

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DA FORÇA DE EXPRESSÃO DE PROMOTORES
PIP-BOX DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Luana Cristina Amistá

Bióloga

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE DA FORÇA DE EXPRESSÃO DE PROMOTORES
PIP-BOX DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Luana Cristina Amistá

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Ferrasa

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

A517a Amistá, Luana Cristina

Análise da força de expressão de promotores PIP-box de
Xanthomonas citri subsp. *citri* / Luana Cristina Amistá. -- Jaboticabal,
2024

116 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Adriano Ferrasa

1. Expressão gênica. 2. Interação planta-patógeno. 3. Virulência. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DA FORÇA DE EXPRESSÃO DE PROMOTORES PIP-BOX DE
Xanthomonas citri subsp. *citri*

AUTORA: LUANA CRISTINA AMISTÁ

ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

COORDENADOR: ADRIANO FERRASA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Microbiologia
Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Presencial)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Dr. FABRICIO JOSÉ JACIANI (Participação Presencial)
Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) / Araraquara/SP

Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI (Participação Presencial)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Luana Cristina Amistá – nascida em 12 de julho de 1988, no município de Jaboticabal, São Paulo, é Bióloga (Bacharel e Licenciada) formada pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA – Araraquara, dezembro em 2012 e Tecnóloga em Gestão Ambiental formada pela Faculdade de Tecnologia Fatec Jaboticabal “Nilo de Stéfani”, em dezembro 2021. Realizou iniciação científica na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP, no período de 2010 a 2012, onde atuou na área de genética molecular do desenvolvimento com o projeto: Estudo da expressão de Neph2, uma molécula de adesão evolutivamente conservada, em *Gallus gallus*. Posteriormente, realizou iniciação científica com bolsa PIBIC-CNPq na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, FCAV/UNESP, de 2018 a 2020, na área de genética e biologia molecular de microrganismos com o projeto: Expressão de genes da família PR-9 em *Fortunella* spp. e *Citrus* spp. em resposta à infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Atualmente é aluna do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, em nível de mestrado, iniciado em março de 2021.

“Uma vida sem sonho é uma manhã sem orvalhos, um céu sem estrelas, uma mente sem criatividade, uma emoção sem aventura. Os sonhos não determinam o lugar aonde vamos, mas produzem a força necessária para nos tirar de onde estamos.”

Augusto Cury

*Dedico este trabalho com profundo amor e
carinho aos meus queridos pais, Elza e ao
inesquecível David (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado ao longo desta jornada, pois sempre se fez presente trazendo refrigério e esperança ao meu coração nos momentos mais difíceis. A Gratidão eterna pela presença do Abba em minha vida!

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela orientação, ensinamentos, apoio, incentivo e conselhos durante esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Adriano Ferrasa, pela co-orientação e pela disposição em ajudar com análise de dados de bioinformática.

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro por todos os ensinamentos, incentivos, pela amizade e disponibilidade do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da FCAV-UNESP, Jaboticabal.

À minha amada mãe, Elza Marçal Amistá, por todo o amor, carinho, incentivo e pelas orações dedicadas à minha vida."

Ao meu amado companheiro de vida, Carlos Alberto De Vitto, expresso minha profunda gratidão por todo o amor, carinho e constante presença em todos os momentos.

Aos meus queridos irmãos Renato, Silvania e Eder, assim como aos meus cunhados Joaquim, Angela e Josiane, e aos meus amados sobrinhos Luan, Jhonatas, Gabriela e Ariadiny, pelo afeto, incentivo e por compartilharem comigo cada conquista com alegria e celebração.

À estimada Dra. Agda Paula Facincani, pela valiosa amizade, conselhos e apoio durante do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Rafael Marini Ferreira, expresso minha sincera gratidão pelas análises virtuais dos desenhos dos oligonucleotídeos e pela construção dos vetores na versão virtual, assim como pelo constante auxílio e pela amizade.

