclusivos em Valência (ND em Kumquat), e também os transcritos que foram expressos em comum nas três espécies. Na comparação dos TDEs induzidos de Valência e Kumquat 24 horas após inoculação com Xac (Figura 18A), 44 transcritos foram expressos em comum e 528 e 578, foram exclusivamente expressos em Valência e Kumquat respectivamente.

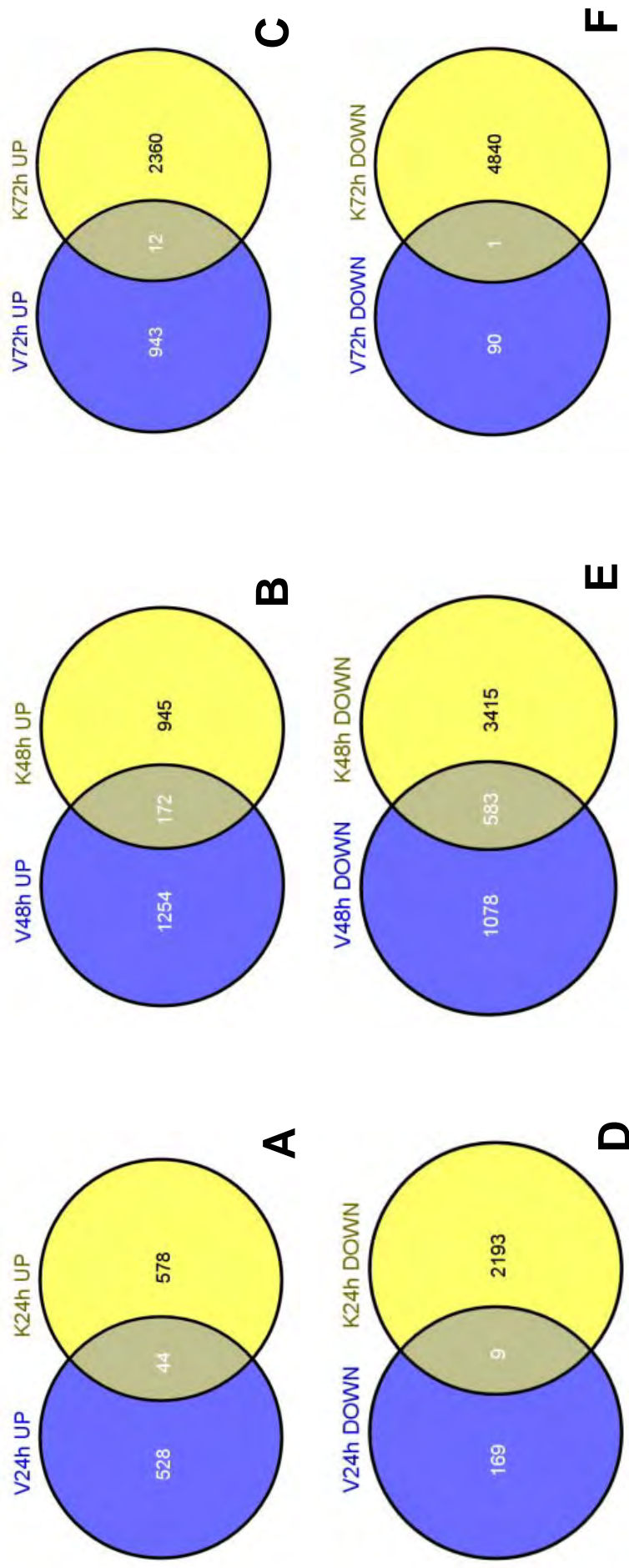


Figura 18. Diagramas de Venn da expressão gênica dos transcritos induzidos em comum ou exclusivos entre as espécies Valência e Kumquat na comparação tempo a tempo 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) após a inoculação com *Xac*, e da expressão gênica dos transcritos reprimidos em comum ou exclusivos entre as espécies Valência e Kumquat na comparação tempo a tempo 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F) após a inoculação com *Xac*.

Na Tabela 7 estão apresentados alguns desses transcritos. Dentre os 578 transcritos induzidos somente em Kumquat o que apresentou menor  $p$ -valor codifica para o citocromo P450 monoxigenase (P450s).

Tabela 7. Transcritos induzidos, com os menores  $p$ -valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 24 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Função putativa	24 h			
		<i>Fold-change</i> Kumquat	<i>P</i> -valor Kumquat	<i>Fold-change</i> Valência	<i>P</i> -valor Valência
transcript10800485	Citocromo P450	640,7694869	0,000169904	ND	ND
transcript10760157	Homogentisate geranilgeranil transferase	INF	0,000191646	ND	ND
transcript2257639	Proteína desconhecida	257,7852972	0,000494993	ND	ND
transcript11131405	SAM dependente carboxi metiltransferase	160,7755964	0,000590837	ND	ND
transcript1220286	Enzima ponte Berberina	265,1728095	0,000880595	ND	ND
transcript2668772	EF-Hand 1, ligação de cálcio	INF	0,001512903	ND	ND
transcript2875339	Gnk2 domínio homólogo	INF	0,000251557	24,53484777	0,001914715
transcript10224318	Gnk2 domínio homólogo	INF	0,000319685	58,37601711	0,000767592
transcript2148089	Oxidoredutase	141,1835682	0,00072027	INF	0,000903008
transcript2148223	Oxidoredutase	122,6715856	0,001250274	INF	0,00244393
transcript7739684	Quitinase I	INF	0,002712129	INF	0,027007494
transcript79598	Proteína relacionada à patogênese PR1	57,2856216	0,003319936	22,1715595	0,000578663
transcript11062541	Proteína de transferência lipídica	ND	ND	INF	6,18E-07
transcript283908	Proteína de transferência lipídica	ND	ND	89,87137812	2,33E-05
transcript821132	Cisteína proteinase	ND	ND	72,68160233	2,39E-05
transcript2248565	Cisteína proteinase	ND	ND	46,6373615	3,79E-05
transcript2150976	Citocromo P450	ND	ND	45,30101987	3,89E-05
transcript294614	Cisteína proteinase	ND	ND	36,66383051	8,32E-05

INF: representa expressão somente no tecido infectado  
ND: Transcrito não detectado



Outros dez transcritos codificam para P450s, oito deles identificados apenas no tecido infectado de Kumquat. Valência também apresentou dez transcritos que codificam para P450s, um deles no ranking dos menores  $p$ -valor (Tabela 7). No entanto, os transcritos que codificam para P450s em Valência apresentam *Fold-change* inferior aos transcritos de Kumquat. Plantas utilizam uma ampla gama da família das enzimas P450s, as quais estão envolvidas no metabolismo oxidativo de compostos endógenos, tais como esteróis, terpenos, flavonóides, ácidos graxos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos e fenilpropanóides (MENDOZA, 2009). Relatos de indução de P450s durante a interação-planta patógeno já foi descrita em outros trabalhos, podendo-se citar Swarbrick et al. (2008), os quais identificaram diversos genes que codificam para P450s, e foram induzidos durante a resposta de resistência de plantas de arroz ao patógeno *Striga hermonthica*. Nesse sentido Khalaf et al. (2007) também encontraram sequências expressas induzidas de P450s em folhas de Kumquat após infecção com Xac, sugerindo o envolvimento dessa proteína em mecanismos de defesa de plantas.

A enzima Homogentisate geranilgeranil transferase codificada pelo transcrito *transcript10760157* encontrada em Kumquat (Tabela 7) expressou-se somente no tecido infectado e outros sete transcritos que codificam para essa enzima também foram identificados. Essa enzima participa da via biossintética da vitamina E em plantas (Figura 19). Plantas contêm uma ampla gama de vitaminas que são essenciais em razão de sua química redox e função como cofatores, tendo algumas delas alto potencial antioxidante, como o ascorbato (vitamina C) e o tocochromanols, (tocopherols e tocotrienols) (vitamina E) (ASENSI-FABADO et al., 2010).

Outra enzima encontrada em Kumquat é da família SAM dependente carboxi metiltransferase de plantas (Tabela 7). Essas enzimas atuam em uma variedade de substratos incluindo ácido salicílico, ácido jasmônico e 7-metilxantina. O SA carboxi metiltransferase (SAMTs) é responsável pela formação de salicilato de metila a partir do ácido salicílico. O salicilato de metila pode atuar sendo convertido para ácido salicílico, e assim ativar genes relacionados à defesa nos tecidos infectados de plantas (KOO et al., 2007). Apesar de Kumquat no tempo de 24 horas ter apresentado três transcritos da família SAM dependente carboxi metiltransferase, um deles no ranking dos menores  $p$ -valor, Valência 24 horas apresentou 22 transcritos que codificam para proteínas dessa família. Interessantemente Koo et al. (2007) revelaram que a superexpressão de ácido salicílico carboxil metiltransferase

em plantas transformadas de *Arabidopsis* infectadas com *Pseudomonas syringae* ou o fungo *Golovinomyces orontii*, falharam no acúmulo de ácido salicílico, tornando-se mais suscetíveis a doença do que as plantas de *Arabidopsis* não transformadas.

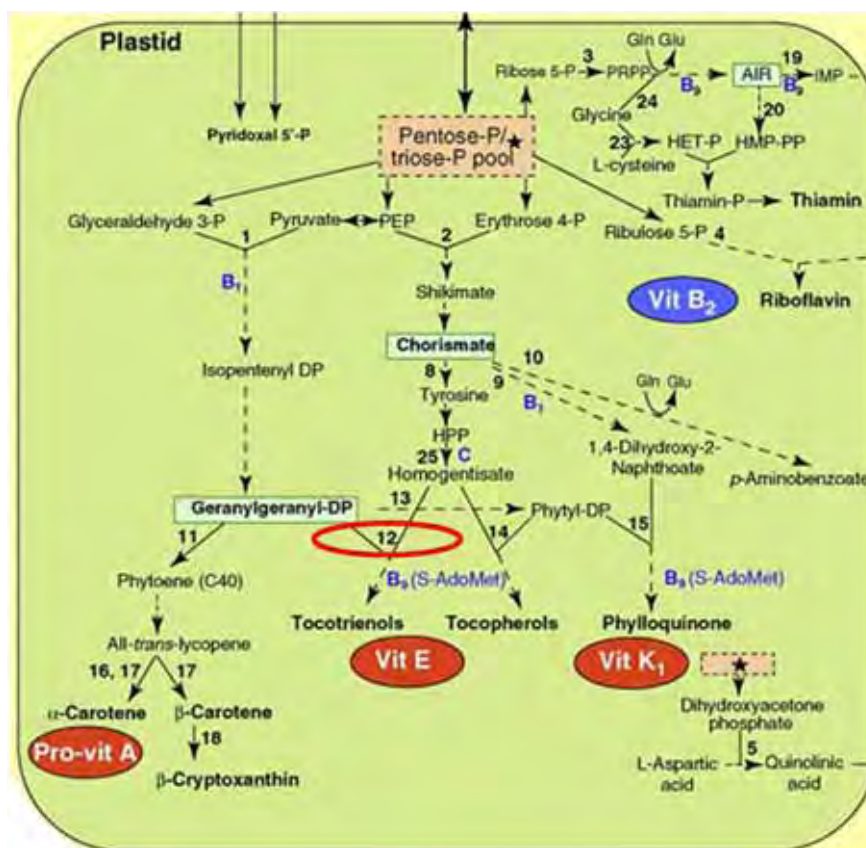


Figura 19. Esquema de pontos cruzados da via biossintética de vitaminas em plantas. O número doze indicado em vermelho ilustra o ponto de atuação da homogentisate geranylgeranyl transferase na via biossintética para a produção de vitamina E. Fonte: adaptado de Asensi-Fabado et al. (2010).

Ainda em Kumquat outra enzima encontrada com baixo *p*-valor e alto *Fold-change* foi a enzima ponte berberina (BBE) (Tabela 7) e outros dez transcritos que codificam para BBE também foram identificados em Kumquat. Essa enzima participa da síntese de alcaloides, que são compostos naturais das plantas (DIXON, 2001) (Figura 20). Os alcaloides podem inibir a multiplicação de tripanossomas, fagos, fungos e bactérias. As atividades aleloquímicas dos alcaloides podem funcionar como compostos químicos de defesa (SCHEMELLER et al., 1997). Cernadas et al. (2008) também identificaram altos níveis de expressão de FAD-linked oxidases (CPRD2 e nactarin 5), similares a enzima BBE, em plantas de laranja doce Pêra Rio após infecção por Xac.

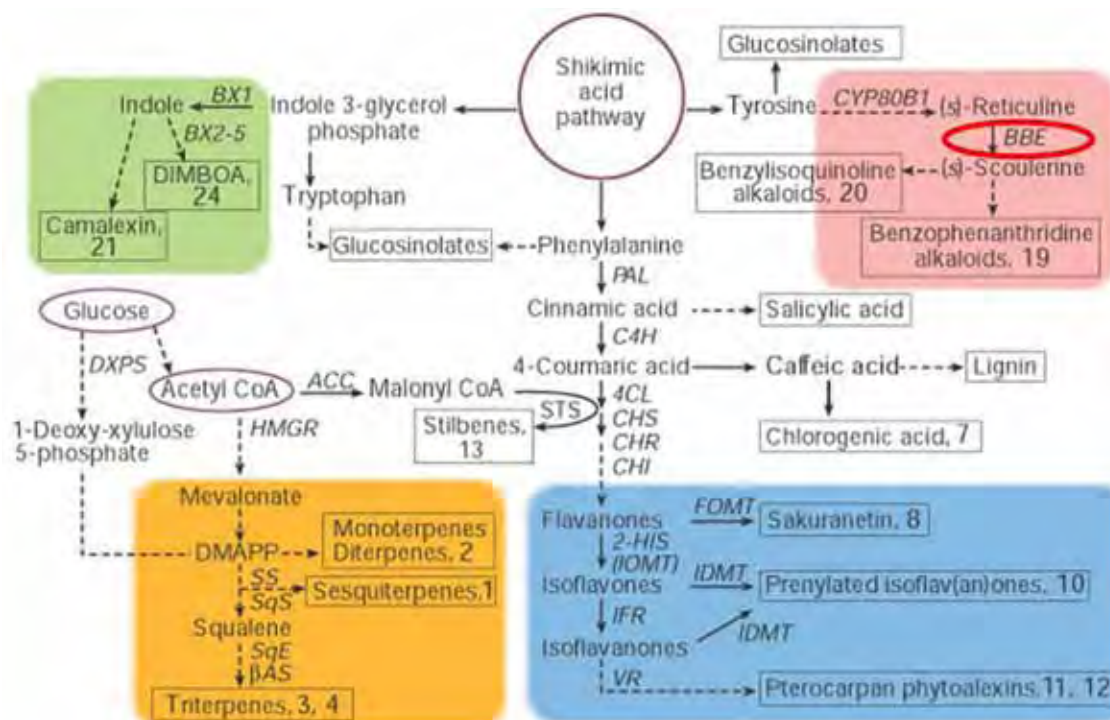


Figura 20. Via biossintética de relacionamento entre produtos antimicrobianos naturais de plantas. Precursores primários estão circulados e os produtos finais estão apresentados dentro de caixas de texto. A enzima BBE está circulada em vermelho, ilustrando sua ação na produção dos alcaloides *benzylisoquinoline* e *benzophenanthridine*. Fonte: adaptado de Dixon (2001).

No ranking dos seis transcritos com menor  $p$ -valor em Kumquat, foi identificado o transcrito que codifica para o domínio proteico EF-Hand 1, ligação de cálcio (Tabela 7). Outros seis transcritos que codificam para proteínas com esse domínio também foram identificados entre os 578 transcritos induzidos em Kumquat. O aumento nos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^+$ ) é reconhecido por  $\text{Ca}^+$  sensores ou proteínas de ligação de cálcio, que podem ativar muitas proteínas quinases dependentes de cálcio. A maioria dos  $\text{Ca}^+$  sensores ligam o  $\text{Ca}^+$  utilizando um *helix-loop-helix motif* denominado de “EF hand”. Segundo Tuteja (2009) a regulação da expressão gênica por  $\text{Ca}^+$  é fundamental para defesa de plantas contra vários estresses.

Em relação aos transcritos induzidos em comum entre Kumquat e Valência, foram identificados dois transcritos (*transcript2875339* e *transcript10224318*) que codificam para uma proteína com domínio proteico homólogo ao *ginkbilobin-2* (GnK2) (Tabela 7). Vale ressaltar que esses transcritos apresentaram um *Fold-change* INF em Kumquat, ou seja, uma expressão somente no tecido infectado, enquanto Valência apresentou *Fold-change* de 24,5 e 58,3 para esses mesmos transcritos (*transcript2875339* e *transcript10224318*, respectivamente). Miyakawa et

al. (2009) descreveram que a proteína antifúngica GnK2 tem de 28 a 31% de sua sequência idêntica ao domínio extracelular de receptores do tipo quinase rico em cisteínas (CRK) de *Arabidopsis*, os quais estão envolvidos em HR.

O transcrito *transcript7739684*, que codifica para quitinase I (Tabela 7), foi induzido somente em tecidos inoculados, mas foi identificado tanto em Kumquat quanto em Valência. No entanto Kumquat apresentou um total de sete transcritos que codificam para glicosídeo hidrolases (GH) da família 19 no tempo de 24 horas, enquanto Valência apresentou somente três. Quitinases I, II e IV pertencem à família 19 de GH. Essas quitinases demonstram atividade de lisozima que hidrolisa a ligação  $\beta$ -1,4 entre GLcNAc (N-acetilglucosamina) e ácido N-acetilmurâmico. Essas quitinases/lisozimas demonstram alta atividade na parede celular peptídeoglicana (mureína) de bactérias (MINIC, 2008). Cernadas et al. (2008) também identificaram a expressão de quitinases 48 horas após inoculação com Xac em laranja doce, e Khalaf et al. (2011) identificaram a expressão de quitinases na espécie Kumquat seis horas após inoculação com Xac.

Entre os transcritos expressos em comum com menor *p*-valor foi identificada uma proteína relacionada à patogênese PR1 (Tabela 7). Kumquat apresentou a expressão de cinco PRs e Valência apresentou seis transcritos que codificam para PR1. No entanto o *Fold-change* dos transcritos que codificam para PR1 em Kumquat foram maiores do que os verificados em Valência. Adicionalmente, foram identificados quatro transcritos que codificam para PR4 em Kumquat, dois deles expressos somente nos tecidos inoculados. Esses dados demonstram que Kumquat apresentou maior expressão de proteínas PR 24 horas após a inoculação por Xac.

Dentre os transcritos com menor *p*-valor expressos somente em Valência no tempo de 24 horas, dois transcritos codificam para a proteína de transferência lipídica de planta (*Lipid transfer protein* LTP). O transcrito *transcript11062541* foi identificado somente em tecido infectado e para o transcrito *transcript283908* foi verificado *Fold-change* de 89,8 (Tabela 7). Apesar destes dois transcritos terem sido expressos somente em Valência, um outro transcrito (*transcript11049044*) que também codifica para LTP, foi identificado tanto em Valência quanto em Kumquat, com *Fold-change* de 253,1 em Valência e de 11,5 em Kumquat. Esses dados demonstram que a alta expressão dessa proteína em Valência pode estar relacionada à sua interação com Xac. As LTPs de plantas são proteínas ricas em cisteínas. Estudos caracterizaram essas proteínas como sendo um componente

potencial que conecta a sinalização celular à defesa das plantas (BLEIN et al., 2002). Como exemplo, em *A. thaliana* essa proteína foi identificada atuando na proteção contra danos celulares em condições de baixa temperatura, estresses salinos e contra patógenos (LI et al., 2012). Interessantemente Jayaraj & Punja (2007), demonstraram que a expressão combinada de genes da quitinase e de LTPs em plantas de cenoura transgênicas resultaram em maior resistência aos fungos *Botrytis* e *Alternaria*.

Laranja Valência apresentou pelo menos oito transcritos que codificam para cisteína proteinases, três desses apresentados na Tabela 7. Apesar de também terem sido identificados em tecido controle de Valência, os valores observados de *Fold-change* indicam a maior expressão em tecidos infectados. As enzimas cisteína proteinases são descritas como essenciais na proteólise em plantas. Elas estão envolvidas na degradação e reconstrução de proteínas em resposta a diferentes estímulos externos e também desempenham a função de remover proteínas deformadas. Dessa forma, a proteólise por cisteína proteinases é um processo altamente regulado. Em resposta a fatores bióticos, as proteínas celulares podem ser reconstruídas. Proteínas danificadas são eliminadas por degradação e substituídas por proteínas recém-formadas, como, por exemplo, proteínas *heat shock*, proteínas induzidas por desidratação e proteínas PR (GRUDKOWSKA et al., 2004).

O diagrama de Venn apresentando na Figura 18B ilustra que 1.254 e 945 TDEs foram induzidos exclusivamente em Valência e Kumquat, respectivamente, 48 horas após inoculação, enquanto 172 TDEs foram induzidos em ambas as espécies nesse mesmo tempo. Na Tabela 8 são apresentados alguns destes transcritos. O transcrito que codifica para a enzima BBE apresentou alta expressão entre os transcritos induzidos exclusivamente em Kumquat 24 horas após inoculação (Tabela 7). No tempo de 48 horas após inoculação foram identificados onze transcritos que codificam para BBE (Tabela 8), destacando-se que para esse transcrito foi observado *Fold-change* INF. Adicionalmente, Valência também apresentou a indução de onze transcritos que codificam para BBE no tempo de 48 horas, no entanto, foram observados menores valores de *Fold-change* em relação a Kumquat.

