

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO
***Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C E**
PLANTAS CÍTRICAS

Claudênia Ferreira da Silva
Bióloga

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO
***Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* tipo C E**
PLANTAS CÍTRICAS

Claudênia Ferreira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Co-Orientador: Prof. Dr. José Belasque Junior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Claudênia Ferreira da
Análise do transcriptoma da interação *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, tipo C e plantas cítricas. / Claudênia Ferreira da Silva. – – Jaboticabal, 2015
vi, 150 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Banca examinadora: Roberto Hiroshi Herai, Fabrício José Jaciani, Flávia Maria Souza Carvalho, Marcos Túlio Oliveira.

Bibliografia

1. Citrus. 2. Cancrose. 3. *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:634.3

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Claudênia Ferreira da Silva, nascida em Brasília – DF, aos 28 dias do mês de outubro do ano de 1986. Em 2005, com base na nota do ENEM, lhe foi concedida bolsa de 100% de isenção pelo programa PROUNI para cursar Ciências Biológicas na Faculdade Juscelino Kubitchek (Anhanguera). Estagiou na Caesb (Companhia de águas e esgoto de Brasília) e na EMBRAPA – Cenargen. Concluiu a Licenciatura em dezembro de 2007 e o Bacharelado em 2008. Ingressou na Universidade de Brasília em 2009, para cursar Mestrado pelo Programa de pós-graduação em Fitopatologia. Em agosto do ano de 2011, iniciou no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Jaboticabal.

“O todo sem a parte não é todo,
A parte sem o todo não é parte,
Mas se a parte o faz todo, sendo parte,
Não se diga que é parte, sendo todo.”

Gregório de Matos Guerra (1636-1696)

”eu... enfim, sei quem eu era, quando me levantei hoje de manhã, mas acho que já me transformei várias vezes desde então. Receio que não possa me explicar Dona Lagarta, porque é justamente aí que está o problema. Posso explicar uma porção de coisas, mas não posso explicar a mim mesma...”

Alice no país das maravilhas - Lewis Carrol

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Aquele que é, foi e será o único digno de toda honra e glória para sempre. Em todos os momentos me pegas pela mão e me conduz. Agradeço pelo ânimo e sagacidade que encontro em tuas palavras sempre que fraquejo ou não me sinto capaz...

À minha família, que sempre está comigo e me apoia em todos os momentos, sejam eles felizes ou de difíceis decisões. A minha mãe, Rosângela, amor supremo que nunca mede esforços para que possamos voar mais alto! Meu irmão Felipe, homem da minha vida, que amo incondicionalmente e ao meu padrasto João que acreditou em mim em todos os momentos e não mediu esforços para que tudo se tornasse real. À Vovó Maria e vovô Fernando (in memoriam), minha base e razão de tudo! É por vocês que vivo e encontro forças para continuar, mesmo quando nada vai bem. Todo o esforço é por e para vocês!! Amor Maior!

À Carlos Leandro, por me apoiar e estar ao meu lado em todos os momentos e que, mesmo a distância se faz muito presente todos os dias. Você é muito importante nesse trajeto e espero continuar nossa estrada juntos sempre!! Glória a Deus por sua vida!

A Cecília Rodrigues, José Cezar Castro, Jullie Kaori Saiki, Fernanda Souza, Luciane Lopes, amigos para todos os momentos, longe ou perto sei que posso contar com vocês sempre, pois carregam o título mais nobre que existe: Amigos!

A todos os meus queridos “mades” que, apesar da distância moram no meu coração e me aguentam sempre que posso ir ao meu amado Distrito Federal. Cecília Rodrigues, Kamila Araújo, Klênia Pacheco, Jessica da Mata, Renato Cantanhede, Lilian Li, Barbara Alencar, Hugo Moreira, Gisele Marques, José Cezar Castro, Kim Lustosa, Nayra Bonfim, Erica Santos.

Ao meu orientador, Jesus Aparecido Ferro, pelos muitos ensinamentos, incentivo e confiança. Mesmo quando nossas opiniões são divergentes, a sua sabedoria e visão me levam a pensar além. Não poderia ter escolhido melhor!

Ao meu co-orientador, José Belasque Junior, pela disponibilidade em ceder as mudas utilizadas, conversas e ensinamentos.

A professora Maria Inês T. Ferro por todo o apoio, ensinamentos, conversas, confiança e ensinamentos, dos quais não é possível mensurar.

Ao Doutor Roberto Hirochi Herai, por ajudar em toda a parte computacional e de dados do trabalho. Pelas reuniões via Skype, muito proveitosas, esclarecedoras e por vezes, dando suporte a momentos de desânimo e tensão. Sem seu auxílio, confiança e suas valiosas colocações, não seria possível tal trabalho. Muito obrigada!

Ao professor Daniel Guariz, ao professor Thiago Balbuena, a Agda Facincani, Fabrício Jaciani e Flávia Maria Carvalho por todo o tempo desprendido em ensinamentos e conversas despretensiosas que sempre resultaram em boas idéias ou apenas para esclarecer pontos.

Às minhas queridas amigas, Flávia Campos, Ana Carolina Buzinari, Aline Belesini, Bruna Telles, sempre dispostas a ajudar EM TUDO!! Muito desse trabalho se deve a elas, mais do que possam imaginar!! Obrigado amores! Minhas “chaperonas”!

Aos amigos que conquistei e que me conquistaram em Jaboticabal, Gustavo Claudiano, Manuela Rocha Franco, Bya Garvana, Marina Elizabeth, Maria Lucília, Vanja Gondim, Elaine Costa. Nunca imaginei que poderia fazer amizades verdadeiras na cidade que cheguei a detestar e que hoje é muito melhor por conta de vocês!

À “nossa casa” onde, unidas pelos mesmos propósitos, dividimos afazeres e sonhos. Eu, Flávia, Marina, o Benjamin e a Bela. Deus sabe de todas as coisas e, dentre tantas pessoas, vocês vieram fazer da minha vida mais feliz, mais alegre e muito mais gostosa. Obrigada meninas, pela convivência, amizade e amor que sempre existe em nosso lar!!!

Aos amigos e colegas do LBM e CREBIO, pela convivência, aprendizado e cordialidade, Mayara Murata, Juliana Cavallini, Teresa Cofre, Juliana Vantini, Flávia Carvalho, Raquel Lunedo, Gustavo Squassoni, Aline Lopes, Aline Belesini, Bruna Telles, Amanda Paulino, Jessica Mello, Thaísa Marthins, Angela Santisteban, Maria Lucília Machado, Janaina Panagassi, Elkin Fernando Rodas, Rafael Marini, Thamiris Kempner, Julie Anne Amorim, Elaine Costa, Maria Angela Coelho, Ana Carolina

Buzinari, Flávia Campos, Helen Penha, Nayara Morotti, Daniele Gimenez, Larissa Simielli, Lucas Bonfá, Agda Facincani, Mariza Mota, Renata Tezza, Michelle Pena.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Flávia Maria Carvalho, Dr. Fabrício José Jaciani, Dr. Marcos Túlio Oliveira, Dr. Roberto Hirochi Herai, por suas valiosas contribuições ao trabalho.

Agradeço aos que, por ventura não foram citados nominalmente, mas, que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, pelo conhecimento repassado, nas disciplinas cursadas.

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO	6
II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 A CULTURA DOS CITROS NO BRASIL.....	9
2.2 A CANCROSE C	9
2.3 O PATÓGENO.....	11
2.4. O COMBATE À DOENÇA	12
2.5 INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO EM PLANTAS	13
2.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	16
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 ISOLADO E PRESERVAÇÃO	19
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	19
3.3 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO	20
EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE FOLHAS CÍTRICAS	21
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>XANTHOMONAS FUSCANS</i> SUBSP. <i>AURANTIFOLII</i> (XAUC) EM ESTADO INFECTANTE	22
3.5 PREPARO DAS BIBLIOTECAS DE CDNA E “CLUSTERIZAÇÃO”	23
3.6 SEQUENCIAMENTO	24
3.8 BANCO DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE CITRUS: CitSeqDB	26
3.9 ANÁLISES DE EXPRESSÃO DE GENES	26
3.10 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DE AMOSTRAS	27
IV - RESULTADOS.....	28
4.1 QUALIDADE DAS AMOSTRAS E BIBLIOTECAS DE CDNA	28
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (GDE)	31
4.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS À VIA DE METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO	34
4.4 CADA COMPARTIMENTO CELULAR É RECRUTADO PARA DEFESA	35
4.5 RESPOSTA DE DEFESA INATA.....	37
4.6 SINALIZAÇÃO HORMONAL.....	40
4.7 PROTEÍNAS RELACIONADAS À PATOGÊNESE (PR)	42
4.8 FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	44
V - DISCUSSÃO.....	47
5.1 RESPOSTA DE DEFESA INATA.....	52
5.2 SINALIZAÇÃO HORMONAL E FATORES DE TRANSCRIÇÃO	55
5.3 PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA PR E CASCATA DE SINALIZAÇÃO HORMONAL.....	57
5.4 FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	58
5.5 ERF/AP2	61
5.6 ARF	62
5.7 WRKY	63
5.8 bHLH	63
5.9 MYB	65
5.10 CHOQUE TÉRMICO (HEAT STRESS).....	66
5.11 DOF.....	67
5.13 GRF	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO *Xanthomonas fuscans* *SUBSP. aurantifolii*, tipo C E PLANTAS CÍTRICAS

RESUMO: A bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC) é o agente causal da cancrose C, que afeta apenas lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle). A principal característica fenotípica desta doença é a hiperplasia e hipertrofia do tecido afetado, que leva à formação de lesões erupescentes características, sendo que o responsável pela proliferação celular desordenada é um efetor tipo TAL da família AvrBs3/PthA, que é injetado na planta pelo sistema de secreção tipo III (SST3) da bactéria e é translocado até o núcleo, onde interage com regiões UPA-box (up-regulated by AvrBs3) e funciona como um ativador transcricional. As variedades de laranja doce são resistentes à cancrose C e, quando inoculadas com XauC apresentam forte reação de hipersensibilidade (HR), causando morte celular programada local (apoptose) e abscisão das folhas afetadas. O(s) mecanismo(s) que confer(em) à lima ácida ‘Galego’ susceptibilidade à XauC não é(são) conhecido(s). Este estudo teve como objetivo identificar, através de sequenciamento de nova geração (NGS), transcritos de plantas diferencialmente expressos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro nos patossistemas XauC-laranja ‘Hamlin’ (espécie resistente) e XauC-lima ácida ‘Galego’ (espécie susceptível). Para isso, folhas de laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ foram inoculadas com suspensão de XauC a uma concentração de 10^6 ufc/mL, sendo que o controle foram folhas inoculadas com água estéril. Essas folhas foram coletadas nos tempos de 5 e 7 dias após inoculação (dai) e o RNA total foi extraído e utilizado para a análise dos transcritos por RNA-seq. Os transcritos obtidos do sequenciamento foram normalizados e as redundâncias foram removidas. Foi montado um banco único de dados genômicos e de transcritos de citros, que foi denominado de CitSeqDB e que é o resultado da junção de 6 bancos públicos: AFFYM, NCBI, UNIGENE, USDA, CITRUSGDB e PHYTOZOME. Os transcritos obtidos via RNA-Seq e que se mostraram diferencialmente expressos em relação aos controles foram confrontados com o banco e categorizados utilizando a ferramenta Blast2GO, sendo identificados como pertencentes a vias metabólicas

relacionadas ao metabolismo primário, secundário e diretamente ligadas a resposta ao patógeno, bem como fatores de transcrição. Chama a atenção o fato de que em laranja 'Hamlin', resistente à cancriose C via HR, quase 3.000 genes tiveram a expressão alterada nos primeiros 5 dias após a infecção, enquanto que em lima ácida 'Galego', susceptível à cancriose C, apenas 59 genes tiveram a expressão alterada neste mesmo período. Esta resposta imediata e em larga escala apresentada pela laranja "Hamlin", provavelmente seja a responsável pelo sucesso da planta em conter a bactéria e evitar a infecção, o que não acontece em lima ácida 'Galego'. Em relação aos fatores de transcrição, analisados de forma mais sistemática, foram encontrados como diferencialmente expressos fatores de transcrição das famílias GRF, GIF e bHLH, que regulam a proliferação celular da planta e que são reprimidos pelo micro RNA miR396. Os dados obtidos no presente trabalho mostram que GRF e bHLH estão mais reprimidos em laranja 'Hamlin' aos 5 dias do que em lima ácida 'Galego'. Isso é compatível com o fato de que neste período já há sintomas de cancro em lima ácida 'Galego' e não em laranja 'Hamlin'. Uma hipótese é que a desrepressão de GRF e bHLH é feita pelo efector PthA de XauC, que interagiria com regiões UPA20 presentes nas regiões regulatórias dos genes GRF e bHLH da planta.

Palavras-Chave – cancriose, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, transcriptoma, defesa de plantas.

ANALYSIS OF INTERACTION TRANSCRIPTOME *Xanthomonas fuscans* SUBSP. *aurantifolia*, type C AND PLANTS CITRUS

ABSTRACT: The bacterium *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolia* type C (XAC) is the causative agent of cancrase C, which affects only acid lime 'Galego' (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle). The main phenotypic characteristic of this disease is the hyperplasia and hypertrophy of the affected tissue, leading to the formation of erupescentes characteristic lesions, and responsible for the abnormal cell growth is a transcription activator-like (TAL) effector family (also called the avrBs3/pthA family), which is injected into the plant by the type type III secretion system (T3SS) and is translocated to the nucleus, where it interacts with UPA-box regions (up-regulated by AvrBs3) and acts as a transcriptional activator. The sweet orange varieties are resistant, and when inoculated with XauC show strong hypersensitive response (HR), causing local programmed cell death (apoptosis) and abscission of affected leaves. The mechanisms that give the acid lime 'Galego' susceptibility to XauC is not known. This study aimed to identify, through next-generation sequencing (NGS), plant differentially expressed transcripts involved in host-pathogen interaction in pathosystems XauC-orange 'Hamlin' (species resistant) and XauC-acid lime 'Galego' (species susceptible). Leaves from 'Hamlin' and acid lime 'Galego' were inoculated with XauC suspension at a concentration of 10^6 cfu/mL (experimental) or sterile water (control) and collected at 5 and 7 days after inoculation (dai). Total RNA was extracted and used for transcriptome analysis by RNA-seq. The transcripts obtained from sequencing were normalized and redundancies removed. A single bank of genomic data and citrus transcripts was assembled, which was called CitSeqDB and is the junction of 6 public banks: AFFYM, NCBI Unigene, USDA, CITRUSGDB and PHYTOZOME. Transcripts that proved to be differentially expressed relative to controls were confronted with the bank and functional annotation was performed using Blast2GO, which allowed the categorization of the transcripts as belonging to metabolic pathways related to primary metabolism, secondary and directly linked the response to the pathogen as well as transcription factors. Interestingly, in orange 'Hamlin', resistant to cancrase C via HR, almost 3,000 genes showed altered

expression in the first 5 days after infection, whereas in acid lime 'Galego', susceptible to cancriose C, only 59 genes showed altered expression in the same period. This immediate and large-scale response presented by the orange 'Hamlin' is, probably, responsible for the success of the plant to contain the bacteria and prevent infection, which does not happen in acid lime 'Galego'. Regarding transcription factors, analyzed more systematically, transcription factors members of GRF, GIF and bHLH family, which regulate cell proliferation of the plant and are suppressed by micro RNA miR396, were found to be differentially expressed. The data obtained in this study indicate that GRF and bHLH are more repressed in orange 'Hamlin' at 5 dai than in acid lime 'Galego'. This is consistent with the fact that in this period there are already symptoms of canker in acid lime 'Galego' but not in orange 'Hamlin'. One hypothesis is that derepression of GRF and bHLH is made by PthA effector of *XauC*, by interacting with UPA20 regions present in regulatory regions of the GRF bHLH genes and the plant.

Keywords – cancriose, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, transcriptome, plant defense.

I- INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das *commodities* mais importantes no mercado mundial. Movimenta cerca de 45.944.432 milhões de dólares ao ano. Com o consumo de 8.419 milhões de litros, o suco de laranja é considerado o suco mais consumido no mundo (NEVES et al., 2010; FLORIDA CITRUS, 2014; CITRUSBR, 2015).

O Brasil é detentor de 50 % da produção mundial de suco de laranja, sendo que 90 % do que é produzido é exportado (NEVES, 2010; CITRUSBR, 2015). O Produto Interno Bruto (PIB) do setor citrícola no Brasil em 2009 foi de US\$ 6,5 bilhões, correspondendo a 3% das exportações do agronegócio, não havendo nenhum outro produto industrializado em que o país se destaque tanto (NEVES, 2010). A safra 2015/2016, na área citrícola de São Paulo e porção sul de Minas Gerais, está estimada em 278,99 milhões de caixas (FUNDECITRUS, 2015).

Quando se trata de produção nacional, o estado que lidera a produção de laranja é São Paulo, com 70 % da área plantada, seguido pelo triângulo mineiro, que juntos formam o chamado “cinturão citrícola”, responsável pela maior parte da produção de suco de laranja concentrado congelado (FCOJ – sigla em inglês) para exportação do país. Estados como o Paraná, Bahia, Rio Grande do Sul, Pará, Goiás e Rio de Janeiro tem sua produção voltada para o consumo da fruta fresca (NEVES, 2010; CITRUSBR, 2015).

A citricultura é acometida por um grande número de doenças causadas por vírus, bactérias e fungos (SAMPIONATO et al., 1997), que freiam tanto a expansão das áreas de cultivo como encarecem a produção. O cancro cítrico é uma destas doenças.

São conhecidos três tipos de cancro cítrico: o tipo A, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), relatada primeiramente no continente asiático e hoje, podendo ser encontrado em praticamente todas as áreas onde citros são cultivados; o tipo B, relatado na Argentina e encontrando também no Uruguai, sendo seu agente causal a bactéria *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* (XauB) e o tipo C ou cancrose C, causado pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (XauC) e encontrada apenas no Brasil (DAS, 2003).

A cancrese tipo C foi reportada no Brasil em 1963, afetando plantas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantiifolia*) em alguns municípios do Estado de São Paulo (NAMEKATA, 1971). Os sintomas causados pela bactéria são muito semelhantes a Xac, porém não afeta laranjas (DAS, 2003). Quando XauC é inoculada em laranja doce (*Citrus sinensis*), provoca reação de hipersensibilidade (HR), resultando em morte local de tecido e desfolhamento (NAMEKATA, 1971). Portanto, XauC afeta apenas lima ácida "Galego", que não tem grande expressão econômica quando comparada com a laranja doce. A reação de HR em plantas de laranja doce sugere que, ao entrar em contato com a bactéria, a planta consegue barrar a infecção com eficácia. Esse tipo de reação nos leva a pensar quais tipos de mecanismos são ativados em plantas de laranja doce, impedindo a proliferação da bactéria e a instalação da doença como um todo (DAS, 2003), o que não ocorre em plantas de lima ácida 'Galego'. O uso de abordagens de genômica comparativa em larga escala para responder questões deste tipo vem sendo utilizada com bastante sucesso, tanto para desvendar mecanismos de defesa do hospedeiro como genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro (YANG & WANG, 2013).

A partir do sequenciamento completo do genoma de Xac (DA SILVA et al., 2002) as perspectivas no estudo de *Xanthomonas* ganharam novos caminhos, novas perspectivas e um aprofundamento nas questões a serem respondidas. Com isso, em 2008, Cernadas e colaboradores, analisaram o perfil transcricional de Xac e XauC, através da técnica de microarranjo, que elucidou parte do que acontece em resposta a interação da planta com o hospedeiro. Porém, em se tratando de microarranjo, deve-se ter em mente que esta técnica tem uma sensibilidade bastante limitada e é dependente do número de genes que estão presentes na membrana (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010). Em 2010, Moreira e colaboradores, sequenciaram duas outras espécies de *Xanthomonas*, *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* tipo B (XauB) e *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* tipo C (XauC), o que tornou possível um maior entendimento das bases moleculares do grupo Xanthomonadales para uso em genômica comparativa (MOREIRA et al., 2010).

O advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) vêm possibilitando o sequenciamento em larga escala de genomas inteiros e de genes expressos a um custo acessível. As NGS produzem milhões de fragmentos de

sequências que são rotineiramente utilizados para genomas, epigenomas e transcriptomas. O sequenciamento de uma amostra de RNA purificado, chamada de RNA-seq, consegue ser mais específico e esclarecedor do que microarranjos, pois não necessita de conhecimento prévio do genoma do organismo. Traz maior confiabilidade quanto à reprodutibilidade e a manipulação humana é bem menor em relação a outras técnicas (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010; MARTIN; WANG, 2011). O uso desse tipo de técnica permite o preenchimento de “lacunas” que até então não podiam ser respondidas. Com isso, perguntas cada vez mais específicas podem ser formuladas e hipóteses testadas quanto a sua veracidade. Uma destas questões é o conhecimento dos genes e mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno de um dado patossistema, conhecimento este que pode ser utilizado para o desenvolvimento de plantas resistentes a patógenos, tanto por melhoramento genético clássico como por engenharia genética.

O presente estudo teve como objetivo identificar, através de sequenciamento de nova geração (NGS), transcritos diferencialmente expressos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro nos patossistemas XauC-laranja ‘Hamlin’ (espécie resistente) e XauC-lima ácida ‘Galego’ (espécie susceptível).

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Cultura dos citros no Brasil

A família Rutaceae tem seu centro de origem no continente asiático, onde, com o comércio e as grandes expansões territoriais, alguns gêneros desta família adaptaram-se muito bem nas Américas, como foi o caso do gênero *Citrus* (ALVES; MELO, 2001; NEVES, 2010). Os portugueses introduziram sementes de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) nas ilhas da Madeira, nas Ilhas Canárias e em outras colônias do Atlântico leste. Cristóvão Colombo, na sua segunda viagem, em 1493, levou sementes desta espécie, que se encontravam nas ilhas Canárias, à ilha do Haiti, em 1518. Depois, a laranja doce se dispersou pela América Central e pela América do Norte, introduzindo-se assim pela primeira vez no Novo Mundo. Na América do Sul, especificamente no Brasil, a laranja doce foi introduzida pelos jesuítas portugueses por volta do ano 1530 nos estados da Bahia e de São Paulo, onde permaneceu por mais de quatro séculos sem constituir uma atividade econômica (ALMEIDA et al., 2011). É caracterizada por plantas perenes, com folhas abundantes e persistentes. Atualmente, laranjas, limões, tangerinas, entre outros, estão entre os membros do gênero *Citrus* sp mais plantados no Brasil. A laranja doce é a mais cultivada (ALVES; MELO, 2001; NEVES, 2010) e as variedades mais plantadas são Pera, Hamlin, Valência, Baía, Westin, Rubi, Pineapple e Pera-Natal (CITRUSBR, 2014). O Brasil é hoje o maior produtor mundial de laranja doce e o maior exportador de suco concentrado e, embora tenha havido uma pequena queda na produção de laranja na safra 2015/2016 em relação à safra anterior, o sabor laranja continua sendo o mais consumido entre as bebidas de frutas prontas para beber (USDA, 2015).

2.2 A cancrose C

A cancrose tipo C, endêmica do Brasil, tem como agente etiológico a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC). É restrita ao estado de São Paulo, afetando lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle) ou *Mexican lime*. Foi

descrita pela primeira vez em 1971 por Namekata, ao observar sintomas semelhantes ao do cancro cítrico tipo A em pomares de lima ácida 'Galego' no Estado de São Paulo (Figura 1). Os sinais são lesões salientes, corticosas, pardacentas, circundadas muitas vezes por halo amarelo na superfície de ramos, folhas e frutos (NAMEKATA, 1971; CIVEROLO, 1994; NOCITI et al., 2006).

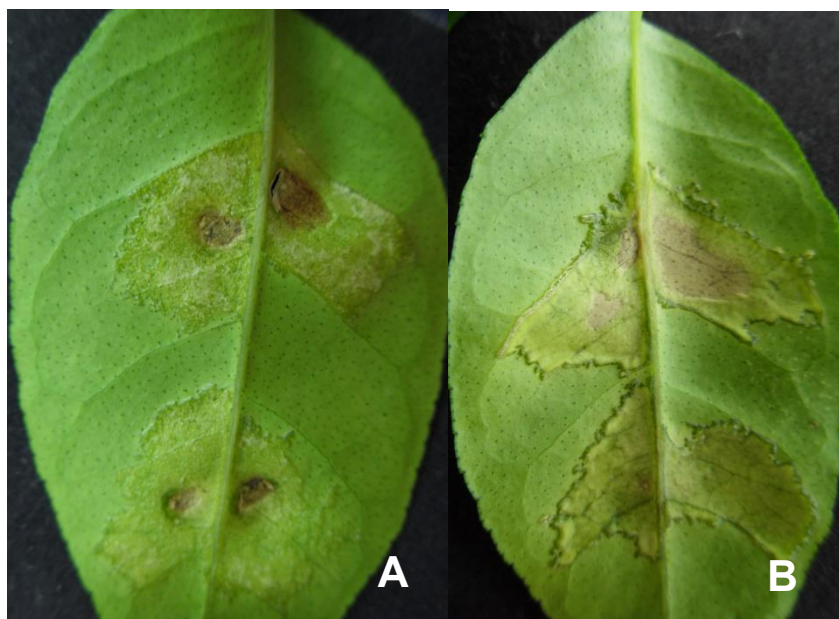


Figura 1- Folhas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) aos 11 dias após inoculação com bactérias do gênero *Xanthomonas*. A – Folha inoculada com a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC), com sintomas e sinais de cancrese. B – Folha inoculada com a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), com sintomas e sinais de cancro cítrico.