Ao Dr. Carlos Antonio Couto Lima pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência, assessoria com a normalização de dados e análise estatística.

Ao Prof. Dr. Fernando Jose Zara, do Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, FCAV- UNESP, pela disponibilização do microscópio confocal Leica Sp8, imprescindível para realização desta dissertação.

Aos amigos do LBM Tamires, Mariana, Jeovanna, Guilherme, pelo agradável convívio, momentos de descontração e companheirismo que tornam cada experiência mais especial.

À estimada Marisa, pela amizade, companheirismo, auxílio e pelas análises de sequenciamento.

Ao Wlademir pela valiosa assistência com as plantas da casa de vegetação.

À Maria Clara e Andréia pela amizade sincera e pela disposição em esclarecer dúvidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Xanthomonas</i> spp.	16
2.2 Interação planta-patógeno	18
2.3 Sistema de secreção tipo 3 (SST3)	20
2.4 Genoma bacteriano	21
2.5 Promotores induzidos por plantas	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Linhagens bacterianas e espécie vegetal	26
3.2 Análise “ <i>in silico</i> ” de genes contendo promotores induzíveis por planta “PIP-box”	26
3.3 Amplificação das sequências “PIP-box” por PCR	27
3.4 Obtenção dos vetores plasmidiais contendo GFP (pRMF-GFP) sob o controle dos promotores “PIP-box” e de linhagens de <i>X. citri</i> geneticamente modificadas contendo os plasmídios	28
3.4.1 Construção dos vetores	28
3.4.2 Obtenção de <i>Escherichia coli</i> contendo vetores plasmidiais pRMF-GFP “PIP-box” e purificação dos plasmídios	31
3.4.3 Obtenção de <i>X. citri</i> contendo vetores pRMF1-GFP	32
3.5 Análise da força de expressão de promotores induzíveis pela planta (PIP-box)	33
3.5.1 Análise de expressão dos diferentes “PIP-box” <i>in vitro</i>	33
3.5.2 Análise de expressão dos diferentes “PIP-box” <i>in planta</i>	34
3.5.3 Preparação das lâminas para análise de fluorescência	35
3.5.4 Quantificação da fluorescência emitida pelos diferentes promotores “PIP-box”	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Obtenção dos vetores contendo as sequências PIP-box putativas	37
4.2 Análise de microscopia de fluorescência de GFP	44
4.2.1 Após crescimento em meios de cultura (<i>In vitro</i>)	44
4.2.2 Após crescimento em planta hospedeira (<i>in planta</i>)	54
5 CONCLUSÃO	63
6 REFERÊNCIAS	64

APÊDICE	75
Apêndice A- Sequências clonadas contendo a região PIP-box presente na região 3' não traduzida dos genes XAC0360 (FS1), XAC2370 (FS2) e XAC2922 (FS3).	76
Apêndice B - Imagens utilizadas para calcular a fluorescência total corrigida (Corrected Total Fluorescence -CTF) utilizando a ferramenta de seleção depixels no software Fiji para análise <i>in vitro</i>.	77
Apêndice C- Valores gerados pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji para calcular a fluorescência total corrigida (<i>Corrected Total Fluorescence</i> -CTF) para análise <i>in vitro</i>.	87
Apêndice D- Imagens utilizadas para calcular a fluorescência total corrigida (<i>Corrected Total Fluorescence</i> -CTF) utilizando a ferramenta de seleção de pixels no software Fiji para análise <i>in planta</i>.	98
Apêndice E- Valores gerados pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji para calcular a fluorescência total corrigida (<i>Corrected Total Fluorescence</i> -CTF) para análise <i>in planta</i>.	103
Apêndice F- Análise estatísticas após o crescimento de <i>X. citri</i> em meios de cultura (<i>in vitro</i>).	109
Apêndice G- Análise estatísticas após crescimento de <i>X. citri</i> em planta hospedeira (<i>in planta</i>).	115

	Comissão Interna de Biossegurança	
	Ofício CIBio 004/2023	
	Ref.: Encaminhamento de parecer técnico para projeto de pesquisa utilizando derivados de organismos geneticamente modificados da classe de risco 1 (NB-1)	

Jaboticabal, 05 de janeiro de 2023.