Na anotação dos transcritos com menor *p*-valor no tempo de 48 horas após inoculação em Kumquat, foram identificados três transcritos que codificam para proteínas do tipo Germin (GLPs) (Tabela 8).

Tabela 8. Transcritos induzidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 48 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Função putativa	48 h			
		<i>Fold-change</i> Kumquat	<i>P</i> -valor Kumquat	<i>Fold-change</i> Valência	<i>P</i> -valor Valência
transcript2823657	Enzima de ponte Berberina	INF	1,08469E-06	ND	ND
transcript391260	Proteína germin	1316,30541	2,3224E-05	ND	ND
transcript285695	Protease	INF	2,75428E-05	ND	ND
transcript1121098	Proteína germin	INF	4,37619E-05	ND	ND
transcript2168489	Proteína de armazenamento de sementes globulina	1312,133285	4,47291E-05	ND	ND
transcript1487861	Proteína germin	1277,713254	4,70919E-05	ND	ND
transcript10800485	Citocromo P450	1003,396041	7,2291E-05	INF	0,003266515
transcript79598	Proteína relacionada à patogênese PR1	282,0747577	0,00017436	36,33710309	7,60E-05
transcript1188166	Proteína hipotética	263,5392236	0,0002084	8,949844786	0,035444232
transcript2221944	Receptor de etileno	374,9697265	0,00023747	11,12110891	0,042215977
transcript2776164	Proteína relacionada à patogênese PR1	232,4469594	0,00025482	90,40461229	2,21E-06
transcript7739684	Quitinase I	356,1951644	0,00026531	11,77778391	0,012999516
transcript2248565	Cisteína proteinase	ND	ND	194,5782166	8,09E-08
transcript294614	Cisteína proteinase	ND	ND	185,4365474	9,03E-08
transcript11049044	Proteína de transferência lipídica	ND	ND	303,1296542	1,43E-07
transcript88863	Cisteína endopeptidase	ND	ND	171,6736077	1,87E-07
transcript9182509	Cisteína proteinase	ND	ND	95,05418798	1,53E-06
transcript821132	Cisteína proteinase	ND	ND	87,96267568	1,99E-06

INF: representa expressão somente no tecido infectado

ND: Transcrito não detectado

Um fato que chamou a atenção na anotação dos transcritos que codificam para essa proteína é que no tempo de 24 horas após a infecção em Kumquat foram identificados dois transcritos que codificam para GLPs, com expressão somente no tecido infectado. No tempo de 48 horas foram identificados 45 transcritos que

codificam para GLPs, sendo que 41 desses foram expressos somente no tecido infectado, e adicionalmente os outros quatro transcritos apresentaram altos valores de *Fold-change* que variaram de 1.316,3 a 762,4. Esses transcritos não foram identificados nem como induzidos nem como reprimidos em Valência, sendo um forte indicativo de que o mesmo esteja relacionado com a resistência de Kumquat a Xac. As GLPs constituem uma família ubíqua de proteínas de plantas, as quais estão envolvidas em muitos processos relacionados ao estresse e desenvolvimento (BERNA & BERNIER, 1999). Em trabalho recente, Wang et al. (2013), identificaram o aumento da expressão de três GLPs em plantas de amendoim após infecção pelo fungo *Aspergillus flavus*. Esses autores também constataram que cada gene GLP apresentou uma resposta única a vários estresses abióticos, bióticos e estímulos por hormônios de plantas, indicando que as GLPs podem ter distintas funções em defesa de plantas. Nos testes *in vivo* com plantas GLP transgênicas de *Arabidopsis* observou-se que esses genes conferiram maior tolerância a estresse salino. No trabalho de Swarbrick et al. (2008), foi identificada a indução de proteína GLP durante a resposta de resistência de plantas de arroz ao patógeno *Striga hermothica*. Por outro lado, no trabalho de Cernadas et al. (2008), foi identificada a repressão de um gene GLP em laranja doce Pêra Rio após 48 horas de infecção por Xac. Também foram identificados transcritos com alta significância estatística que codificam para proteínas da família PR1 em Valência e Kumquat no tempo de 48 horas (Tabela 8). O transcrito *transcript79598*, o mesmo que foi expresso em comum no tempo de 24 horas, apresentou um aumento no *Fold-change* de 282,0 e 36,3, em Kumquat e Valência respectivamente.

Adicionalmente, do total de PR1s expressas em Kumquat e Valência, sete e oito, respectivamente, o *Fold-change* em Kumquat sempre foi maior que em Valência. Esses dados indicam que tanto Valência quanto Kumquat expressam PR1s após infecção por Xac, no entanto, Kumquat sempre apresentou maior de expressão desses genes. Outros autores também observaram a expressão de PR1s após infecção por patógeno (KHALAF et al., 2001; LU et al., 2012). O transcrito *transcript10800485* que codifica para o citocromo P450 também foi expresso em comum entre as espécies no tempo de 48 horas após inoculação (Tabela 8). Esse mesmo transcrito foi identificado somente em Kumquat no tempo de 24 horas após inoculação, sugerindo assim que a velocidade com que Kumquat expressou este transcrito de P450s pode ter influenciado na sua maior resistência a Xac.

O transcrito *transcript2221944* que codifica para receptor de etileno foi o único desse tipo expresso em Valência no tempo de 48 horas, com um *Fold-change* de 11,1, inferior ao observado em Kumquat (*Fold-change* de 374,9 para esse mesmo transcrito) (Tabela 8). A espécie Kumquat expressou mais quatro transcritos que codificam para receptor de etileno, sendo dois destes expressos somente no tecido infectado. Esses dados demonstram que Kumquat apresentou maior expressão de receptores de etileno os quais estão envolvidos na síntese deste fitohormônio descrito como modulador da resistência a doenças de plantas (VAN LOON et al., 2006). Cernadas et al. (2008) e Khalaf et al. (2007) identificaram a indução de receptores de etileno após infecção por Xac em laranja doce e Kumquat, respectivamente.

Dentre os transcritos expressos em comum em Valência e Kumquat foi identificado que o *transcript7739684* que codifica para quitinase I (GH da família 19), além de ter sido expresso no tempo 24 horas após a infecção, continuou sendo expresso no tempo de 48 horas após infecção em Valência e Kumquat (Tabela 8). Outros 16 transcritos que codificam para quitinase I foram identificados em Kumquat no tempo de 48 horas, e a maioria destes transcritos apresentou um *Fold-change* maior do que os outros 10 transcritos adicionais identificados em Valência nesse mesmo tempo. Esses dados permitem estabelecer como hipótese que tanto Kumquat quanto Valência expressam GHs, descritas por Minic (2008) como apresentando atividade de lisozimas, para possível hidrólise da parede celular de Xac.

Dentre os transcritos com os menores *p*-valor expressos somente em Valência 48 horas após inoculação, foram identificados quatro transcritos que codificam para cisteína proteinase, um para cisteína endopeptidase e um para LTP (Tabela 8). Os transcritos *transcript821132*, *transcript2248565* e *transcript294614*, que codificam para cisteína proteinase e foram identificados nos tempos de 24 e 48 horas após inoculação em Valência. Em relação ao *Fold-change* esses três transcritos apresentaram um aumento de expressão significativo de 24 para 48 horas. Por exemplo, o *transcript2248565* no tempo de 24 horas foi observado com *Fold-change* de 46,6 e em 48 horas com 194,5, indicando ser um possível mecanismo de defesa de Valência sob ação de Xac. Adicionalmente, nenhum transcrito que codifica para cisteína proteinase foi identificado em Kumquat nos tempos de 24 e 48 horas após inoculação. O transcrito *transcript11049044*, que



também codifica para LTP, foi identificado nos tempos de 24 e 48 horas em Valência (Tabela 8), com aumento de expressão (*Fold-change* de 253,1 e 303,1, respectivamente). O número de transcritos que codificam para LPT também foi maior em 48 horas em comparação com 24 horas (oito e seis, respectivamente).

Na figura 18C apresenta-se um diagrama de Venn ilustrando os TDEs no tempo de 72 horas após inoculação com Xac. Foram identificados 943 transcritos induzidos somente em Valência, 12 transcritos expressos em comum em Valência e Kumquat e 2.360 transcritos induzidos somente em Kumquat. Na Tabela 9 são apresentados alguns desses transcritos, os quais foram ordenados pelo *p*-valor. O transcrito *transcript2754722*, que codifica para uma enzima aleno óxido sintase, foi identificado exclusivamente em tecido infectado de Kumquat com uma alta significância estatística no tempo de 72 horas após inoculação com Xac (Tabela 9).

Outro transcrito que codifica para aleno óxido sintase também foi identificado em Kumquat com um *Fold-change* de 57,3. A enzima aleno óxido sintase (AOS) é a primeira enzima na via de biossíntese do ácido jasmônico (AJ). Sabe-se que uma rota de defesa vegetal, talvez a mais conhecida, é denominada rota octadecanóide, a qual culmina com a produção de AJ: um hormônio vegetal que induz a expressão de diversos genes relacionados à defesa contra estresses (SOARES et al., 2007). Estresse em plantas por ferimentos mecânicos, danos por herbívoros ou patógenos, desencadeiam a elevação de AJ endógeno, que por sua vez induz a expressão de genes responsivos ao jasmonato no combate ao estresse (SIVASANKAR et al., 2000). Adicionalmente, essa enzima não foi identificada nem como induzida, nem como reprimida, em qualquer dos três tempos avaliados da espécie Valência. Martinelli et al. (2012), empregando a tecnologia de RNA-seq, analisou o perfil transcricional da casca de frutos de citros infectados com *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas). Nos frutos infectados identificou-se a indução de genes envolvidos na biossíntese do AJ como a aleno óxido sintase.

Em Kumquat foi identificado um transcrito que codifica a enzima mio-inositol oxigenase (MIOX) (Tabela 9). Outros 18 transcritos que codificam para MIOX também foram identificados, (não apresentados na Tabela 9). Em contrapartida, somente um transcrito relacionado a MIOX foi identificado em Valência no tempo de 48 horas. Essa enzima é descrita como envolvida na biossíntese de ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA), proporcionando açúcares nucleotídeos para os polímeros da parede celular de plantas (KANTER et al., 2005).

Tabela 9. Transcritos induzidos, com os menores *p*-valores, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 72 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Função putativa	72 h			
		Fold-change Kumquat	P-valor Kumquat	Fold-change Valência	P-valor Valência
transcript2545261	Glicosídeo hidrolase	1801,767543	6,11E-06	ND	ND
transcript2754722	Enzima aleno óxido sintase	INF	7,62E-06	ND	ND
transcript10631255	Enzima mio-inositol oxigenase	INF	7,67E-06	ND	ND
transcript299327	Citocromo P450	INF	1,26E-05	ND	ND
transcript293016	Enzima limoneno sintase	INF	1,31E-05	ND	ND
transcript10233559	Enzima limoneno sintase	1644,495364	1,56E-05	ND	ND
transcript10715542	Proteína multidroga resistência	109,8855518	0,001006637	72,82816626	1,90E-05
transcript233659	Proteína multidroga resistência (MATE)	92,49167738	0,001419706	39,88209105	0,00016
transcript2330423	Xiloglucano endotransglicosilase	INF	0,023822116	34,68007917	0,000755
transcript11170761	Fator de transcrição responsivo ao etileno	207,7940835	0,001443705	13,1976968	0,002848
transcript2337347	Xiloglucano endotransglicosilase	INF	0,026021983	12,42702837	0,003127
transcript11170783	Fator de transcrição AP2	INF	0,00040425	8,336557493	0,010916
transcript2244119	Proteína do corpo de inclusão	ND	ND	39,94567119	8,55E-06
transcript2338354	Proteína lectina leguminosa	ND	ND	63,72464548	4,51E-05
transcript10368731	Germacreno d sintase	ND	ND	INF	7,07E-05
transcript5900323	Proteína lectina leguminosa	ND	ND	INF	7,33E-05
transcript5371535	Proteína lectina leguminosa	ND	ND	37,7145861	0,000101
transcript5184977	Inibidor de proteinase (Miraculina)	ND	ND	22,42222192	0,000105

INF: representa expressão somente no tecido infectado  
 ND: Transcrito não detectado

Outra função relacionada a essa enzima é como precursora de ascorbato (ASC), vitamina C, em plantas, sugerindo que a tolerância de plantas a estresse esta correlacionada com a capacidade de aumentar a biossíntese de ASC ou a atividade de ASC. A super expressão de MIOX em plantas de *Arabidopsis* aumentou a quantidade de ASC nas plantas testadas. Contudo, mutantes de *Arabidopsis* com

níveis de vitamina C reduzidos, demonstraram sensibilidade a condições de estresse (LOCATO et al., 2013). Mio-inositol é um importante metabólito celular que forma a base estrutural de muitas moléculas lipídicas de sinalização que funcionam em muitas vias metabólicas, incluindo respostas ao estresse e a regulação de morte celular, percepção de auxina, biossíntese de parede celular e síntese de ácido ascórbico (EKARDT, 2010).

Dois transcritos que codificam para a enzima limoneno sintase foram identificados somente em Kumquat no tempo de 72 horas após inoculação com Xac – o transcrito *transcript293016* foi induzido somente no tecido infectado e o transcrito *transcript10233559*, o qual apresentou *Fold-change* de 1.644,4 (Tabela 9). Adicionalmente, outros quatro transcritos que codificam para a enzima limoneno sintase também foram identificados no tempo de 72 horas em Kumquat, dois expressos somente no tecido infectado e outros dois com *Fold-change* de 1.864,7 e 534,6. Em Valência não foram identificados transcritos relacionados a essa enzima, indicando assim um possível papel na resistência a patógenos. Em análise do transcriptoma de *Pinus contorta* e *P. banksiana* (espécies de pinheiros), foi feita a caracterização funcional de monoterpene sintase. Isto porque a defesa destes pinheiros contra o besouro *Dendroctonus ponderosae* associada com fungos patogênicos, envolve oleorresina de monoterpenos, que são sintetizados pela família de terpeno sintases (TPSs). Sequências de TPSs que produzem os monoterpenos detectados nos pinheiros, incluindo limoneno e acetato bornilo, foram detectadas parcialmente nos transcritos (HALL et al., 2013). Em análise do transcriptoma de cascas de citros após infecção com CaLas, Martinelle et al., 2012 identificaram genes diferencialmente expressos que codificavam vários tipos de terpeno sintases envolvidas na biossíntese de mono e diterpenos.

Entre os transcritos induzidos em comum nas espécies Valência e Kumquat no tempo de 72 horas, os transcritos *transcript10715542* e *transcript10715542*, que codificam para proteínas com domínio MATE, mas o *Fold-change* em Kumquat foi maior que em Valência (Tabela 9). Células de plantas são capazes de produzir uma ampla variedade de compostos secundários, que podem exercer uma função tóxica as próprias células, por isso é essencial que estes compostos possam ser removidos eficientemente do citosol. Eles podem ser transportados para o espaço apoplástico onde as modificações químicas podem ocorrer, ou elas podem ser transportadas para o vacúolo. Plantas apresentam uma grande representação de proteínas de

transporte ABC (ATP ligação de Cassete) codificadas no genoma. A razão não é muito clara, mas há sugestões de que elas atuam em funções adaptativas contra estresses ambientais. Proteínas de transporte ABC são classificadas em quatro principais subfamílias: MDR (resistência multi drogas), MRP (MDR – proteína associada), AOH (ABC homólogo) e PDR (Resistência de droga pleitrópica). Por exemplo, o alcaloide nicotina, produzido em tecidos de raiz, é transportado até as folhas para exercer um papel defensivo para a sobrevivência de plantas. A captação de Berberina em *Coptis japonica* demonstrou o envolvimento da proteína de transporte do tipo MDR, e em *Arabidopsis thaliana*, que não produz Berberina endógena, este transporte é realizado por outro tipo de transporte chamado de MATE (Extrusão multi antimicrobiana/multidrogas e toxina extrusão) (OKSMAN-CALDENTNEY et al., 2007). Cernadas et al. (2008) também identificaram em laranja doce a indução de genes que codificam para essas proteínas 48 horas após infecção por Xac e avaliando o transcriptoma de plantas de arroz até 11 dias após a infecção com *Striga hermonthica* Swarbrick et al. (2008) também identificaram a indução de proteínas desse tipo.

Entre os transcritos expressos em comum entre Valência e Kumquat no tempo de 72 horas, foram identificados dois transcritos que codificam para Xiloglucano endotransglicosilase (XET), ressaltando que em Kumquat os dois transcritos foram expressos somente no tecido infectado (Tabela 9). Adicionalmente outros três transcritos que codificam para XET em Kumquat também foram expressos somente no tecido infectado no tempo de 72 horas. Há evidências de que a enzima XET esteja envolvida na extensão da parede celular, porque facilita a entrada de expansinas, que, por sua vez, promovem o rompimento das ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos, causando o afrouxamento da parede celular. A reconstrução da parede é promovida pela auxina, pela síntese e deposição de polissacarídeos, devolvendo a rigidez à parede celular (VIEIRA et al., 2008). Em análise de transcriptoma de *Fortunella crassifolia*, no trabalho de Fu et al. (2012) e de *Fortunella margarita*, no trabalho de Khalaf et al. (2011), foi identificada a indução de XET em folhas de Kumquat após infecção por Xac.

Dentre os transcritos expressos somente em Valência no tempo de 72 horas foram identificados mais de 170 transcritos que codificam para a proteína lectina, três deles apresentado na Tabela 9. Por outro lado, Kumquat apresentou a repressão de 40 transcritos de lectina no tempo de 72 horas. A literatura relata

algumas propostas sobre as funções das lectinas: a) a possível participação dessas proteínas nas relações simbiótica entre plantas fixadoras de nitrogênio e bactérias, o que restringe as proteínas lectinas de leguminosas; b) as lectinas vegetais são agentes de defesa contra microrganismos fitopatogênicos, insetos fitófagos e animais herbívoros. Elas possuem propriedades citotóxica, antifúngica e anti-nematoda tanto *in vitro* quanto *in vivo* e são tóxicas para animais superiores; e c) as proteína lectinas podem funcionar como substâncias de reserva, uma vez que, em algumas sementes de plantas, as lectinas representam a principal fração de proteína solúveis (RIPOL et al., 2003; MOURA, 2007). Foi identificada a indução de proteína do tipo lectina em laranja doce 6 e 48 horas após infecção por Xac (Cernadas et al., 2008).

Um transcrito identificado como inibidor de proteinase do tipo miraculina foi expresso com baixo *p*-valor em Valência no tempo de 72 horas após inoculação (Tabela 9). Adicionalmente, transcritos que codificam para este inibidor de proteinase do tipo miraculina, foram altamente reprimidos (94 transcritos) em Kumquat nesse mesmo tempo. É descrito que os inibidores de proteases fazem parte de uma via de defesa associada e induzida por ácido jasmônico que se acumula em ferimentos, ataque de patógenos ou dano causado por inseto em folhas (ALBA et al., 2004). Microrganismos podem produzir enzimas proteolíticas que causam hidrólise em proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras. Assim, inibidores de proteinases são proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo inibição da atividade dessas proteases de microrganismo. Dessa forma, pode ser que os inibidores de proteases dos tecidos das plantas atuem diretamente contra as proteases extracelulares de microrganismos, atrasando a proteólise de paredes celulares e proteínas de membrana, evitando a desorganização celular (TREMACOLDI, 2008). No entanto, Fu et al. (2012) relataram a indução de quatro genes de miraculina em Kumquat e a repressão três genes de miraculina em laranja doce 'Newhall' cinco dias após inoculação com Xac.

As Tabelas 10, 11 e 12 a seguir contêm parte dos transcritos identificados com os menores *p*-valores e reprimidos exclusivamente em Kunquat (ND em Valência), reprimidos exclusivamente em Valência (ND Kumquat) e também os transcritos expressos em comum nas duas espécies.