A bactéria XauC é patogênica apenas para lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) e, quando inoculada em laranja doce ou outras espécies cítricas, provoca reação de hipersensibilidade (HR) (Figura 2), com apoptose local e excisão das folhas afetadas (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 1987; NOCITI et al., 2006).

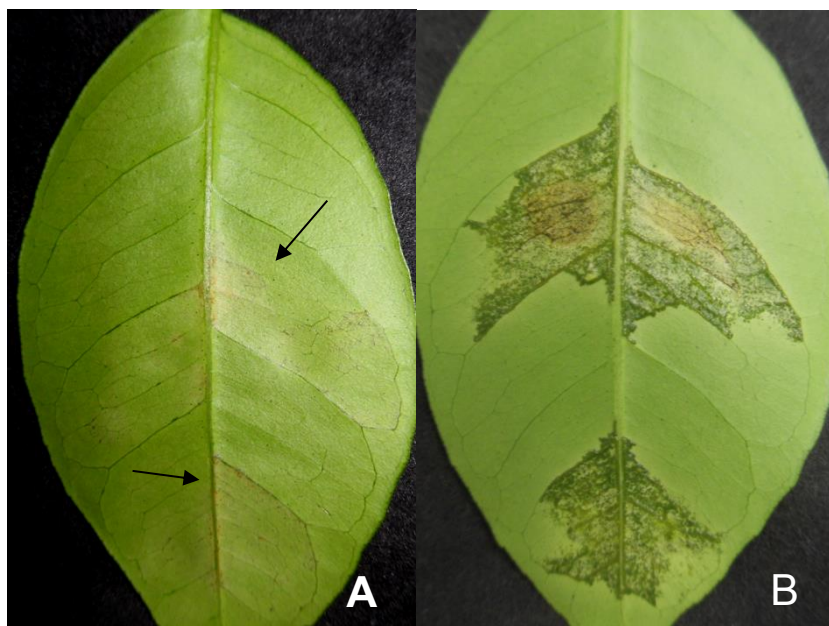


Figura 2- Folhas de laranja 'Hamlin' aos 11 dias após inoculação com bactérias do gênero *Xanthomonas*. A – Folha inoculada com a bactéria XauC, com reação de hipersensibilidade (HR) no local de inoculação, indicado por setas. B – Folha inoculada com a bactéria Xac, com sintomas e sinais de cancro cítrico.

2.3 O Patógeno

A bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC) faz parte do gênero *Xanthomonas*, um dos grupos de fitopatógenos que mais afetam culturas economicamente importantes no mundo.

É uma bactéria gram negativa, com flagelo polar (monotríquia), produz pigmento amarelo (xantomonadina) e goma xantana, o que caracteriza o gênero. Em meio NA (Peptona 5 g/L, Extrato de Carne 3 g/L, Ágar 10 g/L) tem crescimento em até 76 horas, o que comparando com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), representa crescimento bem mais lento e metabolismo retardado. Alguns isolados produzem pigmento marrom em meio de cultura. Pode ser diferenciada dos tipos A e B por sorologia e por PCR com iniciadores específicos para a região 16 S ou por padrão de rep-PCR. São idênticas a olho nu, não havendo diferenciação (SCHAAD et al., 2006).

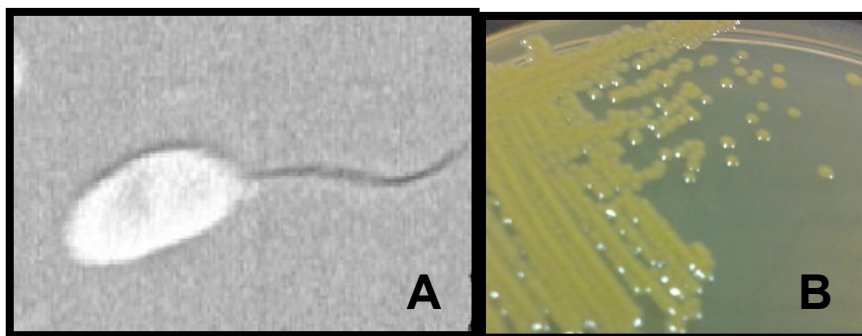


Figura 3- A: Micrografia de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC), mostrando seu formato bastonetiforme e flagelo polar único (MOREIRA et al., 2010). B: Aspecto da colônia de XauC em meio de cultura Nutriente Ágar (NA). As colônias são brilhantes, côncavas, amarelas mucóides. Visualmente indistinguível de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

2.4. O combate à doença

A legislação quanto às cancroses foi abrandada, pois, até o ano de 2009, o produtor era obrigado a arrancar a planta afetada e eliminar todas as plantas num raio de 30 metros, permanecendo até dois anos sem plantar nenhuma planta cítrica no local. A partir de 2013, a lei foi abrandada e os produtores já não são obrigados a eliminar todo o raio de 30 metros da planta afetada, apenas eliminar a árvore afetada e pulverizar todas as plantas num raio de 30 metros com bactericidas a base de cobre e repetir a pulverização a cada brotação (FUNDECITRUS, 2015). Até o momento, não há medida curativa para o cancro cítrico nem para a cancrese tipo C.



Figura 4- Vista aérea de área de plantio de laranja, em que houve medida de controle por arranquio da árvore afetada por Xac e de todas ao redor num raio de 30 metros. Fonte: <http://fito-esalq.blogspot.com.br/2011/10/semana-9-principios-gerais-de-controle.html>

2.5 Interação patógeno-hospedeiro em plantas

A relação entre o patógeno e seu hospedeiro, com influências do meio ambiente, em condições ambientais favoráveis para a invasão e instalação do microrganismo, dá origem ao que conhecemos como doença. A interação planta-patógeno vem sendo estudada em vários patossistemas, inclusive no patossistema *Xanthomonas*-citros (AMARAL, 2004; AGRIOS, 2005; BLUM et al., 2006; TALON; GMITTER JR, 2008).

Para que a interação entre planta-patógeno seja efetiva é necessário que haja: suscetibilidade da planta, capacidade do microrganismo em infectá-la e condições ambientais que favoreçam a colonização do tecido vegetal por esse patógeno. Sem que ocorram esses três fatores, a doença não ocorre e, por isso, como forma geral, sua presença em uma planta é considerada uma exceção na natureza e não uma regra (AMARAL, 2004). Esses fatores, em conjunto com fatores ambientais, desencadeia a resposta do hospedeiro ao ataque do patógeno, que é determinada por ativação de genes específicos. O que se conhece dos genes envolvidos na interação planta-patógeno é muito pouco quando se trata das espécies de *Citrus* e de genes associados com resistência à bactérias (TALON; GMITTER JR, 2008).

Na interação patógeno-hospedeiro, o modelo sugerido por Flor (1971), conhecido como teoria gene-a-gene, propõe que a resistência irá ocorrer quando o hospedeiro possuir o gene de resistência (*R*) e o patógeno expressar o gene complementar dominante ou gene de avirulência (*avr*) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). A interação do produto do gene *R* com o produto do gene *avr* dispara no hospedeiro os mecanismos de defesa que levam à resistência. Em citros, não foi ainda encontrado um mecanismo deste tipo para a interação *Xanthomonas*-citros.

O sistema de defesa das plantas reconhece os padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios (PAMPs ou MAMPs – *pathogen (or microbe) – associated molecular patterns*), como a flagelina, quitina, glicoproteínas e lipopolissacarídeos (GOHRE; ROBATZEK, 2008; POSTEL; KEMMERLING, 2009) e, por conseguinte, ativa os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs)

localizados nas membranas celulares do hospedeiro. Este reconhecimento desencadeia respostas gerais de defesa das plantas denominado imunidade desencadeada por PAMP (PTI – *PAMP-triggered immunity*). Pares de PAMP-PRR tem sido identificados em muitas espécies de plantas (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; LLOYD et al., 2014).

A resposta PTI, juntamente com os PRR, compreende uma série de reações de defesa em geral, suficientes para impedir o crescimento do patógeno. Pode ocorrer ainda, a injeção de efetores pelo patógeno, ativando a imunidade desencadeada por efector (ETI - *effector-triggered immunity*), que são as respostas aos efetores específicos inseridos por um patógeno (MEDZHITOV, JANEWAY, 1997; MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; LLOYD et al., 2014).

Para demonstrar visualmente o que acontece na planta, Jones e Dangle (2006) propuseram o modelo “zig-zag”, sendo este um ótimo modelo que exemplifica muito bem essa ação e reação entre patógeno e hospedeiro (Figura 5).

Tendo isso como base, quando um patógeno consegue ultrapassar as barreiras estruturais do hospedeiro e é reconhecido pelos receptores da planta como não pertencente à planta, uma rápida e coordenada resposta de defesa é induzida pela planta resistente, prevenindo a colonização e desenvolvimento do patógeno, conhecida com interação incompatível. Entretanto, se a planta não reconhecer o patógeno ou não conseguir ativar rapidamente as vias de defesa, como é o caso das plantas suscetíveis, a doença é desencadeada, conhecida como interação compatível (GREWAL et al., 2012).

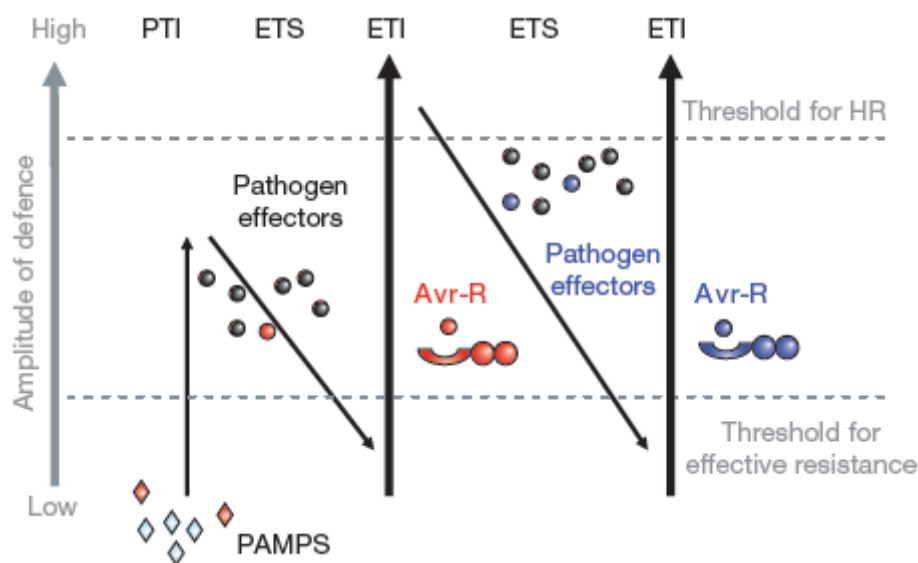


Figura 5- Modelo “zig-zag”, proposto por Jones e Dangle (2006). Na fase 1, quando ocorre o contato e entrada do patógeno com o hospedeiro, a amplitude da resposta de resistência ou susceptibilidade será proporcional ao PTI-ETS+ETI. Na fase 2, quando o hospedeiro não detecta a presença do patógeno, o mesmo consegue introduzir seus efetores, que irão interferir no processo de PTI, resultando em ETS. Na fase 3, quando já foram introduzidos os efetores, são reconhecidos por proteínas como NB-LRR, ativando ETI, uma versão amplificada de PTI e, por ser tão forte, frequentemente resulta em HR. Na fase 4, em caso de patógeno especializado, alguns isolados do patógeno possuem outros tipos de efetores e os liberam, suprimindo assim o efeito de ETI. A seleção de novas plantas com alelos para NB-LRR pode reconhecer os novos efetores, o que resultaria em nova reação de ETI.

No patossistema *Xanthomonas*-cítricos, que resulta em cancro cítrico ou cancrose, o responsável pela proliferação celular desordenada, característica da doença, é um efector TAL (*transcription activator-like*) da família AvrBs3/PthA, que é injetado na planta pelo sistema de secreção tipo III (SST3) da bactéria e é translocado até o núcleo, onde interage com regiões UPA-box (up-regulated by AvrBs3) e funciona como um ativador transcricional (LI et al., 2014). Assim, mutações no gene *pthA* leva à perda dos sintomas da doença (FIGUEIREDO et al., 2011). Entretanto, muitos outros genes do patógeno tem sido implicados na patogenicidade (LAIA et al, 2009; YAN, WANG, 2012; MALAMUD et al., 2013), indicando que a interação *Xanthomonas*-cítricos é bem mais complexa do que parece à primeira vista. Além do fato de que a grande maioria dos estudos tem sido realizados com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), pouco se sabe do que acontece do lado das plantas cítricas, ou seja, dos mecanismos moleculares envolvidos na defesa contra o ataque de diferentes *Xanthomonas* que causam cancro ou cancrose.

2.6 Análise da expressão gênica

Na interação planta-patógeno, o objetivo final é conhecer, em termos moleculares, os mecanismos que são ativados na planta e no patógeno ao longo do tempo e que levam a planta a “derrotar” o patógeno, ou seja, ser resistente à doença, ou levam o patógeno a sobrepujar as defesas da planta e causar a doença. A comparação do transcriptoma de variedades de citros com níveis diferentes de resistência ao cancro cítrico pode levar à identificação dos genes relacionados com as vias de defesa da planta cítrica e a compreender porque uma planta é resistente e a outra não.

A identificação dos genes relacionados com a virulência do patógeno e dos relacionados com os mecanismos de defesa e resistência da planta, que são ativados pela presença do patógeno, pode ser feita através do estudo da expressão gênica temporal da interação planta-patógeno. O conhecimento dos genes expressos (transcriptoma) pelos dois componentes do patossistema ao longo do processo de interação é essencial para compreender como o patógeno consegue ou não vencer as defesas da planta e assim causar a doença.

Várias tecnologias são usadas para análise do transcriptoma. Elas podem ser baseadas na hibridização de sondas (macro ou microarranjos), na construção e sequenciamento de bibliotecas de sequências de etiquetas expressas (ESTs), no sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de cDNA (SAGE, CAGE e MPSS), na análise de fragmentos de cDNA amplificados via PCR e, mais recentemente, no sequenciamento em larga escala dos mRNAs expressos através do sequenciamento de nova geração (NGS – *Next generation sequencing*), denominado RNA-seq.

Com a utilização das técnicas de hibridação supressiva subtrativa e microarranjos, Cernadas et al. (2008) investigaram os mecanismos moleculares da planta cítrica envolvidos nas vias de resistência induzidos por dois patógenos distintos, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolli* tipo C (XauC) e identificaram e categorizaram 100 genes de *C. sinensis* envolvidos no desenvolvimento dos sintomas de cancro cítrico e nos mecanismos de resistência à doença. De maneira significativa, os genes relacionados com a modificação da

parede celular, divisão celular, tráfego de vesículas e com as vias de resistência da planta apresentaram uma expressão alterada nas plantas inoculadas com Xac quando comparadas com plantas inoculadas com XauC, 6 e 48 horas após a inoculação. Esta diferença na expressão gênica explica como a Xac, e não XauC, é capaz de suprimir rapidamente os mecanismos de defesa do hospedeiro durante a infecção e simultaneamente, alterar o status fisiológico das células do hospedeiro, reprogramando sua divisão e crescimento. Este trabalho é considerado a primeira descrição de uma análise global detalhada da expressão gênica em plantas cítricas em resposta à infecção por fitobactérias (CERNADAS et al., 2008).

As tecnologias de biologia molecular e de genômica permitiram grandes avanços na biotecnologia (engenharia genética, plantas e animais transgênicos, terapia gênica, sequenciamento de genomas inteiros) e descobertas de genes de resistência através de sequenciamento de nova geração (*NGS – Next generation sequencing*). São consideradas mais indicadas por não necessitarem de conhecimento prévio de genoma ou do organismo que se quer estudar. Supera as maiores limitações dos ESTs, que busca o aumento na quantidade de informação sequenciada (CARVALHO; SILVA, 2010; KOGENARU et al., 2012; YANG; WANG, 2013).

O sequenciamento RNA-Seq possibilita determinar o perfil da expressão global de genes, o que permite a identificação dos genes que são expressos em amostras biológicas em condições fisiológicas específicas ou em determinados estágios de desenvolvimento. O uso de NGS permite também descobrir estruturas dos genes, posição de região codificante, regiões não traduzidas, sítios de splicing (*introns e exons*), isoformas de splicing, entre outros (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010; MARTIN; WANG, 2011; STUDHOLME et al., 2011; KOGENARU et al., 2012).

O RNA-Seq, além de revelar os genes expressos em um dado momento ou situação, é também um método quantitativo. Desta forma, pode ser usado para determinar os níveis de expressão gênica de maneira mais acurada do que os microarranjos. A técnica é capaz de capturar a dinâmica do transcriptoma em diferentes tecidos e condições, sem necessidade de que normalizações sofisticadas

sejam aplicadas sobre os conjuntos de dados (WANG et al., 2008; OSHLACK et al., 2010; KIMBREL et al., 2011; KOGENARU et al., 2012).

Neste estudo, a técnica de RNA-Seq foi utilizada com o objetivo de identificar genes da planta envolvidos na interação patógeno-hospedeiro entre a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e plantas de lima ácida ‘Galego’ e laranja doce ‘Hamlin’ infectadas com a mesma.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado e preservação

Para o presente estudo, foi utilizada a bactéria *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* (XauC), isolado IBSBF 10535 (338), cedida pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). Em placa de petri contendo meio NA (Nutriente ágar: peptona 5 g, extrato de carne 3 g, ágar 10 g, H₂O q.s.p. 1000 mL) foi plaqueado 20 µl do referido isolado e a mesma incubada por 72 horas a 29 °C, sem agitação. A partir dessa placa, escolheu-se uma colônia isolada, que foi repicada para outra placa contendo meio NA, também incubada a 29 °C, sem agitação, por 48 horas. Após esse período, prepararam-se estoques em tubos criogênicos, tanto em tampão PBS contendo glicerol (16,7 %) como em água de torneira autoclavada, para manutenção do presente isolado vivo e sem contaminação por longos períodos. Os estoques em PBS contendo glicerol foram mantidos em ultrafreezers a -80 °C e os estoques em água de torneira foram mantidos à temperatura ambiente, em ambiente escuro.

Quando necessário, colônias isoladas eram obtidas do estoque como descrito acima e utilizadas nos experimentos. Não se mantinha estoque da bactéria por repique em placas de petri e manutenção em geladeira.

3.2 Material Vegetal

Foram utilizadas duas espécies de *Citrus*, sendo 4 plantas de laranja doce *Citrus sinensis*, variedade “Hamlin” (espécie considerada resistente à XauC) e 4 plantas de lima ácida “Galego”, *Citrus aurantifolia* Swingle (espécie considerada suscetível à XauC) com folhas jovens, totalmente expandidas e ainda não muito escuras, quanto à coloração verde. Todas as mudas tinham pelo menos dois anos de idade, sadias e obtidas de viveiro certificado.

As folhas das plantas foram limpas com água DEPC (tratada com Diethyl Pyrocarbonato, Sigma Aldrich®) autoclavada e levadas para aclimação 24 horas antes de serem inoculadas em laboratório de segurança, o qual possuía temperatura controlada entre 25 e 29 °C, pressão negativa, filtros EPA para filtragem absoluta do

ar e antecâmara, impedindo a propagação do inóculo para fora do laboratório e, assim, tornando o experimento seguro.

3.3 Preparo do inóculo e inoculação

O inóculo foi preparado em câmara de fluxo laminar, a partir do isolado de XauC, crescido por 72 horas em placa de Petri contendo meio NA. Em tubos tipo Falcon® de 50 mL estéril, adicionou-se água destilada estéril e, com o auxílio de alça de platina, transferiu-se porções da massa bacteriana, seguido de leitura a 600 nm em espectrofotômetro BioPhotometer, (Eppendorf®), até uma densidade óptica (DO) de 0,3 equivalente a uma suspensão com 10^8 UFC/mL. A suspensão foi então diluída 1:100 para que estivesse a uma concentração de 10^6 UFC/mL. Os frascos foram então acondicionados em gelo até o momento de inoculação.

A inoculação foi feita na parte abaxial das folhas, por pressão com seringa hipodérmica sem agulha, para minimizar os danos causados ao tecido (Figura 6). Foram inoculadas por vez, 4 plantas, sendo 3 inoculadas com a suspensão bacteriana (experimental) e 1 com água destilada estéril para controle. Foram inoculadas 3 folhas em cada planta, com um total de 9 folhas para extração de RNA das folhas cítricas para cada tempo (5 e 7 dai) e 3 folhas inoculadas com água destilada (controle).

Para extração do RNA bacteriano, foram inoculadas 60 folhas para cada tempo, divididas nas 3 plantas.



Figura 6- Inoculação da suspensão bacteriana em todo o limbo foliar com seringa hipodérmica, sem agulha, por pressão na parte abaxial de folhas de laranja ‘Hamlin’.

Extração do RNA total de folhas cítricas

Primeiramente, todos os materiais utilizados para extração de RNA (vidrarias e metais) foram esterilizados em estufa a 180 °C por no mínimo 4 horas. Os plásticos a serem utilizados foram tratados com solução de NaOH a 0,5 M por 20 minutos. As soluções foram preparadas com água DEPC autoclavada, tornando a solução livre de ribonucleases e própria para o preparo dos materiais.

Nos tempos de 5 e 7 dias após a inoculação das folhas com XauC, coletou-se 3 folhas por planta, as quais foram embrulhadas em papel alumínio estéril e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e, em seguida, guardadas em freezer - 80 °C até o momento da extração do RNA total.

Para a extração do RNA total, foram pesadas 200 mg de cada amostra congelada (cada amostra foi composta por 3 folhas de 3 plantas diferentes, sendo mescladas a fim de se ter um “pool” de folhas), seguido de maceração imediata em almofariz de porcelana com pistilo. Após pulverização total, o pó foi transferido imediatamente para tubos Eppendorf gelados. Adicionou-se então 600 µL de tampão de extração gelado e procedeu-se a extração do RNA total utilizando o kit comercial Ambion Purelink® RNA Mini Kit, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante.

Após a extração, a DO a 260 nm das amostras foi determinada em um espectrofotômetro Nano Drop ND-100, para determinação da concentração

aproximada de RNA total, e a relação A260/A280nm e A230/A260nm das mesmas foi também determinada, para avaliar a presença de contaminantes nas preparações. A integridade do RNA presente nas amostras foi determinada no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent®) utilizando o RNA 6000 Nano Kit (Agilent®). Apenas amostras com RIN (RNA *integrity number*) maior ou igual a 7,5 foram utilizadas para determinação do transcriptoma por RNA-seq. A concentração de RNA de fita simples em cada preparação, com RIN maior ou igual a 7,5 foi mensurada através do fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen®) utilizando Qubit® RNA HS Assay Kit (Invitrogen®). Para cada tempo foram utilizadas três amostras independentes compondo triplicatas, tanto para as folhas inoculadas com XauC (experimental) como para as inoculadas com água estéril (controle). Ao todo, foram sequenciados os mRNAs presentes em 24 amostras, sendo 12 amostras de laranja 'Hamlin' (6 experimentais e 6 controles) e 12 amostras de lima ácida 'Galego' (6 experimentais e 6 controles).

3.4 Extração de RNA total de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (XauC) em estado infectante

Após 5 e 7 dai, as folhas foram coletadas, cortadas em tiras finíssimas com auxílio de bisturi cirúrgico estéril, em placa de vidro estéril mantidas sobre gelo. As tiras foram colocadas imediatamente em béquer estéril contendo 200 ml de água Milli-Q estéril mantido em isopor com gelo. Essa mistura foi mantida sob agitação constante a 200 rpm em gelo por 30 minutos, para exsudação da bactéria presente no tecido vegetal. Após esse tempo, o exsudado foi filtrado em gaze estéril e colocado em tubo de vidro Corex® de 30 ml estéril e previamente gelado. A solução foi centrifugada em centrífuga refrigerada (Himac, CR 20B2, Hitachi) a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado, adicionou-se 100 µL de tampão TE (10 mM Tris; 1,0 mM EDTA, pH 8,0) contendo 0,2 mg/mL de Lisozima e seguiu-se a extração utilizando o kit comercial *Illustra RNAspin Mini* RNA Isolation kit (GE Healthcare®) de acordo com instruções do fabricante. Algumas vezes foram feitas com modificações no protocolo, como lavagens adicionais, alterações na coleta, lavagens do precipitado após a extração. Também foram testados outros

kits para extração de RNA total da bactéria, tais como o NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel®), Purelink® RNA Mini Kit (Ambion®) Quick - RNA™ Miniprep kit (Zymo Research®).