Ilmo. Sr.
 Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro
 Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental
 FCAV/UNESP

Prezado Senhor,

Vimos pelo presente informar a V.Sa. que a CIBio da FCAV/UNESP, reunida em 05/01/2023, **deferiu**, após análise, a solicitação de V. Sa. para o desenvolvimento do projeto de pesquisa utilizando derivados de organismos geneticamente modificados da Classe de Risco 1 intitulado "Análise da força de expressão de promotores PIP-Box de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*", cujo objetivo é avaliar a "força" de expressão dos promotores PIP-box putativos que controlam a expressão dos genes XAC0360, XAC0399, XAC2370 e XAC2922 da XccA isolado 306, projeto este a ser realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM), situado no Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental e que possui extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança da FCAV/UNESP (CQB no. 0088/98). O parecer da CIBio está em anexo.

Juntamente com o Parecer da CIBio, está sendo encaminhado também um Termo de Responsabilidade que deve ser assinado por V. Sa., em duas vias, com uma delas sendo devolvida à CIBio via protocolo da FCAV/UNESP.

Na qualidade de Pesquisador Principal, V. Sa. é responsável pelo cumprimento das normas de biossegurança determinadas pela CTNBio na condução de atividades em contenção dos OGMs e derivados da Classe de Risco 1.

Atenciosamente,


 Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão
 Vice- Presidente da CIBio da FCAV/UNESP

ANÁLISE DA FORÇA DE EXPRESSÃO DE PROMOTORES PIP-BOX DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Resumo - A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X.citri*) é o agente causal do cancro cítrico, responsável pela devastação de pomares inteiros em países produtores de laranja, incluindo o Brasil. Na literatura é descrito que diversas bactérias fitopatogênicas possuem, em locais específicos do genoma, uma sequência consenso localizada na região promotora denominada “PIP-box” (*Plant-Inducible Promoter box*). As caixas PIP são responsáveis pela ativação de uma ampla gama de genes, incluindo a expressão de fatores de patogenicidade e virulência durante interações planta-patógeno. Neste estudo, realizou-se a avaliação funcional e a análise da intensidade de expressão de possíveis promotores “PIP-box” que se encontram na região 5’ não traduzida dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 (*X. citri* 306). As sequências PIP-box putativas foram fusionadas à região 5’ da sequência do gene *gfp* no vetor de expressão pRMF e os vetores recombinantes foram inseridos em *X. citri* 306 por eletroporação. A quantidade de proteína GFP produzida pelas linhagens recombinantes de *X. citri* 306 como resultado da ativação de cada promotor PIP-box foi avaliada por microscopia de fluorescência em duas condições diferentes: crescimento por 20 horas em meio de cultura XVM2, que simula o apoplasto e conhecido como meio indutor de expressão de genes *hrp*, usando como controle crescimento em meio não indutor NYG; crescimento por 5 dias após inoculação em folhas de laranja doce ‘Pêra’. Os resultados das análises demonstraram que as sequências “PIP-box” foram capazes de dirigir a transcrição do gene *gfp* presente à jusante, e a análise estatística mostrou que há diferença significativa entre os promotores em relação à força de expressão. Além disso, há diferenças quando se compara a força de expressão de cada promotor em meio de cultura indutor e *in planta*.