Tabela 10. Transcritos reprimidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 24 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Função putativa	24 h			
		<i>Fold-change</i> Kumquat	<i>P</i> -valor Kumquat	<i>Fold-change</i> Valência	<i>P</i> -valor Valência
transcript330637	Enzima anidrase carbônica	0	0,000283	ND	ND
transcript5517258	Enzima anidrase carbônica	0	0,000296	ND	ND
transcript10827860	Terpeno sintase	0	0,000334	ND	ND
transcript157349	Enzima anidrase carbônica	0,003793	0,000467	ND	ND
transcript4798945	Inibidor de proteinase (Miraculina)	0	0,000627	ND	ND
transcript4729995	Terpeno sintase	0,003869	0,000908	ND	ND
transcript2571327	Enzima fitoquelatina sintase	0	0,044171515	0,069220574	0,010451804
transcript5826771	Enzima magnésio quelatase	0	0,042178201	0,028841906	0,023590527
transcript4662341	Fator de transcrição lhy	0	0,00836744	0,051274499	0,02559143
transcript6078628	Transportador de peptídeos ptr5	0,04553706	0,01904429	0,055376459	0,008008806
transcript5577559	Ribulose bisfosfato carboxilase oxigenase	0	0,009975106	0,076911748	0,034704293
transcript5383699	Enzima anidrase carbônica	0	0,022517667	0,088744325	0,041152178
transcript3186334	Proteína PG1	ND	ND	0,000285187	6,02E-13
transcript3186497	Proteína tricoma	ND	ND	0,000457997	3,79E-12
transcript5047220	Peptidase	ND	ND	0,000538252	5,00E-12
transcript3186358	Proteína PG1	ND	ND	0,000493592	5,10E-12
transcript3186478	Proteína PG1	ND	ND	0,000494569	5,15E-12
transcript4540077	Proteína ubiquitina ligase	ND	ND	0,000513633	5,99E-12

0: representa expressão somente no tecido controle  
 ND: Transcrito não detectado

Tabela 11. Transcritos reprimidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 48 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Função putativa	48 h			
		<i>Fold-change</i> Kumquat	<i>P</i> -valor Kumquat	<i>Fold-change</i> Valência	<i>P</i> -valor Valência
transcript157349	Enzima anidrase carbônica	0	3,55E-05	ND	ND
transcript2608815	Inibidor de proteinase (Miraculina)	0	6,55E-05	ND	ND
transcript279703	Inibidor de protease	0,001116736	8,93E-05	ND	ND
transcript2848266	Receptor de proteína	0	0,000111274	ND	ND
transcript4798945	Inibidor de proteinase (Miraculina)	0	0,00014608	ND	ND
transcript499870	Terpeno sintase	0	0,000175048	ND	ND
transcript7758889	Proteína de ligação de Clorofila ab	0,022392246	7,92E-05	0,003685623	0,000816847
transcript6208842	Proteína de ligação de Clorofila ab	0,016614168	8,24E-05	0	0,035738518
transcript6007357	Ribulose bisfosfato carboxilase oxigenase	0,02263839	0,000177602	0	0,003092321
transcript6399417	Proteína lectina leguminosa	0,032815075	0,000293586	0,009657697	0,004857406
transcript330637	Enzima anidrase carbônica	0,023536738	0,000324385	0	8,90E-05
transcript94901	Proteína de ligação de Clorofila ab	0,028544555	0,000325861	0,007243272	0,002856212
transcript493927	Proteína desconhecida	ND	ND	0	7,32E-05
transcript6616797	Proteína de ligação de Clorofila ab	ND	ND	0,00756538	0,000268559
transcript472680	Proteína látex plastídica aldolase	ND	ND	0,029557765	0,000327087
transcript5765287	Proteína de ligação de Clorofila ab	ND	ND	0,008147333	0,000444879
transcript5891661	Proteína lectina leguminosa	ND	ND	0,024209217	0,000491696
transcript5661800	Proteína lectina leguminosa	ND	ND	0,029420923	0,000519135

0: representa expressão somente no tecido controle  
 ND: Transcrito não detectado

Tabela 12. Transcritos reprimidos, com os menores *p*-valor, expressos em comum ou exclusivamente na espécie Kumquat e/ou na espécie Valência 72 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Função putativa	72 h			
		<i>Fold-change</i> Kumquat	<i>P</i> -valor Kumquat	<i>Fold-change</i> Valência	<i>P</i> -valor Valência
transcript5047656	Peptidase	0,000915715	1,66E-05	ND	ND
transcript2801404	Lipoxigenase de planta	0	3,13E-05	ND	ND
transcript157349	Enzima anidrase carbônica	0	3,75E-05	ND	ND
transcript2354613	Proteína lectina leguminosa	0	3,96E-05	ND	ND
transcript4756591	Proteína desconhecida	0,001908076	5,63E-05	ND	ND
transcript136693	Oxidase redução férrico cloroplastídica	0,000938648	6,46E-05	ND	ND
transcript2526311	Receptor LRR proteína serina treonina quinase	0,030062801	0,035687429	0,158262266	0,018029882
transcript5047220	Peptidase	ND	ND	0,027954583	1,36E-05
transcript5046492	Proteína hipotética	ND	ND	0	6,43E-05
transcript484132	Proteína desconhecida	ND	ND	0,076500175	0,001672023
transcript8891324	Inibidor pectinesterase	ND	ND	0,019266711	0,002034993
transcript2343776	Proteína homeobox-leucina zipper	ND	ND	0,071065736	0,004813965
transcript487207	Hidrolase Nudix	ND	ND	0	0,004901597

0: representa expressão somente no tecido controle  
 ND: Transcrito não detectado

Na comparação dos TDEs reprimidos de Valência e Kumquat 24 horas após inoculação com Xac (Figura 18D), nove transcritos foram expressos em comum e 169 e 2.193, foram exclusivamente expressos em Valência e Kumquat, respectivamente. Dentre os transcritos reprimidos somente em Kumquat no tempo de 24 horas, três deles codificam para a enzima anidrase carbônica (Tabela 10). Outros 47 transcritos que codificam para a enzima anidrase carbônica foram reprimidos em Kumquat (não apresentados na Tabela 10). No entanto, Valência reprimiu somente seis transcritos da enzima anidrase carbônica no tempo de 24 horas. Em plantas a anidrase carbônica atua em muitas funções fisiológicas importantes que envolvem reações de descarboxilação e carboxilação, incluindo fotossíntese e respiração. Ela tem um papel importante nos primeiros eventos da



fotossíntese, elevando a concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) no cloroplasto, a fim de aumentar a taxa de carboxilação da enzima ribulose bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) (MITRA et al., 2004). Nos tempos de 48 e 72 horas após infecção por Xac, 51 e 49 transcritos da enzima anidrase carbônica respectivamente, também foram identificados como reprimidos em Kumquat (Tabelas 11 e 12).

A enzima Rubisco, essencial no sistema da fotossíntese, foi identificada entre os transcritos reprimidos em comum no tempo de 24 horas (Tabela 10). Essa é uma das enzimas mais abundantes nas plantas, atuando na captação do dióxido de carbono procedente do ar e também de um açúcar existente na célula chamado RuDP (ribulose 1,5-difosfato ou RuBP - ribulose bis-fosfato). A reação entre estes dois reagentes dá origem a duas moléculas do açúcar PGA (fosfoglicerato). A Rubisco é assim responsável pelo primeiro passo do ciclo de Calvin e, em concreto, pela fixação do  $\text{CO}_2$  na sua forma orgânica (COOPER, 2000). Vale ressaltar que enquanto Valência reprimiu somente oito transcritos de Rubisco no tempo de 24 horas, a espécie Kumquat reprimiu 209 transcritos neste tempo. Esses dados demonstram que a fotossíntese é fortemente reprimida em Kumquat logo nas primeiras 24 horas de infecção por Xac.

Kumquat apresentou 50 transcritos reprimidos que codificam para inibidor de proteinase do tipo miraculina no tempo de 24 horas. Dentre os 50 transcritos, um deles se encontra no ranking dos menores *p*-valor (Tabela 10). O tempo de 48 horas também apresentou uma alta repressão de proteinase do tipo miraculina, 99 transcritos foram identificados, e dentre esses três deles com maior significância estatística (Tabela 11). E como descrito anteriormente, no tempo de 72 horas Kumquat manteve a repressão desses transcritos. Dentre outros transcritos reprimidos em comum no tempo de 24 horas, foi identificado um transcrito que codifica para enzima fitoquelatina sintase (PCS) (Tabela 10). É descrito que esta enzima está envolvida na síntese de fitoquelatinas (PC) e homofitoquelatinas (HPC), peptídeos de metais pesados de ligação de plantas. As fitoquelatinas são peptídeos ricos em enxofre, antioxidantes não enzimáticos, com capacidade de se acumular no vacúolo contribuindo para a desintoxicação das células uma vez que diminuem a quantidade de metal livre no meio celular (DELITE, 2007).

Laranja Valência no tempo 24 horas apresentou uma alta repressão de três transcritos que codificam para a proteína poligalacturonase 1 (PG1) (Tabela 10). Essa proteína está envolvida com a atividade de hidrólise de pectina na parede

vegetal e são descritas diferentes formas dessas PGs, chamadas de isoenzimas: PG1, PG2, PG2b e PGx. Uma proteína de 8kDa que é parte do complexo multiproteína PG1 de tomate foi isolada, purificada e sua função foi caracterizada. Essa proteína, designada 'ativadora' (ACT), pertence à classe de proteínas de transferência lipídica não específica (nsLTPs). Apesar de não ser bem entendida a função biológica das proteínas de transferência lipídica, reconhece-se que as mesmas podem exercer uma função na defesa de plantas contra fungos e bactérias patogênicas (TOMASSEN et al., 2007). Adicionalmente, na anotação dos transcritos que codificam PG1, não foram identificados nem como induzidos nem como reprimidos transcritos de PG1 na espécie Kumquat.

Na comparação dos TDEs reprimidos de Valência e Kumquat 48 horas após inoculação com Xac (Figura 18E), 583 transcritos foram expressos em comum e 1.078 e 3.415, foram exclusivamente expressos em Valência e Kumquat respectivamente. A Tabela 11 apresenta alguns destes transcritos. Nos transcritos reprimidos em comum entre Kumquat e Valência no tempo de 48 horas, proteínas do fotossistema como a enzima anidrase carbônica, rubisco e proteína de ligação de clorofila ab, continuaram sendo altamente reprimidas pela espécie Kumquat. É descrito que a proteína de ligação de clorofila ab (coleta de luz) está associada ao fotossistema I (PSI) ou fotossistema 2 (PSII) de plantas (ANDERSON et al., 2003). No tempo de 48 horas Valência também apresentou repressão dessas enzimas, podendo-se citar o aumento de seis para 46 transcritos reprimidos relacionados à enzima anidrase carbônica de 24 para 48 horas. O mesmo foi observado para a rubisco, para a qual a repressão foi de oito transcritos para 97 transcritos de 24 para 48 horas. Comparando-se as espécies avaliadas, a proteína de ligação de clorofila ab teve 47 transcritos reprimidos em Kumquat contra 129 reprimidos em Valência no tempo de 48 horas. Curiosamente, em Valência a proteína lectina foi reprimida no tempo de 48 horas (Tabela 11), assim como o inibidor de proteinase do tipo miracula (60 e 15 transcritos, respectivamente). No entanto, como apresentado na Tabela 9, ambas as proteínas foram induzidas no tempo de 72 horas em Valência. Adicionalmente, a espécie Kumquat reprimiu miraculinas e lectinas em todos os tempos analisados.

Na comparação dos TDEs reprimidos de Valência e Kumquat 72 horas após inoculação com Xac (Figura 18F), um transcrito foi expresso em comum enquanto 90 e 4.840 transcritos foram exclusivamente expressos em Valência e Kumquat,

respectivamente. Dentre os transcritos reprimidos no tempo de 72 horas somente em Valência (Tabela 12), foi identificado o transcrito *transcript487207* o qual codifica para a proteína hidrolase Nudix. Em *Arabidopsis* foram descritas 32 proteínas Nudix (atNUDTs) e, apesar do pouco conhecimento sobre a função dessa proteína, atNUDT7 foi identificada como um regulador negativo na resposta de defesa. Mutações na sequência de *AtNUDT7* acarretaram a perda de sua função e conferiram aumento de resistência a doenças, deixando as plantas hiper responsivas contra agentes patogênicos e não patogênicos (GET et al., 2008).

## **5.7 Validação dos resultados**

A validação da expressão dos transcritos diferencialmente expressos, inicialmente daqueles que se apresentaram potencialmente envolvidos com resposta de resistência a Xac, pode ser realizada empregando-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e essa validação constitui-se num dos próximos passos a serem realizados na continuação da pesquisa aqui apresentada.

## 6 CONCLUSÕES

As análises dos transcriptomas das espécies *Citrus sinensis* variedade Valência e das *Fortunella crassifolia* e *Fortunella margarita*, Kumquat Meiwa e Kumquat Nagami respectivamente, empregando-se a tecnologia de RNA-seq, demonstrou que Valência e Kumquat apresentaram diferenças nos perfis transcricionais após inoculação com Xac em todos os tempos analisados (24, 48 e 72 horas).

As três espécies avaliadas apresentaram fenótipos diferentes entre si após inoculação com Xac, sendo as três espécies suscetíveis, no entanto Valência apresentou o fenótipo mais suscetível a Xac com sintomas típicos da infecção por esta bactéria em relação as duas Kumquats.

Tanto Valência quanto Kumquat apresentaram a indução de transcritos que codificam para proteínas com domínios típicos de genes de resistência como NBS-LRR.

Somente na espécie Kumquat foram identificados transcritos que codificam para proteína germin, e com uma expressão quase exclusiva do tecido infectado. Essa proteína pode estar envolvida na maior resistência de Kumquat ao cancro cítrico em relação a Valência.

As espécies de Kumquat também apresentaram uma forte expressão de transcritos que codificam para proteínas e enzimas envolvidas na produção de metabólitos secundários como alcaloides, monoterpênos e antioxidantes (vitaminas E e C).

Em Valência, nos tempos de 24 e 48 horas, foram identificados muitos transcritos que codificam para cisteína proteinases e LTPs, possivelmente envolvidas no mecanismo de defesa sob ação de Xac

Foi identificada uma forte repressão de transcritos que codificam para proteínas relacionadas à fotossíntese, como anidrase carbônica e rubisco, em Kumquat nos três tempos avaliados e em Valência nos tempos de 24 e 48 horas.

Após estas análises poderíamos descrever alguns possíveis genes alvos que podem estar envolvidos na resistência a Xac:

- Quitinase I
- Proteína relacionada à patogênese PR1

- Proteína de transferência lipídica
- Cisteína proteinase
- Enzima de ponte Berberina
- Proteína germin
- Citocromo P450
- Hidrolase Nudix
- Receptor de etileno
- Fator de transcrição AP2/EFR
- Homogentisate geranyltransferase
- GNK2 domínio homólogo
- Xiloglucano endotransglicosilase
- Proteína lectina
- Inibidor de proteinase(miraculina)

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZAL, A.J.; WOOD, A.J.; LIGHTFOOT, D.A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 5, p. 507-517, 2008.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press. 5 ed. Amsterdam, 2005.
- ALBA, R.; FEI, Z.; PAYTON, P.; LIU, Y.; MOORE, S.L.; DEBBIE, P.; COHN, J.; D'ASCENZO, M.; GORDON, J.S.; ROSE, J.K. ESTs, cDNA microarrays and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. **Plant Journal**, v. 39, n. 5, p. 697-714, 2004.
- ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.I.; MEIJER, P.J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, v. 92, p. 773-84, 1998.
- AMARAL, S.F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **Biológico**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 112-123, 1957.
- 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.; MOU, Z. Non-Host Defense Response in a Novel *Arabidopsis-Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathosystem. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**. v. 11, n. 10, 2010.
- ANDERSON, U.; HEDDAD, M.; ADAMSKA, I. Light Stress-Induced One-Helix Protein of the Chlorophyll *a/b* – Binding Family Associated with Photosystem I. **Plant Physiology**. v. 132, p. 811-820, 2003.
- ASENSI-FABADO, M.A.; MUNNÉ-BOSCH, S. Vitamins in plants: biosynthesis and antioxidant function. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 10, 2010.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.J.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interaction. **Science**, v. 276, p. 726-733, 1997.
- 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.
- BEDENDO, I. P. Manchas foliares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. eds. **Manual de Fitopatologia**. v. 1 : Princípios e conceitos, 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 848-858, 1995.

BELASQUE JR, J.; BARBOSA, J.C.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição do *Huanglongbing* no Estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research and Technology**, v. 31, p. 1-9, 2010.

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

BERNA, A.; BERNIER, F. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. **Plant Molecular Biology**, v.39: 539-549, 1999.

BITANCOURT, A.A. Cancro cítrico. **Biológico**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.

BLEIN, J.P.; COUTOS-THÉVENOT P., MARION D., & PONCHET. M. From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defence mechanisms. **Trends in Plant Science**. 7:293-296, 2002.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379-406, 2009.

BONFIG, K.B.; SCHREIBER, U.; GABLER, A.; ROITSCH, T.; BERGER, S: Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. **Planta**, 225(1):1-12, 2006.

BOSCARIOL, 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. *Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v. 13, p. 530-536, 2006.

BOYES, D.C.; MCDOWELL, J. M.; DANG, L J. L. Plant pathology: Many roads lead to resistance. **Current Biology**, v. 6, p. 634-637, 1996.

BROEKAERT, W.F.; DELAURE, S.L.; DE BOLLE, M.F.; CAMMUE, B.P. The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, 44, 393-416, 2006.

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

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. (Ed.). (Org.) **Biotecnologia aplicada à agropecuária**, p. 355-377. 1 ed. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, v. , p.355-377, 2010.

CARVALHO, F.M.S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlados por promotores induzidos pela planta hospedeira.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CERNADAS, R.A., CAMILLO, L.R. & 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.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of *Citrus*. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, v. 37, p. 127-146, 1984.

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.

CLAY, N., ADIO, A., DENOUX, C., et al., Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response, **Science**, v. 323, p. 95–101, 2009.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

COOPER, G.M. **The Cell: A Molecular Approach** (2nd ed.). "10.The Chloroplast Genome".Washington, D.C: ASM Press, 2000.

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

DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; DO AMARAL, A.M. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, p.459-463, 2002.

DANÓS, E.; BERGER, R.D.; STALL, R.E. Temporal and spatial spread of *Citrus* canker within groves. **Phytopathology**, v. 74, p. 904-908, 1984.

DE 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 Res**, v. 34, p. 362-365, 2006.

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. 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, 2007b.



- DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; CARLOS, E.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; AMARAL, A.M.; ASTUA, J.F.; SILVA-PINHATI, A.C.O.; BOSCARIOL- AMARGO, R.L.; BERGER, I.J.; RODRIGUES, C.M.; REIS, M.S.; MACHADO, M.A. Analysis of expressed sequence tags of *Citrus sinensis* L. Osb. Infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetic and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 957-964, 2007a.
- DEYOUNG, B.J. & INNES, R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, v. 7, n. 12, p. 1243-1249, 2006.
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, p. 843-847, 2001.
- DODDS, P.N. & RATHJEN, J.P. Plant Immunity: towards as integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews**. v. 11, p. 539-548, 2010.
- DONG, J.; QING-IIANG Y.E., WANG F.S. & LI. C. The Mining of *Citrus* EST-SNP and Its Application in Cultivar Discrimination . **ScienceDirect**, v. 9, n. 2, p. 179-190, 2010.
- ECKARDT, N.A. *Myo*-Inositol Biosynthesis Genes in *Arabidopsis*: Differential Patterns of Gene Expression and Role in Cell Death. **The Plant Cell**. v. 22: 537, 2010.
- EULGEM, T. and SOMSSICH, I. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 366–71, 2007.
- FAGOAGA, C. et al. 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, 2001.
- FAO. The Statistics Division. **FAOSTAT**: core production data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>>. Acesso 2013.
- FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças dos citros. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2 – Doenças das plantas cultivadas. São Paulo. Agronômica Ceres, v. 2, p. 239-269, 2005.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, p. 275-276, 1971.
- FONSECA, A.E. **Análise de focos de cancro cítrico sob o programa de erradicação no Estado de São Paulo de 1999 a 2009**. Dissertação (Mestrado Profissionalizante) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2012.
- FORMENT, J. et al. Development of a *Citrus* genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. **Plant Molecular Biology**, 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**, v. 7, n. 7, 2012.

GECHEV, T.S. & HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. The **Journal of cell biology**, v. 168, p. 17-20, 2005.

GET, X.; XIA, Y. The role of AtNUDT7, a Nudix hydrolase, in the plant defense response. **Plant Signalling & Behavior**, v. 3:2, p. 119-120, 2008.

GIMENES-FERNANDES, N., BARBOSA, J.C., AYRES, A.J., MASSARI, C.A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 320-325, 2000.

GMITTER, F. G. et al. *Citrus* genomics. **Tree Genet. & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 611–626, 2012.

GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego: **Academic Press**. 342p. 1990.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; CIVEROLO, E.L.; BARRET, H.C.; 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, 1993.

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.

GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J.H.; SUN, X.; RILEY, T. The *Citrus* canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, v. 91, p. 30-34, 2001.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic *Citrus* canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.

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.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CIVEROLO, 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

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in *Citrus* cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, p. 1319-1325, 1992.

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).: Proceedings **International Citrus Canker Research Workshop**, June 20-22, Florida, p. 7., Fort Pierce, 2000.

GRAHAM, J.H.; MCGUIRE, R.G.; MILLER, J.W. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in *Citrus* plant debris and soil in Florida and Argentina. **Plant Disease**, v. 71, p. 1094-1098, 1987.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 414-20, 2006.

GRUDKOWSKA, M; ZAGDAŃSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p. 609-624, 2004

GUIDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H. Putative resistance genes in the CitEST database. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 931-942, 2007.

HAAS B.J.; CHIN M.; NUSBAUM C.; BIRREN B.W.; LIVNY J. How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? **BMC Genomics**, v. 13, 2012.

HALL et al.; Transcriptome resources and functional characterization of monoterpene synthase for two host species of the mountain pine beetle, lodgepole pine (*Pinus contorta*) and jack pine (*Pinus banksiana*). **BMC Plant Biology**. 13:18, 2013.

HAMMOND-KOSACK, K. E., AND KANYUKA, K. Resistance Genes (R Genes) in Plants. **Encyclopedia of LifeSciences**, 2007.

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.

JACIANI, F. J.; DESTEFANO, S. A.; RODRIGUES NETO, J.; BELASQUE JR., J. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting Swingle citrumelo in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v. 93, n. 10, p. 1074, 2009.

JAIN, M. Next generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. Briefings in functional genomics, v. 2, p. 63-70, 2011.

JAYARAJ, J.; PUNJA, Z. K. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. **Plant Cell**, 26:1539-1546, 2007.

KANAZIN, V.; MABEK, L.F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 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**, v. 221, p. 243-254, 2005.

KHALAF, A.A. et al. *Fortunella margarita* Transcriptional Reprogramming Triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 159, 2011.

KHALAF, A.A.; MOORE, G.A.; JONES, J.B.; GMITTER, F.G. JR. New insights into the resistance of Nagami Kumquat to canker disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 71:240-250, 2007.

KIM, K.H.; KANG, Y.J.; KIM, D.H.; YOON, M.Y.; MOON, J.K.; et al. RNA-Seq analysis of a soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and -susceptible alleles. **DNA Research**, v. 18, p. 483-497, 2011.