Para a amostra controle, foi feita extração de RNA de suspensão bacteriana crescida em meio de cultura (72 horas a 10^6 UFC/mL), utilizando-se o *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit* (GE Healthcare®) e seguindo-se os mesmos passos para centrifugação e extração. A DO a 260 nm das amostras foi determinada em um espectrofotômetro Nano Drop ND-100, para determinação da concentração aproximada de RNA total, e a relação A260/A280nm e A230/A260nm das mesmas foi também determinada, para avaliar a presença de contaminantes nas preparações. A integridade do RNA presente nas amostras foi determinada no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent®) utilizando o *RNA 6000 Nano Kit* (Agilent®). Apenas amostras com RIN (*RNA integrity number*) maior ou igual a 7,5 foram utilizadas para a determinação do transcriptoma por RNA-seq. A concentração de RNA fita simples em cada preparação com RIN maior ou igual a 7,5 foi mensurada através do fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen®) utilizando o *Qubit® RNA HS Assay kit* (Invitrogen®).

3.5 Preparo das bibliotecas de cDNA e “clusterização”

A tecnologia empregada para o sequenciamento RNA-seq foi a plataforma HiScan e HiSeq, da Illumina®.

Para o preparo das bibliotecas, partiu-se da concentração inicial de 1500 µg de RNA total em 50 µL, para todas as amostras. A preparação de bibliotecas de laranja ‘Hamlin’ e de limão Galego’ de 5 e 7 dias após a inoculação com seus respectivos controles experimentais, foi feita utilizando o *TruSeq RNA Library Preparation Kit v2* (Illumina), de acordo com as recomendações do fabricante. Primeiramente, os mRNAs foram separados do RNA ribossomal pela adição de complementos poli-T, ligados a esferas magnéticas, que capturam os mRNA’s que possuem cauda poli-A. Sequencialmente, as amostras foram eluídas e desnaturadas, adicionou-se a enzima SuperScript® e o mix para síntese da primeira fita de cDNA. Após 75 minutos em termociclador, adicionou-se outro mix para a

síntese da segunda fita de cDNA que, após a PCR, foi novamente lavado para purificação do cDNA recém gerado. No passo seguinte foi feito o “End repair”, preparando e adenilando as bibliotecas para receber os “Bar codes”. Esses foram escolhidos a fim de que, ao final do sequenciamento, as amostras pudessem ser separadas umas das outras, não podendo, esses adaptadores, serem repetidos na mesma “lane” da “flow-cell”. As bibliotecas prontas, formaram fragmentos de 240 a 300 pares de bases (pb) e foram purificadas e testadas quanto à sua integridade no Bioanalyzer 2100 utilizando o chip específico para DNA (Agilent DNA-1000). A concentração de cDNA foi determinada no fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit *Qubit® dsDNA BR Assay Kit*.

A etapa seguinte foi a “clusterização”, realizada no aparelho denominado *cbot*, que prepara a “flow-cell” para o sequenciamento, fazendo a síntese em fase sólida. Somente após esse procedimento é que pode-se dar início ao sequenciamento propriamente dito.

3.6 Sequenciamento

A superfície de clonagem (*flow cell*) é dividida em oito canaletas, que são utilizadas para o sequenciamento. Em cada canaleta, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para a iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização.

Os fragmentos de DNA da amostra são ligados aos adaptadores em ambas as extremidades (Figura 7), 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 7). 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. Até 50 milhões de clusters podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. 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.

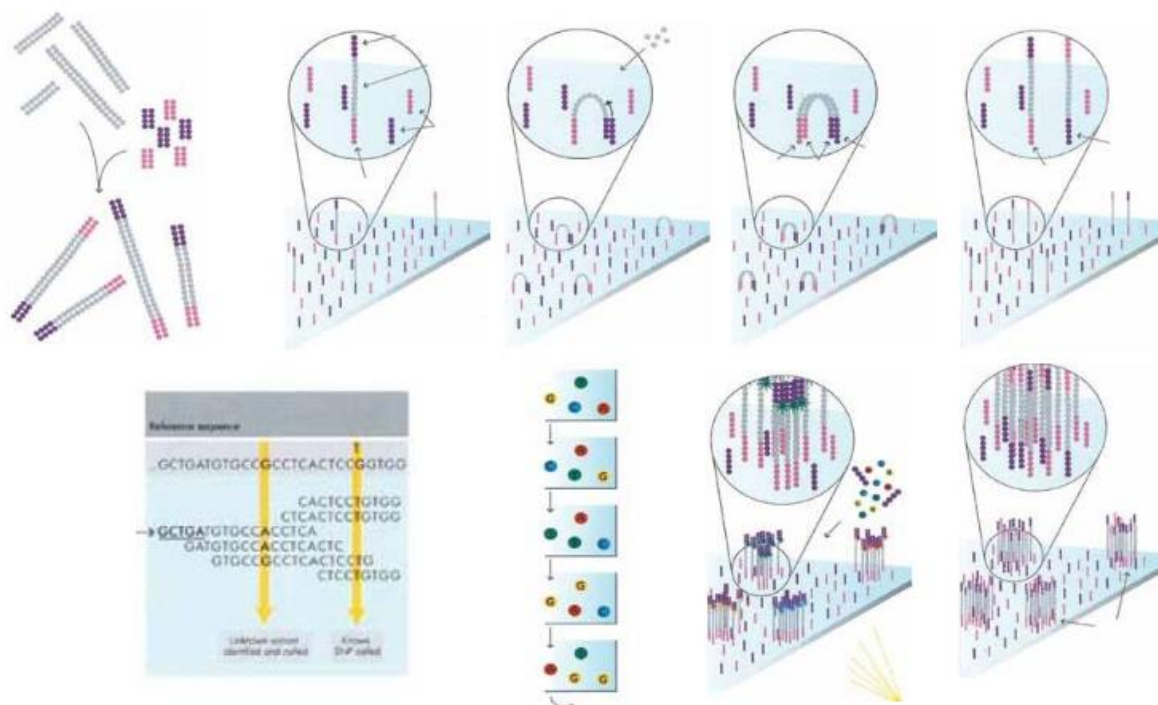


Figura 7- Representação do fluxo de trabalho da plataforma HiScan Illumina® em sequenciamento "Paired-ends", que envolve as etapas de preparação das bibliotecas, clusterização e sequenciamento. Fonte: <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/library-prep-methods.html>

O tipo de sequenciamento realizado foi o “*Paired-end*”, que é o mais indicado quando se busca transcritos raros. Durante o sequenciamento foram lidos 100 pares de bases (reads ou transcritos) de um lado da fita e 100 pares de bases do lado contrário da fita, o que dá maior confiabilidade ao processo de sequenciamento.

O sequenciamento que foi realizado primeiramente na plataforma HiScan (Illumina®), utilizando o *TruSeq Rapid SBS Kit* (Illumina®), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, na Facility do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-UNESP. Para 6 das 24 amostras foi necessário um segundo sequenciamento, o qual foi realizado no sequenciador HiScan (Illumina), na Facility da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)-USP.

3.8 Banco de dados de sequenciamento de Citrus: CitSeqDB

Foi criado um banco de dados de sequências expressas de *Citrus spp.* para ser usado como banco de referência para as análises de expressão gênica diferencial, denominado CitSeqDB. Este banco de referência foi baseado em sequências presentes em seis bancos de dados públicos independentes disponíveis: AFFYM (FU et al., 2012), NCBI (MARTINELLI et al., 2012), UNIGENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>), USDA (<http://citrus.pw.usda.gov/>), CITRUSGDB (<http://www.citrusdb.org/>), e PHYTOZOME (GMITTER et al., 2012). Eles foram combinados em um único banco de dados e as redundâncias foram removidas pelo software CD-HIT (LI; GODZIK et al., 2006), considerando similaridade máxima de 90%.

3.9 Análises de expressão de genes

Para checar a qualidade e filtrar as sequências de alta qualidade, as bibliotecas de sequências cruas de *Citrus* foram analisadas para a retirada de sequências de baixa qualidade e contaminadas com muitos tipos de artefatos como iniciadores, amplicons, e sequências menores que 25 pb. O software NGS QC Toolkit (PATEL; JAIN, 2012) foi usado para esta etapa.

Para cada biblioteca sequenciada, sequências de alta qualidade foram mapeadas no banco CitSeqDB usando o software Bowtie2 (LANGMEAD et al., 2012), que permite apenas uma incompatibilidade de 22 pb. As bibliotecas mapeadas foram analisadas pelo software *t* (<http://tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/do:regular>) para extrair o número absoluto de sequências alinhadas para cada transcrito. Calculou-se os valores normalizados individuais dos transcritos, considerando uma abordagem de leitura de contagem aproximada, seguindo uma distribuição binomial negativa sobre a expressão gênica. A correção da taxa de falso positivo foi aplicada sobre a significância estatística encontrada nas amostras usando aproximação FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Essas análises foram realizadas usando o programa DESeq, do pacote Bioconductor R (ANDERS; HUBER, 2010). Os transcritos foram considerados diferencialmente expressos quando a significância estatística do p-value fosse menor que 0.05.

Foram considerados diferencialmente expressos, transcritos que apresentaram valor de fold change maior ou igual a 2. O único grupo de transcritos em que o valor de fold change não foi considerado foi os fatores de transcrição, para os quais foi considerado apenas o p-value.

A categorização funcional dos transcritos foi feita através do programa Blast2 GO. Para correlacionar genes considerados diferencialmente expressos, foram feitos diagramas de Venn.

3.10 Análise de agrupamento de amostras

A análise de agrupamento fez uso da contagem total de sequências a partir da análise de expressão gênica. Esta matriz é utilizada para calcular distâncias Euclidianas das amostras aos pares. Usando o método de ligação simples, amostras foram agrupadas baseadas em distâncias curtas. Matrizes de distância também podem ser usadas para criar *heatmap* com cores representando a similaridade da expressão global das amostras aos pares, variando do verde (alta variabilidade) ao vermelho (baixa ou ausência de variação).

IV - RESULTADOS

4.1 Qualidade das amostras e Bibliotecas de cDNA

Apesar de várias tentativas, com diferentes kits comerciais, não foi possível obter RNA bacteriano íntegro e de boa qualidade para que pudesse ser utilizado na construção de bibliotecas de cDNA e posterior sequenciamento. Assim, o sequenciamento do transcriptoma da bactéria *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* tipo C (XauC), em condições infectantes, não pode ser realizado, ficando para ser realizado futuramente.

Em relação às plantas hospedeiras inoculadas com XauC, lima ácida ‘Galego’ e laranja doce ‘Hamlin’, foi possível obter preparações de RNA de boa qualidade, com número de integridade do RNA (RIN) igual ou maior que 7, 5 (Figura 9), o que permitiu a análise do transcriptoma por RNA-seq.

Foram realizadas muitas extrações, na tentativa de extração do RNA bacteriano íntegro, porém não foi possível uma boa qualidade para que o mesmo fosse utilizado para prosseguimento dos trabalhos. Portanto, o sequenciamento do mRNA da bactéria *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* foi adiado para experimentos futuros, bem como sua melhor extração e processamento.

Portanto, essa parte foi deixada em espera e deu-se sequência aos experimentos com as extrações de RNA de tecido vegetal.

Para a parte da planta, os RNA's de boa qualidade foram obtidos por extração e foram aceitos índices de qualidade (RIN) igual ou maior que 7, 5 (Figura 9). Totalizaram-se 24 (sendo 3 amostras inoculadas e 3 amostras controle experimental, para cada tempo e espécie cítrica) amostras que foram transformadas em bibliotecas de cDNA para o sequenciamento e dispostas nas 7 lanes da lâmina de sequenciamento (Tabela 1).

Tabela 1- Esquema de disposição das amostras nas lanes da lamina utilizada para o sequenciamento, contendo seus respectivos tamanhos de fragmentos gerados na montagem da biblioteca antes do sequenciamento.

Lane	Amostra	Tamanho (pb)
1	7	250
1	8	200
1	9	260
2	10	230
2	11	300
2	12	300
3	19	200
3	20	300
3	21	300
4	22	240
4	23	300
4	24	300
5	1	300
5	2	300
5	3	260
5	4	300
6	5	300
6	6	300
6	13	300
6	14	260
7	15	300
7	16	260
7	17	300
7	18	300

As 24 bibliotecas produzidas a partir dos RNA extraídos (Tabela 2) foram sequenciadas na plataforma HiScan (Illumina®). Durante o sequenciamento, por motivos desconhecidos, a *lane 7* da *flow cell* parou de ser lida, não sendo então possível a captura dos sinais luminosos e a identificação, pelo sequenciador, dos nucleotídeos incorporados. Os dados dessa *lane* foram equivalentes a “0”, para as 4 amostras (15, 16, 17, 18) que se encontravam na mesma (Figura 2). Como correspondiam a amostra de controles, este fato impossibilitava a normalização dos dados como um todo. Por esse motivo, as amostras dessa *lane*, e mais três amostras (6,14,23) que ficaram abaixo de 20 milhões de *reads*, foram resequenciadas na plataforma HiSeq (Illumina®). No segundo sequenciamento, obteve-se dados com a qualidade e quantidade necessárias para as análises dos

transcriptomas (Tabela 2), que permitiu a normalização e o confronto dos transcritos de cada biblioteca com aqueles presentes no banco CitSeqDB de dados de sequências expressas de *Citrus spp.*

Tabela 2: Relação das bibliotecas sequenciadas em sequenciador HiScan (Illumina®), com a quantidade de *reads* obtidos para cada biblioteca, mostrando 4 que foram “zeradas” e mais 3 que ficaram abaixo de 20 milhões de *reads*.

Amostras	Nome	Reads
1	CNLG5-1-1	21.294.563
2	CNLG5-2-1	20.976.622
3	CNLG5-3-1	32.945.377
4	H5CNF-5-1	34.731.325
5	CNHM5-2-1	28.633.508
6	CNHM5-3-1	17.864.207
7	LG5XF-1-1	31.417.388
8	LG5-3-1	27.546.342
9	LG5-2-1	44.674.497
10	HM5-1-1	54.375.086
11	HM5-3-1	52.369.404
12	HM5-7-1	23.113.850
13	CNLG7-3-1	72.243.070
14	CNLG7-8-1	16.875.478
15	CNLG7-4-1	0
16	CNHM7-4-1	0
17	CNHM7-5-1	0
18	CNHM7-6-1	0
19	LG7XF-1-1	43.222.340
20	LG7XF-2-1	65.524.010
21	LG7-6-1	21.279.579
22	H7XF-2-1	76.498.232
23	HM7-4-1	18.048.579
24	HM7-6-1	39.554.963

4.2 Análise da expressão gênica e genes diferencialmente expressos (GDE)

Para que os genes (transcritos) fossem considerados diferencialmente expressos (DE), levou-se em consideração tanto parâmetros estatísticos (valores de *p-value*) como valores de *fold change*. Assim, foram considerados induzidos os genes que apresentaram *p-value* $\leq 0,05$ e *fold change* ≥ 2 , e foram considerados reprimidos os genes que apresentaram *p-value* $\leq 0,5$ e *fold change* $\leq -0,5$, em comparação com a expressão dos mesmos nos controles.

Aos 5 dias após a inoculação (dai), lima ácida ‘Galego’ apresentou 59 genes diferencialmente expressos (GDEs), entre induzidos e reprimidos, e laranja ‘Hamlin’ apresentou 2851 GDEs (Figura 8), dos quais 39 são comuns às duas espécies (Figura 10). Aos 7 dai, lima ácida ‘Galego’ apresentou 1350 GDEs, enquanto que laranja “Hamlin” apresentou 1367 GDEs, dos quais 176 são comuns às duas espécies (Figura 9).

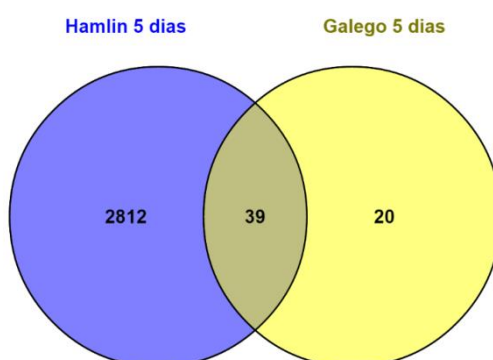


Figura 8- Diagrama de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos (GDEs) em lima ácida ‘Galego’ e em laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai. O número de GDEs exclusivos de cada espécie e o número de GDEs que são comuns podem ser visualizados.

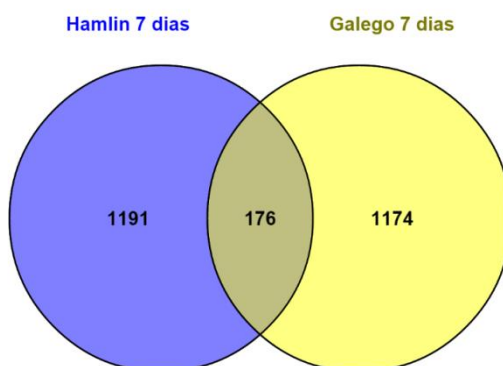


Figura 9- Diagrama de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos (GDEs) em lima ácida ‘Galego’ e em laranja ‘Hamlin’ aos 7 dai. O número de GDEs exclusivos de cada espécie e o número de GDEs que são comuns podem ser visualizados.

Quando se analisa conjuntamente os GDEs (induzidos ou reprimidos) nas duas espécies, nos tempos de 5 e 7 dai, verificou-se que há GDEs em comum, exceto entre lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai e laranja ‘Hamlin’ aos 7 dai e entre lima ácida ‘Galego’ aos 5 e 7 dai e laranja ‘Hamlin’ aos 7 dai (Figura 10).

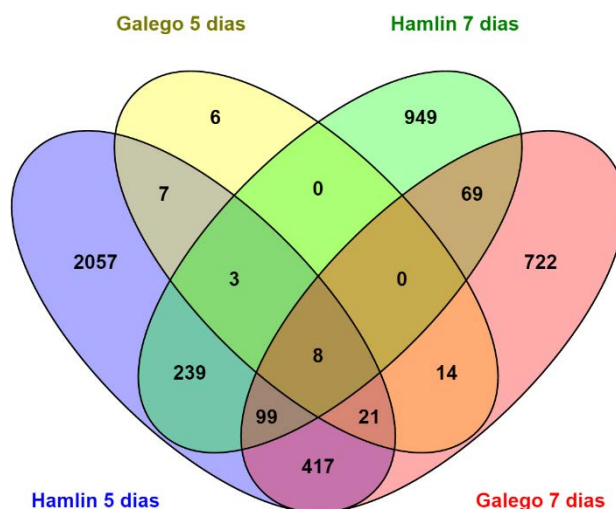


Figura 10- Diagrama de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos (GDEs) em lima ácida ‘Galego’ e em laranja ‘Hamlin’ aos 7 dai. O número de GDEs que são comuns podem ser visualizados.

Ao analisar apenas os genes cuja expressão foi induzida nas duas espécies, nos tempos de 5 e 7 dai, observou-se que para laranja ‘Hamlin’ apenas 33 genes são comuns para os dias 5 e 7, enquanto que lima ácida ‘Galego’ apresentou 27 genes em comum para estes dois dias (Figura 11). Entre os genes induzidos, apenas 5 foram comuns a todos os tempos nas duas espécies, todos com valores de $\log^2$ de *fold change* acima de 3 (Figura 11).

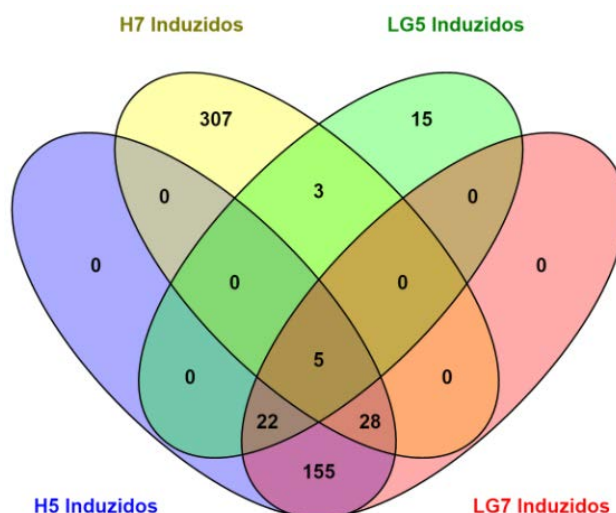


Figura 11- Diagrama de Venn mostrando o número de genes induzidos aos 5 e 7 dai em lima ácida 'Galego' e em laranja 'Hamlin'. O número de GDEs que são comuns podem ser visualizados. H5: laranja 'Hamlin' aos 5 dai; H7: laranja 'Hamlin' aos 7 dai; LG5: lima ácida 'Galego' aos 5 dai; LG7: lima ácida 'Galego' aos 7 dai.

Para os genes que se mostraram reprimidos, não foi identificado nenhum gene comum a todos os tempos nas duas espécies (Figura 12). Apenas 3 genes foram reprimidos em lima ácida 'Galego' tanto aos 5 como aos 7 dai, enquanto que em laranja 'Hamlin' foram 79 (Figura 12). Enquanto em relação aos genes induzidos (Figura 11), há bem genes reprimidos comuns a alguma espécie e/ou tempo (Figura 12).

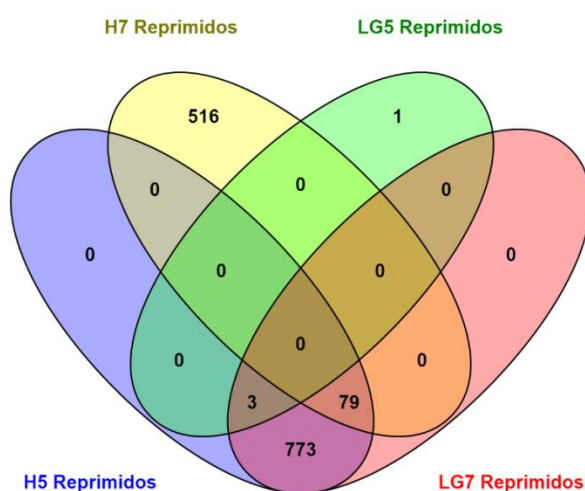


Figura 12- Diagrama de Venn mostrando o número de genes reprimidos aos 5 e 7 dai em lima ácida 'Galego' e em laranja 'Hamlin'. O número de GDEs que são comuns podem ser visualizados. H5: laranja 'Hamlin' aos 5 dai; H7: laranja 'Hamlin' aos 7 dai; LG5: lima ácida 'Galego' aos 5 dai; LG7: lima ácida 'Galego' aos 7 dai.

Muitos dos transcritos que aparecem em todos os tempos, ou que são comuns às duas espécies, fazem parte de processos biológicos vitais à manutenção da célula, tais como fosforilação oxidativa, ciclo de Krebs, fotossíntese e metabolismo de carboidratos, entre outros.

4.3 Processos biológicos associados à via de metabolismo primário e secundário

A categorização funcional dos GDEs pelo programa Blast2GO permitiu verificar a que processos biológicos os mesmos estavam associados. Processos biológicos responsáveis pela manutenção das células, pelo metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e diversos outros, são responsáveis pelo bom funcionamento das células como um todo, estejam elas saudáveis ou infectadas com patógenos. Em casos de infecção por patógenos, o aporte energético é usado para barrar o avanço da infecção, mantendo a planta saudável como um todo.

Observou-se que, por mais que alguns processos sejam comuns e essenciais ao bom funcionamento da célula, eles podem apresentar grande variação de uma espécie para outra. Em laranja 'Hamlin' aos 5 dai foram identificados 613 transcritos GDE's como participantes de processos biológicos (Tabela 3S) e aos 7 dai, foram identificados 262 GDE's envolvidos em processos biológicos diversos como processos catabólicos, parede celular, processos biossintéticos, componente celular, atividade transmembrana e resposta a estresse (Tabela 4S). Destes, 68 transcritos foram expressos em ambos os tempos analisados. Para lima ácida 'Galego' aos 5 dai foram identificados 13 transcritos (Tabela 5s) e, aos 7 dai, 324 transcritos envolvidos em processos biológicos diversos (Tabela 6S). Destes, 10 transcritos foram expressos nos dois tempos.

Os valores de expressão dos genes (transcritos) como um todo foram altos e o gene com maior expressão para processos biológicos aos 5 dai para laranja 'Hamlin' foi identificado como hyoscyamine 6-dioxygenase-like, com valor de expressão de 9,3 (Tabela 3S). Este foi categorizado com atividade de oxidoreductase, participando de processos de oxidação e redução (Figura 13).

Identificou-se também, 21 transcritos participantes da via de biossíntese de fenilpropanóide, entre eles a fenilalanina amônia liase (PAL) (Tabela 3S). Esse é um gene pertencente à via fenilpropanóide e responsável pela resposta a estres e processos oxidativos (Figura 13).