Palavras chave: 1. Expressão gênica. 2. Interação planta-patógeno. 3. Virulência

Functional validation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* promoters inducible by the plant hosts

Abstract - The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) is the causative agent of citrus canker, a disease responsible for devastating entire orchards in orange-producing countries, including Brazil. In scientific literature, it's noted that several phytopathogenic bacteria harbor a consensus sequence, known as the "PIP-box" (*Plant-Inducible Promoter box*), located in specific regions of their genome. PIP-box sequences play a crucial role in activating a wide array of genes, including those responsible for pathogenicity and virulence factors during interactions between plants and pathogens. This study was centered on functionally evaluating and analyzing the expression intensity of putative "PIP-box" promoters located within the 5' untranslated region of genes XAC0360, XAC2370, and XAC2922 in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolate 306 (*X. citri* 306). To achieve this, the putative PIP-box sequences were incorporated upstream of the *gfp* gene sequence within the expression vector pRMF. Subsequently, these recombinant vectors were introduced into *X. citri* 306 through electroporation. The level of GFP protein produced by the resulting recombinant strains of *X. citri* 306, triggered by the activation of each PIP-box promoter, was assessed using fluorescence microscopy under two distinct conditions: growth for 20 hours in XVM2 culture medium, known to simulate the apoplast and induce the expression of *hrp* genes, using growth in the non-inducing NYG medium as a control; and growth for 5 days after inoculation on leaves of 'Pêra' sweet orange. The results revealed that the "PIP-box" sequences were able to drive the transcription of the downstream *gfp* gene, and statistical analysis further underscored significant disparities in expression strength among the promoters. Notably, variations were observed in the expression strength of each promoter between inducing culture medium and *in planta* conditions.

Keywords: 1. Gene expression. 2. Plant-pathogen interaction. 3. Virulence.

1 INTRODUÇÃO

A bactérias do gênero *Xanthomonas* são Gram-negativas, e causadoras de doenças em plantas, mais especificamente a cancrose. É conhecido que mais de 400 plantas hospedeiras diferentes, tais como arroz, trigo, frutas cítricas, tomate, repolho, pimentão, banana e feijão, são algumas das espécies e variedades susceptíveis ao cancro (Timilsina et al., 2020). A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X.citri*) é a causadora do cancro cítrico (CC) tipo A. O CC acomete todas as espécies cítricas de interesse comercial, dentre elas, laranjas, tangerinas, limões, limas e pomelos. Os sintomas podem ser observados nas folhas, ramos e frutos. O CC apresenta a formação de lesões necróticas circulares de coloração marrom, com aspecto de encharcamento e halo clorótico, podendo provocar desfolha e queda prematura dos frutos. A evolução da doença compromete a qualidade dos frutos, resultando em prejuízos econômicos significativos (Abdulridha et al., 2019).

As bactérias fitopatogênicas possuem mecanismos e estratégias para vencer as barreiras fisiológicas e moleculares para colonizar o hospedeiro. Por exemplo, a *X. citri* possui sistemas de secreção, sendo o mais conservado entre bactérias patogênicas de planta o sistema de secreção tipo III (SST3). O SST3 secreta, no citoplasma da célula hospedeira, proteínas efetoras que estão relacionadas com virulência e patogenicidade (Hueck, 1998; Wagner et al., 2022).

Os genes responsáveis pela codificação de proteínas efetoras e estruturais do SST3 apresentam uma regulação parcialmente intermediada por proteínas derivadas dos genes *hrpX* e *hrpG*. No caso específico de *X. citri*, os genes reguladores do SST3, situados na região promotora, exibem uma sequência consenso canônica de nucleotídeos (TTCGC...N15...TTCGC), denominada "PIP-box" (*Plant Inducible Promoter box*). A ativação da sequência putativa "PIP-box" ocorre quando a bactéria está no interior da planta hospedeira. A regulação de genes do SST3 ocorre de forma dependente da proteína HrpX, que se conecta à sequência do "PIP-box", ativando assim a transcrição dos genes (Da Silva et al., 2002, Joe et al., 2021).

Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) foi encontrado um ativador transcricional do tipo AraC que interage com a sequência "PIP-box" presente na região

promotora de genes regulados por HrpX, tais como os operons *hrpB*, *hrpF* e *hrpE*. Essas sequências "PIP-box" podem ser empregadas para a identificação de genes cuja expressão é modulada na presença da planta hospedeira (Koebnik et al., 2006).