KOIZUME, M. *Citrus* canker: The world situation. In: *Citrus* canker: An international perspective. **Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred**. pp.2-7. 1985.

KOO, Y.J. et al.; Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, 64:1-15, 2007.

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

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

LEE, H.A. The increase in resistance to *Citrus* canker with the advance in maturity of *Citrus* trees. **Phytopathology**, v. 11, p. 70-73, 1921.

LEITE, JR., R.P.; MOHAN, S.K. Evaluation of *Citrus* cultivars for resistance to canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in the State of Paraná, Brazil. **Proceedings International Society of Citriculture**, v. 1, p. 385-389, 1984.

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.

LI, LAN.; ZHANG, C.; XU, D.; SCLAPP.; XU, Z. Expression of recombinante EARL11, a hybrid proline-rich protein of *Arabidopsis*, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the grow of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*, **GENE**, v. 506, p. 50-61, 2012.

LOCATO, V.; CIMINI, S.; GARA, L. Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspectives to food biofortification. **Plant Science**, v. 4, n. 52, p. 1-12, 2013.

LU, J.; DU, Z.X.; KONG, J.; CHEN, L.N.; QIU, Y.H. Transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* infected by *Cucumber mosaic virus* during systemic symptom development. **PLoS ONE**, v. 7, e43447, 2012.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of *Citrus* for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 158-172, 2011.

MARTINELLI, F.; URATSU, S.L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R.L.; PHU, M.L., et al. Transcriptome Profiling of *Citrus* Fruit Response to *Huanglongbing* Disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

MENDES B.M.J.; CARDOSO S.C.; BOSCARIOL-CAMARGO R.L.; CRUZ R.B.; MOURÃO FILHO F.A.A & BERGAMIM FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, v. 59, p. 68-75, 2010.

MENDOZA, D.G. CYTOCHROM P450 monooxygenase enzymatic complex IN PLANTS. **Agricultura Técnica en México**, v. 35, n. 2, p. 225-231, 2009.

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

MINIC, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, v. 227, p. 723-740, 2008.

MITRA, M.; LATO, S.M.; YNALVEZ, R. A.; XIAO, Y.; MORONEY, J.V. Identification of a New Chloroplast Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, v. 135, p. 173-182, 2004.

MIYAKAWA, T.; MIYAZONO, K.; SAWANO, Y.; HATANO, K.; TANOKURA, M. Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. **Proteins**, p. 247-251, 2009.

MOURA, G.E.D.D. Avaliação do efeito citotóxico da Lectina da esponja marinha *Cliona varians* contra células de leucemia mieloide crônica. **Dissertação de mestrado** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B. M. J. Perspectivas da produção e utilização de transgênicos para o controle do *huanglongbing*. **Citrus Research & Technology**, v. 31, p. 91-100, 2010.

NEVES, M. F. (Org.). **O retrato da Citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p. Disponível em: <[http://www.Citrusbr.com.br/download/Retrato\\_Citricultura\\_Brasileira\\_Marcos\\_Fava.pdf](http://www.Citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf)> Acesso em: jan. 2013.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. Mapeamento e quantificação do sistema agroindustrial cítrica. In: Workshop do sistema agroindustrial cítrica, Ribeirão Preto: Pensa/Fearp-USP, **Relatório**, Ribeirão Preto, 2005.

OKSMAN-CALDENTEY et al.. **Applications of Plant Metabolic Engineering**. R. VERPORTE; A.W.ALFERMAN, T.S. JOHNSON. Metabolic engineering of the alkaloid biosynthesis in plants. 2007

OLSEN, A.N.; ERNST, H.A.; LOLEGGIO, L.; SKRIVER K. cDNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. **Plant Science**, v.169, p.785-794, 2005.

PANDEY, S. AND SOMSSICH, I. The role of wrky transcription factors in plant immunity, **Plant Physiology**, v. 150, p. 1648–55, 2009.

PATEL, R.K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **PLoS ONE**, 7(2): e30619, 2012.

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.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B.W.M.; LÉON- KLOOSTERZIEL, K.M.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; RESENDE, M.L.V.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para a defesa refinada. **Rundo**, v. 13, p. 277-295, 2005.

RIPOL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 517-523, 2003.

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

RYBAK, M., MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E. & JONES, J. B. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 249–262, 2009.

SCHEMELLER, T.; LATZ-BRUNING, B.; WINK, M. Biochemical activities of berberine, plamatine and sanguirine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 257-266, 1997.

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, n. 5, p. 388-395, 1987.

SCHROEDER A., et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 3, 2006.

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

SHENDURE, J. & JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SIVASANKAR, S.; SHELDRIK, B.; ROTHSTEIN, S.J. Expression of Allene Oxide Synthase Determines Defense Gene Activation in Tomato. **Plant Physiologists**, v. 122, p. 1335-1342, 2000.

SOARES, A.M.S; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9, 2007.

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

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.C.; JONES, J.G.D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661-667, 1995.

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. 88, p. 1179-1188, 2004.

SWARBRICK, P.J.; HUANG, K.; LIU, G.; SLATE, J.; PRESS, M.D.; SCHOLLES, J.D. Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasitic plant *hermonthica*. **New Phytologist**, v. 179, p. 515-529, 2008.

TALON M. & GMITTER Jr. “*Citrus* Genomics”. **International Journal of Plant Genomics**, Article ID 528361, 17 pages, 2008.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of non host resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 351–357, 2003.

TOMASSEN, M.M.M.; BARRETT, D.M.; VAN DER VALK, H.C.P.M.; WOLTERING, E.J. Isolation and characterization of a tomato non-specific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, n. 5, p. 1151-1160, 2007.

TOR, M.; BROWN, D.; COOPER, A.; WOODS-TOR, A.; SJOLANDER, K.; JONES, J.D.G.; HOLUB, E.B. Arabidopsis Downy Mildew Resistance Gene RPP27 Encodes a Receptor-Like Protein Similar to CLAVATA2 and Tomato *Cf-9*. **Plant Physiology**. 135:1100-1112, 2004.

TORRES, M.A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 397-430, 2005.

TREMACOLDI, C.R. Proteases e inibidores de proteases na interação planta-microorganismo. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 627 p. 2008.

TUTEJA, N. Integrated calcium signaling in plants. **Signaling in Plants, Signaling and Communication in Plants**, BALUSKA, F. & MANCUSO, S.(eds), Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p. 135-162, 2006.

VANTINI, J.S. **Ativação das vias relacionadas a resistência de *Citrus sinensis* em resposta a interação com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 2007.

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.

VIEIRA, C.R.Y.I.; PAIOLI PIRES, E.J.; TERRA, M.M.; TECCHIO, M.A.; VIEIRA, M.C. Reguladores vegetais influenciando número e tamanho de células das bagas da uva ‘Niagara Rosada’. **Revista brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 1, p. 025-030, 2008.

WANG, Y., et al., Differential structure and physiological response to canker challenge between ‘Meiwa’ kumquat and ‘Newhall’ navel orange with contrasting resistance. **Science Horticultural**, 2011.

WANG, T.; CHEN, X.; ZHU, F.; LI, H.; LI, L.; YANG, Q.; CHI, X.; YU, S.; LIANG, X. Characterization of Peanut Germin-Like Proteins, *AhGLPs* in plant Development and Defense. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WILDERMUTH, M.C. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 288-296, 2006.

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

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



ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP- triggered immunity, **Current Opinion. In Plant Biology**, v. 12, p. 414–20, 2009.

ZUBRZYCKI, H.M.; ZUBRZYCKI, A.D. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dowson in oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Proceedings Internacional Society of Citriculture**, v. 1, p. 405-409, 1981.

# APÊNDICE A

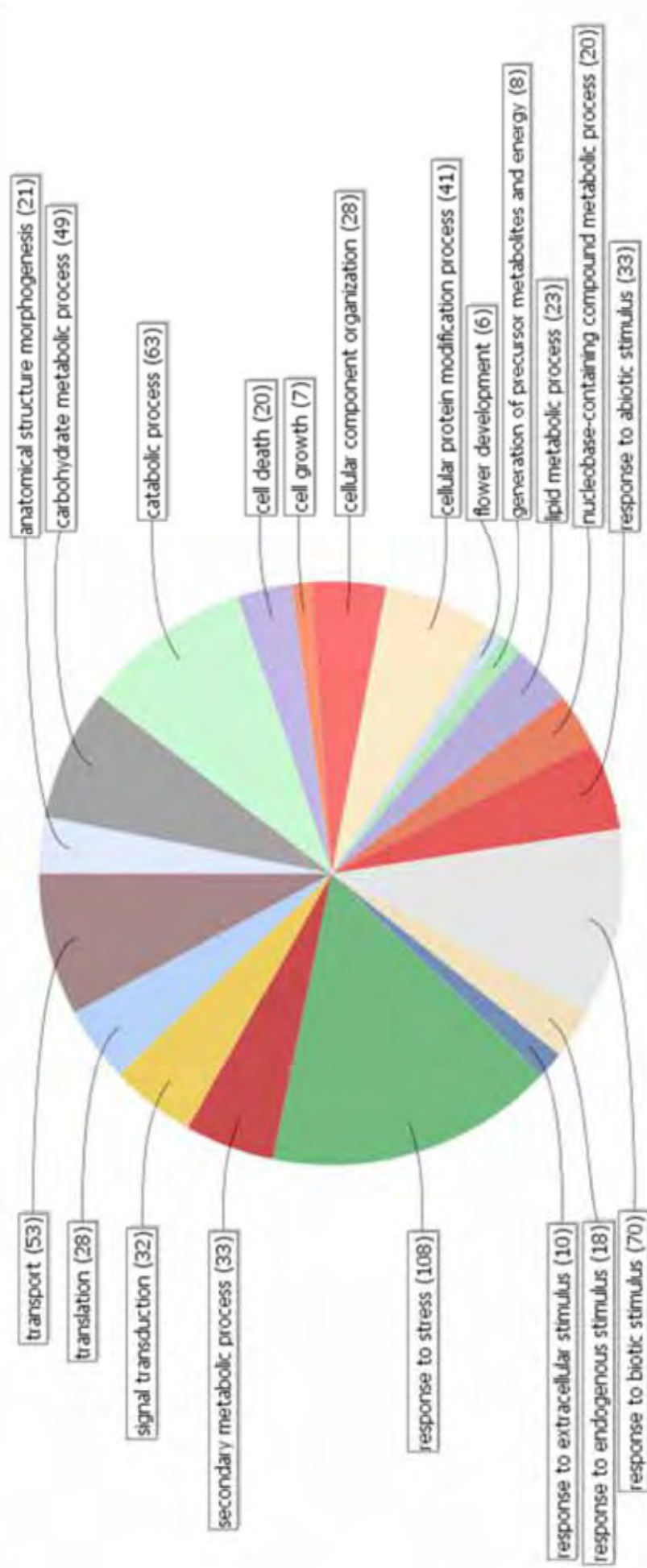


Figura 1. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (572) na espécie Valência 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 5 transcritos.

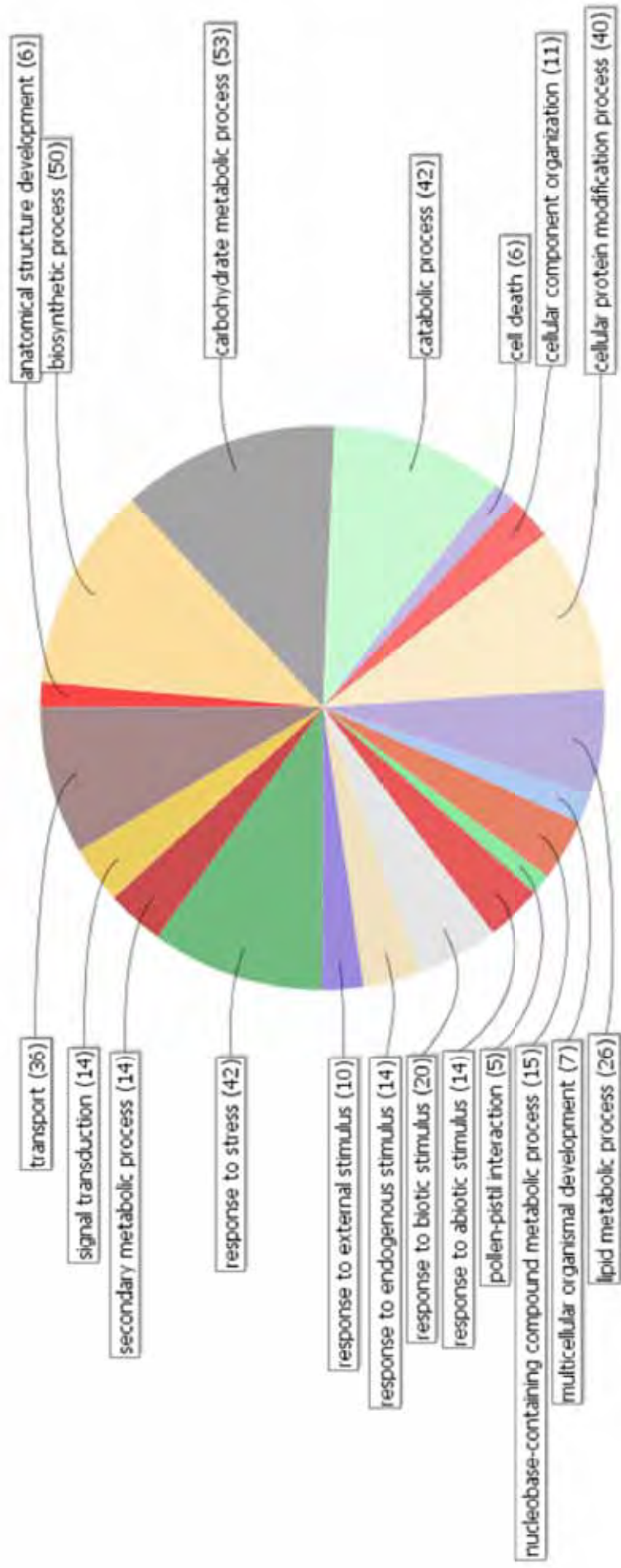


Figura 2. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (622) na espécie Kumquat 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 5 transcritos.

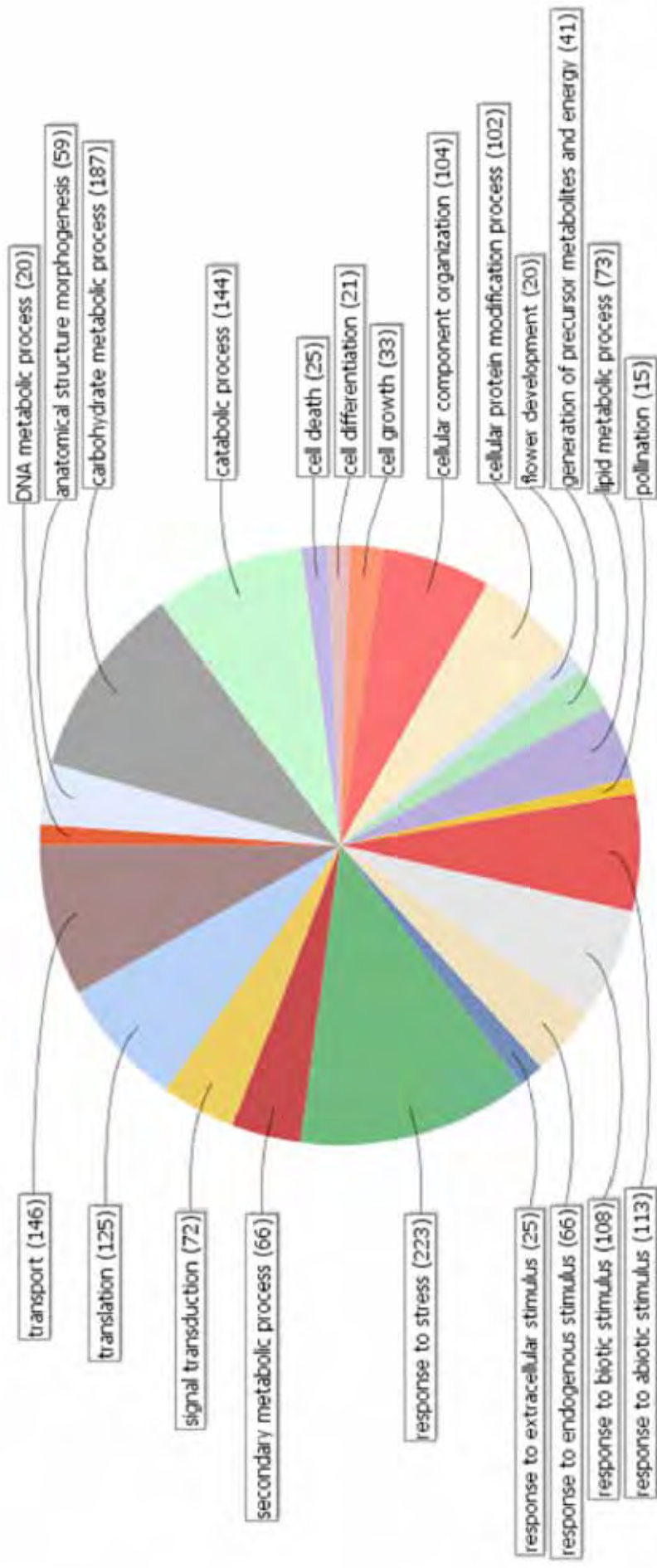


Figura 3. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (1426) na espécie *Valência* 48 horas após inoculação com *Xac*. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 15 transcritos.

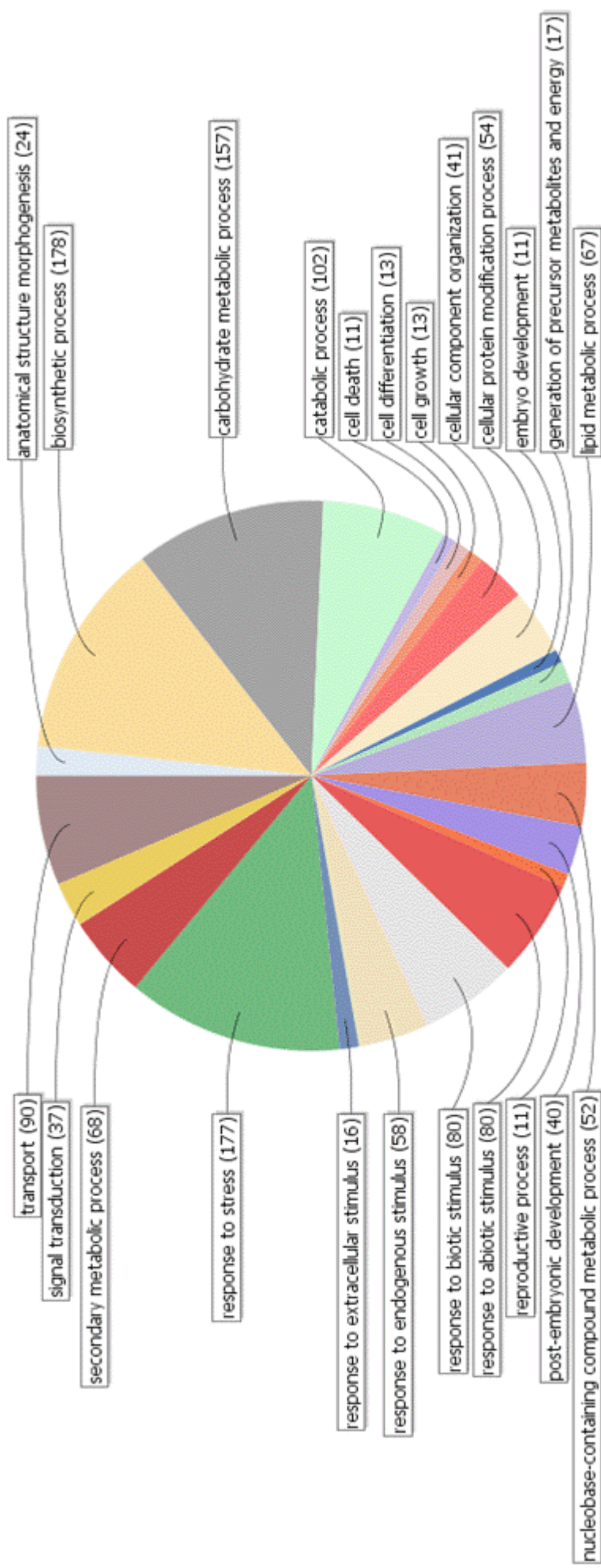


Figura 4. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (1117) na espécie *Kumquat* 48 horas após inoculação com *Xac*. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 10 transcritos.