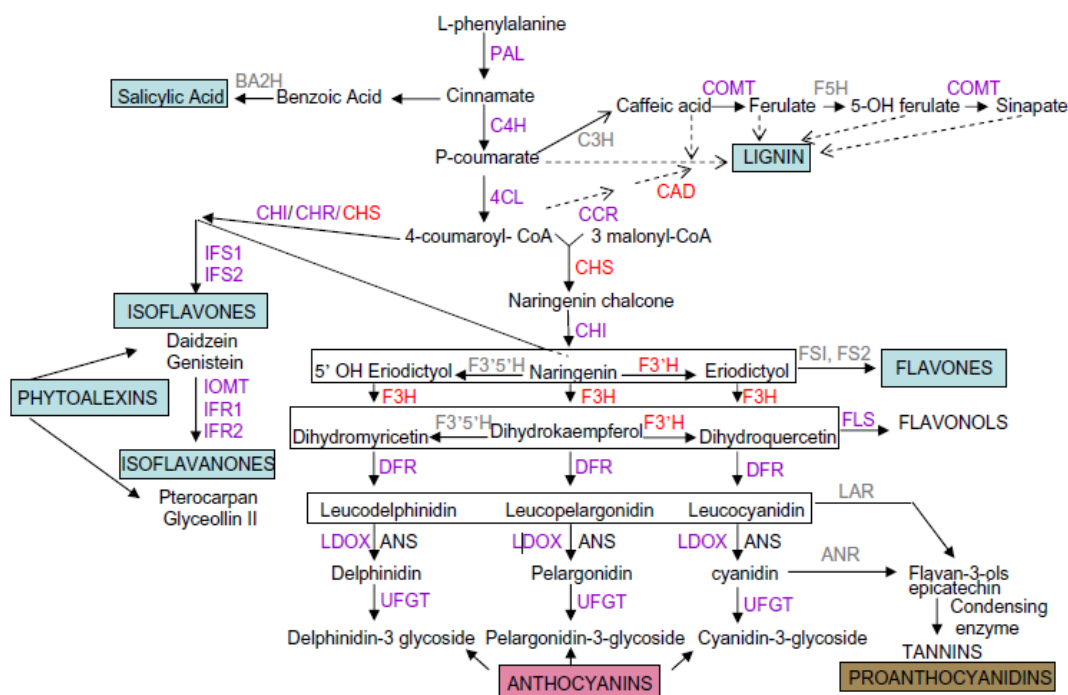


Figura 13- Via de biossíntese de fenilpropanóide destacando a participação das enzimas PAL (Fenilalanina amônia liase), (C4H) ácido cinâmico 4 hidroxilase e (4CL) 4-ácido cumárico CoA ligase, enzimas chave na via de biossíntese de fenilpropanóide, a principal via responsável pela ativação de compostos fenólicos participantes na defesa de plantas de laranja ‘Hamlin’ contra patógenos (Zabal et al., 2006).

4.4 Cada compartimento celular é recrutado para defesa

Algumas vezes, elevados níveis de açúcar e amido presentes em espaços apoplásticos, funcionam como sinalizadores, facilitando a formação de metabólitos secundários de defesa, para que a célula possa responder mais rapidamente ao ataque de patógenos (MOGHADDAN; VAN DEN ENDE, 2012; FU; LIU, 2013).

Levando-se em consideração vias essenciais, podemos destacar a via de degradação de tolueno com a enzima 3-hydroxyacyl-CoA desidrogenase, mais expressa em laranja ‘Hamlin’, presente na via de degradação de benzoato, com a enzima enoyl-CoA hidratase expressa e interferindo diretamente na formação do

acetil-CoA, podendo alterar o funcionamento da via, aumentando a quantidade de acetil CoA a entrar no ciclo do ácido cítrico, que terá mais substrato para trabalhar.

No ciclo do ácido cítrico a energia se faz necessária para que a resposta seja efetiva. A enzima citrato sintase, responsável pela formação de cis-aconitato e por ação (reversível) da mesma enzima, formará o isocitrato, aparece com expressão levemente alterada (Figura 14).

Dentro do ciclo, a enzima succinil-CoA sintetase teve a expressão induzida, provocando assim maior fluxo de substratos decorrentes do ciclo, necessários para que continuem os processos de fosforilação oxidativa (Figura 15).

Ainda para laranja 'Hamlin' aos 5 dai foram identificados 4 genes envolvidos na fosforilação oxidativa, sendo que a difosfatase ou pirofosfatase inorgânica, encontra-se reprimida (Tabela 3S). Esta enzima é responsável pela hidrólise do pirofosfato (PPi), que é formado principalmente como produto das muitas reações biossintéticas que utilizam ATP (Figura 15).

Outro gene identificado é participante do complexo I da fosforilação oxidativa, como 3 enzimas, uma redutase com translocação de H⁺, uma desidrogenase quinona e uma desidrogenase (Tabela 3S, Figuras 14 e 15) Em se tratando da laranja 'Hamlin', resistente à cancrose, a reação de hipersensibilidade é forte, fazendo com que haja morte celular em toda a parte do limbo foliar que foi infiltrada com a suspensão bacteriana, causando prejuízo na taxa fotossintética das folhas afetadas.

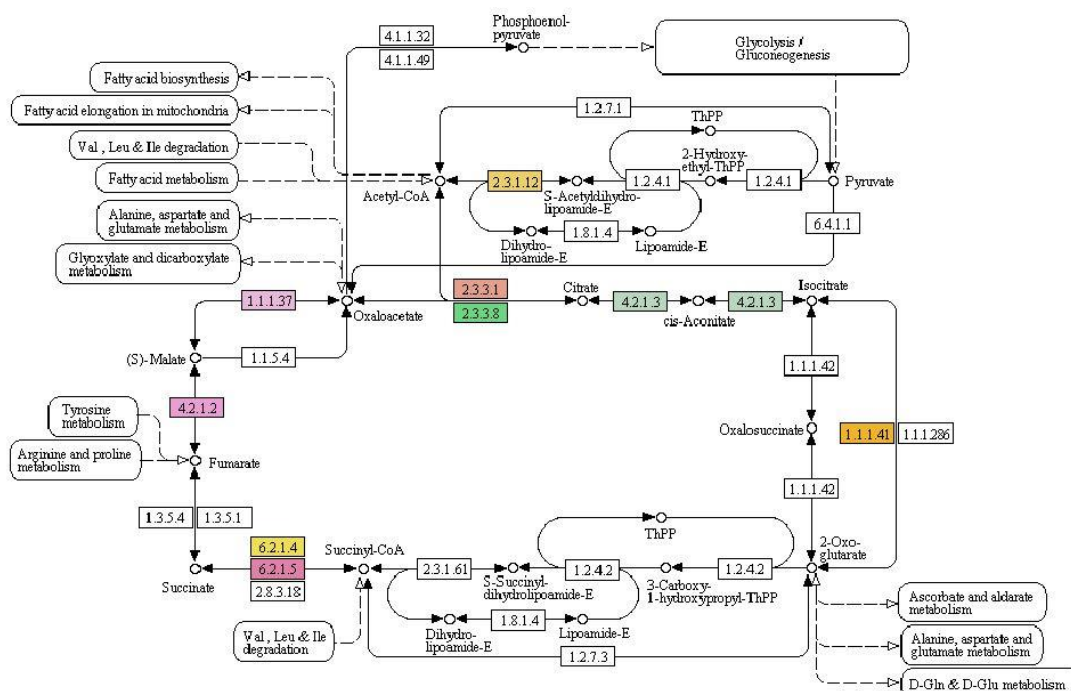


Figura 14- Esquema demonstrativo dos transcritos afetados no Ciclo do ácido cítrico, gerado automaticamente pelo software Blast2GO. Com a superexpressão de citrato sintase e na enzima succinyl liqase (succinil-CoA sintetase).

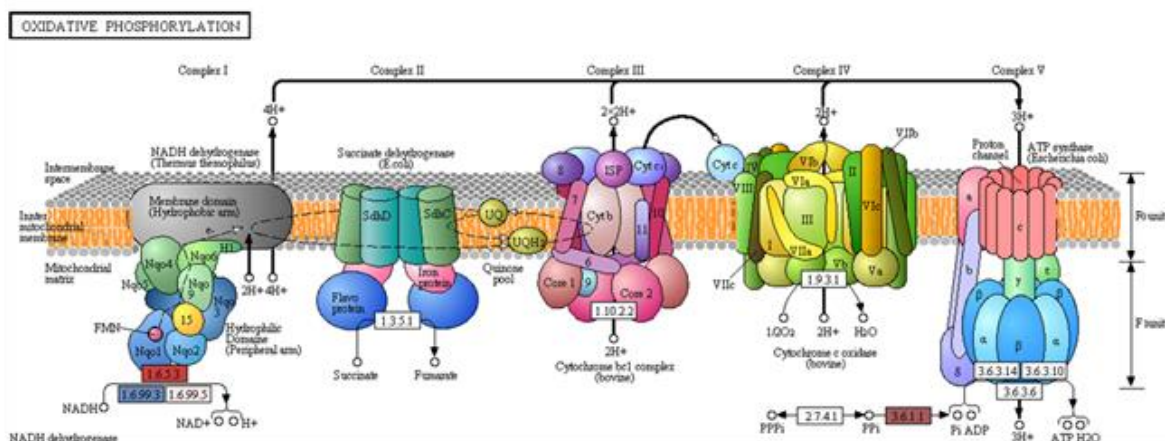


Figura 15- Esquema demonstrativo dos transcritos afetados na fosforilação oxidativa, gerado automaticamente pelo software Blast2GO.

Em lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai, foram identificados 13 transcritos ligados a processos biológicos diversos como processos catabólicos, transporte, parede celular e destes, 10 transcritos foram significativamente mais expressos (Tabela 5S).

4.5 Resposta de defesa inata

Assim que a planta percebe a entrada de algo estranho à célula vegetal, como resposta ao estresse, é disparada uma série de compostos para barrar o patógeno (FRITIG; HEITZ; LEGRAND, 1998).

Para identifica, a nível de RNA, as respostas de cada genótipo de citros quando inoculado com a bactéria XauC, foram analisados os genes diferencialmente expressos das duas espécies, comparados com seus respectivos controles.

O sistema de defesa inata das plantas realiza detecção específica através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Essa resposta de resistência é conhecida como imunidade desencadeada por PAMP (PTI - *PAMP-triggered immunity*). Alguns patógenos secretam proteínas efetoras que desregulam PTI. Para que haja o contra-ataque por parte da planta, proteínas de resistência da planta (Poteínas R) reconhecem os efetores secretados pelo patógeno e ativam imunidade desencadeada por efetores (ETI-*Effector-triggered immunity*) (DODDS; RATHJEN, 2010; BIGEARD et al., 2015).

Grande parte dos GED's identificados em 'Hamlin' são oxidases, transferases, monoxigenases, oxidoredutases e peroxidases responsáveis pela ativação de resposta, através dos receptores de sinalização do tipo NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*). Entre induzidos e reprimidos, eles estão representados por 32 genes, identificados em 'Hamlin' aos 5 dai (Tabela 3S) e aos 7 dai 16 transcritos (Tabela 4S). Em lima ácida 'Galego' aos 5 dai foram identificados 4 transcritos (Tabela 5S) e aos 7 dai, 35 transcritos (Tabela 6S).

Os NB-LRR são proteínas polimórficas responsivas à efetores de virulência, também chamadas de proteínas de avirulência (Avr). Funcionam como receptores de sinal para a ativação de síntese de homônios como óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, ácido jasmônico, ácido benzóico e etileno (DE YOUNG; INNES, 2006; MCHALE et al., 2006; LEE; YEOM, 2015).

Juntamente com os receptores transmembrana, encontram-se as proteínas de reconhecimento de patógenos com domínio LRR. Tais proteínas subdividem-se em dois tipos, RLP (*Receptor Like Protein*), que são receptores compostos por um domínio extracelular, um transmembrana e uma curta região citoplásmica associada a um domínio quinase (WANG et al., 2008; YANG et al., 2012) e RLK (*Receptor Like*

Kinase) que possuem um domínio quinase citoplásmico em suas extremidades e são utilizados para sinalização celular (TOR; LOTZE; HOLTON, 2009; ANTOLÍN-LLOVERA et al., 2012; YANG et al., 2012). Receptores RLK são responsáveis pela percepção de estímulos externos e internos. São receptores tipo proteína kinases, que recebem o sinal e repassam até a ativação de expressão no gene de destino (BURDIAK et al., 2015).

Em laranja 'Hamlin', genótipo resistente a XauC, aos 5 dai identificou-se 31 transcritos do tipo RLP (Tabela 3S) e 2 transcritos do tipo RLK e aos 7 dai foram identificados 19 transcritos do tipo RLP e 2 do tipo RLK (Tabela 4S). Dos transcritos do tipo RLP identificados aos 5 e 7 dai, 7 se repetem nos dois tempos. Os dois transcritos do tipo RLK identificados aos 5 e 7 dai são os mesmos transcritos, com valores de expressão bem próximos.

Aos 5 dai, Identificou-se para laranja 'Hamlin' um transcrito que codifica para a proteína LRR *receptor-like serine threonine-protein kinase fls2* (Tabela 3S) e 3 transcritos para lima ácida 'Galego' aos 7 dai (Tabela 6S). Tal proteína é responsável pelo reconhecimento de flagelina, presente em bactérias (WALTERS, 2015; WYRSCH et al., 2015), desencadeando resposta inata do tipo PAMPs e MAMPs, causando PTI. Também reconhecem efetores inseridos pelo patógeno no interior da célula. Ativam os efetores do tipo EF-Tu (SCHOONBEEK et al., 2015), que são fatores de alongação, com 4 genes identificados em laranja 'Hamlin' aos 5 dai (Tabela 3S) e aos 7 dai, foram identificados 19 (Tabela 4S). Em lima ácida 'Galego' aos 5 dai, não foi identificado nenhum transcrito e, aos 7 dai, apenas 1 transcrito foi identificado (Tabela 6S).

Referente ao domínio serina treonina proteína kinase, para a espécie lima ácida 'Galego' aos 5 dai foram identificados 2 transcritos (Tabela 5S). Aos 7 dai foram identificados 35 transcritos para esse domínio (Tabela 6S). Já para a espécie laranja 'Hamlin', aos 5 dai foram identificados 57 transcritos (Tabela 3S) e aos 7 dai, 16 transcritos (Tabela 4S).

Foram identificados também receptores do tipo *cysteine-rich receptor-like protein kinase*. Para laranja 'Hamlin' aos 5 dai, foram identificados 16 transcritos (Tabela 3S) e aos 7 dai, foram identificados 9 transcritos (Tabela 4S).

Em lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai, foi identificado apenas um transcrito *cysteine-rich receptor-like protein kinase 10-like isoform x1* (CRK10) (Tabela 5S) e aos 7 dai foram identificados 7 transcritos (Tabela 6S). Para laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai, foram identificados 16 transcritos (Tabela 3S) e aos 7 dai, foram identificados 9 transcritos (Tabela 4S).

Todos esses citados anteriormente, correspondem a proteínas PRR. Tais proteínas sinalizam para os receptores do tipo NB-LRR (Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat). Esses tipos de receptores desempenham papel fundamental na planta, sendo responsáveis por fazer o reconhecimento dos efetores no citoplasma e sinalizar para que a cascata de sinalização hormonal se inicie.

No total, aos 5 dai em laranja ‘Hamlin’ foram encontrados 32 transcritos do tipo NB-LRR (Tabela 3S) e aos 7 dai foram 16 (Tabela 4S). Em lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai foram identificados 3 transcritos (Tabela 5S) e aos 7 dai foram identificados 35 transcritos (Tabela 6S).

4.6 Sinalização hormonal

Em relação a proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK’s), foram identificados 2 transcritos em laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai (Tabela 3S) e também aos 7 dai, 2 transcritos foram identificados (Tabela 4S). Para lima ácida ‘Galego’ não foi identificado nenhum transcrito referente à MAPK’s.

Esses eventos de sinalização e reconhecimento são chamados SAR (*Systemic Acquired Resistance*) (VAN VERK; BOL; LINTHORST, 2011). Foram identificados transcritos relativos a proteínas F-box (FBPs), que tem função de sinalização rápida e ativação de fatores de transcrição (KIPREOS; PAGANO, 2000; Navarro-Quezada et al., 2013). Para proteínas F-box, foram identificados em laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai, 21 transcritos (Tabela 3S) e, aos 7 dai, 8 transcritos (Tabela 4S). Já para lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai não foi identificado nenhum transcrito (Tabela 5S) e aos 7 dai foram identificados 17 transcritos relacionados a F-box (Tabela 6S). Nota-se maior quantidade de transcritos ligados à sinalização para laranja ‘Hamlin’ do que em lima ácida ‘Galego’, o que pode estar relacionado ao fato da laranja

‘Hamlin’ ser resistente ao patógeno. A maior quantidade de proteínas F-box influencia diretamente na ativação de fitormônios e fatores de transcrição.

Grande parte dos fitormônios é ativada durante a infecção de patógenos e dependem de sinalização, seja por estímulo biótico ou abiótico. Para ativação de SAR, é necessário que ácido salicílico (SA) esteja presente e se acumule nas regiões de danos da célula, no caso de interferência biótica (LOAKE; GRANT, 2007; KUMAR, 2014).

Em laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai, foi identificado um transcrito para a enzima corismato mutase (Tabela 3S) e, para lima ácida ‘Galego’ 7 dai, também foi identificado apenas um transcrito (Tabela 6S). O ácido acetil salicílico (SA) também pode ser sintetizado pela via da fenilalanina através da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), fazendo parte dos compostos fenólicos responsáveis por ativar SAR (Kumar, 2014). Em relação à laranja ‘Hamlin’, foram identificados 3 transcritos de PAL (Tabela 3S e 4S) e, para lima ácida ‘Galego’, apenas um transcrito de PAL foi identificado (Tabela 6S).

Também foram identificados transcritos referentes à síntese de etileno, fazendo parte da via da metionina ou ciclo de Yang (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; BURSTENBINDER; SAUTER, 2011). Para a laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai, foram identificados 4 transcritos para 1-aminocyclopropano (ACC) (Tabela 3S) e, aos 7 dai apenas 1 transcrito foi identificado (Tabela 4S). Para lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai não foi identificado nenhum transcrito e, aos 7 dai, 3 transcritos foram identificados para 1-aminocyclopropano, que é intermediário da reação com S-adenosilmetionina na biossíntese do gás etileno (BURSTENBINDER; SAUTER, 2011; MAO et al., 2015).

Em laranja ‘Hamlin’, aos 5 dai, foram identificados 7 transcritos relacionados à biossíntese de etileno (Tabela 3S) e, aos 7 dai, nenhum transcrito foi identificado. Para lima ácida ‘Galego,’ aos 5 dai não foram identificados nenhum transcrito e, aos 7 dai, 3 transcritos foram identificados (Tabela 6S). Esses dados sugerem que a produção de etileno na espécie resistente, em resposta à infecção pelo patógeno, é disparada de forma rápida e intensa, enquanto na suscetível ela ocorre tardiamente e com menor intensidade.

Quando o etileno está presente nos tecidos, ativa fatores de transcrição responsivos à sua presença. É um sinalizador juntamente com os demais hormônios (ácido jasmônico, auxinas, citocinas) (MAO et al., 2015). Foram identificados 16 transcritos que correspondem a fatores de transcrição (Tabela 3S) responsivos a etileno em laranja 'Hamlin' aos 5 dai e 4 aos 7 dai (Tabela 4S). Em lima ácida 'Galego' foram identificados transcritos apenas aos 7 dai, sendo 10 responsivos ao etileno (Tabela 6S).

Os fatores de transcrição são muito importantes no processo de interação patógeno-hospedeiro, pois são responsáveis pela ativação de genes de proteínas R (PR), fitoalexinas e defensinas.

4.7 Proteínas relacionadas à patogênese (PR)

As proteínas relacionadas à patogênese (*Pathogenesis-related (PR) proteins*) são produzidas sempre que as plantas detectam algo errado, seja por estresse causado por ataque de patógeno, ferimentos, compostos químicos (incluindo fitormônios e metais pesados), poluição do ar, raios ultravioleta e condições limitantes de crescimento (BOWLES, 1990). As proteínas PR são identificadas principalmente na resposta do tipo SAR, onde a detecção do patógeno se dá mais rapidamente, contendo a infecção (SZATMÁRI et al., 2014;).

Na literatura são descritos 17 tipos de proteínas PR, classificadas quanto à similaridade de sequências, sorologia e propriedades enzimáticas (VAN LOON et al., 1994). Na tabela 7 encontra-se a classificação das proteínas PR, que são de vários tipos e cuja expressão é desencadeada por diversos acontecimentos no hospedeiro.

Tabela 7: Classes de proteínas relacionadas a patogenicidade (PRs).

Família	Membro tipo	Propriedades
PR-1	tobacco PR-1 ^a	antifungal?, 14-17kD
PR-2	tobacco PR-2	class I, II, and III
PR-3	tobacco P, Q	class I, II, IV, V, VI, and VII about 30Kd
PR-4	tobacco R	antifungal, <i>win</i> -like proteins, endochitinase activity, 13, 19Kd
PR-5	tobacco S	antifungal, , osmotins, zeamatin, permatins, similar to alpha-amylase/trypsin inhibitors

PR-6	tomato inhibitor I	protease inhibitors, 6-13Kd
PR-7	tomato P69	Endoproteases
PR-8	cucumber chitinase	class III chitinases, chitinase/lysozyme
PR-9	lignin-forming peroxidase	peroxidases, peroxidase-like proteins
PR-10	parsley PR-1	ribonucleases, Bet v 1-related proteins
PR-11	tobacco class V chitinase	endochitinase activity
PR-12	radish Ps-AFP3	plant defensins
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Thionins
PR-14	barley LTP4	nonspecific lipid transfer proteins (ns-LTPs)
PR-15	barley OxOa (germin)	oxalate oxidase
PR-16	barley OxOLP	oxalate-oxidase-like proteins
PR-17	tobacco PRp27	Unknown

Fonte: <http://dmd.nih.gov/latex/defense-e.html>

As quitinases, endo quitinases, taumatinas são proteínas PR e são ativadas principalmente nas interações planta-fungo, no caso em tabaco e por bactérias que possuem o sistema de secreção tipo três (T3SS) (MAHER et al., 1994; SZATMÁRI et al., 2014), como é o caso de XauC que, ao adentrar a célula vegetal através de aberturas naturais, injeta efetores que, serão ou não detectados pela planta, dependendo dela ser resistente ou não. Assim, as proteínas PR são proteínas importantes para defesa das plantas, e sua quantidade irá variar sempre de acordo com o genótipo, como é o caso do presente estudo, onde usou-se uma espécie resistente e uma susceptível. Para laranja ‘Hamlin’, foram identificados aos 5 dai, 32 transcritos de proteínas PR (Tabela 3S). Aos 7 dai, foram identificados 14 transcritos com essa função (Tabela 4S). Em lima ácida ‘Galego’, aos 5 dai, foram identificados 6 transcritos identificados aos 5 dai (Tabela 5S) e aos 7 dai, identificou-se 27 transcritos (Tabela 6S). Assim, em um primeiro momento pode-se observar que a resposta em laranja ‘Hamlin’ é mais eficaz e mais rápida do em lima ácida ‘Galego’, o que explicaria a grande quantidade de transcritos aos 5 dai, alguns induzidos e outros reprimidos. Já aos 7 dai, essa quantidade cai devido a resposta que já foi lançada, não sendo mais necessário grandes quantidades. Em lima ácida ‘Galego’, ocorre o contrário. Aos 5 dai, poucos transcritos foram identificados e todos induzidos e, aos 7 dai, uma quantidade bem maior de transcritos foi identificada, sendo que a quantidade de transcritos induzidos e reprimidos flutua bastante.

Os dois transcritos mais expressos foram identificados como *Thaumatin-like protein 1^a* (Pathogenesis-related protein 5a) (Tabela 6S). As taumatinas fazem parte

do grupo das proteínas PR e são induzidas por várias condições ambientais e bióticas. Foram primeiramente descritas em tabaco como resposta ao estresse osmótico (SINGH et al., 1987) e em espaço apoplástico de folhas de centeio, na aclimação com atividade anti congelamento (ANTIKAINEN et al., 1996).

Os resultados indicam que, à semelhança do que se observou para os genes relacionados à síntese de ácido salicílico, uma das razões da laranja 'Hamlin' ser resistente a XauC pode estar relacionada ao fato de ativar a expressão as proteínas PR mais rapidamente do que a lima ácida "Galego" após a infecção com a bactéria.

4.8 Fatores de transcrição.

A regulação de muitos processos biológicos na célula, modulando o ciclo celular, metabólico e o balanço fisiológico é feita através da modulação da expressão gênica a nível de transcrição, em resposta a mudanças internas e externas (meio ambiente).