No genoma de *X. citri*, foi realizado um mapeamento por meio de análise *in silico* utilizando as sequências consenso (5'-TTCGN...N15...TTCGN-3') e (GCGAA...N16...GCAA). Um total de 104 sequências "PIP-box" putativas e genes potencialmente regulados por essas sequências foram identificados, dos quais 32 genes apresentaram expressão diferencial, sendo 12 *upregulated* e 19 *downregulated* (Carvalho et al., 2016). O estudo evidenciou que os promotores "PIP-box" desempenham uma função crucial na regulação da expressão de genes em *X. citri*, influenciando a disseminação da bactéria durante a interação planta-patógeno. Além disso, ensaios enzimáticos utilizando a proteína GUS demonstraram a indução do gene repórter controlado por alguns "PIP-box" quando em contato com a planta. (Carvalho et al., 2016).

A proteína fluorescente (GFP), extraída da água-viva *Aequorea victoria*, tem desempenhado um papel crucial como ferramenta no estudo da expressão gênica e na localização de proteínas *in vivo*, *in situ* e em tempo real. O cromóforo GFP é intrínseco à estrutura primária da proteína, e sua fluorescência não depende de substrato ou cofator, aumentando ainda mais seu valor como ferramenta biotecnológica. A estabilidade da fluorescência da GFP permite um monitoramento não invasivo em células vivas (Sakamoto et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi a avaliação funcional e da força de expressão dos promotores "PIP-box" putativos que se encontram à montante da região codificadora dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 (*X. citri* 306). O uso de promotores PIP-box com diferentes forças de indução da expressão gênica poderá ser usado tanto como ferramenta biotecnológica bem como no estudo de genes com função desconhecida em diferentes patógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Xanthomonas* spp.

As bactérias *Xanthomonas* spp. são fitopatógenos complexos capazes de infectar plantas angiospermas e já foram detectadas em 268 dicotiledôneas e 124 monocotiledôneas, além de outros grupos como do gênero saprófitas e epífitas (Leyns et al., 1984; Chan e Goodwin, 1999). Conforme a classificação filogenética, que se fundamenta principalmente em comparações de sequências nucleotídicas, especialmente do rRNA 16S, o gênero *Xanthomonas* pertencem ao filo *Proteoacteria* da classe “Gammaproteobacteria” (Classe III), da ordem “Xanthomonadales” (Ordem III) e família Xanthomonadaceae (Garrity e Holt, 2000). As *Xanthomonas* spp. são bactérias gram-negativas em forma de bastonete e possui flagelo polar. Em meios de cultura artificial, essas bactérias formam colônias com coloração amarela e uma textura viscosa, atribuída à produção de exopolissacarídeos (Coplin e Cook, 1990).

O exopolissacarídeo, também conhecido como xantomadina, é uma característica das *Xanthomonas* spp. No entanto, algumas espécies, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* e *Xanthomonas campestris* pv. *vitícola*, não produzem esse pigmento (Bradbury, 1993; Timilsina et al., 2020).

Há uma variedade de bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, que compreende 35 espécies, dividida em diversas subespécies. Estas bactérias são responsáveis por desencadear cancrose em uma ampla gama de plantas hospedeiras, incluindo arroz, trigo, frutas cítricas, tomate, pimenta, repolho, mandioca, banana e feijão (Timilsina et al., 2020).

Os diversos tipos de cancrose, que acometem diversas plantas hospedeiras, estão relacionados a notáveis variações genotípicas e fenotípicas bacterianas, como homologia DNA-DNA e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Cubero e Graham, 2002; Egel et al., 1991; Hartung e Civerolo, 1989; Vernière et al., 1998). Algumas *Xanthomonas* spp. colonizam vasos condutores de seiva bruta, como *Xanthomonas albilineans* em plantações de cana-de-açúcar, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em plantações de arroz, enquanto outras espécies colonizam tecido mesofílico (Timilsina et al., 2020).