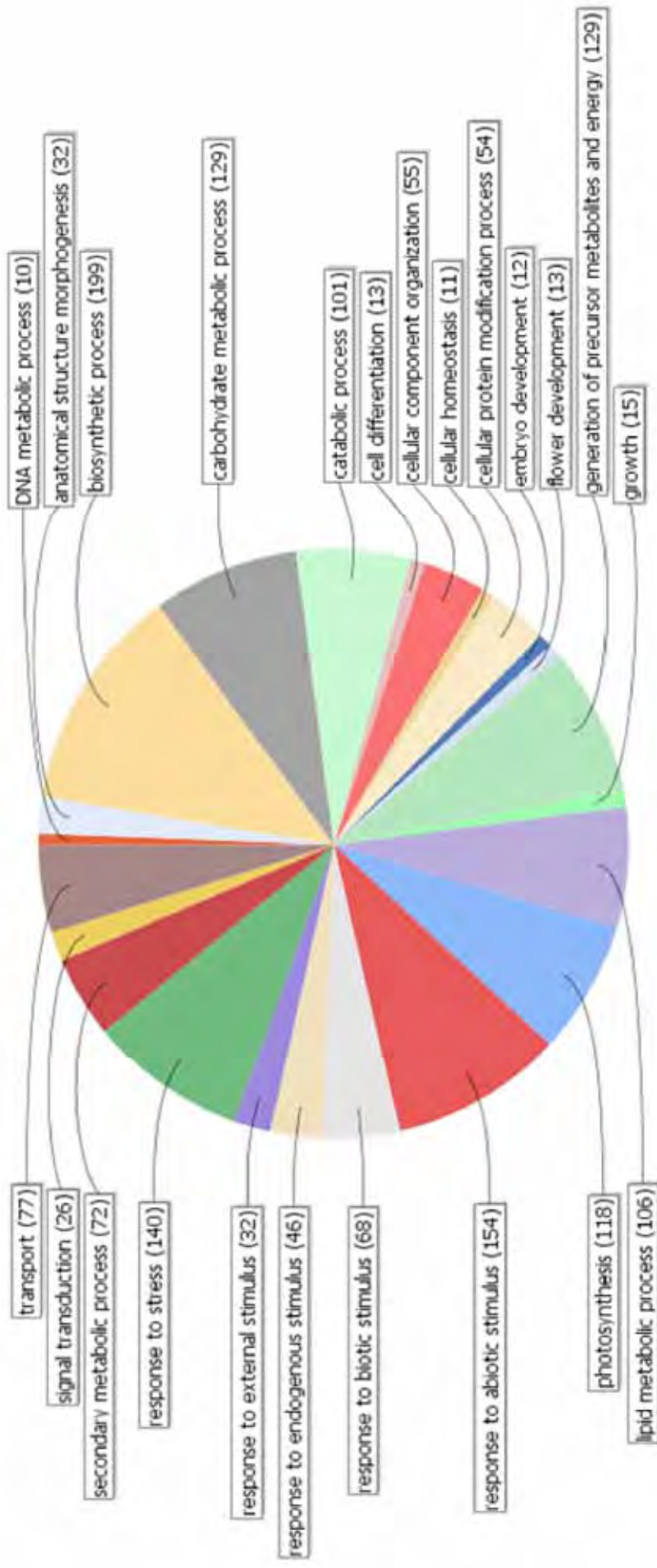


Figura 5. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (955) na espécie *Valência 72* horas após inoculação com *Xac*. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 10 transcritos.

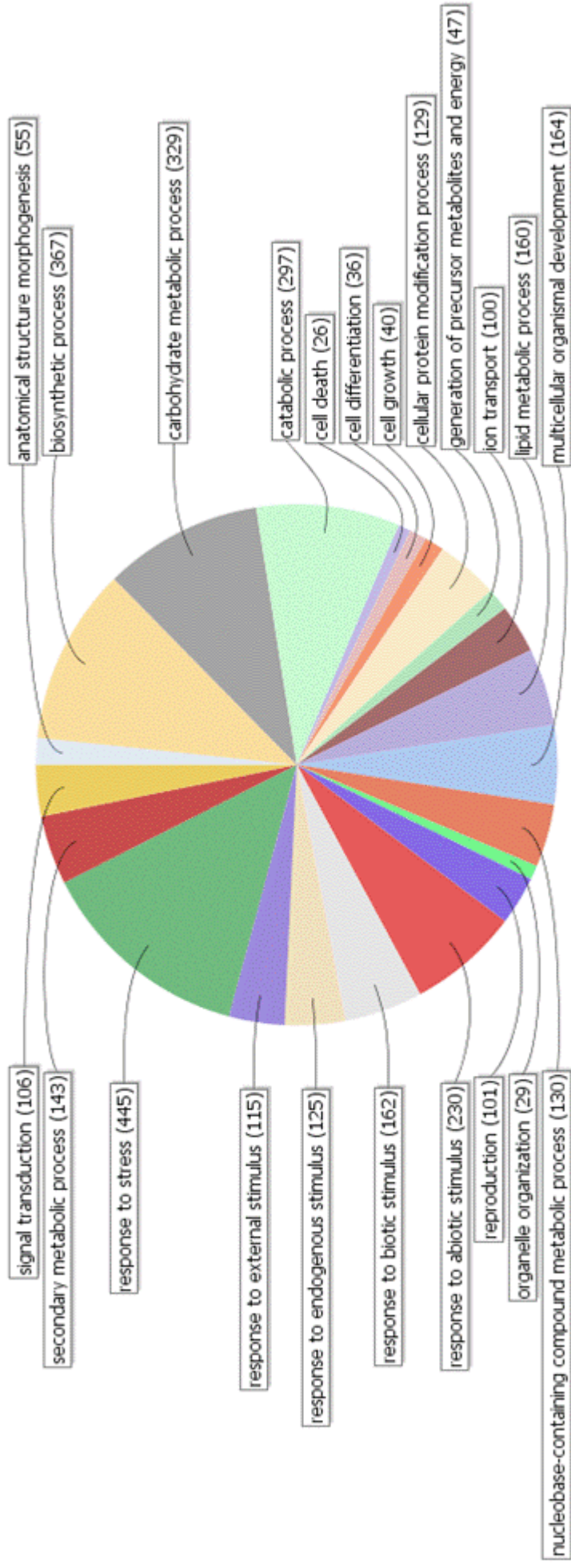


Figura 6. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos induzidos (2342) na espécie Kumquat 72 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 25 transcritos.



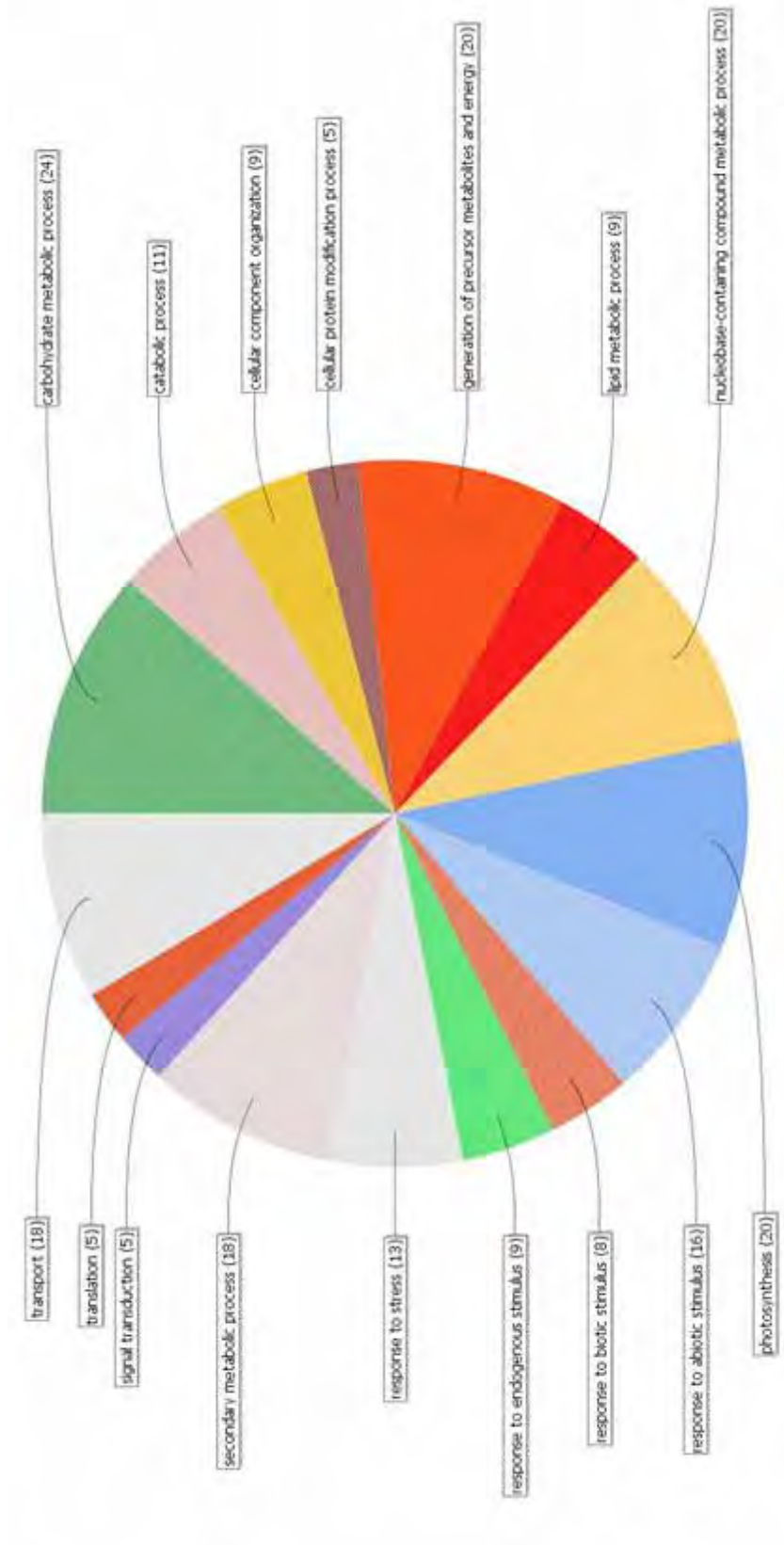


Figura 7. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (178) na espécie *Valência* 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 5 transcritos.

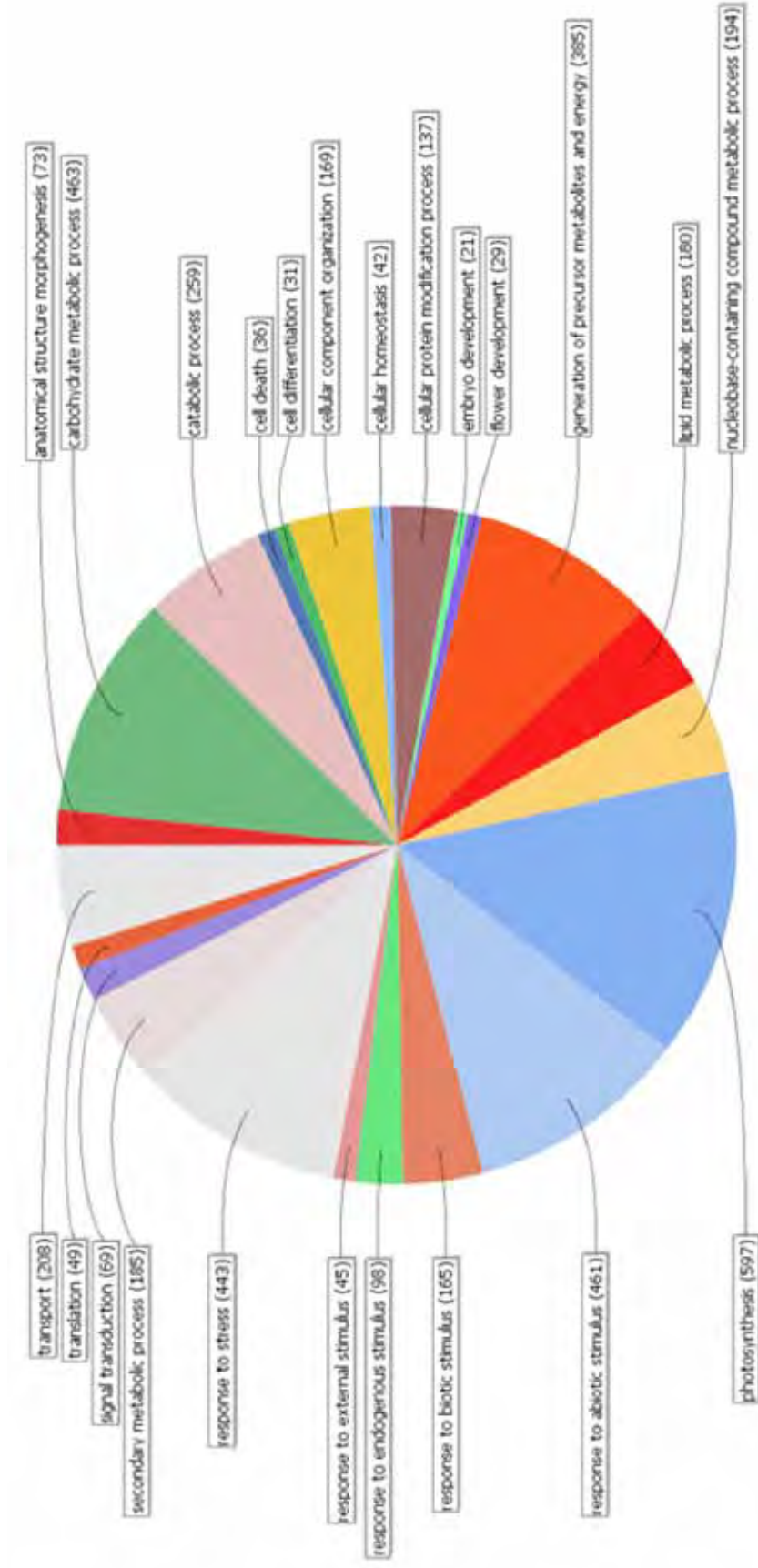


Figura 8. Gráfico multinível ilustrando a categorização dos transcritos reprimidos (2202) na espécie Kumquat 24 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 20 transcritos.

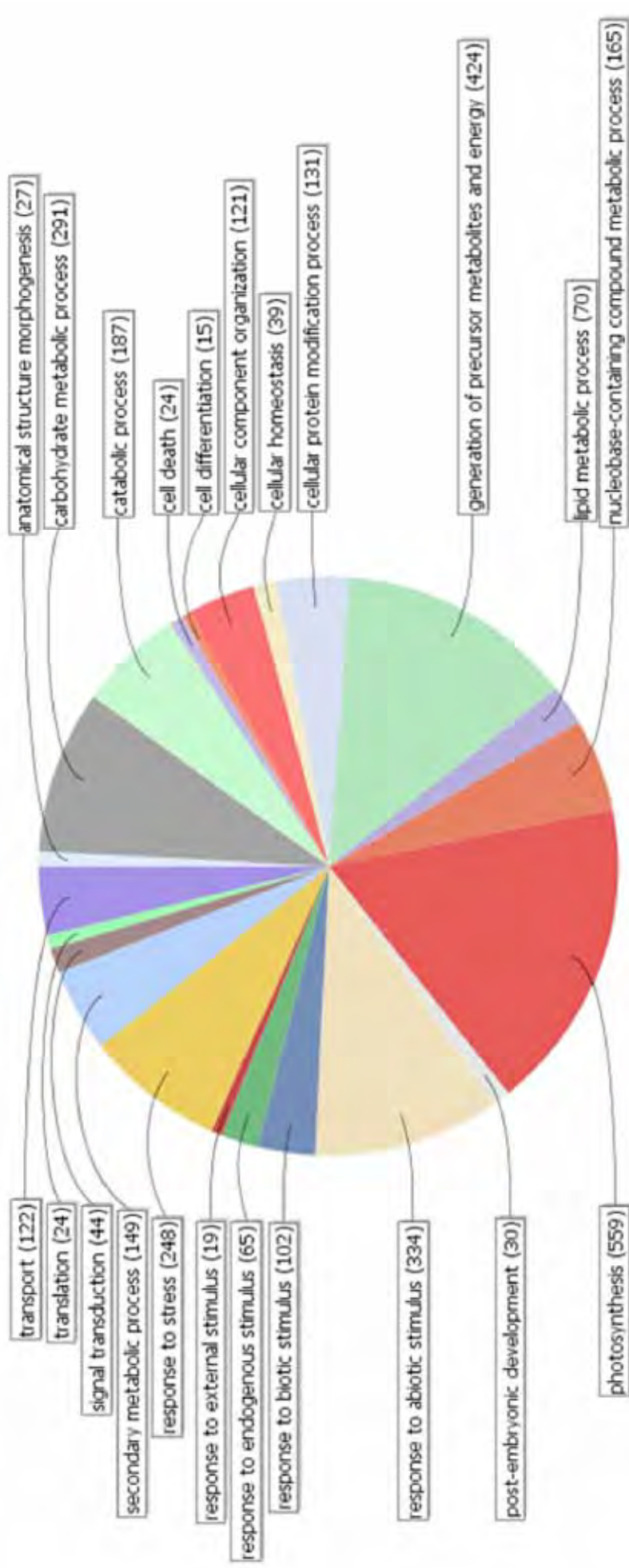


Figura 9. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (1661) na espécie *Valência* 48 horas após inoculação com *Xac*. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 15 transcritos.

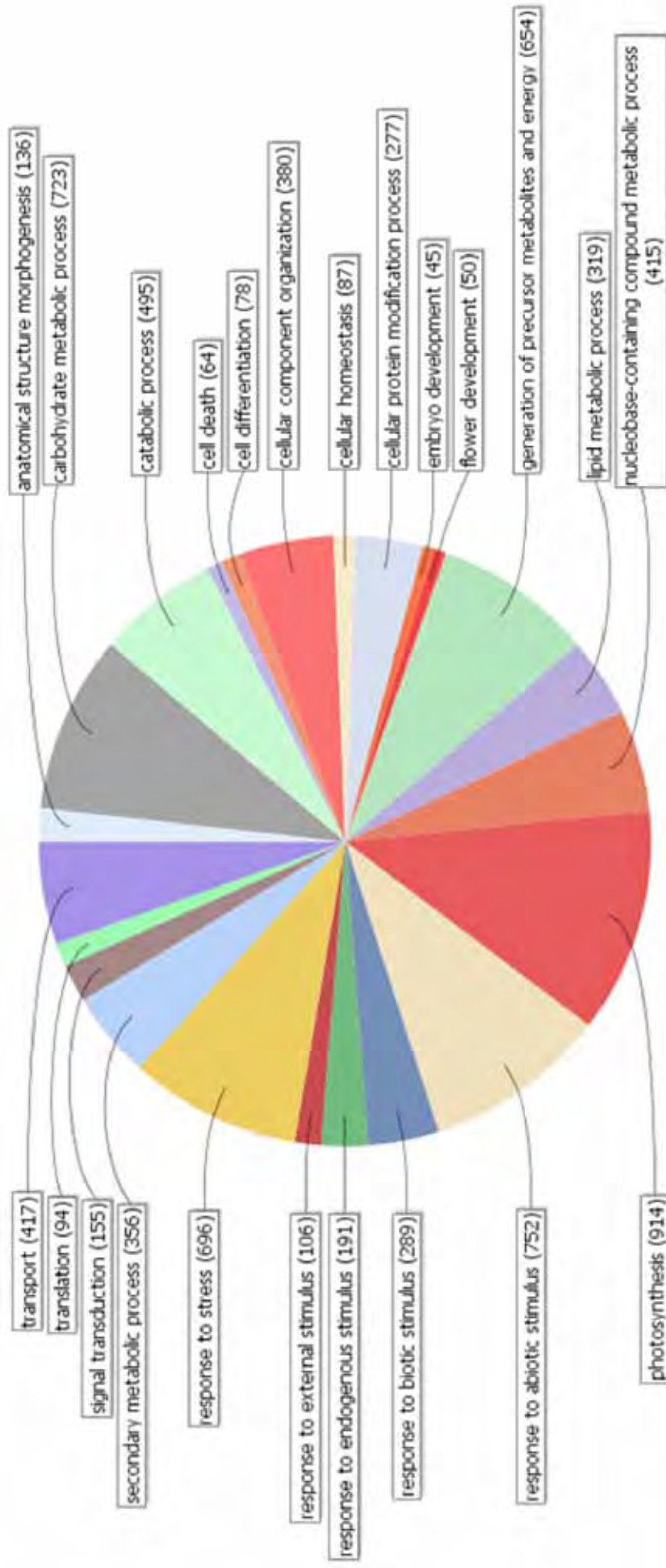


Figura 10. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (3998) na espécie *Kumquat* 48 horas após inoculação com *Xac*. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 40 transcritos.