O desenvolvimento é baseado na capacidade celular de diferenciação da expressão de genes e frequentemente fatores de transcrição atuam como interruptores de cascatas regulatórias (SCOTT, 2000; RIECHMANN et al., 2000). Os fatores de transcrição são definidos como proteínas contendo um domínio de ligação ao DNA (DBD - DNA binding domain), que reconhece uma sequência de DNA específica, e que regulam o primeiro passo da expressão do gene. Além disso, algumas proteínas sem DBD podem interagir com uma proteína contendo domínio DBD para formar um complexo de transcrição. São classificados como fatores de transcrição (MITSUDA & OHME-TAKAGI, 2009). Os fatores de transcrição são possivelmente, a chave para vários processos existentes e ainda não bem estudados, dado a sua ação específica e pontual, muitas vezes sendo sequer detectado por técnicas sensíveis como o sequenciamento.

Aproximadamente metade dos fatores de transcrição existentes são considerados planta-específicos, pois não são encontrados em outros organismos eucarióticos (MITSUDA; OHME-TAKAGI, 2009). Essas famílias de fatores de transcrição incluem APETALA2 (AP2) responsivos a etileno com elemento de ligação ERF; NO APICAL MERISTEM (NAM), ATAF1/2, CUP-SHAPED

COTYLEDON 2 (CUC2 ou NAC); WRKY; ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)/VIVIPAROUS1 (VP1); auxin response factor (ARF) e SQUAMOSA promoter binding protein (SBP ou SPL). Muitos dos fatores de transcrição de família específicas de plantas são relacionados com genes de regulação do desenvolvimento de órgãos e sistemas de resposta para adaptações ambientais (YAMASAKI et al., 2013).

No presente trabalho, pôde-se verificar a identificação de algumas famílias de fatores de transcrição. Assim, em laranja 'Hamlin' aos 5 dai, foram identificadas 32 famílias de fatores de transcrição (Tabela 8S). Aos 7 dai, identificou-se 15 famílias (Tabela 9S). Em lima ácida 'Galego' aos 5 dai, identificou-se 3 famílias de fatores de transcrição (Tabela 10S) e aos 7 dai, 23 famílias de fatores de transcrição foram identificadas (Tabela 11S). Ao todo 37 famílias identificadas em todos os tempos. Essas famílias já foram amplamente estudadas em eucariotos e nem sempre exclusivamente de plantas. Algumas como MYB, possuem a nomenclatura em referência à primeira identificação em célula animal. Estes fatores de transcrição fazem parte, em sua maioria, de resposta a estímulos externos e da entrada de patógenos.

O etileno é um sinalizador para fatores de transcrição, juntamente com os demais hormônios vegetais (ácido jasmônico, auxinas, citocinas) (MAO et al., 2015). Em laranja 'Hamlin' foram identificados, aos 5 dai, 16 transcritos que correspondem a fatores de transcrição responsivos a etileno (Tabela 8S) e aos 7 dai, foram identificados 4 (Tabela 9S). Em lima ácida 'Galego' foram identificados transcritos de fatores de transcrição apenas aos 7 dai, sendo 10 responsivos aos etileno (Tabela 11S).

Existem pequenas sequências específicas que são capazes de regular a função de transcrição, garantindo mecanismos para assegurar padrões estáveis de ativação do gene e repressão (PTASHNE, 2011). Uma reação de transcrição será efetiva se todos os fatores requeridos (cis e trans) cooperarem para recrutar a maquinaria transcripcional da célula (LEVINE, 2010).

Os fatores de transcrição são muito importantes no processo de interação patógeno-hospedeiro, pois, são responsáveis pela ativação de genes de proteínas R (PR), fitoalexinas e defensinas.

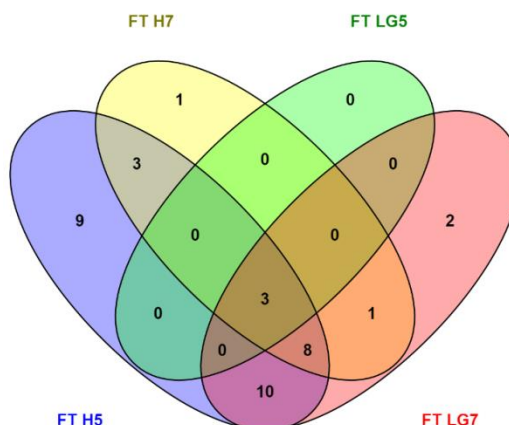


Figura 16- Fatores de transcrição identificados em todos os tempos, nas duas espécies de citros. FT: Fator de transcrição; H5: laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai; H7: laranja ‘Hamlin’ aos 7 dai; LG5: lima ácida ‘Galego’ aos 5 dai; LG7: lima ácida ‘Galego’ aos 7 dai.

Em laranja ‘Hamlin’ e em lima ácida ‘Galego’ foram identificadas várias famílias de fatores de transcrição diferencialmente expressos. Para os fatores de transcrição não foi considerado o *fold-change*, apenas o *p-value*. Assim, todos os transcritos relacionados a fatores de transcrição que apresentaram *p-value* $\geq 0,05$ foram considerados como relevantes para a resposta da planta ao patógeno.

Em laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai, foram identificados 140 transcritos (Tabela 8S) e aos 7 dai, foram identificados 27 transcritos para fatores de transcrição, sendo de famílias diversas (Tabela 9S). Destes, 3 transcritos se repetem nos dois tempos (Figura 16, Tabela 8S, 9S). Em lima ácida ‘Galego’ foram identificados aos 5 dai, 3 transcritos (Tabela 10S) e, aos 7 dai, 71 transcritos também de famílias diversas (Tabela 11S). Nenhum destes transcritos se repete tempos (Figura 16), sendo que 3 famílias de transcritos se repetem em todos os tempos, sendo elas MYB, WRKY e bHLH.

Essa diferença da quantidade de transcritos de uma espécie para outra, sugere que os mesmos estão envolvidos na interação planta-patógeno e no desenvolvimento da doença. Em laranja ‘Hamlin’, resistente a XauC, em ambos os tempos analisados os fatores de transcrição estão ativados em maior quantidade do que na lima ácida ‘Galego’, o que faz com que as respostas e expressão de PRs sejam mais eficientes em laranja, levando à contenção da infecção.

4.9 Transcritos sem função descrita

Algumas sequências apresentaram expressão 0 (zero) na amostra controle, enquanto na amostra experimental houve expressão das mesmas. . Tanto laranja ‘Hamlin’ como lima ácida ‘Galego’ apresentaram genes sem função descrita nos dois tempos analisados. Em laranja ‘Hamlin’, aos 5 dai, 8 transcritos tiveram expressão igual a 0 no controle, apresentando expressão apenas na amostra experimental. Aos 7 dai, 308 transcritos apresentaram expressão apenas no infectado. Em lima ácida ‘Galego’, aos 5 dai, um transcrito apresentou expressão apenas na amostra experimental e, aos 7 dai, nenhum transcrito teve expressão igual a zero.

Quando submetidas à categorização funcional pelo Blast2GO, estes transcritos não tiveram identidade com nenhuma das sequências dos bancos de dados públicos utilizados para a categorização funcional dos mesmos.

Em vários destes transcritos foi possível identificar domínios funcionais putativos, o que permite inferir sobre a possível função dos mesmos.

Destes, alguns chamam mais atenção pela presença de domínios importantes. É o caso do transcrito NONCS_RNA_7620, presente em laranja ‘Hamlin’ aos 5 dai. Este transcrito possui dois domínios identificados como LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase. A grande importância deste domínio se dá pela sua possível função, quando há a interação da planta com fatores externos que possam causar mudanças fisiológicas na planta como um todo.

V - DISCUSSÃO

A categorização funcional dos genes (transcritos) diferencialmente expressos (GDEs) em laranja “Hamlin” e lima ácida ‘Galego’ em resposta à infecção com *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii* tipo C (XauC), mostrou que os mesmos participam de processos biológicos tais como fotossíntese, resposta ao estresse, metabolismo de açúcares, metabolismo secundário e de respostas que são desencadeadas quando ocorre interferência provocada por fitobactérias patogênicas. Esses processos estão intimamente ligados à manutenção da célula e com os mecanismos de defesa que são ativados contra estímulos externos e

patógenos (CERNADAS et al., 2008; DODDS; RATHJEN, 2010; MARTINELLI et al., 2013; MACHO; ZIPFEL, 2014).

Em se tratando de duas espécies de citros, uma resistente e outra suscetível à XauC, optou-se por dar maior atenção às vias que interferem no metabolismo secundário, fotossíntese e resposta ao estresse, uma vez que estas vias tem maior destaque em estudo com interação patógeno-planta, como em experimento realizado por Cernadas e colaboradores (2008), através de hibridização subtrativa com as bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e XauC em laranja doce e lima ácida 'Galego', onde puderam notar que, transcritos ligados a fotossíntese, em sua maioria, encontravam-se reprimidos ou sem expressão diferencial. O mesmo foi observado por Martinelli e colaboradores (2013) para o greening ou HLB (Huanglongbing) em frutos de laranja doce, e por Fu e Liu (2013) com perfis transcricionais de laranja doce transgênica resistente ao cancro cítrico.

No presente trabalho, os transcritos relacionados à fotossíntese apresentaram respostas discrepantes aos 5 dai. Enquanto em laranja 'Hamlin' todos os transcritos relacionados à fotossíntese se mostraram reprimidos, em lima ácida 'Galego' nenhum transcrito relacionado à fotossíntese apresentou expressão alterada em relação ao controle. Este resultado está em concordância com o observado por Cernadas e colaboradores (2008). Esse tipo de comportamento foi observado também por Rudolph (1993), que descreveu o que acontece com a folha em caso de ataque de patógeno bacteriano, afirmando que com a infecção pela bactéria na folha, há o extravasamento de conteúdo celular, causando assim o aspecto de encharcamento no início da doença, diminuindo a taxa fotossintética, o metabolismo de carboidratos, trazendo danos à planta.

Para a espécie de lima ácida 'Galego', aos 5 dai, foram identificadas poucas vias relacionadas ao metabolismo primário. Já para laranja 'Hamlin', aos 5 dai, muitas vias de metabolismo primário foram identificadas. Dentre elas, a via da fotossíntese se destacou por estar diretamente relacionada ao metabolismo de carboidratos e energia.

Em laranja 'Hamlin', identificou-se transcrito correspondente ao gene que codifica uma redutase, mais especificamente uma ferredoxina-NADP⁺ redutase (FNR), responsável pelo transporte de elétrons, fazendo parte da fixação de carbono

em organismos fotossintéticos. Ela faz parte do complexo da desidrogenase e são doadores de ferredoxina, flavodoxina e adrenodoxina para os metabolismos basais redox de plastídeos e mitocôndrias. Catalisa a reação final do transporte de elétrons fotossintéticos, ou seja, a transferência de elétrons reduzidos do fotossistema I. Essa reação doa NADPH necessários para a assimilação de CO_2 em plantas (MUSUMECI; CECCARELLI; CATALANO-DUPUY, 2012) e participa também nos processos de transferência de elétrons como fixação de nitrogênio, biossíntese de isoprenóides, metabolismo de esteróides e resposta ao estresse oxidativo (MUSUMECI; CECCARELLI; CATALANO-DUPUY, 2012). ela é considerada enzima chave para o transporte de elétrons fotossintéticos, participando de processos como o fluxo de elétrons no fotossistema I e no controle de homeostase $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ em estresse de cloroplastos (PALATNIK et al., 1997).

Em laranja 'Hamlin' foram identificados transcritos relacionados com a fotossíntese, em destaque para s-sulfocisteína sintase cloroplástica. Também encontrada em *Arabidopsis thaliana* e *Cucumis sativus*, sua atividade é essencial para o bom funcionamento do cloroplasto e controle da atividade redox dependente de luz (WATANABE et al. 2008; BERMÚDEZ et al. 2010; 2012). Estes transcritos foram reprimidos em laranja 'Hamlin', corroborando com dados obtidos por Cernadas et al. (2008), que também observaram que genes ligados a fotossíntese foram reprimidos em variedades de laranja doce após infecção com XauC. Este fato é mais ou menos previsível, uma vez que a reação de hipersensibilidade (HR) desencadeada pela presença de XauC leva à morte celular programada localizada, com consequente diminuição da fotossíntese. Em lima ácida 'Galego,' aos 5 dai, não foram identificados transcritos diferencialmente expressos relacionados à fotossíntese, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Este fato sugere que, em lima ácida "Galego, a resposta à presença do patógeno é tardia.

Os processos biológicos necessários para o bom funcionamento das atividades celulares incluem, além da fotossíntese, manutenção das células, metabolismo de carboidratos e açúcares e diversos outros. Levando-se em consideração vias essenciais, podemos destacar a via de degradação de tolueno (3-hydroxyacyl-CoA desidrogenase), que está intimamente ligada à via de degradação de benzoato (enoyl-CoA hydratase) (Tabela 3S e 4S), interferindo na formação do

acetil-CoA, que entrará no ciclo do ácido tricarboxílico, excedendo a capacidade do mesmo e fazendo com que o tecido entre em colapso.

O ciclo do ácido cítrico participa de um dos processos biológicos mais importantes. É ele que comanda o metabolismo de carboidratos para geração de energia nas células vegetais, fornecendo assim, substratos necessários para o bom funcionamento (NELSON et al., 2010).

Em laranja 'Hamlin', o ciclo do ácido cítrico apresentou alteração na enzima citrato sintase, responsável pela formação do citrato, na primeira reação do ciclo. Observou-se também, alteração na enzima succinil-ligase (succinil-CoA sintase), provocando assim maior fluxo de substratos decorrentes do ciclo, necessários para que continuem os processos de fosforilação oxidativa, uma vez que quando ocorre infecção da célula, toda a maquinaria celular trabalha em função de conter a propagação da mesma.

Algumas vezes, elevados níveis de açúcar e amido presentes em espaços apoplásticos funcionam como sinalizadores para facilitar a formação de metabólitos secundários de defesa para que a célula possa responder ao ataque de patógenos mais rapidamente (MOGHADDAN; VAN DEN ENDE 2012; FU; LIU, 2013).

Aos 5 daí, muitos transcritos relacionados ao metabolismo secundário foram identificados em laranja 'Hamlin' (Tabela 3S), sendo que a maioria dos induzidos são transcritos de fenilalanina amônia liase (PAL), cinnamoyl- reductase e cytochrome p450 79a2. Estes, também relatados por Schuler e colaborador (2003), Cernadas e colaboradores (2008) e Fu e colaborador (2013).

Em todos os tempos foram identificados transcritos relacionados à defesa, variando apenas a quantidade.

Um desses transcritos foi a enzima Feruloyl CoA ortho-hydroxylase 1 (F6'H1), uma oxidoreductase ligada ao processo de morte celular programada (KAI et al. 2008; SHIMIZU, 2014), sendo que em lima ácida 'Galego', a quantidade de genes relacionados à defesa e ao metabolismo secundário é baixa, sugerindo uma relação entre pouca quantidade de transcritos e a susceptibilidade da bactéria, permitindo que a doença se instale.

Houve expressão diferencial de transcritos relacionados a metabolismo secundário tanto em laranja 'Hamlin' como em lima ácida 'Galego', mas com

diferença temporal. Em laranja 'Hamlin', , foram identificados muito mais transcritos aos 5 dai do que aos 7 dai, enquanto que em lima ácida 'Galego' ocorreu o contrário, ou seja, foram identificados pouquíssimos transcritos aos 5 dai e muitos aos 7 dai. Novamente, parece que a resposta ao patógeno em lima ácida 'Galego' é mais tardia do que em laranja 'Hamlin', o que pode explicar a diferença de susceptibilidade das duas à XauC.

Os valores de diferença de expressão também foram altos e o transcrito com maior expressão aos 5 dai em laranja 'Hamlin', foi identificado como hyoscyamine 6-dioxygenase-like (Tabela 3S). Esta enzima atividade de oxidoreductase, participando de processos de oxidação e redução e está presente na via de biossíntese de flavonóides como flavanona 3-dioxygenase (F3H), sendo a enzima chave para a via que é responsável pela síntese de flavonóides, importantes para o crescimento das plantas, desenvolvimento e reprodução como também de tolerância a estresse biótico e abiótico (KHLESTKINA; TERESHCHENKO; SALINA, 2009).

A via de síntese de flavonoides juntamente com a via de biossíntese de fenilpropanóides, é responsável pela síntese de grande parte dos precursores de metabólitos secundários. A fenilalanina amônia liase (PAL), é uma das enzimas mais importantes na via, pois participa do início da biossíntese de fenilpropapanóide (PPP), transformando fenilalanina em ácido trans cinâmico, reação catalisada posteriormente por ácido cinâmico 4 hidroxilase (C4H) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES 2000). Em estudos realizados por Park e colaboradores (2013) em folhas de arroz, identificou-se a via fenilpropanóide ativa e transcritos de PAL induzidos em folhas tratadas com raios UV.

Fukushima e colaboradores (2012) analisaram dados de transcriptoma de folhas, frutos e raízes de tomate, depositados em bancos públicos e utilizando análise individualizada de componentes, observaram grande acúmulo de flavonóides nas folhas e frutos, porém muito pouco nas raízes de tomate, sugerindo que a coexpressão diferencial indica uma mudança na coexpressão do gene, podendo "reprogramar" as "redes" do transcriptoma entre dois tecidos biológicos.

Em lima ácida 'Galego', apenas um transcrito da via fenilpropanóide apresentou-se diferencialmente expresso, de forma reprimida. Trata-se de uma peroxidase 5 (PER5), responsável pela resposta a estresse e processos oxidativos.

Esta enzima já foi descrita em *Arabidopsis thaliana* e *Scutellaria baicalensis* (MEDHY, 1994) como participando do processo de defesa quando há ataques de patógenos, removendo o peróxido de hidrogênio formado e outras espécies de oxigênio reativo (ROS) (MEDHY, 1994; SZATMARI et al., 2014).

Estando reprimida, atua na contenção da colonização bacteriana na folha de 'Hamlin', onde as peroxidases estão em sua maioria superexpressas.

De um modo geral, em lima ácida 'Galego', suscetível à infecção por XauC, observou-se que ocorre a inativação e até mesmo repressão de muitos mecanismos de defesa aos 5 dai, mecanismos estes que seriam essenciais para barrar o desenvolvimento da doença. Ainda que neste período a via de biossíntese de isoflavonas está superexpressa, assim como a da fenilalanina e de fenilpropanóide, com um transcrito identificado para cada, são insuficientes para que a planta possa reconhecer a ameaça a tempo e combater o patógeno de forma eficaz.

5.1 Resposta de defesa inata

Plantas, por serem seres sésseis, desenvolveram mecanismos moleculares para a detecção de pragas e patógenos que ativam respostas de defesa. O sistema de defesa inata das plantas realiza detecção específica através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Essa resposta de resistência é conhecida como PTI (*PAMP-triggered immunity*). Alguns patógenos secretam proteínas efetoras que desregulam PTI. Para que haja o contra-ataque por parte da planta, proteínas de resistência da planta, chamadas proteínas R, reconhecem os efetores secretados pelo patógeno e ativam ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (POSTEL; KEMMERLING, 2009; DODDS; RATHJEN, 2010; MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; ZIPFEL, 2014). O reconhecimento das células bacterianas por parte das células da planta ocorre por meio de proteínas de membrana que fazem parte do mecanismo imune inato da planta, formado pelas proteínas PRR. Por serem os primeiros a serem disparados assim que a planta percebe a entrada de algo estranho à célula vegetal, como resposta ao estresse, é disparada uma série de compostos para barrar o patógeno, a maioria sintetizados pela via fenilpropanóide (PPP), também é responsável pela

fortificação da parede celular através de ligninas, barrando assim a infecção de tecidos sadios (LEGRAND; FRITIG; HIRTH, 1976). A biossíntese de fenilpropanóide é responsável pela formação da maioria dos compostos fenólicos, como ácido benzóico, ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (JA), além de estimular a síntese de etileno. Estas moléculas são eficazes na defesa de plantas e ativadoras de algumas proteínas PR (*Pathogen related*) envolvidas na defesa de plantas como quitinases, glucanases, peroxidases e taumatinas, que participam tanto do metabolismo primário quanto do secundário (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; THOMMA et al., 2011; ZIPFEL, 2014).

As quitinases e endo quitinases são ativadas principalmente nas interações planta-fungo e para bactérias que possuem o sistema de secreção tipo três (T3SS) (MAHER et al., 1994; SZATMÁRI et al., 2014), como é o caso de XauC, que ao adentrar a célula vegetal através de aberturas naturais, injeta efetores que serão detectados pelas plantas resistentes mas não pelas susceptíveis.

Grande parte dos transcritos identificados em 'Hamlin' são oxidases, transferases, monoxigenases, oxidoredutases e peroxidases que são responsáveis por essa ativação de resposta, através dos receptores de sinalização do tipo NB-LRR (*Nucleotide binding-leucine rich repeat*).

Os NB-LRR são proteínas polimórficas responsivas à efetores de virulência, também chamadas de proteínas de avirulência (Avr). Funcionam como receptores de sinal para a ativação de síntese de homônios como óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, ácido jasmônico, ácido benzóico e etileno (DE YOUNG; INNES, 2006; MCHALE et al., 2006; LEE; YEOM, 2015).

Juntamente com os receptores, encontram-se as proteínas de reconhecimento de patógenos com domínio LRR. Tais proteínas subdividem-se em dois tipos, RLP (*receptor like protein*) que são receptores compostos por um domínio extracelular, um transmembrana e uma curta região citoplásmica associada com um domínio quinase (WANG et al., 2008; YANG et al., 2012) e RLK (*receptor like kinase*) que possuem um domínio quinase citoplásmico em suas extremidades e são utilizadas para sinalização celular (TOR; LOTZE; HOLTON, 2009; ANTOLÍN-LLOVERA et al., 2012; YANG et al., 2012). Receptores RLK são responsáveis pela percepção de estímulos externos e internos. Possuem um grande número de

receptores-like proteína kinases que recebem o sinal e repassam até a ativação de expressão no gene de destino (SCHWESSINGER; RONALD, 2012; BURDIAC et al., 2015).

O processo infeccioso dependerá diretamente da planta que o patógeno entrará em contato (COURNOYER; DINESH-KUMAR, 2011). Em lima ácida 'Galego', o processo inicia-se logo após o contato da bactéria com os tecidos da planta. A bactéria XauC ultrapassa o espaço apoplástico, entrando em contato direto com as células da planta. Não há reconhecimento das células bacterianas invadindo o tecido hospedeiro ou esse reconhecimento é ineficiente, pois, mesmo com a presença dos receptores, a colonização dos tecidos vegetais pela bactéria prosseguiu (SCHWESSINGER E RONALD, 2012) (Tabela 3S).

Em laranja 'Hamlin', genótipo resistente a XauC, transcritos do tipo RLP e transcritos do tipo RLK foram identificados tanto aos 5 como aos 7 dai.

Em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' identificou-se, tanto aos 5 quanto aos 7 dai, transcritos que codificam uma proteína *LRR receptor-like serine threonine-protein kinase fls2* (Tabelas 3S, 4S, 5S e 5S). Tal proteína é responsável pelo reconhecimento da flagelina, presente no flagelo de bactérias, desencadeando resposta do tipo PAMPs e MAMPs, causando PTI.

Também reconhecem efetores inseridos pelo patógeno no interior da célula. Ativam os EF-Tu, que são fatores de elongação (ZHANG et al., 2013). Em experimento realizado por Sun e colaboradores (2013) verificou-se que essa sinalização acontece em *Arabidopsis thaliana*, através da interação de duas moléculas que formam uma superestrutura o receptor AtFLS2 acoplado ao AtBAK1, tornando-se funcional, formando uma plataforma ligante para reconhecimento de patógenos, podendo isso ocorrer também em *Citrus* sp., por ser conservada em muitas espécies de plantas.

O domínio de receptores serina/treonina proteína kinase (STK) e de receptores do tipo *cistein-rich receptor-like protein kinase* (CRK) foram identificados para ambas as espécies. São de extrema importância para reconhecimento de agentes externos que tenham adentrado o citoplasma.

Todos esses receptores correspondem a proteínas PRR. Tais proteínas sinalizam para os receptores do tipo NB-LRR (*Nucleotide binding-leucine rich repeat*

domain). Esses tipos de receptores desempenham papel fundamental na planta, sendo responsáveis por fazer o reconhecimento dos efetores no citoplasma e sinalizar para que a cascata de sinalização hormonal se inicie (ZHANG et al., 2013; WU et al., 2014; ANTOLIN-LLOVERA et al., 2014).

Sem esse reconhecimento em lima ácida ‘Galego’ ocorre ineficiência na sinalização NB-LRR, necessária para o desencadeamento da cascata hormonal, iniciada pela liberação de ácido salicílico, ácido benzóico, ácido jasmônico, ROS e etileno. Uma vez que estes compostos são precursores eficazes na defesa de plantas e ativadores de algumas proteínas PR como quitinases, glucanases, peroxidases, taumatinas, que participam tanto do metabolismo primário quanto do secundário (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES 2000; THOMMA et al. 2011).

5.2 Sinalização hormonal e fatores de transcrição

Eventos de sinalização e reconhecimento são chamados SAR (*systemic acquired resistance*) (VAN VERK et al., 2011).