A cancrese causada pela bactéria *Xanthomonas vesicatoria* em tomates pode devastar pomares, impossibilitando a comercialização dos frutos ou até mesmo levando a morte da planta (Ashmawy et al., 2020). A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é a bactéria responsável por causar a podridão negra em crucíferas, como das famílias Brassicaceae e Solanaceae (Figura 1). A infecção normalmente se dá via sementes, e em alguns casos pode ocorrer pelo solo (Vicente e Holub, 2013).



Figura 1- Sintomas da podridão negra desencadeado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) em folhas de repolho. No canto direito da imagem, colônias de Xcc em meio cultura sólido. Fonte: Tang et al. (2021).

Dentro do gênero *Xanthomonas*, destaca-se a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, (*X. citri*), identificada como o agente causal do cancro cítrico (CC) tipo A (Dalio et al. 2017; Martins et al., 2020). Os sintomas do CC, que podem ser encontrados em folhas, ramos e frutos (Figura 2), envolvem a formação de lesões necróticas circulares de coloração marrom, com aspecto de encharcamento e halo clorótico (Brunings e Gabriel, 2003; Ference et al., 2020). A evolução dos sintomas provoca desfolha e queda prematura dos frutos, com impacto direto na produção, causando grandes prejuízos. A qualidade dos frutos restantes é comprometida, o que restringi a comercialização. Além disso, por se tratar de uma doença quarentenária, a

sua entrada em alguns países não é permitida devido às normas fitossanitárias (Embrapa, 2017).



Figura 2 - Sintomas decorrentes do cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* presente nas folhas, ramos e frutos. Fonte: Fundecitrus (2018)

O fitopatógeno infecta o hospedeiro através de aberturas naturais como os estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos, acarretando sintomas da doença. A anatomia dos estômatos das plantas cítricas influencia na maior penetração da bactéria, sugerindo ser um dos fatores determinantes na variabilidade de espécie susceptíveis a doença (Graham e Gottwald 1990; Ryan et al., 2011). Todas as variedades de citros de interesse comercial são susceptíveis ao CC. Até o momento não há nenhum método curativo para o CC. O controle é feito por aplicação de soluções bactericidas de cobre, que poluem o ambiente e geram resistência na bactéria, e por erradicação de plantas doentes (Brasil, 2018).

2.2 Interação planta-patógeno

As plantas desenvolveram diversas estratégias de defesa para garantir a sobrevivência diante do ataque de agentes fitopatogênicos e condições adversas. A ativação dos mecanismos de defesa ocorre após constantes eventos e sinais,

culminando com o reconhecimento de organismos invasores. Essa interação complexa depende de vários fatores, incluindo os estágios de desenvolvimento da planta, as condições climáticas no momento da infecção e a evolução conjunta de genes, tanto nas plantas quanto nos fitopatógenos. Essa evolução cooperativa estabelece as bases para uma comunicação eficaz entre ambas as partes, contribuindo para a resposta adaptativa desses organismos à dinâmica do ambiente (Boyd et al., 2013; Rani, 2015).

As barreiras fisiológicas e bioquímicas constituem um complexo de ataque e defesa de forma dinâmica com o ambiente. A capacidade de impedir que o microrganismo penetre no tecido vegetal transcorre da formação de camadas de cutículas, barreiras físicas e fechamento de estômatos. Entretanto, armas bioquímicas são acionadas com a indução de reações de defesa após o reconhecimento do patógeno na superfície da célula (Embrapa, 2008; Rani, 2015).

Os mecanismos de defesa da planta são ativados através do reconhecimento via transdução de sinais, dentre eles a geração de espécies reativas de oxigênio, morte celular programada no sítio de infecção (HR), lignificação da parede celular, síntese de fitoalexinas, síntese de proteínas relacionadas à patogênese ou proteínas PR ("PR-Proteins"-PRPs), que se acumulam no hospedeiro durante a infecção por patógeno (Stintzi et al., 1993; Kawahara et al., 2012; Balint-Kurti, 2019; Vanholme et al., 2019).