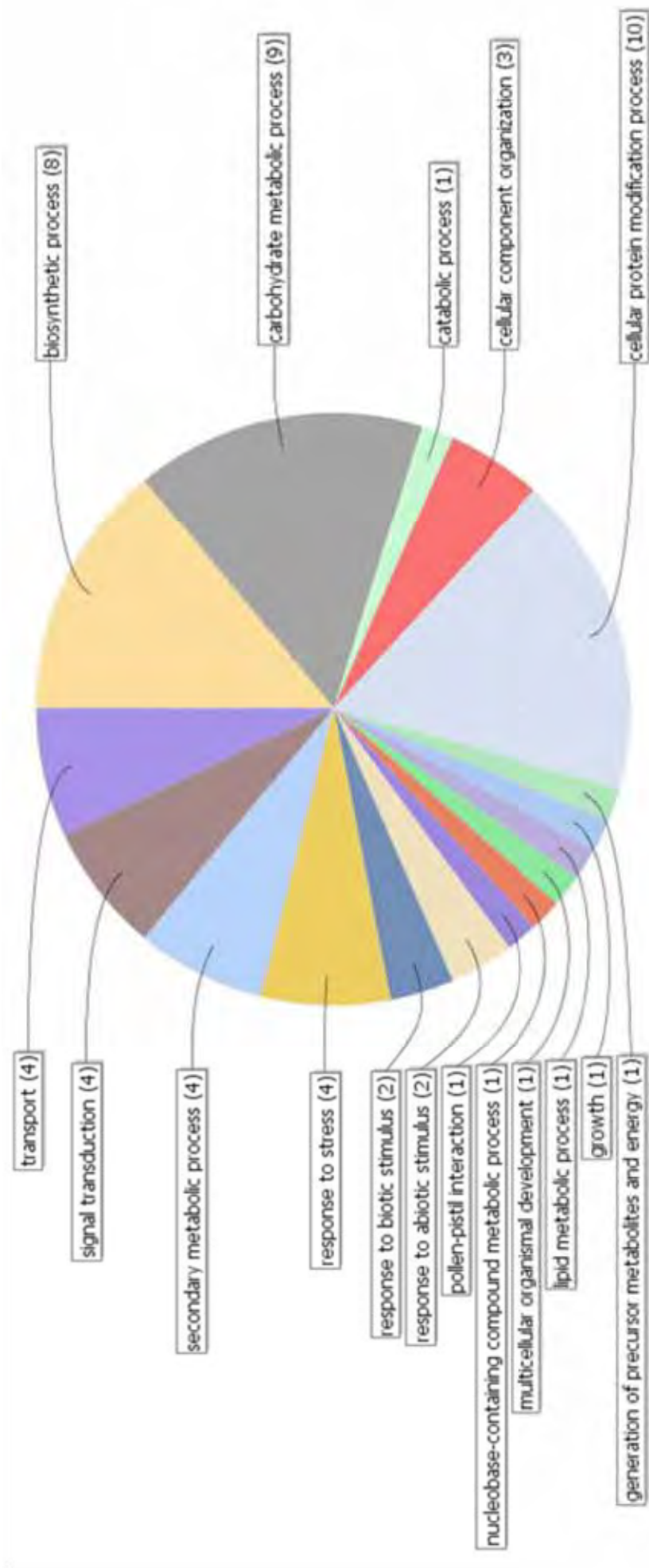


Figura 11. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (91) na espécie *Valência* 72 horas após inoculação com Xac. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 1 transcritos.

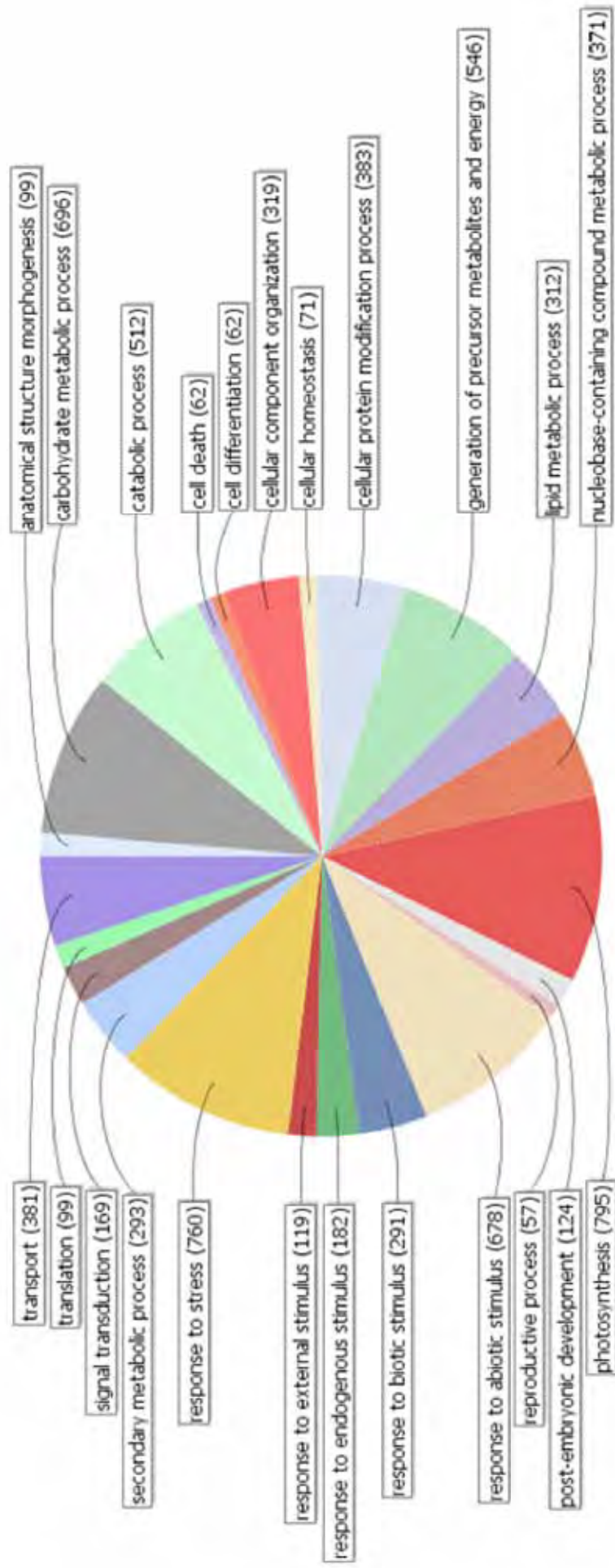


Figura 12. Gráfico multinível ilustrando a categorização no processo biológico dos transcritos reprimidos (4841) na espécie *Kumquat* 72 horas após inoculação com *Xac*. Para gerar o gráfico foi considerado um corte (*Cut-off*) de 50 transcritos.

# **APÊNDICE B**

Tabela 1. Transcritos relacionados à resistência induzidos em Kumquat (*Fortunella* spp.) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação.

Transcrito	Função putativa	Fold-change		
		24 h	48 h	72 h
transcript6729720	Proteína resposta resistência a doenças de plantas	16,86491292	-	-
transcript11029259	Proteína de resistência a doenças	-	17,21001526	-
transcript10514439	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	15,04945058	20,47970534
transcript2437435	Proteína de resistência a doenças	-	-	INF
transcript11015141	Proteína de resistência a doenças	-	-	INF
transcript10544833	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	INF
transcript5428906	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	INF
transcript11120061	Proteína de resistência a doenças	-	-	INF
transcript2632994	Proteína de resistência lrr	-	-	INF
transcript11028215	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	INF
transcript347535	Proteína de resistência a doenças	-	-	INF
transcript7686240	Resistência a nematóide Hs1pro-1	-	-	INF
transcript2494517	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	107,1438243
transcript2644662	Proteína de resistência tmv	-	-	80,08730301
transcript10465114	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	53,03078172
transcript6404812	Proteína de resistência a doenças	-	-	53,03078172
transcript6987455	Proteína de resistência a doenças	-	-	42,20817321
transcript358751	Proteína de resistência tmv	-	-	38,96139065
transcript160473	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	31,92669512
transcript10175554	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	26,51539086
transcript2513790	Proteína de resistência tmv	-	-	25,97426043
transcript2522141	Proteína de resistência tmv	-	-	22,72747788
transcript944942	Proteína de resistência a doenças	-	-	21,64521703
transcript4679601	Gene de resistência a doenças	-	-	21,1040866
transcript11164339	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	19,84144894
transcript2627329	Proteína de resistência tmv	-	-	19,26424316
transcript2511297	Proteína de resistência a doenças	-	-	17,74907796
transcript10518057	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	15,47633018
transcript10742381	Proteína de resistência a doenças	-	-	15,36810409

INF: representa expressão somente no tecido infectado



Tabela 2. Transcritos relacionados à resistência reprimidos em Kumquat (*Fortunella* spp.) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação.

Transcrito	Função putativa	Fold-change		
		24 h	48 h	72 h
transcript10631801	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	0	-	0
transcript2795307	Proteína de resistência a doenças	0,038881644	-	-
transcript10638725	Proteína de resistência a doenças	0,056899966	0,022192154	-
transcript2360411	Proteína de resistência a doenças	0,06630978	0,025753857	0,02352741
transcript2625793	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	0,041721249	-
transcript5958618	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	0,033646169	-
transcript2501435	Proteína de resistência a doenças	-	0,022674592	-
transcript234432	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	0,019679834	0,020041868
transcript11110533	Proteína de resistência a phytophthora	-	0,016823084	-
transcript7187906	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	0	-
transcript11007881	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	0	-
transcript2203464	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript10735535	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0
transcript2658028	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript10834255	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript10864364	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0
transcript463712	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0
transcript2352769	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript10993311	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript11028798	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript462413	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0
transcript6400288	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript10784442	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript2637798	Proteína de resistência nbs-lrr	-	-	0
transcript2637183	Proteína de resistência tmv	-	-	0
transcript10549999	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript2192964	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript5799513	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript2511455	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0
transcript7488209	Proteína de resistência cc-nbs	-	-	0
transcript7263642	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript10244599	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript10276240	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript2643446	Proteína de resistência tmv	-	-	0
transcript2629758	Proteína de resistência nbs-lrr	-	-	0
transcript10145503	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript7479559	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript10992678	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript60816	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript6615487	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript7420739	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript5421627	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript6720324	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript11012059	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript2627161	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0
transcript5736485	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript11028854	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript6512707	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0
transcript6438736	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript11060570	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript4844507	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript10436628	Proteína de resistência a doenças	-	-	0

	rpp13			
transcript95086	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
transcript10739507	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
	rpp8			
transcript5964599	Proteína de resistência a doenças	-	-	0
	rga4			
transcript4992797	Proteína de resistência tmv	-	-	0
transcript10357793	Proteína de resistência tmv	-	-	0
transcript5896189	Proteína de resistência tmv	-	-	0
transcript377104	uvb-resistance protein	-	-	0
transcript10625530	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,008076574
transcript10625512	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,009410964
	rga4			
transcript156119	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,015031401
	rga4			
transcript2731776	Proteína de resistência lrr	-	-	0,016397892
transcript10689038	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,01865967
transcript10749531	Proteína de resistência tmv	-	-	0,01865967
transcript6416609	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,018987032
	isoforma 1			
transcript5405939	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,020812709
transcript277144	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,023026827
	rga4			
transcript10647545	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,024596838
transcript10088894	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,025168857
transcript10645550	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,026396606
transcript10357083	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,027056521
	rpp13			
transcript10647488	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,027349552
transcript5067833	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0,029250293
transcript10210161	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,029449275
transcript4952818	Proteína de resistência parcial	-	-	0,029569969
transcript10465068	Proteína de resistência rpp13	-	-	0,030062801
transcript21152	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,030062801
transcript2360647	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,030921739
	rpm1			
transcript7071290	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,030921739
transcript5459489	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,031675927
transcript4682468	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,031831202
transcript7725090	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,031831202
transcript2538444	Proteína de resistência tmv	-	-	0,031831202
transcript2631171	Proteína de resistência nbs-lrr	-	-	0,033820652
transcript10944391	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,034687848
transcript10744074	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,036562867
transcript2357525	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,03935494
	rpm1			
transcript4767815	Proteína de resistência cc-nbs	-	-	0,040910204
transcript10210110	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,04256082
transcript10362254	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,042608695
transcript5798905	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,043290434
transcript10225487	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,044173912
transcript2638284	Proteína de resistência lrr	-	-	0,047467581
transcript10749624	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	-	0,048640937
transcript5374601	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,048750489
	rga4			
transcript2131590	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,049193675
transcript5424919	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,049950501
transcript267082	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,050337714
transcript4790003	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,050337714
	af506028_20nbs-lrr			
transcript11009121	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,052367461

transcript2285506	Proteína de resistência a doenças rpm1	-	-	0,055030213
transcript10647530	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,055416971
transcript10678832	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,058500587
transcript7510175	Proteína de resistência a doenças rpm1	-	-	0,061843477
transcript6777874	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,062288394
transcript10327119	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,064505614
transcript2432285	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,066260868
transcript7203422	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,074000742
transcript2437186	Proteína de resistência tmv	-	-	0,074405434
transcript2127529	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,076911939
transcript2512211	Proteína de resistência a doenças rpp13	-	-	0,077959468
transcript2281447	Proteína de resistência a doenças	-	-	0,079578004
transcript4895240	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,08039652
transcript5706581	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	-	0,083357704

0: representa expressão somente no tecido controle

Tabela 3. Transcritos relacionados à resistência induzidos em Valência (*Citrus sinensis*) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação.

Transcrito	Função putativa	Fold-change		
		24 h	48 h	72 h
transcript2343629	Proteína não específica de resistência a doenças	INF	-	-
transcript10146024	Proteína de resistência a doenças at3g14460-like	-	INF	-
transcript7070544	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	INF	-
transcript7009962	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	INF	-
transcript7067921	Proteína de resistência a doenças rpm1	-	INF	-
transcript7497763	Proteína de resistência a doenças	-	INF	-
transcript4114614	Proteína de resistência nbs-lrr	-	INF	-
transcript7203554	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	INF	-
transcript10173615	Proteína resposta resistência a doenças de plantas 206	-	6,948045183	-
transcript2634336	Proteína de resistência tir-nbs-lrr	-	13,76899198	-
transcript2431212	Proteína de resistência lrr	-	15,88729844	-
transcript7368901	Proteína de resistência tmv	-	-	19,07404354
transcript9812711	Proteína de resistência a doenças família lrr	-	-	5,960638608

INF: representa expressão somente no tecido infectado

Tabela 4. Transcritos relacionados à resistência reprimidos em Valência (*Citrus sinensis*) nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação.

Transcrito	Função putativa	Fold-change		
		24 h	48 h	72 h
transcript11005414	Proteína de resistência cc-nbs-lrr	-	0,062303131	-
transcript5559747	Proteína de resistência tmv	-	0,082378584	-

## **CAPÍTULO 2**

**High resolution transcriptome of sweet orange Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck) plants infected with *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.**

Teresa Del Carmen Gabriel Cofre<sup>1</sup>; Mayara Mari Murata<sup>2</sup>; Juliana da Silva Cavallini<sup>2</sup>; Roberto Hirochi Herai<sup>3</sup>; Adriano Ferrasa<sup>4</sup>; Maria Inês Tiraboschi Ferro<sup>2</sup>, Jesus Aparecido Ferro<sup>2\*</sup>; José Belasque Júnior<sup>5</sup>; Henrique Ferreira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP, Araraquara, São Paulo, 14801-902, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 14884-900, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pediatrics/Cellular and Molecular Medicine, School of Medicine, University of California San Diego - UCSD, San Diego, California, 92037, United States .

<sup>4</sup>Departamento de Informática, Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Ponta Grossa, Paraná, 84052-000 Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo - USP, Piracicaba, São Paulo, 13.418-900, Brazil.

**\* To whom correspondence should be addressed:** Jesus Aparecido Ferro

**Address:** Via de Acesso Prof.Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

**Telephone/Fax numbers:** +55 (16)3209-2675 **E-mail:** [jesus@fcav.unesp.br](mailto:jesus@fcav.unesp.br)

**Summary** Citrus canker is a serious disease worldwide, responsible for major losses in the most important citrus production areas. Caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), no resistant citrus genotypes are available for disease control. Although some plant-pathogen interaction models were reported, there is a few knowledge of the molecular and genetic mechanisms underlying the early stages of citrus canker disease. Genotyping approaches using microarray was already used to study the disease, but never at high resolution at nucleotide level with high throughput sequencing technologies (HTS) for citrus plants infected with citrus canker. Using HTS for mRNA extraction, here we show differentially expressed transcripts in plants infected with Xac in the early stages of disease development at 24, 48, and 72 hours compared with non-infected plant. We found several up-regulated transcripts associated with pathogenic signal perception such as receptors serine threonine kinase and plant defense as pathogenesis-related (PR) proteins and resistance proteins (R). Additionally, at 24 and 48 hours, we identified a high expression of cysteine proteinases enzymes, involved in protein degradation and reconstruction in response to different external stimuli caused by pathogenicity. Based on the differentially expressed transcripts observed in Valencia was proposed a plant-pathogen interaction model with the events that occurred in the plant in response to infection by Xac. The observed results indicate that changes in some specific metabolic pathways in the early stages of the disease can be used as valuable genetic targets involved in citrus canker disease as well as to design novel genetic strategies for its control.

**Keywords:** citrus canker, plant-pathogen interaction, transcript expression, disease resistance.

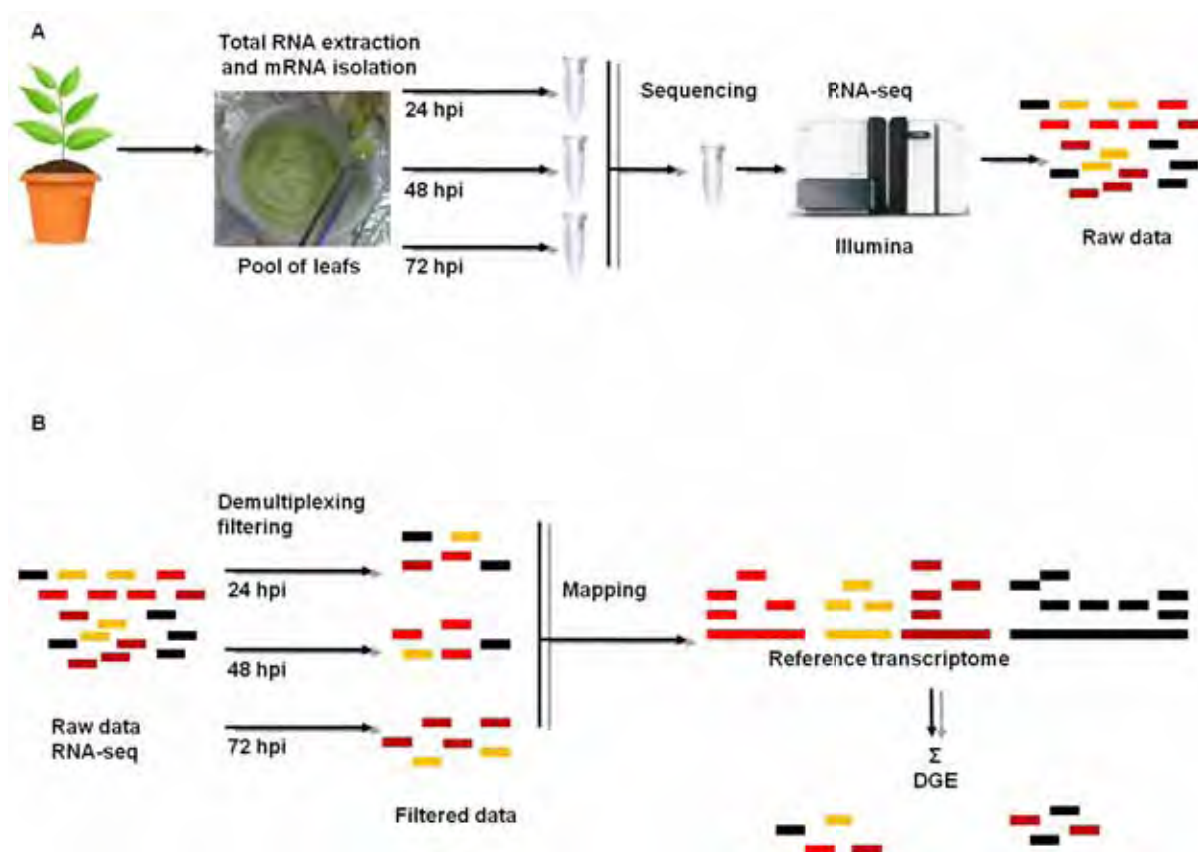
Citrus canker is one of the worst diseases affecting citrus plants and is responsible for the devastation of entire orchards in producing countries around the world, such as Brazil, China and the United States (Neves, 2010; Talon et al., 2008; Civerolo, 1984). Caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), some know symptoms in susceptible plants are in general brownish circular lesions, formation of water-soaked eruptions and pustule-like lesions on the surface of leaves, stems and fruits (Bitancourt 1957; Rossetti, 2001). Two main control approaches are used for this disease – the eradication of plants and orchards to prevent the spread of citrus canker to free areas, as adopted in Sao Paulo state, Brazil; and the disease management using less susceptible varieties, wind-breaks, and copper sprays, as adopted in Florida (USA) and some regions in South America (Behlau et al., 2012). However, no complete resistant citrus genotypes are available for this disease and, by consequence, under any of the control approaches described damages and economical losses occurred in reason of citrus canker (Barbosa et al., 2001). For this reason, the understanding of genetic alterations underlying the early stages of citrus canker disease can show insights on how to control the disease before affecting the plant productivity. The use of microarray technology has been widely during the last decade for genotyping studies, including plant diseases. In sweet orange infected by Xac, they were used to identify genetic variations on genes involved in defence, like cell wall remodeling, cell growth, and genes related to disease resistance and defense responses to stress (Cernadas et al., 2008). In kumquat (*Fortunella margarita*) – a specie in which Xac causes a incompatible reaction, the use of

microarray allowed the identification of several components of incompatible reactions, such as reactive oxygen species (ROS) and programmed cell death (Khalaf et al., 2011). Additionally, they also found that defense related proteins, such as chitinase and pathogenesis related (PR) proteins were differentially expressed six hours post inoculation by Xac. Furthermore, microarray was also used to compare the Xac-infected citrus species Meiwa Kumquat (*Fortunella crassifolia*) and Newhall sweet orange (*Citrus sinensis*), resistant and susceptible to citrus canker, respectively (Fu et al., 2012). The study identified several genes in Meiwa and in Newhall as involved in the response to infection. The Meiwa specie showed increased expression of several genes involved in response to abiotic stimuli (receptor kinases) and defense compared to Newhall. Additionally, they also found genes related to photosynthesis were significantly repressed in Newhall. Although the importance of these reported studies on Xac impact on modulating diseased citrus plant genotypes, the use of microarray technology limit the analysis for only know transcripts, without allowing any study at nucleotide resolution level that can be done by using high throughput sequencing (HTS) technologies (Wang et al., 2009).