Proteínas do tipo MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) são sinalizadores intracelulares, incluindo serina, treonina e tirosina proteína kinase, responsáveis pela ativação de cascata hormonal, principalmente do etileno. Tais proteínas sinalizam para ativação de hormônios, por reconhecerem e sinalizar em cascata para que sejam ativados concomitantemente, os fatores de transcrição (WU et al., 2014). Também são sinalizadores as proteínas F-box (FBPs). Possuem localização citoplasmática e nuclear, função de sinalização rápida e ativação de fatores de transcrição (KIPREOS & PAGANO, 2000; NAVARRO-QUEZADA et al., 2013).

Em laranja ‘Hamlin’ houve uma maior quantidade de transcritos destas moléculas sinalizadoras do que na lima ácida ‘Galego’ (Tabelas 3S, 4S, 5S e 6S), que influi diretamente na ativação de fitormônios e fatores de transcrição.

Grande parte dos fitormônios é ativada durante a infecção de patógenos e dependem de sinalização, seja por estímulo biótico ou abiótico. Para ativação de SAR, é necessário que ácido salicílico (SA) esteja presente e se acumule nas regiões de danos da célula, no caso de interferência biótica (LOAKE; GRANT, 2007; KUMAR, 2014). O SA é sintetizado na via do shikimato, pela conversão de corismato

em isocorismato, podendo ocorrer ainda pela via da fenilalanina através da fenilalanina amônia liase (PAL) (YALPANI et al., 1991; KUMAR, 2014). Caso a via da fenilalanina seja inibida, ainda assim pode ocorrer o acúmulo de SA. Em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego', foi identificado corismato mutase. O SA faz parte dos compostos fenólicos responsáveis por ativar SAR (KUMAR, 2014). Caso a via da fenilalanina seja inibida, ainda assim pode ocorrer o acúmulo de SA. Em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego', foi identificado corismato mutase. O SA faz parte dos compostos fenólicos responsáveis por ativar SAR (KUMAR, 2014).

Em um estudo realizado por Mur e colaboradores (2006), observou-se que, plantas de *Arabidopsis* tratadas com baixas concentrações de JA e SA apresentaram um efeito sinérgico sobre a expressão de genes PR1 PDF1.2 enquanto que o tratamento com maior concentrações resultou em um efeito antagonista. Isso pode corroborar com os poucos transcritos identificados para esse gene no presente estudo.

Dentre os transcritos, identificou-se transcritos referentes à síntese de etileno, fazendo parte da via da metionina ou ciclo de Yang (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; BURSTENBINDER; SAUTER, 2011). O 1-aminocyclopropano (ACC) é o precursor do etileno, sendo intermediário da reação com S-adenosilmetionina na biossíntese, participando do ciclo da metionina e sintetizando o gás etileno (BURSTENBINDER; SAUTER, 2011; VAHALA et al., 2013; MAO et al., 2015).

Os resultados obtidos indicam que a síntese de etileno na espécie resistente (laranja 'Hamlin') é ativada mais rapidamente do que na espécie susceptível (lima ácida 'Galego'), uma vez que em laranja 'Hamlin' foram encontrados muitos transcritos para proteínas envolvidas na síntese de etileno tanto aos 5 como aos 7 dai, enquanto que em lima ácida 'Galego' quase não houve transcritos para esses componentes. Isso sugere que, enquanto na espécie suscetível não acontece a biossíntese de etileno, retardando as respostas e defesa contra o patógeno, há um aumento significativo na concentração de etileno da espécie resistente. Uma determinação das concentrações de AS em folhas de laranja 'Hamlin' e de lima ácida 'Galego' infectadas com XauC poderia comprovar esta hipótese. Um modelo dos mecanismos de defesa utilizados pela laranja 'Hamlin' para resistência à infecção por XauC é mostrado na Figura 17.

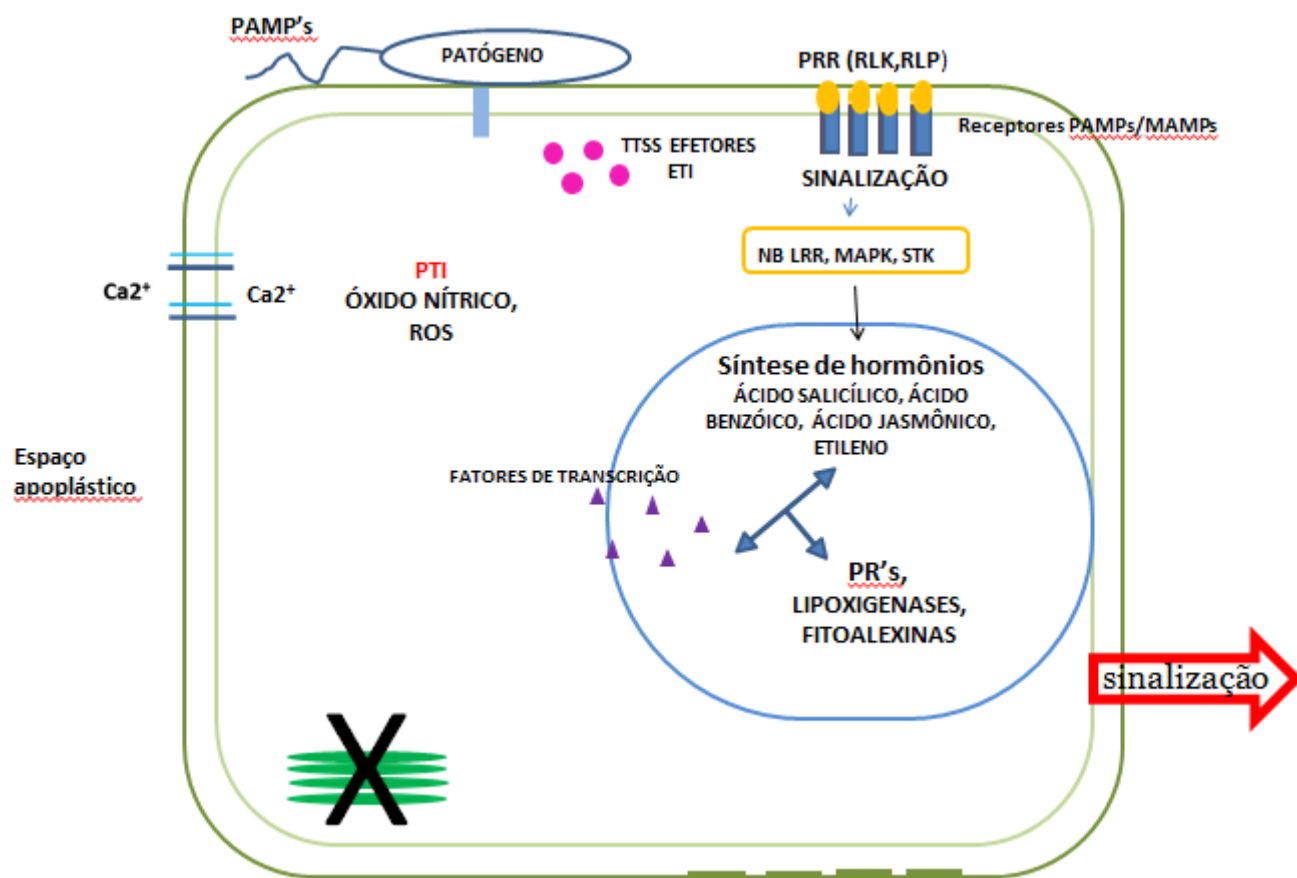


Figura 17- : Modelo proposto dos mecanismos de defesa utilizados pela laranja 'Hamlin' em resposta à infecção causada pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (XauC). Em um primeiro estágio, há o contato da bactéria com PAMP (*patogen associated molecular pattern*) e será reconhecido pelos receptores PRR que desencadeiam a reação de PTI (*PAMP-triggered immunity*). Em um segundo estágio, XauC introduz os efetores através do sistema de secreção tipo três (SSTT), que através de uma cascata de eventos será reconhecido pelas proteínas NB-LRR, ocorrendo assim ETI (*effector-triggered immunity*). Juntamente a esses eventos ocorre a sinalização de hormônios e fatores de transcrição que ativam resposta de defesa do tipo PR (*patogen recognition*), lipoxigenases e fitoalexinas.

5.3 Proteínas de resistência PR e cascata de sinalização hormonal

Os transcritos com maior expressão foram identificados como proteínas de resistência (PR). Em laranja 'Hamlin', o transcrito com maior valor de expressão foi identificado como *Thaumatin-like protein 1^a* (*Pathogenesis-related protein 5a*).

As taumatinas fazem parte do grupo das proteínas PR e são induzidas por várias condições ambientais e bióticas. Foram primeiramente descritas em tabaco como resposta ao estresse osmótico (SINGH et al., 1987) e em espaço apoplástico

de folhas de centeio, na aclimação com atividade anti-congelamento (ANTIKAINEN et al., 1996). Em situação de HR e SAR, são identificados altos níveis de expressão de proteínas PR.

A sinalização de moléculas que mediam a indução dessas proteínas nas plantas durante a infecção inclui SA para PRs ácidas, bem como etileno e metil jasmonato para PRs básicas (TORNERO et al., 1997; KITAJIMA; SATO, 1999; CAMPOS et al., 2007).

Famílias de genes PRs em citros tem sido pouco estudadas. Proteínas quitinase e glucanases em citros são associadas a desenvolvimento de frutos (MCCOLLUM et al., 1997) e resposta a patógenos (PORAT et al., 2001; PORAT et al., 2002; FANTA et al., 2003; PORAT et al., 2003), bem como expressão constitutiva (RECUPERO et al., 1997). Esses genes PR em citros também podem ser disparados por altas temperaturas (PAVONCELLO et al., 2001), raios UV e ferimentos (PORAT et al., 1999) e ácido β -aminobutírico (PORAT et al., 2003). FAGOAGA et al. (2001) reportou que a proteína PR-5 de tabaco, pode ser superexpressa constitutivamente em plantas transgênicas de *Citrus sinensis*, conferindo resistência para o patógeno *Phytophthora citrophthora*, sugerindo que proteínas PR podem ser usadas em programas de melhoramento genético de citros (CAMPOS et al., 2007).

5.4 Fatores de transcrição

Uma vez que uma bactéria invade o tecido vegetal, os PAMPs, efetores de agentes patogênicos e elicitores são percebidos, e respostas de defesa são ativadas por uma rede de vias de sinalização, mediadas por hormônios de defesa, o que, leva à reprogramação transcricional que regula coordenadamente expressão de um ou vários conjuntos de genes (ZHANG et al., 2015).

A reprogramação da transcrição é consequência da ação coordenada de uma gama de fatores de transcrição que funcionam diretamente ou indiretamente, para que a sua atividade se dê de forma adequada. Fatores de transcrição são divididos em diferentes famílias, de acordo com domínios estruturais conservados que estão envolvidos na atividade de ligação do DNA e inúmeros outros fatores de transcrição

pertencentes às famílias AP2 / FER, NAC, WRKY e bZIP têm sido implicados em plantas diversas respostas contra patógenos (SEO; CHOI, 2015).

Os fatores de transcrição regulam o primeiro passo da expressão do gene e, são definidos como proteínas contendo um domínio de ligação ao DNA (DBD) que reconhece uma sequência de DNA específica. Além disso, algumas proteínas sem DBD podem interagir com uma proteína DNA-binding para formar um complexo de transcrição. Os fatores de transcrição e os complexos de transcrição, ativam ou reprimem a transcrição (MITSUDA; OHME-TAKAGI, 2009; SCOTT, 2000; RIECHMANN et al., 2000; SEO; CHOI, 2015).

Com o rápido desenvolvimento de sequenciadores automáticos de DNA, em 10 anos, conseguiu-se muitas informações e sequenciamento de genomas inteiros de plantas, o que facilitou muito a identificação de fatores de transcrição. Plantas possuem aproximadamente de 1000 a 3000 fatores de transcrição ou reguladores transcricionais, dos quais apenas 10 a 15% codificam para proteínas (DUVICK et al., 2008; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2010; JIN et al., 2014). Além disso, os perfis transcricionais de respostas da planta à infecção por patógeno proporcionou uma visão de todo o genoma da expressão de genes, que pode ter fatores de transcrição envolvidos em sistemas de defesa de plantas (WINDRAM et al., 2012; ZHU et al., 2013).

Aproximadamente metade dos fatores de transcrição existentes são considerados planta-específicos, pois não são encontrados em outros organismos eucarióticos (MITSUDA; OHME-TAKAGI, 2009). Essas famílias de fatores de transcrição incluem APETALA2 (AP2) responsivos a etileno com elemento de ligação ERF; NO APICAL MERISTEM, ATAF1/2, CUP-SHAPED COTYLEDON 2 (NAC); WRKY; ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)/VIVIPAROUS1 (VP1); auxin response factor (ARF), e SQUAMOSA promoter binding protein (SBP). Muitos dos fatores de transcrição de família específicas de plantas são relacionados com genes de regulação do desenvolvimento de órgãos e sistemas de resposta para adaptações ambientais (YAMASAKI et al., 2013).

No presente trabalho, pôde-se identificar algumas famílias de fatores de transcrição, bem como seus precursores (Tabelas 8S, 9S, 10S e 11S). As famílias identificadas em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' aos 5 e 7 dai foram, ao todo,

37 famílias, sendo as mais conhecidas WRKY, BHLH, MYB, HEAT SHOCK, AP2, ARF, NAC e GRF. Essas famílias já foram amplamente estudadas e nem sempre são exclusivamente de plantas. Algumas como MYB, possuem a nomenclatura em referência às primeiras identificações em célula animal. Fazem parte, em sua maioria, de resposta à estímulos externos e da entrada de patógenos.

Fatores de transcrição tem que ser capazes de perceber rapidamente a sinalização hormonal e, ser capaz de traduzi-la em resposta funcional.

Devem ser capazes de localizar e se ligar ao motivo específico, enquanto os cofatores devem reconhecer seu sítio na cromatina onde estes são requeridos. Eficientes na supressão da RNA Polymerase II (RNAPol II), ativadores de transcrição devem ser capazes de recrutar RNAPII como alvo promotor. O recrutamento de RNAPII deve ser executado várias vezes, para produzir mRNA em grandes quantidades, de acordo com a intensidade e frequência do sinal. Por fim, fatores de transcrição, devem ser capazes de desempenhar sua função dentro de redes maiores, funcionando cooperativamente ou antagonicamente, para regular a expressão de redes de genes (MOORE; LOAKE; SPOEL, 2011).

São pequenas sequências específicas, capazes de regular a função de transcrição, com mecanismos para assegurar padrões estáveis de ativação de genes e repressão (PTASHNE, 2011). Uma reação de transcrição será efetiva se todos os fatores requeridos (cis e trans) cooperarem para recrutar a maquinaria transcricional da célula (LEVINE, 2010).

Os fatores de transcrição são muito importantes no processo de interação patógeno-hospedeiro, pois, são responsáveis pela ativação de genes de proteínas R (PR), fitoalexinas e defensinas.

Quando o etileno está presente nos tecidos, também se torna responsável pela ativação de fatores de transcrição responsivos a sua presença inclusive, há uma classe de fatores de transcrição responsivos ao etileno. A transdução de sinal da extremidade dos receptores envolve fosforilação, degradação proteossomal e a translocação nuclear de vários módulos regulatórios da via (QIAO et al., 2012). A cascata leva à estabilização de fatores de transcrição EIN3 e EIN3-like1 (EIL1) (AN et al., 2010).

5.5 ERF/AP2

Os fatores de resposta a etileno (ERF/AP2) são uma grande família de fatores de transcrição que possuem 4 proteínas ERF e inicialmente foram chamadas de proteínas de ligação a elemento responsivo a etileno (EREBPs), identificadas em tabaco e *Arabidopsis* (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995; BUTTNER; SINGH, 1997). O domínio ERF, que interage tipicamente com GCC box, consiste de 58–59 aminoácidos (OHME-TAKAGI; SHINSHI, 1995). Os ERFs pertencem à superfamília APETALA2 (AP2)/ERF, e partilham estruturas conservadas dos domínios AP2 e ERF.

A superfamília AP2/ERF está dividida nas famílias AP2, RAV e ERF dependendo do número de domínios. A família AP2 contém dois domínios AP2 (RIECHMANN; MEYEROWITZ, 1998). Esse domínio exibe um sítio de reconhecimento de DNA por estrutura de folha β (ALLEN et al., 1998; RIECHMANN et al., 2000). A família RAV contém um domínio AP2 e B3 (SWAMINATHAN et al., 2008) e a família ERF contém um domínio AP2 e um domínio ERF (FUJIMOTO et al., 2000; SAKUMA et al., 2002).

Um nível de complexidade é gerada pelo fato de diferentes ERFs mostrarem capacidade de resposta temporal ao etileno (ONATE-SANCHEZ; SINGH, 2002), e que a regulação pode depender de outros componentes ERF (ONATE-SANCHEZ et al., 2007). Apesar da maioria dos ERFs serem responsivos a etileno, eles também podem responder a outras sinalizações hormonais integradas, como ácido jasmônico, auxina, ácido absísico e citocininas (FINKELSTEIN et al., 1998; MENKE et al., 1999; FUJIMOTO et al., 2000; LORENZO et al., 2003; RASHOTTE et al., 2006; HIROTA et al., 2007; ZHANG et al., 2008; RASHOTTE; GOERTZEN, 2010; MAO et al., 2015).

O etileno é um fitormônio em forma gasosa, responsável pelo crescimento e desenvolvimento de plantas, e que não é encontrado em grandes quantidades na célula. Em geral, é encontrado em quantidades normais e em condições de estresse, muitas vezes possui efeito de regulação negativa para proliferação celular, por exemplo (SHI et al., 2012).

A família AP2/ERF abrange grande parte das famílias de fatores de transcrição e dentro dela se encontram quatro subfamílias: AP2, ERF, dehydration-responsive element-binding protein (DREB) e RELATED TO ABI3/VP1 (RAV). Essas subfamílias estão envolvidas com respostas a estresse abiótico, frio, desidratação, choque térmico e estresse mecânico, bem como resposta a etileno, desenvolvimento de flores, raízes, embriões e sementes. Membros da subfamília RAV estão envolvidos também com a senescência de folhas (CHANDLER et al., 2007; MIZOI et al., 2012; YAMASAKI et al., 2012).

5.6 ARF

Na superfamília B3 se encontram ARF; LEAFY COTYLEDON2-ABI3-VAL (LAV); RAV; REPRODUCTIVE MERISTEM (REM) e todas essas famílias tem função relacionada com hormônios de resposta (YAMASAKI et al., 2013).

Os fatores de resposta a auxina (ARFs), auxiliam as proteínas Aux/IAA na interação com o DNA sozinhas, facilitando assim sua ligação.

Membros das famílias ARF e LAV possuem um único domínio B3, enquanto a família REM contém mais de seis repetições do domínio (SWAMINATHAN, et al., 2008). Alguns membros da família RAV possuem um domínio AP2/ERF juntamente com B3. O reconhecimento dos motivos das sequências podem ser identificados por membros da família ARF. Em contraste, membros de outras famílias, como VRN1 da família REM não possuem afinidade específica para ligação com DNA, necessitando assim de um ligante (LEVY et al., 2002; YAMASAKI et al., 2013).

Como último passo na regulação de genes com sinalização de auxina, os componentes de fatores de transcrição ARF tem especificidade à auxina na seleção de genes alvo (BOER et al., 2014).

Em trabalho realizado por Drisch & Sthal (2015) em raízes de *Arabidopsis thaliana*, a regulação de fitormônios através de fatores de transcrição do tipo ARF controla a proliferação e desenvolvimento das mesmas. Já no presente estudo, aos 5 dai, foram identificados 6 transcritos referentes a ARF, para laranja 'Hamlin' e nenhum para lima ácida 'Galego'. Já aos 7 dai, não foram identificados nenhum transcrito para ambas espécies.

5.7 WRKY

A família WRKY é definida pela sequência de aminoácidos conservados WRKYGQK na região N-terminal junto com o motivo semelhante a dedo de zinco (*motif zinc-finger-like*), e atividade de ligação ao DNA (DNA binding) (Tabela 4S). É uma superfamília extensa, que possui um único motivo semelhante a dedo de zinco e é encontrada apenas em plantas.

É subdividida em dois grandes grupos: o grupo I possui dois domínios WRKY, enquanto o grupo II possui apenas um domínio WRKY. O grupo II pode ser dividido em dois subgrupos, baseados na estrutura do domínio WRKY e também em algumas proteínas do grupo dois WRKY, como ABF2 e WIZZ, que contém o motivo dedo de leucina (*motif leucine-zipper*) (MAEO et al., 2001).

Aos 5 dai, tanto em laranja 'Hamlin' quanto em lima ácida 'Galego', foram identificados 24 e 1, transcritos de fatores de transcrição da família WRKY, respectivamente. Já aos 7 dai, identificou-se 2 e 10 transcritos referentes a essa família de fatores de transcrição. O que pode indicar que, a resposta da laranja 'Hamlin' ao patógeno é mais rápida do que a resposta da lima ácida 'Galego'.

Os fatores de transcrição da família possui interação com diversos genes, entre eles a lipase-like PAD4 (*Phytoalexin deficient 4*) e pode heterodimerizar para ativação do elicitor de percepção de sinal EDS1 (*enhanced disease susceptibility 1*).

O PAD4 tem localização nuclear e é importante para passos subsequentes da via de biossíntese de ácido salicílico (SA). Quando não há a ativação de PAD4, pode não ocorrer o acúmulo de SA suficiente para dar início à resposta SAR (VAN VERK et al., 2011).

Apesar de expresso nas duas variedades, a resposta é insuficiente para contenção da doença em lima ácida aos 5 dai., uma vez que já está colonizando o tecido sem que haja nenhuma barreira, tanto física quanto química. Isso indica a demora da detecção, afetando a resposta.

5.8 bHLH

Fatores de transcrição de domínio BHLH (*helix-loop-helix proteins*) são proteínas que se ligam a regiões específicas do DNA e ajudam a controlar a atividade de genes específicos. Tais proteínas são fundamentais na regulação de muitas vias durante o desenvolvimento da planta, principalmente eventos de diferenciação celular. Regulam importantes processos metabólicos como a mobilização de fosfato e biossíntese de fosfolípidos.

Em geral, o domínio bHLH compreende cerca de 18 aminoácidos hidrofílicos e um N terminal na extremidade do domínio, seguido por duas regiões de resíduos hidrofóbicos para formar α hélices anfipáticas, separados por um loop (HEIM et al., 2003). É um domínio conservado entre plantas e animais, com uma estrutura dimérica do complexo de ligação em plantas, com uma sequência de aminoácidos conservada, que modulam a expressão do gene por ligação de DNA (HEIM et al., 2003).

São conhecidos por serem importantes para a regulação da expressão de proteínas, e estas regiões podem ser conservadas ao nível de aminoácidos relacionadas entre espécies diferentes e estarem ligados a proliferação celular e alongação (KIM; KENDE, 2003). Esses fatores de transcrição também atuam na regulação da biossíntese de clorofila nos tecidos (HUQ et al., 2004).

Em laranja 'Hamlin' aos 5 dai, foram identificados 15 transcritos e em lima ácida 'Galego', apenas 1. Aos 7 dai, 5 e 6 transcritos foram identificados, respectivamente. Indicando maior atividade dos fatores de transcrição do tipo bHLH nos estágios iniciais da doença, onde a proliferação celular é maior.

Análises genéticas da via de biossíntese de antocianinas em milho indicaram grupos de genes bHLH requeridos para a produção de pigmento roxo de antocianina. Um estudo realizado por Petroni e colaboradores (2000), mostrou que as proteínas bHLH interagem com proteínas R2R3-MYB, do grupo de fatores de transcrição MYB em *Z. mays*, quando expressos em conjunto, controlam a pigmentação dos tecidos (PETRONI et al., 2000). Portanto, grupos de fatores de transcrição podem interagir e, juntos, expressarem uma resposta ou característica diferentes de quando não estão associadas. MYC2 é o regulador chave de bHLH. Regula a expressão de diferentes subtipos de genes responsivos a ácido jasmônico

(BOTER et al., 2004; LORENZO et al., 2004; DOMBRECHT et al., 2007; FERNANDEZ-CALVO et al., 2011).

5.9 MYB

O motivo MYB consiste de uma estrutura hélice-volta-hélice (*helix-turn-helix*) com três voltas espaçadas regularmente (DU et al., 2012).

Em plantas, os fatores de transcrição MYB (Myeloblastosis) desempenham um papel chave no desenvolvimento, incluindo metabolismo secundário, transdução de sinal de hormônios, resistência a doenças e tolerância a estresses abióticos (RIECHMANN et al., 2000; YANHUI et al., 2006).

Tais fatores de transcrição possuem domínios proteicos, classificados em 4 grandes grupos, 1R-MYB, 2R-MYB, 3R-MYB e 4R-MYB, cada uma contendo uma, duas, três e quatro repetições do domínio, respectivamente. Em plantas, o domínio que prevalece é o R2R3-MYB, e suas funções incluem controle de morfogênese celular, regulação de metabolismo secundário, formação de meristema e regulação do ciclo celular (DUBOS et al., 2010; DU et al., 2012).