As plantas possuem um sistema de defesa capaz de detectar a presença do fitopatógeno por determinantes microbianos como, glicoproteínas, quitina, lipossacarídeos e flagelinas conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* – "PAMPs") (Jones e Dangl, 2006). Os PAMPs são responsáveis pela ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs - *Pattern-recognition receptors*) presentes na membrana do hospedeiro. Imediatamente a planta inicia uma resposta de defesa inespecífica conhecida como PTI (*PAMP -Triggered Immunity*) com a tentativa de limitar a propagação do patógeno (Chisholm et al., 2006; Wang et al., 2023). Em resposta ao PTI, o sistema de virulência do patógeno é desencadeado, promovendo a chamada susceptibilidade induzida por efector (ETS - *Effector Triggered Susceptibility*) por meio de mecanismos de secreção, no intuito de inativar o sistema da planta (Wang et al., 2023). Entretanto, para tentar conter a infecção as plantas acionam um sistema

composto por receptores de domínio de ligação a nucleotídeos e proteínas de repetição rico em leucinas (NLR - *Nucleotide-binding domain Leucine-rich repeat/* NBD-LRR *containing*) que reconhecem os efetores, ativando o sistema de defesa denominado por imunidade desencadeada por efetores (ETI-*Effector Triggered Immunity*) (Ye e Ting, 2008; Yuan et al., 2021; Zhang et al., 2022).

Os efetores são proteínas de avirulência (Avr) codificadas por genes de avirulência (*avr*). Estas proteínas são reconhecidas pelas proteínas R codificadas por genes *R*, desencadeando uma resposta de resistência ETI (Boyd et al., 2013). Este mecanismo Avr/R é conhecido como resistência gene a gene, aonde a proteína Avr do patógeno se encaixa no receptor (proteína R) da planta (*lock-and-key*) acionando o sistema de defesa (Boyd et al., 2013). A capacidade da planta em reconhecer o patógeno e responder imediatamente desempenha um papel crucial nos fatores de susceptibilidade e resistência do hospedeiro (Ngou et al., 2021).

2.3 Sistema de secreção tipo 3 (SST3)

Em *Xanthomonas* spp., durante o processo de infecção a adesão à superfície foliar e ambiente intercelular é essencial para a obtenção de nutrientes e para suprimir os mecanismos de defesa da planta. Durante este processo a bactéria utiliza sistemas de secreção, com a função de secretar proteínas no espaço extracelular ou transporte de proteínas para o interior da célula hospedeira. Nesta circunstância as proteínas são denominadas efetores. A utilização do sistema de secreção de proteínas e outros fatores de virulência é utilizado por diversos patógenos como meio de sobrevivência e propagação no hospedeiro (Büttner e Bonas, 2010).

Na literatura estão descritos seis sistemas de secreção em *Xanthomonas* spp. (tipos I ao VI), porém o sistema de secreção do tipo III (SST3) apresenta alta conservação entre bactérias patogênicas de plantas, sendo considerado essencial para o início do desencadeamento de doenças em plantas hospedeiras, causando sintomas típicos como o do CC (Büttner e Bonas, 2010; Tampakaki et al., 2010; Alvarez-Martinez et al., 2021).

Os efetores do SST3 são subdivididos em duas grandes classes: os efetores TAL ("*transcription activator-like*") e os efetores não-TAL ("*non-TAL effectors*"). As *Xanthomonas* spp. injetam os efetores TAL na célula vegetal através da parede celular

utilizando o SST3 em resposta a genes de hipersensibilidade e de patogenicidade (*hrp*). Uma vez no citoplasma, chegam até o núcleo e se ligam a sequências específicas do DNA, modulando a expressão gênica. Entretanto, os efetores não-TAL são um grupo diverso de proteínas, tanto estrutural como funcional. Estes efetores podem contribuir para a indução de virulência e crescimento do patógeno em plantas hospedeiras (Ryan et al., 2011).