In this work, we used Illumina HTS for messenger RNA (mRNA) extraction of control and Xac-infected sweet orange Valencia plants. To perform the study, Valencia sweet orange plants were infected by Xac, and 24 hours, 48 hours, and 72 hours post inoculation (HPI) mRNA were extracted and isolated from leaves, and subjected to RNA-seq in an Illumina HTS machine. Next, we performed bioinformatics analysis to detect high significant transcript expression alteration in affected samples compared to controls, for each one of the three time points. Finally, we correlated the transcripts with significant expression variations with metabolic pathways having association with Canker citrus disease phenotype.



For total RNA extraction from leaves of Valencia, biological assays were performed using three nursery plants maintained throughout the experiment in a controlled environment at 28°C under a 12-h/day fluorescent light. Plant leaves of three plants to be used as controls (VC) were infiltrated with sterile distilled water, and the same 3 plants to be used as infected (VI) were infiltrated with a suspension of Xac 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU) per ml (strain 306, Da Silva et al., 2002). Post inoculation, three leaves VC and three leaves VI were collected at 24, 48 and 72 hours for total RNA extraction (PureLink™ RNA Mini Kit from Ambion®). With a minimum concentration of 1µg total RNA from leaves (Qubit® RNA Assay HS) having high RNA integrity (RIN > 8, RNA 6000 Nano LabChip) were isolated for mRNA extraction and cDNA library preparation (TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 LT). Libraries were multiplexed and then subjected to Illumina HiScanSQ System HTS (Figure 1A). The sequenced samples produced three VC and three VI RNA-seq libraries, corresponding to more than 98 million of 50 bp single-end reads (Table 1).



**Figure 1. Schematic representation of RNA extracting, sequencing and bioinformatics analysis.** (A) Valencia leaves were infected with water or *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ( $10^8$  CFU/ml), separately, and at 24, 48 and 72 hours post inoculation (hpi). Leafs of control and infected plants were collected for RNA extraction, isolation of mRNA and library preparation considering multiplexing of the samples, that are then subject for Illumina sequencing to generate 6 raw RNA-Seq libraries; (B) Raw RNA-Seq libraries were filtered to remove contaminants, and then, for each of the three stages, considering controls and inoculated samples, filtered libraries were aligned against a reference citrus transcriptome.

**Table 1. Data generated by RNA-seq sequencing (Illumina).** Samples of cDNA libraries from leaves tissues of Valencia sweet orange (V) (*Citrus sinensis*) post inoculation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* - Xac ( $10^8$  CFU/ml). Samples were collected 24, 48 and 72 hours post infiltration with water (VC) and inoculation with Xac (VI).

cDNA libraries	Total reads	High quality reads	Aligned reads (%)
VC24	7.186.521	3.500.912	75,11
VC48	6.283.185	5.054.378	96,87
VC72	22.010.728	19.877.201	96,62
VI24	12.501.163	10.652.019	96,96
VI48	25.315.317	22.889.459	97,44
VI72	25.263.671	22.785.329	97,39
<b>TOTAL</b>	<b>98.560.585</b>	<b>84.759.298</b>	<b>93,40</b>

For the analysis of gene expression between sequenced libraries, we initially built a reference transcriptome database of different *Citrus* spp. based on six public databases: AFFYM (Fu et al., 2012), NCBI (Martinelli et al., 2012), UNIGENE, USDA, CITRUSGDB, and PHYTOZOME (Gmitter et al., 2012). These databases were grouped in a single database, applying a redundancy control between sequences

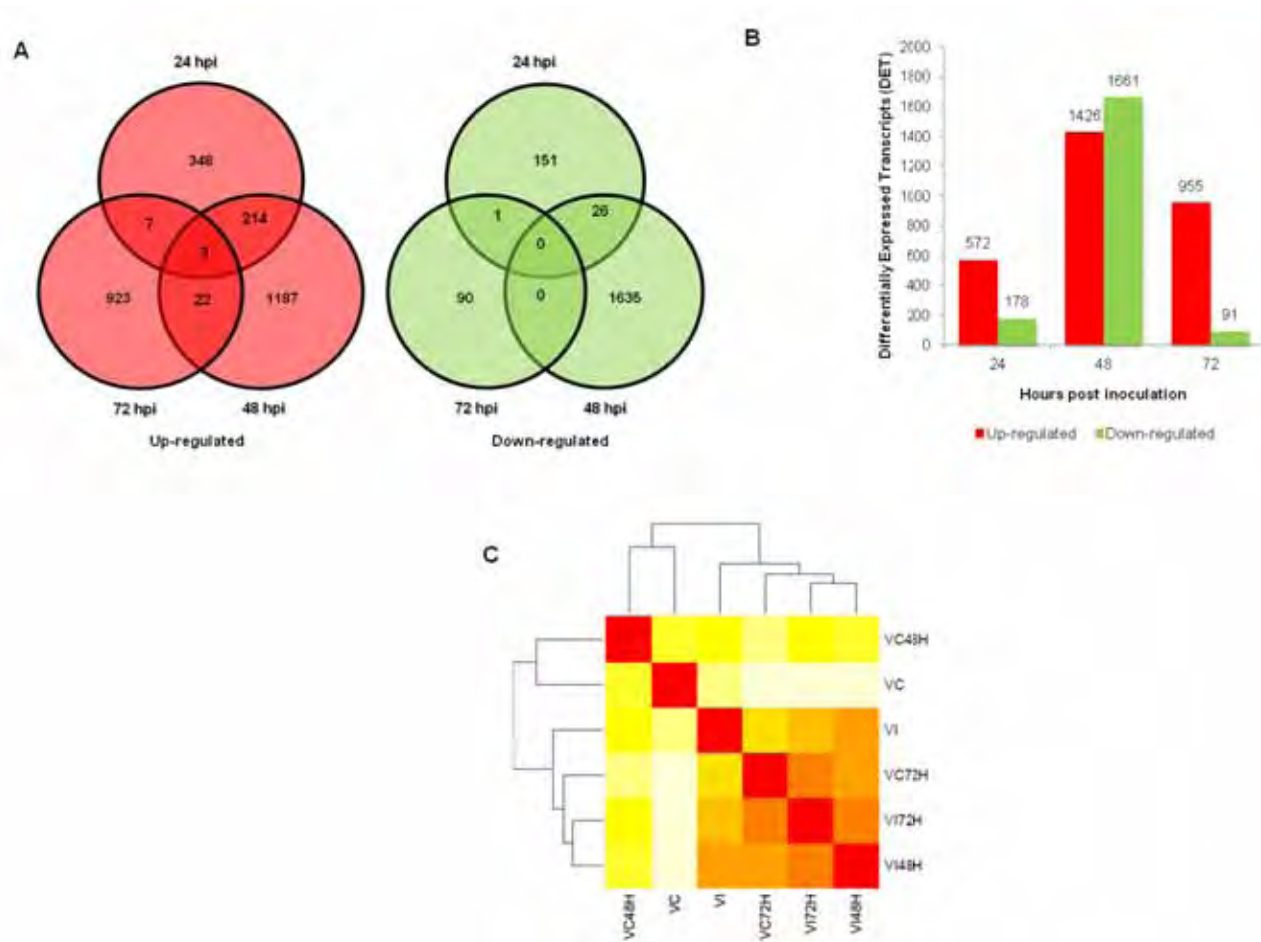
(unpublished data). Then, the raw data of six sequenced libraries were filtered with the tool NGS-QC Toolkit (Patel and Jain, 2012) for nucleotide quality control and sequence contamination. High quality reads were then aligned against the reference transcriptome using the tool Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) (Figura 1B), with more than 90% of alignment per library.

For transcriptome expression analysis, we used a strategy based on read-counting available in the tool DESeq (Anders & Huber, 2010), which also performs statistical significance tests and control of false discovery rate (FDR). We considered as differentially expressed transcripts (DET) those with statistical significance (p-value)  $<0.05$ . Additionally, we also considered a less stringent approach for expression variation analysis, based on the fold-change. Transcripts with higher expression in the infected tissue (Fold-change  $>2$ ) were termed up-regulated transcripts and those ones having higher expression in control tissue (Fold-change  $<0.5$ ) were called down-regulated transcripts. Exclusive transcripts or transcripts expressed in common in the three times evaluated were identified using Venn diagrams (Figure 2A).

We identified 750, 3,087 and 1,046 DET in Valencia, at 24, 48, and 72 hpi with Xac, respectively, when compared to their controls (Figure 2B). The program Blast2GO was used to analyze functional description of the transcripts based on the results of the tools Blastx (NCBI), Gene Ontology (GO), and InterProScan, inserted in the program Blast2GO (Conesa et al., 2005). Because of the large number of differentially expressed transcripts (DET), the annotation of the transcripts was performed for those having only significant expression variation (p-value  $\leq 0.05$ ).

All transcripts with statistical significance expression variation between samples in at least one condition were isolated in a subgroup of transcripts for

clustering analysis. The clustering was based on a distance matrix of the Euclidian distance between each pair of samples. The values within the matrix are then analyzed by a *single linkage method*, that correlate the samples and, additionally, is used to create a heatmap for global expression correlation between samples. Based on the dendrogram (Figure 2C) the samples library infected at 24 (VI), 48 (VI48H), 72 (VI72H) hour post inoculation (hpi) and the sample library control at 72 (VC72H) hpi clustered together, additionally the VI48H and VI72H are more similar in this cluster. In other cluster we have the samples libraries control 24 (VC) and 48 (VC48H) hpi, been the VC the more different sample from the others.



**Figure 2.** Differentially expressed transcripts analysis for Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) leaves not-inoculated (only water) and inoculated by *Xanthomonas citri* subsp *citri* ( $10^8$  CFU/ml) at 24, 48 and 72 hours. (A) Veen's

diagrams illustrating the number of transcripts that were up-regulated (fold-change > 2) or down-regulated (fold-change < 2) in common or exclusives to each time. (B) Number of differentially expressed transcripts ( $p$ -value < 0.05) up-regulated (red bars) or down-regulated (green bars) at each time of infection. (C) Heatmap showing a dendrogram of similarity (red color) or differences (white color) between samples libraries inoculated and not-inoculated of each time

In plants are two types of immunity to bacterial pathogens - *Pathogen Triggered Immunity* (PTI) and *Effector Triggered Immunity* (ETI). Stimulation of Pattern Recognition Receptors (PRRs) is a key step in the early stages of PTI. At 24 hpi one transcript of Lrr receptor-like serine threonine-protein kinase type flagellin sensing 2 (FLS2) were up-regulated only in infected condition (Table 2). Also respiratory burst oxidase homologue (RBOH) is an important factor in the production of reactive oxygen species (ROS) during the plant response to abiotic and biotic stresses (Clay et al., 2009; Zipfel, 2009). A transcript encoding RBOH protein was highly expressed in infected condition at 24 hpi (Table 2). Calcium is an essential second messenger in the signal transduction pathways that regulate plant responses (Clay et al., 2009; Zipfel, 2009). A autoinhibited  $Ca^{2+}$ -ATPase 1, Cation-transporting P-type ATPase C-terminal were expressed in infected condition at 24 hpi. Genes involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling cascade are downstream components in PTI (Clay et al., 2009; Zipfel, 2009). Interestingly, the expression of a transcript encoding mitogen-activated protein kinase 4 (MAPK4) were identified only in infected tissue at 24 hpi (Table 2).

The second type of stress perception in plants involves recognition of pathogen virulence molecules called effectors by specific plant intracellular receptors, or

ETI. To investigate the role of ETI in Valencia, R proteins up-regulated were identified. Transcripts encoding for proteins R such as: resistance protein CC-NBS-LRR, protein of resistance TIR-NBS-LRR and the RPM1 disease resistance protein were identified at 24, 48, and 72 hpi (Table 2). Cernadas et al. (2008) also identified the expression of disease resistance proteins with domain CC-NBS-LRR in sweet orange plants at 48 hours after inoculation with Xac.

**Table 2. Differentially expressed transcripts (DET) in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) up-regulated at 24, 48 and 72 hours post inoculation (hpi) with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ( $10^8$  CFU/ml). The transcripts with p-value < 0.05 were considered DET and that with the fold-change > 2 up-regulated.**

Transcript	Target description	Fold-change	p-value
<b>24 hpi</b>			
transcript11062541	Lipid transfer protein (LTP)	INF*	6,18E-07
transcript283908	Lipid transfer protein (LTP)	89,87137812	2,33E-05
transcript821132	Cysteine proteinase	72,68160233	2,39E-05
transcript2248565	Cysteine proteinase	46,6373615	3,79E-05
transcript2150976	Cytochrome p450	45,30101987	3,89E-05
transcript294614	Cysteine proteinase	36,66383051	8,32E-05
transcript79598	Pathogenesis-related protein PR1	22,1715595	0,000578663
transcript10224318	Gnk2-homologous domain	58,37601711	0,000767592
transcript2875339	Gnk2-homologous domain	24,53484777	0,001914715
transcript7739684	Chitinase 1	INF	0,027007494
transcript7373867	Lrr receptor-like serine threonine-protein kinase FLS2-like	INF	0,023090791
transcript10237940	Respiratory burst oxidase homolog	17,53587866	0,03338471
transcript10706235	Autoinhibited $ca^{2+}$ -atpase 1	17,30514341	0,036310713

transcript2583095	Mitogen-activated protein kinase 4 (MPK4)	INF	0,018152993
transcript2343629	Non-race specific disease resistance	INF	0,039361446
transcript7317876	Wrky transcription factor	INF	0,009779813
transcript7166806	Wrky transcription factor 33	INF	0,015686623
transcript9881844	Lox 1	16,49757005	0,013402813
transcript737603	Transcription factor bhlh35-like	41,0708737	0,002891884
transcript10643939	Transcription factor bhlh35-like	32,99514011	0,005856619
transcript41981	Pathogenesis-related protein PR10	INF	0,028957104
transcript4914611	Pathogenesis-related protein PR10	INF	0,002448458
transcript2412647	Pathogenesis-related protein PR5 (thaumatin-like protein)	23,3042598	0,015389518
transcript2610494	Pathogenesis-related protein PR5 (thaumatin-like protein)	INF	0,034389896
<b>48 hpi</b>			
transcript2248565	Cysteine proteinase	194,5782166	8,09E-08
transcript294614	Cysteine proteinase	185,4365474	9,03E-08
transcript11049044	Lipid transfer protein (LTP)	303,1296542	1,43E-07
transcript9182509	Cysteine proteinase	95,05418798	1,53E-06
transcript821132	Cysteine proteinase	87,96267568	1,99E-06
transcript2776164	Pathogenesis-related protein PR1	90,40461229	2,21E-06
transcript79598	Pathogenesis-related protein PR1	36,33710309	7,60E-05
transcript10800485	Cytochrome p450	INF	0,003266515
transcript7739684	Chitinase 1	11,77778391	0,012999516
transcript2221944	Ethylene receptor	11,12110891	0,042215977
transcript7070544	CC-NBS-LRR resistance protein	INF	0,009969918
transcript7009962	TIR-NBS-LRR resistance protein	INF	0,023160899
transcript7067921	Disease resistance protein rpm1-like	INF	0,040710493
transcript9881844	Lox 1	10,08313874	0,020816046
<b>72 hpi</b>			

transcript10715542	Multidrug resistance (MATE)	72,82816626	1,90E-05
transcript2338354	Protein lectin	63,72464548	4,51E-05
transcript5900323	Protein lectin	INF	7,33E-05
transcript5371535	Protein lectin	37,7145861	0,000101
transcript5184977	Protease inhibitor (Miraculin)	22,42222192	0,000105
transcript233659	Multidrug resistance (MATE)	39,88209105	0,00016
transcript2330423	Xyloglucan endotransglucosylase (XET)	34,68007917	0,000755
transcript11170761	Ethylene responsive transcription factor	13,1976968	0,002848
transcript2337347	Xyloglucan endotransglucosylase (XET)	12,42702837	0,003127
transcript11170783	AP2 domain transcription factor	8,336557493	0,010916
transcript7368901	TMV resistance protein	19,07404354	0,023209547
transcript9812711	Disease resistance family protein lrr family	5,960638608	0,043934448
transcript9881844	LOX 1	4,395498407	0,048059254

\*INF: Expressed only in infected tissue of Valencia.

WRKY, LOX1, and PR proteins have been implicated in plant immune responses to pathogen attacks. WRKY transcription factor play important roles in plant resistance system in response to abiotic and biotic stress (Eulgem and Somssich, 2007; Pandey et al., 2009), and are involved at various points in the signalling pathways that regulated these responses. Valencia expressed many transcripts of WRKY transcription factors at 24 hpi (Table 2). Valencia transcript (transcript9881844) of lipoxygenase 1 (LOX1) were identified at 24, 48, and 72 hpi (Table 2). bHLH transcription factors, plays a crucial role in Jasmonic Acid (JA) signalling pathway (Chini et al., 2009). Many bHLH transcription factors were up-regulated at 24 hpi (Table 2). Several transcripts related to PR protein were up-regulated, such as PR10, PR1 and PR5 (thaumatin-like protein) (Table 2). We



identified transcripts that encoding for pathogenesis-related (PR) proteins of the family PR1, at 24 and 48 hpi, however the fold-change at 48 hpi were higher (Table 2). The term PR proteins are used for all those proteins with enzymatic function or not, that are produced after infection by pathogens. They are currently grouped into 17 families which are numbered according to the order they were discovered (Vaan Loon et al., 2006).

At 24 ad 48 hpi were also identified up-regulated transcripts encoding for the lipid transfer protein (LTP) (Table 2). These are cysteine-rich proteins secreted by the plant cells characterized as a potential component of the cellular signaling in plant defense mechanisms (Blein et al., 2002). In *Arabidopsis thaliana* was characterized by having functions to protect plants against cell damage under stress from low temperature, salt stress and to pathogens (Li et al., 2012). Interestingly, Jayaraj and Punja (2007) demonstrated that the combined expression of chitinase genes and LTP in carrots transgenic plants had increased resistance to infection by the fungus *Botrytis* and *Alternaria*.

Valencia showed many transcripts encoding for cysteine proteinases at 24 and 48 hpi (Table 2). Cysteine proteases enzymes are described as essential to plant proteolysis. They are involved in reconstruction and degradation of proteins in response to different stimulus and also perform the function of removing misfolded proteins. Thus, proteolysis by cysteine proteases is a highly regulated process. In response to biotic stress, cellular proteins can be reconstructed. Damaged proteins are eliminated by degradation and replaced by newly formed proteins, for example, heat shock proteins, proteins induced by dehydration and PR proteins (Grudkowska et al. 2004).

Still at 24 and 48 hpi we identified transcripts that encoding for cytochrome P450 (Table 2). Plants use a wide range of the enzymatic complex P450 monooxygenase, which are involved in the oxidative metabolism of endogenous compounds, such as sterols, terpenes, flavonoids, fatty acids, alkaloids, cyanogenic glycosides and phenylpropanoids (Mendoza 2009). Reports of induction of P450s during plant-pathogen interaction has been described in other studies (Swarbrick et al., 2008), during the induced resistance response of rice plant to the pathogen *Striga hermonthica*. Accordingly Khalaf et al. (2007) also found expressed sequences of P450s in leaves of Kumquat after infection by Xac, suggesting the involvement of this protein in plant defense mechanisms.

There are still transcripts induced at 24 hpi encoding a protein homologous to the protein with ginkbilobin-2 (GnK2) domain (Table 2). Miyakawa et al. (2009) reported that the protein GnK2 has to 28-31% of their sequence identity to the extracellular domain of cysteine-rich kinase receptor (CRK) of *A. thaliana*. CRKs are involved in hypersensitivity reaction which is a typical system of programmed cell death.

Another transcript identified at 24 and 48 hpi coding for chitinase I (Table 2). Some chitinase also show lysozyme activity which hydrolyses the  $\beta$ -1,4 linkages between GlcNAc and *N*-acetylmuramic acid. These lysozymes/chitinases show higher activity on bacterial cell walls peptidoglycan (murein) (Minic, 2008). Cernadas et al. (2008) also identified the expression of chitinase 48 hpi with Xac in sweet orange, and Khalaf et al. (2011) identified the expression of chitinase in leaves of kumquat six hpi with Xac. Thus, the results presented here also illustrated that a high expression of the gene encoding chitinase I in Valencia infected by Xac may be related to an attempt to prevent pathogen action destroying their cell wall.

Transcripts encoding for ethylene receptors were identified at 48 hpi (Table 2). These are involved in the synthesis of the ethylene phytohormone that are described as modulating disease resistance in plants (van Loon et al. 2006). Cernadas et al. (2008) and Khalaf et al. (2007) identified the induction of ethylene receptors after infection by Xac in kumquat and sweet orange, respectively.

At 72 hpi with the lowest p-value were identified a transcript encoding for protein multidrug with MATE domain. Plant cells are capable of producing a wide variety of secondary metabolites, which can exert a function toxic of the themselves cells, so it is essential that these compounds can be efficiently removed from the cytosol. They can be transported to the apoplastic space where the chemical modification may occur, or they can be transported to the vacuole. The presence of a domain MATE correlates with transporter proteins ABC (ATP binding cassette) encoded in the plant genome. The reason is not very clear, but there are suggestions that they act in adaptive functions against environmental stresses. ABC transport proteins are classified into four major subfamilies: MDR (multi drug resistance), MRP (MDR-associated protein), AOH (ABC homologue) and PDR (Pleitropic Drug Resistance). The uptake of berberine in *Coptis japonica* showed the involvement of MDR transport protein, and *A. thaliana*, which does not produce endogenous berberine, this transport is carried out by another mode of transport called MATE (Multi Antimicrobial Extrusion / multidrug and toxin extrusion) (Oksman-Caldentey et al., 2007).