O ácido jasmônico induz a expressão dos genes MYB21, MYB24, MYB57, MYB108 (MANDAOKAR et al., 2006), modula e regula MYB21, MYB24 e MYB57 (SONG et al., 2011).

O domínio R2R3, dos fatores de transcrição MYB, MYB77, interage com a região C-terminal de ARF7 e promove sinergicamente a expressão de genes responsivos à auxina. MYB77 tem sua expressão reduzida sob condições de privação de potássio, conferindo alteração de respostas e condições de transição de nutrientes suficiente para deficiência de nutriente (SHIN et al., 2007; HILL, 2015).

Aos 5 dai, foram identificados 15 transcritos para laranja 'Hamlin' e 1 transcrito para lima ácida 'Galego'. Aos 7 dai, foram identificados 4 e 1 transcritos, respectivamente. Ou seja, a expressão destes fatores de transcrição é ativada por Xauc em laranja 'Hamlin' mas não em lima ácida 'Galego'.

Com a indução dos fatores de transcrição MYB, juntamente com a sinalização hormonal, desencadeia-se um processo chamado de resposta de hipersensibilidade (HR). Tal processo ocorre em plantas resistentes, como laranja 'Hamlin' para a

cancrose tipo C, e consiste na ativação, por meio dos fatores de transcrição, de proteínas PR, fitoalexinas e peroxidases. Os sinais hormonais se intensificam através de forte acúmulo de compostos fenólicos e hormônios, sinalizando para células vizinhas e toda a área afetada irá sofrer necrose, podendo assim, a colonização ser contida.

5.10 CHOQUE TÉRMICO (HEAT STRESS)

Os fatores de transcrição de choque térmico (*Heat Shock Factors* - HSFs) induzem a transcrição de genes quando há variações bruscas de temperatura (choque térmico) em resposta de estresse por estímulos ambientais (MORANO; THIELLE, 1998). Os HSFs reconhecem elementos cis em promotores, compostos de variações repetidas e invertidas chamadas de elementos de choque térmico (*Heat Shock Elements* - HSEs) (GUERTIN; LIS, 2010). São formadas por padrões palindrômicos repetitivos, se ligando a motivos (5'-AGAAAnnTTCT-3') e uma extremidade TATA box induzida por choque térmico (HS-inducible) (NOVER et al., 2001; AKERFELT et al., 2010).

Os HSFs contêm um domínio N terminal de ligação a DNA do tipo hélice-volta-hélice alada (*helix-turn-winged helix*), um ou mais domínios de trimerização enrolado (*coiled-coil*), com domínio de localização nuclear e um domínio de trans-ativação.

Em condições normais, HSF está presente nas plantas em estado latente e é ativado por estresse térmico e indução da trimerização e alta afinidade de ligação de DNA e exposição de domínio para atividade transcricional (PIRKKALA; NYKÄNEN; SISTONEN, 2001; WU, 1995).

Aos 5 dai, foram identificados 7 transcritos para laranja 'Hamlin' e nenhum para lima ácida 'Galego'. Aos 7 dai, foram identificados apenas um transcrito para ambas as espécies cítricas. Isso indica que laranja 'Hamlin' ativa a expressão de fatores de transcrição de choque térmico nas fases iniciais de infecção por XauC, enquanto que em lima ácida 'Galego' isso não ocorre.

No que se refere a plantas, foi mostrado experimentalmente em *Arabidopsis* que, a associação de AtHsfA1a com elementos responsivos ao estresse é relevante para a expressão de genes Hsf-dependente (GUO et al., 2008).

5.11 DOF

Os fatores de transcrição com domínio DOF (*DNA binding with one finger*) são fatores de transcrição específicos de plantas. Estes fatores de transcrição possuem domínios altamente conservados, incluindo um C2-C2 zinc finger (MAEO et al., 2001; YANAGISAWA, 2004; VENKATESH; PARK, 2015).

As proteínas com domínio DOF se dividem em dois subgrupos maiores: um grupo com N-terminal conservado e domínio DNA-binding e o segundo grupo com domínio C-terminal variável para regulação transcricional (CAI et al., 2013). Estes fatores de transcrição são fundamentais para regulação de processos básicos como a fotossíntese, resposta a estresse, germinação de sementes, indução de flores e ditar o ritmo circadiano quanto à luminosidade (NOGUERO et al., 2013). Em geral, são encontrados em pequenas proporções em plantas, por estar ligado a vias essenciais.

Aos 5 dai, foram identificados 3 transcritos para laranja 'Hamlin' e nenhum para lima ácida 'Galego'. Aos 7 dai, foram identificados apenas um transcrito para ambas as espécies cítricas. Isso indica que laranja 'Hamlin' ativa ligeiramente a expressão de fatores de transcrição de choque térmico nas fases iniciais de infecção por XauC, enquanto que em lima ácida 'Galego' isso não ocorre.

5.12 NAC

A família NAC de fatores de transcrição tem muitas funções no estresse biótico e abiótico e são fatores de transcrição exclusivos de plantas. Os membros da família NAC apresentam aproximadamente 150 aminoácidos em forma de homodímeros e heterodímeros. As sequências de DNA que são reconhecidas pelos fatores de transcrição NAC possuem propriedades palindrômicas e com distâncias diferentes, como AN₅TCN₇ACACGCATGT, que é proteínas NAC responsivas a ácido abscísico (ANAC) (YAMASAKI et al., 2013).

O complexo de regulação dos fatores de transcrição NAC incluem microRNA (miRNA), que mediam a clivagem de mRNAs e fazem a proteólise ubiquitina-dependente. A estrutura do domínio foi determinada, revelando apenas uma dobra no fator de transcrição (MALLORY et al., 2004; OLSEN et al., 2005; YAMASAKI et al., 2013; ERNST et al., 2004). Aos 5 dai, foram identificados 4 transcritos para laranja 'Hamlin' e nenhum para lima ácida 'Galego'. Aos 7 dai, foram identificados 2 e 6, respectivamente. Aqui também, em laranja 'Hamlin' a expressão de fatores de transcrição NAC ocorre em laranja 'Hamlin' ocorre mais precocemente do que em lima ácida 'Galego' em resposta à infecção por XauC.

5.13 GRF

Uma das famílias que mais chamaram atenção no presente estudo foi a GRF (GROWTH-REGULATING FACTOR), por sua ação de fator de transcrição estar ligado diretamente à proliferação celular.

Esse grupo de fatores de transcrição desempenham um papel na regulação da expansão celular em folhas e cotilédones. Os GRFs são componentes de uma rede formada por seus co-reguladores miR396 e seus fatores de coativação GIFs (GRF-interacting factors) ou ANGUSTIFOLIA3 e atuam na regulação da função meristema, pelo menos parcialmente, através do controle da proliferação celular. Esses genes GRF são muito expressos em tecidos em crescimento ativo como desenvolvimento de galhos, botões florais, raízes e mais fracamente em caules maduros e tecido foliar (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2004; NELISSEN et al., 2015).

Este grupo de fatores de transcrição é específico de plantas e contém um domínio QLQ (Gln, Leu, Gln) que é responsável pela interação proteína-proteína e ainda um domínio WRC (Trp, Arg, Cys), o domínio de ligação de DNA tipo CCCH (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2004), que é incorporado no domínio WRC e possui uma região rica em Pro/Ser. Essas características indicam função de regulação transcricional (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2003; BALOGLU, 2014).

O domínio QLQ é caracterizado por conter resíduos de Gln-Leu-Gln conservados. Outra característica deste domínio é a extrema conservação de

resíduos aromáticos e hidrofóbicos como os de Phe, Trp, Tyr, Leu, Glu. O resíduo Pro também é absolutamente conservado e sua presença é crítica, pois, auxilia na função do domínio QLQ, que é de interação proteína-proteína. Possui coativadores GIF, com domínios SWI2/SNF2 (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2003; BALOGLU, 2014).

O domínio WRC contém duas estruturas distintas com os aminoácidos Arg e Lys, um espaço conservado com três Cys e um resíduo de His, o motivo C3H. É altamente conservado, o que indica que é essencial para a função do domínio WRC, de atuar como um sinalizador de localização nuclear. Por ser conservado, C3H pode mediar a ligação com o DNA (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2004; BALOGLU, 2014).

Alguns fatores de transcrição são responsáveis pelo início da proliferação celular, é o caso do GRF e bHLH. Os fatores de transcrição GRF são fatores de transcrição eucarióticos de plantas. Esse grupo de ativadores de transcrição desempenham um papel na regulação da expansão celular em folhas e cotilédones. Componente de uma rede formada por miR396, seus co-reguladores, os GRFs e seus fatores de interação (GIFs) atuam na regulação da função meristema, pelo menos parcialmente, através do controle da proliferação celular (Kim e Kende, 2003; Kim e Kende, 2004; Baloglu, 2014).

Em recente estudo, Hu e colaboradores (2014), afirmaram que a susceptibilidade das plantas de citros ao cancro cítrico, se daria pela interação do efector PthA com dois genes, CsLOB e CsSWEET, sendo que, a expressão destes dois genes determinaria se a planta seria resistente ou não à doença.

Essas duas famílias de fatores de transcrição foram escolhidas por serem exclusivas de plantas e estarem diretamente ligadas a proliferação celular, o que pode estar ligada aos sintomas que a bactéria incita na planta hospedeira após inoculada.

Quando acontece o contato da bactéria com a planta hospedeira, no caso a bactéria XauC com lima ácida 'Galego', uma interação totalmente compatível, a bactéria tem a oportunidade de utilizar seu sistema de secreção tipo III (SST3), juntamente com seu arsenal de efetores de virulência e injetá-los no interior das células vegetais.

Um dos efetores mais importantes secretados é o PthA, podendo ser de 4 tipos PthA1, PthA2, PthA3 e PthA4. Dentre estes, o mais importante e comprovadamente capaz de causar sintomas é o PthA4, também conhecido como AvrBs3. Em estudo realizado por Figueiredo e colaboradores (2011), os 4 tipos de PthA foram nocauteados e, apenas quando retirada a sequência referente ao PthA4 e inoculado o mutante em planta hospedeira, pôde-se observar a ausência de sintomas de cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). A Xac mutante contendo apenas PthA4 foi capaz de produzir sintomas claros de cancro.

Os PthAs fazem parte de uma classe de efetores classificados como TALES (*Transcription activator like effectors*) que são injetados via, SST3, nas células de plantas hospedeiras, onde são responsáveis por desencadear doença ou resistência através de ligação do DNA do hospedeiro com os genes TALES específicos (BOGDANOVE et al., 2010; SOUZA et al., 2012).

Tendo isso em mente, podemos inferir que, ao adentrar a célula hospedeira via SST3, o PthA4 é translocado por Hrps, também injetados pelo SST3, levando-o até o núcleo (BUTTNER; BONNAS, 2002), onde funciona como um ativador transcricional, reprogramando a maquinaria celular. Uma vez dentro do núcleo, irá reconhecer o UPA-Box, podendo reconhecer UPA20, UPA17 e UPA21. UPA20 (Upregulated by AvrBs3) é induzido e codifica α -expansinas putativas e proteínas induzidas por auxinas, levando a indução da hipertrofia celular. Mas, em meio a esses genes que são ativados pelo UPA20, são também ativados muitos fatores de transcrição, entre eles GRF (Growth-Regulating Factor), GIF (GRF-Interacting Factor) e bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2003; HU et al., 2014).

Através da formação de um complexo transcricional entra GRF e GIF, um grupo de coativadores que controlam a proliferação de células (LEE et al., 2013). Esse complexo é formado através da interação do domínio QLQ de GRF com GIF, sendo um complexo funcional envolvido com a proliferação celular (KIM; KENDE, 2003; KIM; KENDE, 2004; BALOGLU, 2014). O coativador GIF possui domínios SWI2/SNF2 e SWI/SNF, responsáveis pela remodelagem de cromatina (KIM; KENDE, 2004).

O que acontece é que, provavelmente, os efetores da bactéria, ao chegarem no núcleo, confundem a maquinaria, representada pelo UPA20, ativando GRF+GIF, que “entendem” que é hora de fazer com que as células se proliferem. Com isso, dá-se início aos sintomas do cancro propriamente dito.

Em estudo realizado por Romer e colaboradores (2007) em pimentão, fez-se uma mutação em domínios NLS ou AD de AvrBs3, não havendo reconhecimento do patógeno pelo gene R Bs3, conseqüentemente, não havendo multiplicação celular, o que sugere que o reconhecimento envolve ativação transcricional de genes de transcrição do hospedeiro, entre eles, o UPA-box.

Através dos dados analisados e de levantamento de dados literários que suportam a teoria de que PthA desreprime GRF, GIF E bHLH, burlando o sistema de reconhecimento da planta e desencadeando o processo de multiplicação celular, que conflui para a hiperplasia e hipertrofia dos tecidos vegetais, juntamente com outros episódios que ocorrem concomitantemente na célula, causando seu desbalanço e posterior colapso, sugerimos um modelo (Figura 18), que ilustra de forma clara o que ocorreria desde a entrada da bactéria nos tecidos da planta, até a manifestação dos sintomas nos tecidos, culminando em seu colapso. A comprovação ou não do modelo poderia ser obtida utilizando *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (XauC) com o gene *pthA4* nocauteado. Além da verificação de presença ou ausência de sintomas, a quantificação da expressão dos fatores de transcrição bHLH e GRF e GIF por qRT-PCR, em planta infectada pelo mutante, pela XauC selvagem e pelo mutante complementado pelo gene *pthA4*, forneceria elementos a favor ou não do modelo.

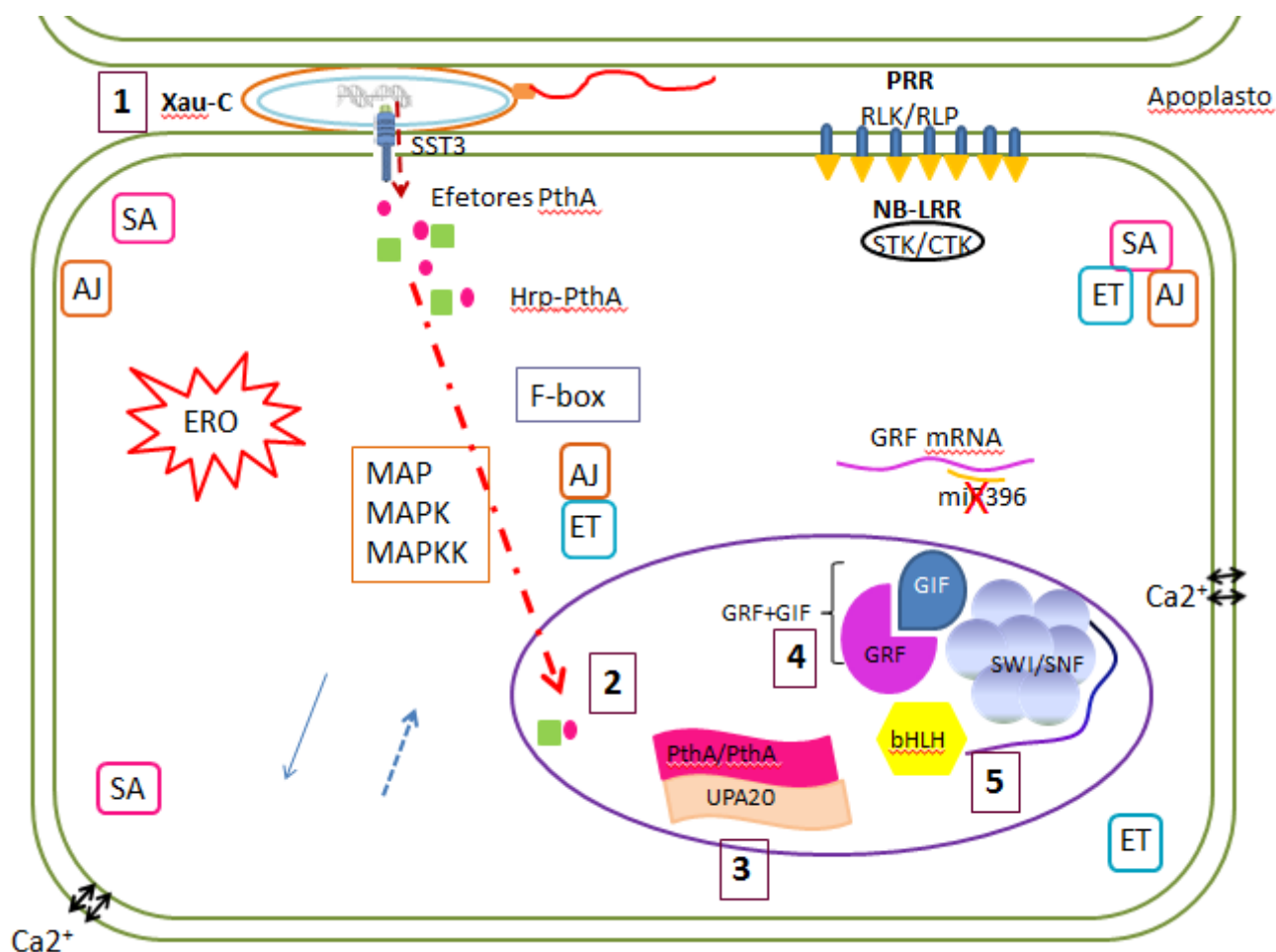


Figura 18- Modelo proposto para o processo de reconhecimento de PthA pelos fatores de transcrição. 1 – Entrada da bactéria no apoplasto foliar, ativando assim o sistema de secreção tipo 3 (SST3) e, através do injectoma, insere dentro das células da planta efetores como PthA e Hrp. O complexo PthA-Hrp formado no interior da célula vegetal é translocado até o núcleo da célula vegetal. 2 – Ao entrar no núcleo, o PthA, que é um ativador transcrricional, irá desordenar toda a maquinaria celular do hospedeiro, formando homodímeros que reconhecem as sequências regulatórias UPA, conhecida como UPA-BOX, podendo ser UPA20, UPA21 e UPA17. 3 – Através da interação do PthA4, especificamente com o UPA20, o conjunto de genes regulados por este UPA-Box levam à expressão aumentada de fatores de transcrição do tipo bHLH e GRF e GIF. O GRF possui dois domínios QLQ, responsáveis pelo reconhecimento proteína-proteína, que reconhece e se liga ao complexo de remodelagem da cromatina (SWI/SNF), e por um domínio WRC que desempenha a função de sinalização nuclear ainda não bem esclarecida. Esse processo irá iniciar uma cascata de eventos que, juntamente com Bhlh, darão início à proliferação celular, através da hipertrofia de células da parede celular, aumentando assim a quantidade de célula bem como seu tamanho, dando início ao crescimento do tecido de forma desordenada. Fatores de transcrição de domínio BHLH (helix-loop-helix proteins) foram identificados. São proteínas que se ligam a regiões específicas do DNA e ajudam a controlar a atividade de genes específicos. Tais proteínas são fundamentais no controle e regulação de muitas vias, durante o desenvolvimento da planta. 4- O GRF é regulado por um micro RNA, o miR396, que regula negativamente ou positivamente a transcrição de GRF, em função da sinalização recebida. Quando a célula detecta a entrada de patógeno ou estresse abiótico, o miR396 regula negativamente a transcrição de GRF, evitando assim que a célula se prolifere de maneira desordenada e que a energia seja utilizada para combater o estresse. O PthA4 dribla essa regulação ativando a transcrição do GRF, com o complexo GRF-GIF levando à multiplicação celular descontrolada.

5- Ocasiona o desbalanço e desregulação do complexo, atendendo ao “falso” estímulo dado por PthA4 para proliferação das células e sua hiperplasia, deixando a planta manifestar os sintomas da infecção cancriosa C.

VI - Conclusões

Em laranja 'Hamlin', resistente à cancrose C via HR, quase 3.000 genes tiveram a expressão alterada nos primeiros 5 dias após a infecção. Esta resposta imediata e em larga escala, provavelmente é a responsável pelo sucesso da planta em conter a bactéria e evitar a infecção. Em lima ácida 'Galego', susceptível à cancrose C, apenas 59 genes tiveram a expressão alterada nos primeiros 5 dias após a infecção. Esta resposta lenta e em pequena escala, provavelmente é a responsável pelo sucesso do patógeno em se estabelecer na planta e causar a doença.

O PthA é o responsável pela hiperplasia e hipertrofia do tecido foliar. Os dados obtidos sugerem que o PthA age desreprimindo a expressão de fatores de transcrição do tipo GRF e bHLH da planta, o que é um dado novo. Esta hipótese precisa ser comprovada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology** 5. ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p., 2005.
- ALLEN, M. D.; YAMASAKI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TATENO, M.; SUZUKI, M. A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. **The EMBO Journal**, v.17, n.18, p. 5484–5496, 1998.
- AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.11, n.8, p 545–555. 2010.
- ALVES, P. R. B.; MELO, B. **Cultura dos Citros**. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm#1> – Introdução. Acesso em: 16 nov. 2015.
- AMARAL, A. M. O que torna o cancro cítrico uma doença?. **Revista Laranja**, v.25, p. 375-387, 2004.
- AN, F.; ZHAO, Q.; JI, Y.; LI, W.; JIANG, Z.; YU, X.; ZHANG, C.; HAN, Y.; HE, W.; LIU, Y.; ZHANG, S.; ECKER, J. R.; GUO, H. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.22, n.7, p 2384–2401, 2010.
- ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, R106, doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106, 2010.
- ANTIKAJINEN, M., GRIFFITH, M., ZHANG, J., HON, W. C., YANG, D. S. C., PIHAKASHI-MAUNSBACH, K. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing. **Plant Physiology**, v.110, p.845–857, 1996.
- ANTOLIN-LLOVERA, M.; PETUTSCHING, E. K.; RIED, M. K.; LIPKA, V.; NURNBERGER, T.; SILKE ROBATZEK, S.; PARNISKE, M. Knowing your friends and foes – plant receptor-like kinases as initiators of symbiosis or defence. **New Phytologist**, v.204, n.4, p.791–802, 2014.
- AVILA, Q. **Citricultura deve encolher na nova safra, depois de um ano com seca, pragas e insumos mais caros**. 2014. Disponível em: <http://www.canalrural.com.br/noticias/rural-noticias/citricultura-deve-encolher-nova-safra-depois-ano-com-seca-pragas-insumos-mais-caros-54201>. Acesso em: 16 nov. 2015.
- BALOGLU, M. C. Genome-wide *in silico* identification and comparison of Growth Regulating Factor (GRF) genes in Cucurbitaceae family. **Plant Omics Journal**, v.7,

n.4, p. 260-270, 2014.

BERMÚDEZ, M. A., PÁEZ-OCHOA, M. A., GOTOR, C., AND ROMERO, L. C. *Arabidopsis* S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control. **Plant Cell**, v. 22, p.403-416, 2010.

BERMÚDEZ, M. A., GALMÉS, J., MORENO, I., MULLINEAUX, P. M., GOTO, R. C., ROMERO, L. C. 2012. Photosynthetic adaptation to length of day is dependent on S-sulfocysteine synthase activity in the thylakoid lumen. **Plant Physiology**, v.160, p.274-288, 2012.

BIGEARD, J.; JEAN COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). **Molecular Plant**, v.8, n.8, p. 521–539, 2015.

BLUM, L. E. B., CARES, J. H., UESUGI, C, H. **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. 1ª Edição, Editora Otimismo, 2006.

BOER, D. R.; FREIRE-RIOS, A.; VAN DEN BERG, W. A. M.; SAAKI, T.; MANFIELD, I. W.; KEPINSKI, S.; LOPEZ-VIDRIO, I.; FRANCO-ZORRILLA, J. M.; DE VRIES, S. C.; SOLANO, S.; WEIJERS, D.; COLL, M. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin dependent ARF transcription factors. **Cell**, v.156, n.3, p. 577–589, 2014.

BOTER, M.; RUIZ-RIVERO, O.; ABDEEN, A.; PRAT, S. Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. **Genes Development**, v.18, n.13, p. 1577–1591, 2004.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, v.59, p. 873-907, 1990. doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.004301

BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., AND JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. Third Edition, pp. 1115-1155, 2000.

BUTTNER, M.; SINGH, K. B. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n.11, p. 5961–5966, 1997.

CAI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, T.; HU, T., YE, J.; ZHANG, J.; TAOTAO WANG, T.; LI, H.; YE, Z. Genome-wide analysis of plant-specific Dof transcription factor family in Tomato. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.55, n.6, p. 552–566, 2013.

CAMPOS, M. A.; ROSA, D. D.; TEIXEIRA, J. E. C.; TARGON, M. L. P. N.; SOUZA, A. A.; PAIVA, L. V.; STACH-MACHADO, D. R.; MACHADO, M. A. PR gene families of citrus: Their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3 (suppl), p. 917-930, 2007.

Canal Rural – Disponível em: <http://www.canalrural.com.br/noticias/rural-noticias/citricultura-deve-encolher-nova-safra-depois-ano-com-seca-pragas-insumos-mais-caros-54201>.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.57, n.1, p. 289-300, 1995.

CARVALHO, M. C. C. G.; DA SILVA D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p. 735-744, 2010.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO L. R.; BENEDETTI C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n.5, p. 609–631, 2008.

CHANDLER, J. W.; COLE, M.; FLIER, A.; GREWE, B.; WERR, W. The AP2 transcription factors DORNRO" SCHEN and DORNRO" SCHEN-LIKE redundantly control *Arabidopsis* embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. **Development**, v.134, p. 1653–1662, 2007.

CITRUSBR – Disponível em: http://www.citrusbr.com/download/CITRUS_APEX_PORTUGUES.pdf, 2015. Acesso em: 13 de maio de 2015.

CIVEROLO, E. L. Citrus bacterial canker disease in tropical regions. In: LEMATTRE, M.; FREIGOUN, S.; RUDOLPH, K.; SWINGS, J. G. (Eds.) **Proceedings of the 8th International Conf Plant Path Bacteria**. Paris: ORSTOM/INRA, 1994. p. 45-50.

DA SILVA, A. C. R.; 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. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; et al.: Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, n.6887, p. 459-463, 2002.

DAS, A. K. Citrus canker – A review. **Journal of Applied Horticulture**, v.5, n.1, p. 52-60, 2003.

DE YOUNG, B. J., INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, v. 7, p.1243-1249, 2006.

DOMBRECHT, B.; XUE, G.P.; SPRAGUE, S. J.; KIRKEGAARD, J. A.; ROSS, J. J.; REID, J. B.; FITT, G. P.; SEWELAM, N.; SCHENK, P. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.19, n.7, p 2225– 2245, 2007.

DODDS, P. N., RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v.11,n.8, p.539-48, 2010.

DU, H.; FENG, B-R.; YANG, S-S.; HUANG, Y-B; TANG, Y-X. The R2R3-MYB transcription factor gene family in Maize. **PLoS ONE**, v.7, n.6, p. e37463, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0037463

ERNST, H. A., LARSEN, S., LEGGIO, L. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. **EMBO Reports**. v.5, n.3, p.297–303, 2004.

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAREJOS, C.; TUSET, J. J.; ARNAU, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; PENA, L. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, v.7, n.2, p. 175-185, 2001.

FANTA, N.; ORTEGA, X.; PEREZ, L. M. The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinases and beta- 1,3-glucanases from *Citrus limon* seedlings. **Biological Research**, v.36, n.3-4, p. 411-420, 2003.

FERNANDEZ-CALVO, P.; CHINI, A.; FERNANDEZ-BARBERO, G.; CHICO, J. M., GIMENEZ-IBANEZ, S.; GEERINCK, J.; EECKHOUT, D.; SCHWEIZER, F.; GODOY, M.; FRANCO-ZORRILLA, J. M.; PAUWELS, L.; WITTERS, E.; PUGA, M. I.; PAZ-ARES, J.; GOOSSENS, A.; REYMOND, P.; JAEGER, G. D.; SOLANO, R. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. **The Plant Cell**, v.23, n.2, p. 701–715, 2011.

FIGUEIREDO, J. F. L.; MINSAVAGE, G. V.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; JONES, J. B. Mutational analysis of type III effector genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v.130, n.3, p. 339–347, 2011.

FINKELSTEIN, R. R.; WANG, M. L.; LYNCH, T. J.; RAO, S.; GOODMAN, H. M. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. **The Plant Cell**, v.10, n.6, p. 1043–1054. 1998.

FLORIDA CITRUS - **Florida citrus economic & market indicators december 2014**. Florida Department of Citrus. Disponível em: <https://fdocgrower.app.box.com/shared/ka5u5mfsqo/1/1466036915>. Acesso em: 16 nov. 2015.

FRITIG, B., HEITZ T., AND LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion Immunology**, v.10, p.16-22, 1998.

FUJIMOTO, S. Y.; OHTA, M.; USUI, A.; SHINSHI, H.; OHME-TAKAGI, M. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. **The Plant Cell**, v.12, n.3, p. 393–404, 2000.

FUKUSHIMA, A., NISHIZAWA, T., HAYAKUMO, M., HIKOSAKA, S., SAITO, K, GOTO, E., KUSANO, K. Exploring tomato gene functions based on coexpression modules using graph clustering and differential coexpression approaches. **Plant Physiology**, v.158, p. 1487–1502, 2012.

FUNDECITRUS. **Cancro cítrico**, 2015. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em: 16 nov. 2015.

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, p. e41790, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0041790

FU, X. Z.; LIU, J. H. Transcriptional profiling of canker-resistant transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) constitutively overexpressing a spermidine synthase gene. **Biomed. Res. Int.** 2013:918136. doi: 10.1155/2013/918136.

GUERTIN, M. J.; LIS, J. T. Chromatin landscape dictates HSF binding to target DNA elements. **PLoS Genetics**, v.6, n.9, p. e1001114. 2010. doi:10.1371/journal.pgen.1001114 e1001114

GMITTER, F. G.; CHEN, C.; MACHADO, M. A.; SOUZA, A. A.; OLLITRAULT, P. FROECHLICHER, Y.; ZHIMOZU, T. Citrus genomics. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, n.3, p. 611–626, 2012.

GOTO, M.; YAGUCHI, Y.; HYODO, H. Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. **Physiological Plant**, v.16, n.3, p.343–350, 1980.

GUO, L.; CHEN, S.; LIU, K.; LIU, Y.; NI, L.; ZHANG, K.; ZHANG, L. Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites in vivo revealed variations of heat shock elements in *Arabidopsis thaliana*, **Plant and Cell Physiology**, v.49, n.9, p. 1306–1315, 2008.

GREWAL, R. K.; GUPTA, S.; DAS, S. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice. **BMC Genomics**, v. 13, p. 49-61, 2012. doi: 10.1186/1471-2164-13-49

HEIM, M. A.; JAKOBY, M.; WERBER, M.; MARTIN, C.; WEISSHAAR, B. The Basic Helix–Loop–Helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, n.5, p. 735–747, 2003.

HILL, K. Post-translational modifications of hormone-responsive transcription factors: the next level of regulation. **Journal of Experimental Botany**, 2015. doi:10.1093/jxb/erv273

HIROTA, A.; KATO, T.; FUKAKI, H.; AINDA, M.; TASAKA, M. The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.19, n.7, p 2156–2168, 2007.

HUQ, E.; AL-SADY, B.; HUDSON, M.; KIM, C.; APEL, K.; PETER H.; QUAIL, P. H. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a Critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. **Science**, v.305, n.5692, p.1937–1941, 2004.

JONES, J. D. G.; DANGL J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, n.16, p. 323-329, 2006.

KAI, K., MIZUTANI, M., KAWAMURA, N., YAMAMOTO, R., TAMAI M., YAMAGUCHI H., SAKATA, K., SHIMIZU, B. Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.55, p.989–999, 2008.

KIM, J. H.; KENDE, H. The AgGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon grown in *Arabidopsis*. **The plant journal**, v.36, n.1, p .94-104, 2003.

KIM, J. H.; KENDE H. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.101, n.36, p. 13374–13379, 2004. doi: 10.1073/pnas.0405450101

KITAJIMA, S.; SATO, F. Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. **The Journal of Biochemistry**, v.125, n.1, p. 1-8, 1999.

KHLESTKINA, E. K., TERESHCHENKO, O. Y., SALINA, E. A. 2009. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat–rye hybrids. **Molecular. Genetic Genomics**, v. 282, p.475-485, 2009,

KOGENARU, S.; YAN, Q.; GUO, Y.; WANG, N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC Genomics**, v.13:629, 2012.

LAIA, M. L., MOREIRA, L. M., DEZAJACOMO, J., BRIGATI, J. B., FERREIRA, C. B., FERRO, M. I., SILVA, A. C., FERRO, J. A., OLIVEIRA, J. C. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a

transposon-based mutant library. **BMC Microbiol.** 2009 Jan 16;9:12. doi: 10.1186/1471-2180-9-12.

LANGMEAD, D. B.; SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v.9, n.4, p.357-359, 2012.

LEE, H. A., YEOM, S. I. Plant NB-LRR proteins: tightly regulated sensors in a complex manner. **Brief Functional Genomics**, v.14, n.4, p.233-42, 2015.

LEGRAND, M., FRITIG, B., HIRTH, L. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. **Phytochemistry**, v.15, p.1353-1359, 1976.

LI, W; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**. v.22, n.13, p. 1658-1659, 2006.

LI, L.; ZHANG, C.; XU, D.; SCHLÄPPI, M.; XU Z-Q. Expression of recombinant EARLI1, a hybrid proline-rich protein of *Arabidopsis*, in *Escherichia coli* and its inhibition effect to the growth of fungal pathogens and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v.506, n.1, p. 50–61, 2012.

LI, N., HUANG, L., LIU, L., LI, D., DAI, S., DENG, Z. 2014. The relationship between PthA expression and the pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol Biol Rep.**, 41:967–975, 2014.

LOAKE, G., GRANT, M. Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. **Curren Opinion in Plant Biology**, v.10, n.5, p.466-72, 2007.

LLOYD, S. R.; SCHOONBEEK, H. J.; TRICK, M.; ZIPFEL, C.; RIDOUT, C. J. Methods to study PAMP-Triggered immunity in Brassica species. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.27, n.3, p. 286-295, 2014.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, v.15, n.1, p. 165–178, 2003.

LORENZO, O.; CHICO, J. M.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.16, n.7, p. 1938–1950, 2004.

MCCOLLUM, T. G.; DOOSTDAR, H.; MAYER, R. T.; MCDONALD, R. E. Characterization of chitinases and beta-1,3-glucanases in grapefruit flavedo during fruit development. **Physiology Plantarum**, v. 99, n.3, p. 486-494, 1997.

MAEO, K.; HAYASHI, S.; KOJIMA-SUZUKI, H.; MORIKAMI, A.; NAKAMURA, K. Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of Tobacco

WRKY family proteins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n.11, p. 2428-2436, 2001.

MALAMUD, F., HOMEI, R. A., CONFORTE, V. P., YARYURA, P. M., CASTAGNARO, A. P., MARANO, M. R., DO AMARAL, A. M., VOJNOV, A. A. Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Microbiology**, v.159, n.9, p. 1911-9, 2013. doi: 10.1099/mic.0.064709-0.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; CARVALHO, M. L. V.; RODRIGUES NETO. J.; ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E. M. C.; PALAZZO, D. A. Reaction of different *Citrus* and relatives to bacterial canker C [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]. **Proceedings Congress of the International Society of Citriculture**, v.1, p.363-364, 1987.

MALLORY, A. C.; DUGAS, D. V.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. **Current Biology**, v.14, n.12, p. 1035–1046, 2004.

MAO, D., YU, F., LI, J., VAN DE POEL, B., TAN, D., LI, J., LIU, Y., LI, X., DONG, M., CHEN, L., LI, D., LUAN, S. FERONIA receptor kinase interacts with S-adenosylmethionine synthetase and suppresses S-adenosylmethionine production and ethylene biosynthesis in Arabidopsis. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 12, p. 2566–2574, 2015. DOI: 10.1111/pce.12570

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v.12, n.10, p.672-682, 2011.

MARTINELLI, F.; REAGAN, R. L.; URATSU, S. L.; PHU, M. L.; ALBRECHT, U.; MEDZHTOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, n.3, p.295-298, 1997.

MEDHY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, v.105, n.2, p.467-472, 1994.

MENKE, F. L. H.; CHAMPION, A.; KIJNE, J. W.; MEMELINK, J. A novel jasmonate and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. **The EMBO Journal**, v.18, n.16, p. 4455–4463, 1999.

MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, M. Functional Analysis of Transcription Factors in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v.50, n.7, p.1232–1248, 2009.

MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1819, n.2, p. 86–96, 2012.

MOGHADDAN, M. R. B.; VAN DEN ENDE, W.. Sugars and plant innate immunity. **J Experimental Botany**. doi:10.1093/jxb/ers129. 2012.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, n.14, p.349-357, 2012.

MOORE, J. W.; LOAKE, G. J.; SPOEL, S. H. Transcription Dynamics in Plant Immunity. **The Plant Cell**, v.23, n.8, p. 2809–2820, 2011.

MORANO, K. A.; THIELE, D. J. Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. **Gene expression**, v.7, n.4-6, p. 271-282, 1999.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, N. F.; POTNIS, N.; DIGIANPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; SILVA, A. C.; SILVA, A. M.; MORAES, F. E.; OLIVEIRA, J. C.; SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, R. R.; GIMENEZ, D. F.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE, R. P.; NISHIYAMA M. Y.; RODRIGUES NETO J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA, H. A.; STASKAWIKZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas axonopodis* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v.11, p. 7-25, 2010. doi:10.1186/1471-2164-11-238

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; ATZORN, R.; MIERSCH, O.; WASTERNAK, C. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, v.140, n.1, p.249–262, 2006.

NAMEKATA, T. **Estudo comparativo entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., N.F. SP. *aurantifolii*, agente causal da cancrose do limoeiro Galego.** (Tese de Doutorado). Piracicaba SP. ESALQ-USP, 1971.

NELISSEN, H.; EECKHOUT, D.; DEMUYNCK, K.; PERSIAU, G.; WALTON, A.; VAN BEL, M.; VERVOORT, M.; CANDAELE, J.; DE BLOCK, J.; AESAERT, S.; VAN LIJSEBETTENS, M.; GOORMACHTIG, S.; VANDEPOELE, K.; VAN LEENE, J.; MUSZYNSKI, M.; GEVAERT, K.; INZÉ, D.; DE JAEGER, G. Dynamic changes in ANGUSTIFOLIA 3 complex composition reveal a growth regulatory mechanism in the maize leaf. **The Plant Cell**, 2015. doi: 10.1105/tpc.15.00269

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira. Markestrat, Centro de Pesquisa E Projetos em Marketing e Estratégia.** Ribeirão Preto: FEA/USP, 2010. 137 p. Disponível em: http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf. Acesso em: 16 nov. 2015.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Agressividade de Linhagens de *Xanthomonas axonopodis*

pv. *aurantifolii* Tipo C em Lima Ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.2, p. 140-146, 2006.

NOGUERO, M.; ATIF, R. M.; OCHATT, S.; THOMPSON, R. D. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. **Plant Science**, v. 209, p. 32–45, 2013.

NOVER, L.; BHARTI, K.; DORING, P.; MISHRA, S. K.; GANGULI, A.; SCHARF, K. D. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress Chaperones**, v.6, n.3, p. 177–189, 2001.

OHME-TAKAGI, M; SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA-binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **The Plant Cell**, v.7, n.2, p. 173–182, 1995.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v.11, n.12, p. 220, 2010. doi:10.1186/gb-2010-11-12-220

PADMANABHAN, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Physiology of citrus leaves infected by *Xanthomonas citri* (Hesse) Dowson with special reference to halo formation : respiration and oxidative enzymes. **Indian Journal Experimental Biology**, v.11, n.4, p. 359-361, 1973.

PALATNIK, J. F., VALLE, E. M., CARRILLO, N. Oxidative Stress Causes Ferredoxin-N AD P+ Reductase Solubilization from the Thylakoid Membranes in Methyl Viologen-Treated Plants. **Plant Physiology**, v.115, p.1721-1727, 1997.

PARK, H. L.; LEE, S-W.; JUNG, K-H.; HAHN, T-R.; CHO, M-H. Transcriptomic analysis of UV-treated rice leaves reveals UV-induced phytoalexin biosynthetic pathways and their regulatory networks in rice. **Phytochemistry**, v.96, p. 57–71, 2013.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PLoS ONE**, v.7, n.2 p. e30619, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0030619

PAVONCELLO, D.; LURIE, S.; DROBY, S.; PORAT, R. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiology Plantarum**, v.111, n.1, p. 17-22, 2001.

PETRONI, K.; COMINELLI, E.; CONSONNI, G.; GUSMAROLI, G.; GAVAZZI, G.; TONELLI, C. The developmental expression of the maize regulatory gene Hopi determines germination-dependent anthocyanin accumulation. **Genetics**, v.155, n.1, p. 323–336, 2000.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB Journal**, v.15, n.7, p.1118-1131, 2001.

PORAT, R.; VINOKUR, V.; HOLLAND, D.; MCCOLLUM, T. G.; DROBY, S. Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. **Journal of Plant Physiology**, v.158, n.12, p. 1585-1590, 2001.

PORAT, R.; MCCOLLUM, T. G.; VINOKUR, V.; DROBY, S. Effects of various elicitors on the transcription of a beta-1,3-endoglucanase gene in citrus fruit. **Journal of Phytopathology**, v.150, n.2, p.70-75, 2002.

PORAT, R.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E. E.; DROBY, S. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by beta-aminobutyric acid. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, n.9, p. 901-907, 2003.

QIAO, H.; SHEN, Z. X.; HUANG, S-S. C.; SCHMITZ, R.J.; URICH, M. A.; BRIGGS, S. P.; ECKER, J. R. Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. **Science**, v.338, n.6105, p. 390–393, 2012.

RASHOTTE, A. M.; GOERTZEN, L. R. The CRF domain defines Cytokinin Response Factor proteins in plants. **BMC Plant Biology**, v. 10: n.74, 2010. doi:10.1186/1471-2229-10-74

RASHOTTE, A. M.; MASON, M. G.; HUTCHISON, C. E.; FERREIRA, F. J.; SCHALLER, G. E.; KIEBER, J. J. A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.103, n.29, p. 11081-11085, 2006.

RECUPERO, G. R.; GENTILE, A.; RUSSO, M. P.; DOMINA, F. Genetic analysis of resistance to *Phoma tracheiphila* in three *Citrus* and *Poncirus* progenies. **Plant Breeding** v.116, n.2, p.198-200, 1997.

RIECHMANN, J. L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C. Z.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O. J.; SAMAHA, R. R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J. Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B. K.; YU, G. *Arabidopsis* Transcription Factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**. v.290, n.5499, p.2105-2110, 2000.

RIECHMANN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. **Biological Chemistry**, v.379, n.6, p. 633–646, 1998.

SAMPIONATO, O.R.; GIROTTTO, L.F.; STUCHI, E.S. Produção de mudas sadias. In Donadio, L.C.; Moreira, C.S. **Clorose variegada dos citrus**. Bebedouro: Fundecitrus, 162p. 1997.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, H.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.8, p. 690–695, 2006.

SCOTT, M. P. Development: the natural history of genes. **Cell**, v.100, n.1, p. 27–40, 2000.

SEO, E., CHOI, D. Functional studies of transcription factors involved in plant defenses in the genomics era. **Briefings in Functional Genomics**, 14, 260–267, 2015. doi: 10.1093/bfpg/elv011

SCHOONBEEK, H., WANG, H., STEFANATO, F. L., CRAZE, M., BOWDEN, S., WALLINGTON, E., ZIPFEL, C., RIDOUT, C. J. *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. **New Phytologist**, v.206, p. 606–613, 2015.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P. R. Plant Innate Immunity: Perception of conserved microbial signatures. **Annual Review of Plant Biology**, v.63, p. 451–82, 2012. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105518.

SHIMIZU, B.-I. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins. **Frontiers in Plant Science**, v.5, n.549, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00549

SHIN, R.; BURCH, A. Y.; HUPPERT, K. A.; TIWARI, S. B.; MURPHY, A. S.; GUILFOYLE, T. J.; SCHACHTMAN, D. P. The *Arabidopsis* transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. **The Plant Cell**, v.19, n.8, p. 2440–2453, 2007.

STUDHOLME, D. J.; GLOVER, R. H.; BOONHAM, N. Application of High-Throughput DNA Sequencing in Phytopathology. **Annual Review of Phytopathology**, v.49, p. 87–105, 2011. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095408

SUN, Y.; LI, L.; MACHO, A. P.; HAN, Z.; HU, Z.; ZIPFEL, C.; ZHOU, J. M.; CHAI, J. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. **Science**, v.342, n.6158, p. 624–628, 2013.

SWAMINATHAN, K.; PETERSON, K.; JACK, T. The plant B3 superfamily. **Trends in Plant Science**, v.13, n.12, p. 647–655, 2008.

SZATMARI, A., ZVARA, A., MORICZ, A. M., BESENYEI, E., ERIKA SZABO, E., OTT, P. G., PUSKAS, L. G., BOZSO, Z. Pattern Triggered Immunity (PTI) in Tobacco: Isolation of activated genes suggests role of the phenylpropanoid pathway in inhibition of bacterial pathogens. **Plos one**, v.9, p.1–16, 2014.

TALON, M., GMITTER, F. G. 2008. Citrus Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 1-17, 2008. doi:10.1155/2008/528361

TORNERO, P.; GADEA, J.; CONEJERO, V.; VERA, P. Two *PR-1* genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis related genes during the hypersensitive response and development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, n.5, p.624-634, 1997.

USDA - United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade**. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acessado em janeiro de 2016.

VAHALA, J.; FELTEN, J.; LOVE, J.; GORZSAZ, A.; GERBER, L.; LAMMINMAKI, A.; KANGASJARVI, J.; SUNDBERG, B. A genome-wide screen for ethylene-induced Ethylene Response Factors (ERFs) in hybrid aspen stem identifies ERF genes that modify stem growth and wood properties. **New Phytologist**, v.200, n.2, p. 511–522, 2013.

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T. H.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, n.3, p. 245-264, 1994.

VAN VERK, M. C., BOL, J. F., LINTHORST, H. J. M. Prospecting for Genes involved in transcriptional regulation of plant defenses, a bioinformatics approach. **BMC Plant Biology**, v.11, n.88, p. 1-12. 2011. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/88>

VENKATESH, J.; PARK, S. W. Genome-wide analysis and expression profiling of DNA-binding with one zinc finger (Dof) transcription factor family in potato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.94, p. 73:85, 2015. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.05.010.

WALTERS, M. The plant innate immune system. **Journal of Endocytobiosis and Cell Research**, v. 26, p. 8-12, 2015. [zs.thulb.uni-jena.de/content/main/journals/ecb/info.xml](http://www.zs.thulb.uni-jena.de/content/main/journals/ecb/info.xml)

WANG, N. **Citrus bacterial disease**, 2012.

WATANABE, M., KUSANO, M., OIKAWA, A., FUKUSHIMA, A., NOJI, M., AND SAITO, K. Physiological roles of the b-substituted alanine synthase gene family in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.146, p.310-320, 2008.

Windram, O., Madhou, P., McHattie, S., Hill, C., Hickman, R., Cooke, E., Jenkins, D. J., Penfold, C. A., Baxter, L., Breeze, E., Kiddle, S. J., Rhodes, J., Atwell, S., Kliebenstein, D. J., Kim, Y., Stegle, O., Borgwardt, K., Zhang, C., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J., Finkensadt, B., Wild, D. L., Mead, A., Rand, D., Beynon, J., Ott, S., Buchanan-Wollaston, V., Denby, K. J. *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: Chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. **The Plant Cell**, v. 24, p. 3530–3557, 2012.

WYRSCH, I., DOMINGUEZ-FERRERAS, A., GELDNER, N., BOLLER, T. Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis fls2* mutants. **New Phytologist**, v.206, p.774–784, 2015.

WU, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.11, p. 441-469. 1995.

WU, S.; SHAN, L.; HE, P. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. **Plant Science**, v. 228, p. 118–126, 2014.

YAMASAKI, K.; KIGAWA, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YOKOYAMA, S. DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. **Trends in Plant Science**, v.18, n.5, p. 67-276, 2013.

YAN, Q. WANG, N. High-Throughput Screening and Analysis of Genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Involved in Citrus Canker Symptom Development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.25, n.1, p. 69-84, 2013. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0121>

ZABALA, G.; ZOU, J.; TUTEJA, J.; GONZALEZ, D. O.; CLOUGH, S. J.; VODKIN, L. O. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. **BMC Plant Biology**, v.6, n.26, doi:10.1186/1471-2229-6-26, 2006.

ZHANG, H.; YANG, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, J.; WANG, X-C.; HUANG, R. Expression of the ethylene response factor gene TSRF1 enhances abscisic acid responses during seedling development in tobacco. **Planta**, v. 228, n.5, p. 777–787, 2008.

ZHANG, W.; FRAITURE, M.; KOLB, D.; LÖFFELHARDT, B.; DESAKI, Y.; BOUTROT, F. F. G.; TÖR, M.; ZIPFEL, C.; GUST, A. A.; BRUNNER, F. *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and Receptor-Like kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. **The Plant Cell**, v.25, n.10, p. 4227–4241, 2013.

ZHANG, H., HUANG, L, DAI, Y., LIU, S., HONG, Y., TIAN, L., HUANG, L., CAO, Z., LI, D., SONG, F. *Arabidopsis* AtERF15 positively regulates immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00686.

ZHAO, W.; DAVIS, C. E.; BOWMAN, K. D.; DANDEKAR, A. M. Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. **PLoS One**, v.8, n.9, p. e74256, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074256

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, n.4, p. 414-420, 2009.

Zhu, Q., Stephen, S., Kazan, K., Jin, G., Fan, L., Taylor, J., Dennis, E. S., Helliwell, C. A. Wang, M. Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in Arabidopsis using RNA-seq. **Gene** v. 512, p. 259–266, 2013.