Among the transcripts expressed in Valencia at 72 hpi were identified more than 170 transcripts coding for the lectin protein, three presented in Table 2. The literature reports some proposals on the functions of lectins: a) the possible involvement of these proteins in the symbiotic relationships between plants and

nitrogen-fixing bacteria; b) the plant lectins are agents of defense against pathogenic microorganisms, phytophagous insects and herbivores. They possess cytotoxic properties, antifungal and anti-nematode both in vitro and in vivo; and c) the lectin protein can function as reserve substances, since in some plant seeds, lectins are the major soluble protein fraction (Ripol et al., 2003; Moura, 2007). Cernadas et al. (2008) identified induce lectin like protein in sweet orange 6 and 48 hpi by Xac.

A transcript identified as proteinase inhibitor type miraculin was expressed with a low p-value in Valencia at 72 hpi (Table 2). It is reported that protease inhibitors are part of a defense pathway associated and induced by jasmonic acid that accumulates in injury, pathogen attack or damage caused by insect (Alba et al. 2004). Microorganisms can produce proteolytic enzymes which cause hydrolysis of membrane proteins and cell wall of the host plants. Thus, proteinase inhibitors are proteins capable of forming complexes with proteolytic enzymes promoting inhibition of the activity of these proteases microorganism. Thus, it may be that protease inhibitors of plant tissues act directly against the extracellular proteases from microorganisms, delaying the proteolysis of cell wall and membrane proteins, preventing cellular disorganization (Tremacoldi, 2008). However, Fu et al. (2012) reported the induction of four genes of miraculin in kumquat and repression of three miraculin genes in sweet orange 'Newhall' five days after inoculation with Xac.

Another transcripts expressed in Valencia at 72 hpi were encoding Xyloglucan endotransglucosylase (XET). There is evidence that the XET enzyme are involved in cell wall extension because it facilitates the entry of expansinas which, in turn, lead to the disruption of hydrogen bonds between the polysaccharide, causing loosening of the cell wall. The reconstruction of the wall is promoted by auxin, the synthesis and deposition of polysaccharides, returning rigidity to the cell wall (Vieira et al., 2008). In

transcriptome analysis of *Fortunella crassifolia* by Fu et al. (2012) and *Fortunella margarita* by Khalaf et al. (2011), they identified the induction of XET.

Finally at 72 hpi were identified transcripts encoding proteins involved in ethylene biosynthesis, like ethylene receptors and transcription factors AP2/EFR (apetala2/ethylene responsive factor). The phytohormone ethylene is a key modulator in many developmental processes and stress responses such as seed germination, cell elongation, senescence, fruit ripening, and also in the reaction of plants to pathogens (Broekart et al., 2006). Cernadas et al. (2008) have been described results demonstrate that transcriptional changes in *C. sinensis*, between 6 and 48 hpi with Xac, showed expression of key genes in ethylene synthesis including 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase, ethylene receptors and several transcription factors AP2/ERF.

As down-regulated transcripts were identified many transcripts at 24 and 48 hpi encoding for proteins related to photosynthesis like carbonic anhydrase, ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) and chlorophyll ab binding (Table 3). In plants carbonic anhydrase acts in many important physiological functions that involve decarboxylation and carboxylation reactions, including photosynthesis and respiration. It plays an important role in the early events of photosynthesis, increased concentration of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) in the chloroplast in order to increase the rate of carboxylation of Rubisco (Mitra et al. 2004). The Rubisco enzyme is essential for photosynthesis system. This is one of the most abundant enzymes in plants, acting in the capture of carbon dioxide from the air and also founded a sugar in the cell called RUDP (ribulose 1,5-diphosphate or RuBP - ribulose bis-phosphate). The reaction between these two reagents gives rise to two sugar molecules (PGA phosphoglycerate). The Rubisco is thus responsible for the first step of the Calvin

cycle and, in particular, for the fixation of carbon dioxide into organic form (Cooper, 2000). It is described that the protein chlorophyll ab binding is associated with photosystem I (PSI) or photosystem 2 (PSII) in plants (Anderson et al., 2003).

**Table 3. Differentially expressed transcripts (DET) in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) down-regulated at 24, 48 and 72 hours post inoculation (hpi) with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ( $10^8$  CFU/ml). The transcripts with p-value < 0.05 were considered DET and that with the fold-change < 2 down-regulated.**

Transcript	Target description	Fold-change	p-value
<b>24 hpi</b>			
transcript3186334	PG1 protein	0,000285	6,02E-13
transcript3186358	PG1 protein	0,000494	5,10E-12
transcript3186478	PG1 protein	0,000495	5,15E-12
transcript2571327	Enzyme phytochelatin synthase	0,069221	0,010452
transcript5577559	Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco)	0,076912	0,034704
transcript5383699	Carbonic anhydrase	0,088744	0,041152
<b>48 hpi</b>			
transcript330637	Carbonic anhydrase	0*	8,90E-05
transcript6616797	Chlorophyll a b binding	0,007565	0,000269
transcript5765287	Chlorophyll a b binding	0,008147	0,000445
transcript5891661	Protein lectin	0,024209	0,000492
transcript5661800	Protein lectin	0,029421	0,000519
transcript7758889	Chlorophyll a b binding	0,003686	0,000817
transcript94901	Chlorophyll a b binding	0,007243	0,002856
transcript6007357	Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco)	0	0,003092
transcript6399417	Protein lectin	0,009658	0,004857

transcript6208842	Chlorophyll a b binding	0	0,035739
<b>72 hpi</b>			
transcript5046492	Hypothetical protein	0	6,43E-05
transcript5046492	Hypothetical protein	0	6,43E-05
transcript484132	Unknow protein	0,076500175	0,001672023
transcript487207	Nudix hydrolase	0	0,004901597
transcript2526311	Lrr receptor-like serine threonine-protein kinase	0,158262266	0,018029882

\*O: Expressed only in control tissue of Valencia.

The repression of genes involved in photosynthesis during plant-pathogen interaction represents a cost to the adaptation of the plant when its energy is redirected to the defense response, as discussed by Khalaf et al. (2011). The repression of genes related to photosynthesis was also identified by Fu et al. (2012) in Newhall plants after infection Xac. Khalaf et al. (2011) also reported the repression of photosynthetic genes machinery in kumquat leaves six hpi with Xac. In another study Bonfig et al. (2006) identified the repression of photosynthetic genes of the transcriptome of *A. thaliana* three hours after infection with *Pseudomonas syringae*, and Lu et al. (2012), after analyzing the transcriptome of *Nicotiana tabacum* infected with Cucumber mosaic virus (CMV), reported inhibition of photosynthesis in various stages of disease development. Plants, when exposed to biotic stress, show a suppression of their photosynthetic genes, because there is probably a targeting metabolism for the production of proteins for defense against the pathogen, such as the relocation of the nitrogen in the photosynthetic pathway machinery defense (Fu et al. 2012). However, the suppression of photosynthesis related genes can be in reason of the cell death promoted by the pathogen colonization. Reducing the membrane plasmatic integrity, Xac colonization decreases the functional

metabolism of host cell, resulting, for example, in less ATP production. The inhibition of photosynthetic machinery of infected tissues can be a direct effect of the pathogen, not a consequence of the adaptation of the plant to redirected its energy to the defense responses.

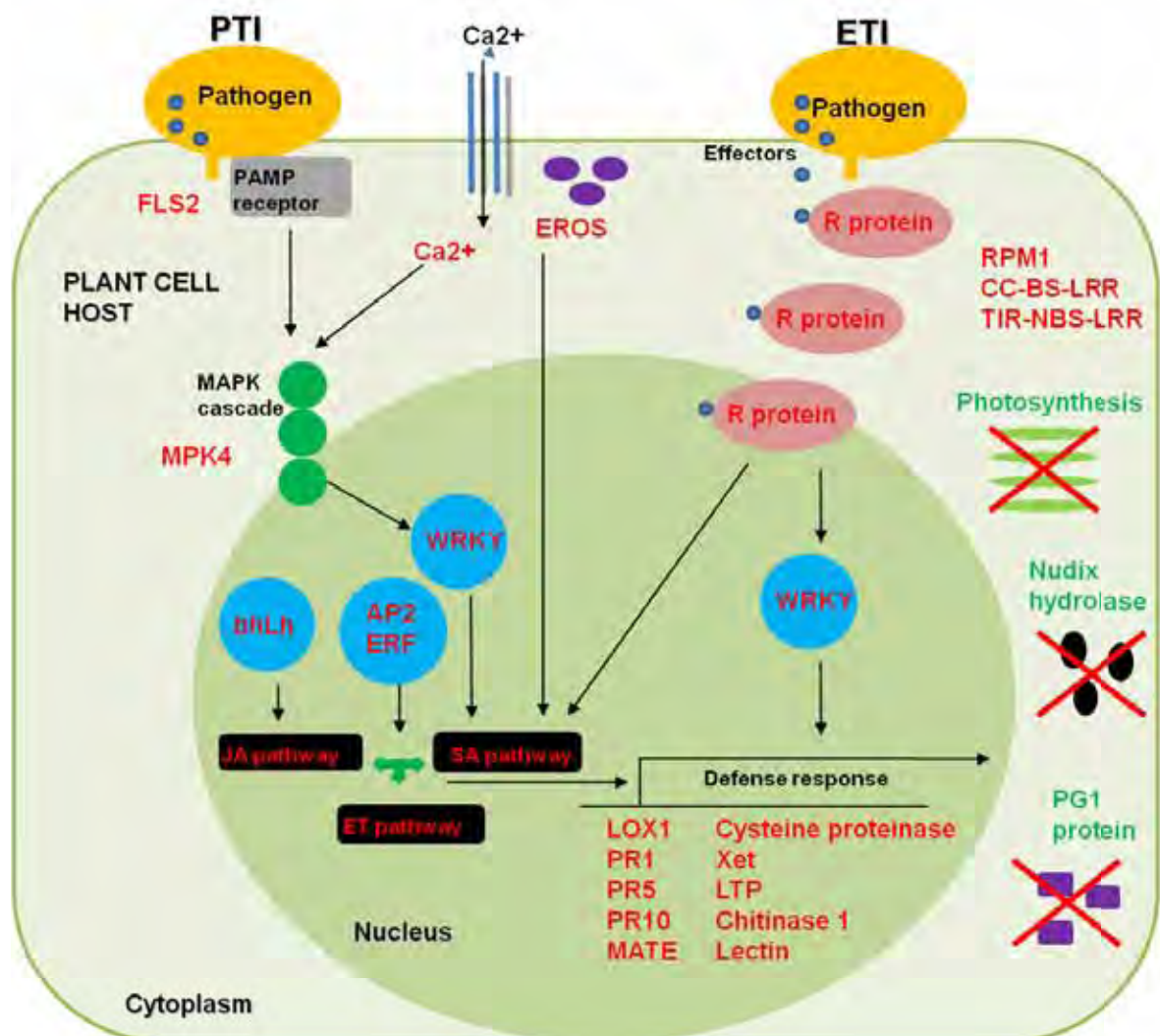
Interestingly, Valencia lectin protein was suppressed at 48 hpi (Table 3), as well as proteinase inhibitor type miracula (60 and 15 transcripts, respectively). However, as shown in Table 2, both proteins were induced at 72 hpi. Among other transcripts repressed at 24 hpi, it was identified a transcript encoding the enzyme phytochelatin synthase (PCS) (Table 3). It is described that this enzyme is involved in the synthesis of phytochelatin (PC) and homophytochelatin (HPC), peptides binding of heavy metals plants. The phytochelatin peptides are rich in sulfur, non-enzymatic antioxidants, capable of accumulating in the vacuole contributes to the detoxification of cells once they decrease the amount of free metal in the cellular environment (Delite, 2007).

Valencia at 24 hpi had a high suppression of three transcripts that encode for the protein polygalacturonase 1 (PG1) (Table 3). This protein is involved in the activity of hydrolysis of pectin in the plant wall and are described different forms of these PGs, called isoenzymes: PG1, PG2, and PG2b PGx. A 8kDa protein that is part of the complex multiproteína PG1 of tomato was isolated, purified and its function was characterized. This protein, designated 'activator' (ACT), belongs to the class of non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs). Although not well understood biological function of LTP it is recognized that these may play a role in plant defense against pathogenic bacteria and fungi (Tomassen et al. 2007).

Among the transcripts down-regulate 72 hpi in Valencia (Table 3), was identified a transcript which encodes the protein Nudix hydrolase. In *A. thaliana* it



were described 32 Nudix proteins (atNUDTs) and, despite the lack of knowledge about the function of this protein, atNUDT7 was identified as a negative regulator in the defense response. In biological assays mutations of AtNUDT7 caused the loss of its function and confer increased resistance to disease, leaving the plants hyper responsive against pathogens (Get et al., 2008). Based on the differentially expressed transcripts observed in the three times of infection by Xac in Valencia it was possible to suggest events that occurred in the plant in response to infection by Xac. The main transcripts and mechanisms differentially expressed in Valencia identified in our study are presented as a plant-pathogen interaction model at Figure 3.



**Figure 3. Proposed plant-pathogen interaction model with PTI and ETI systems describing the transcripts and mechanisms of Valencia sweet Orange (*Citrus sinensis*) that were differentially expressed after infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. The transcripts up-regulated are represented in red bold characters and transcripts down-regulated in green bold-characters. Figure based on Kim et al. (2011).**

The identification of various DET on Valencia plants infected by Xac, which are apparently related to defense of plants against pathogenic bacteria, suggest that these pathways may play a key role in the development of defense of plants to pathogens in their initial stages. Thus, the results presented herein provide by the first time, information associated with the Valencia citrus genotype infected by Xac. Furthermore, the identification of transcripts that play a key role in defending plants against biotic agents assumes that the defense system is able to act directly against the pathogen, but as for the pathosystem presented here so still incomplete considering the susceptibility from Valencia to Xac. Thus, an alternative that can be employed in an attempt to reduce the susceptibility Xac is the overexpression of some genes identified as expressed in Valencia sweet oranges in this study.

## References

- Alba, R.; Fei, Z., Payton, P., Liu, Y., Moore, S.L., Debbie, P., Cohn, J., D'ascenzo, M., Gordon, J.S., Rose, J.K.** (2004) ESTs, cDNA microarrays and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J.*, **39**(5), 697-714.
- Anders, S., Huber, W.** (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**(106), 1-12.

- Anderson, U., Heddad, M., Adamska, I.** (2003) Light Stress-Induced One-Helix Protein of the Chlorophyll *a/b* – Binding Family Associated with Photosystem I. *Plant Physiol.*, **132**, 811-820.
- Barbosa, J.C., Gimenes-Fernandes, N.; Massari, C.A., Ayres, A.J.** (2001) Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. *Summ. Phyto.*, **27**, 30-35.
- Behlau F., Amorim L, Belasque Jr. J, Bergamin Filho A., Leite Jr. R.P., Graham J.H., Gottwald T.R.** (2010) Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. *Plant Pathol.*, **59**, 1031-1036.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y.** (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B.*, **57**, 289-300.
- Bitancourt, A.A.** (1957) Cancro cítrico. *Biológico*, São Paulo, **23**(6), 101-111.
- Blein, J.P., Coutos-Théveno T.P., Marion D., & Ponchet. M.** (2002) From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defence mechanisms. *Trend Plant Sci.*, **7**, 293-296.
- Bonfig, K.B., 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. *Planta*, **225**(1), 1-12.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F., Cammue, B.P.** (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**, 393-416.
- Cernadas, R.A., Camillo, L.R. & Benedetti, C.E.** (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol. Plant Pathol.*, **9**, 609–631.
- Chini, A., Boter, M. and Solano, R.** (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid signalling module, *FEBS J.*, **276**, 4682–92.
- Civerolo, E.L.** (1984) Bacterial canker disease of citrus. *J. of the Rio Gran. Va. Hort. Soc.*, **37**, 127-146.
- Clay, N., Adio, A., Denoux, C., et al.,** (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response, *Science*, **323**, 95–101.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M.** (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, **21**(18), 3674-3676.
- Cooper, G.M.** (2000) *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). "10.The Chloroplast Genome". Washington, D.C: ASM Press.

- Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., Do Amaral, A.M.** et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **417**, 459-463.
- Eulgem, T. and Somssich, I.** (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**, 366–71.
- Fu, X.Z., Gong, X.Q., Zhang, Y.X., Wang, Y., Liu, J.H.** (2012) Different Transcriptional Response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kumquat and Sweet Orange with Contrasting Canker Tolerance. *PLoS ONE*, **7**( 7), 1-17.
- Get, X., Xia, Y.** (2008) The role of AtNUDT7, a Nudix hydralase, in the plant defense response. *Plant Signal. Behav.*, **3**(2), 119-120.
- Gmitter, F.G.** et al. (2012) Citrus genomics. *Tree Genet. & Genomes*, **8**(3), 611–626.
- Grudkowska, M., Zagdańska, B.** (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteínases. *Acta Biochim. Pol.*, **51**(3), 609-624.
- Jayaraj, J., Punja, Z.K.** (2007) Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistane to foliar fungal pathogens. *Plant Cell*, **26**,1539-1546.
- Khalaf, A.A.** et al. (2011) *Fortunella margarita* Transcriptional Reprogramming Triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Plant Biol.*, **11**(159), 1-17.
- Khalaf, A.A., Moore, G.A., Jones, J.B., Gmitter, F.G. JR.** (2007) New insights into the resistance of Nagami Kumquat to canker disease. *Physiol. Mol. Plant Path.*, **71**, 240-250.
- Kim K.H., Kang Y.J., Kim D.H., Yoon M.Y., Moon J.K.,** et al. (2011) RNA-Seq analysis of a soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and -susceptible alleles. *DNA Res.*, **18**, 483-497.
- Langmead, B., Salzberg, S.** (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, **9**, 357-359.
- Li, Lan., Zhang, C., Xu, D., Sclapp., Xu, Z.** (2012) Expression of recombinante EARL11, a hybrid proline-rich protein of Arabdopsis, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the grow of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, **506**(1:10), 50-61.
- Lu, J., Du, Z.X., Kong, J., Chen, L.N., Qiu, Y.H.** (2012) Transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* infected by *Cucumber mosaic virus* during systemic symptom development. *PLoS ONE*, **7**(8), 1-12.
- Martinelli, F., Uratsu, S.L., Albrecht, U., Reagan, R.L., Phu, M.L.,** et al. (2012) *Transcriptome Profiling of Citrus Fruit Response to Huanglongbing Disease*. *PLoS ONE*, **7**(5), 1-16.

**Mendoza, D.G.** (2009) CYTOCHROM P450 monooxygenase enzymatic complex IN PLANTS. *Agric. Téc. Méx.*, **35**(2), 225-231.

**Minic, Z.** (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, **227**, 723-740.

**Mitra, M., Lato, S.M., Ynalvez, R. A., Xiao, Y., Moroney, J.V.** (2004) Identification of a New Chloroplast Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, **135**, 173-182.

**Miyakawa, T., Miyazono, K., Sawano, Y., Hatano, K., Tanokura, M.** (2009) Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. *Proteins*, 247-251.

**Moura, G.E.D.D.** (2007) Avaliação do efeito citotóxico da Lectina da esponja marinha *Cliona varians* contra células de leucemia mieloide crônica. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

**Neves, M.F.** (Org.). O retrato da Citricultura brasileira. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato\\_Citricultura\\_Brasileira\\_Marcos\\_Fava.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf)> Acesso em: jan. 2013.

**Oksman-Caldentey et al.** (2007) Applications of Plant Metabolic Engineering. R. Verporte, A.W. Alferman, T.S. Johnson. Metabolic engineering of the alkaloid biosynthesis in plants. pp. 109-127. The Netherlands: Springer.

**Pandey, S. and Somssich, I.** (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity, *Plant Physiol.*, **150**, 1648–55.

**Patel, R.K., Jain, M.** (2012) NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLoS ONE*, **7**(2), 1-7.

**Ripol, C., Favery, B., Lecomte, P., Van damme, E., Peumans, W., abad, P., Jouanin, L.** (2003) Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Sci.*, **164**( 4), 517-523.

**Rossetti, V.V.** (2001) Manual ilustrado de doenças dos citros. Piracicaba. Fealq/Fundecitrus.

**Soares, A.M.S, Machado, O.L.T.** (2007) Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *R. Trop. Ci. Agr. Biol.*, **1**(1), 9.

**Swarbrick, P.J., Huang, K., Liu, G., Slate, J., Press, M.D., Scholes, J.D.** (2008) Global patterns of gene expression in rice cultivars undergoing a susceptible or resistant interaction with the parasit plant *hermonthica*. *New Phytol.*, **179**, 515-529.

**Talon M. and Gmitter Jr.** (2008) “Citrus Genomics”. *International Journal of Plant Genomics*, Article ID 528361,,1-17.

**Tomassen, M.M.M., Barrett, D.M., Van Der Valk, H.C.P.M., Woltering, E.J.** (2007) Isolation and characterization of a tomato non-specific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. *J Exp Bot.*, **58**(5), 1151-1160.

**Tremacoldi, C.R.** (2008) Proteases e inibidores de proteases na interação planta-microorganismo. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. *Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 627.

**Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of inducible defense-related proteins in INFected plants. *Ann Rev Phytopathol*, **44**, 135-162.

**Vieira, C.R.Y.I., Paioli Pires, E.J., Terra, M.M., Tecchio, M.A., Vieira, M.C.** (2008) Reguladores vegetais influenciando número e tamanho de células das bagas da uva 'Niagara Rosada'. *Ver. Bras. Frutic.*, **30**(1), 025-030.

**Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M.** (2009) RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 57-63.

**Zipfel, C.** (2009) Early molecular events in PAMP- triggered immunity, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 414–20.