2.4 Genoma bacteriano

O genoma bacteriano contém informações cruciais, abrangendo propriedades fisiológicas e de virulência. Nos últimos anos, os avanços tecnológicos, notadamente no sequenciamento completo do genoma de bactérias e outros organismos (Dobrindt e Hacker, 2001), têm possibilitado uma compreensão mais profunda dessas características. Essa metodologia tem propiciado a revelação de notáveis variações no tamanho do genoma, as quais são dependentes do gênero e da espécie bacteriana em questão. Para ilustrar, observou-se o menor genoma em *Mycoplasma genitalium*, com 580 kb, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* apresentou o maior genoma, com 6300 kb. Outras informações importantes foram descobertas, como o conhecimento de genes específicos e fatores que permitem a adaptação em diferentes condições ambientais (Dobrindt e Hacker, 2001).

O sequenciamento genômico de microrganismos como da *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas citri*, dentre outros, proporciona conhecimento dos mecanismos de virulência e patogenicidade e as diferenças na interação do patógeno e hospedeiro (Buell et al., 2003; Da Silva et al., 2002; Simpson et al., 2000; Thieme, et al., 2005; Wood et al., 2001) .

O sequenciamento do genoma da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, antes denominada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* isolado 306, possibilitou a identificação de um cromossomo circular contendo 5.175.554 pares de bases (pb) e dois plasmídios circulares, o pXAC33 (33.699 pb) e o pXAC64 (64.920 pb) (Da Silva et al., 2002). O genoma de *X. citri* revelou características distintivas, possivelmente relacionadas à habilidade adaptativa do fitopatógeno aos seus hospedeiros citros. Essas particularidades incluem a presença de genes que codificam enzimas que

degradam a parede celular e transportadores de açúcares, bem como genes putativos que codificam proteínas efetoras de virulência associadas ao sistema de secreção do tipo III (SST3). Além disso, o genoma abriga genes envolvidos na biossíntese da goma xantana e do complexo do sistema flagelar e quimiotaxia. Esses elementos destacam-se como elementos potenciais na adaptação e interação específica entre *X. citri* e seus hospedeiros (Moreira et al., 2004; Facincani et al., 2014, Ferreira et al., 2016).

X. citri apresenta um diversificado conjunto de 296 genes reguladores, distribuídos em diversas categorias funcionais. Este grupo inclui 69 genes pertencentes a um sistema de dois componentes, 164 genes atuantes como ativadores e repressores, 32 genes responsáveis pela codificação de quinases e fosfatases, e 31 genes relacionados a fatores sigma e outros componentes regulatórios (Moreira et al., 2004). Vale destacar ainda a identificação de sistemas análogos a *nodVW* e *ntrBC*, ambos associados aos processos de nodulação e assimilação de nitrogênio. Essa diversidade de genes reguladores evidencia a complexidade do aparato genético de *X. citri* e sugere sua adaptabilidade em resposta a diferentes condições ambientais (Moreira et al., 2004).

2.5 Promotores induzidos por plantas

Os genes *hrp* estão presentes em bactérias gram-negativas fitopatogênicas e são induzidos quando a bactéria infecta a planta (*in planta*) ou em meios de cultura específicos que mimetizam o apoplasto (*in vitro*). Estes genes são altamente controlados por dois sistemas de regulação acionados durante a interação planta-patógeno. O primeiro grupo é composto por um membro da família ECF que atuam como fatores sigma alternativos, identificados em *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae*. O segundo grupo possui o ativador transcricional pertencente à família AraC, sendo HrpX em *Xanthomonas* spp. e HrpB em *R. solanacearum*, ambos responsáveis pela regulação de genes *hrp* (Wengelnik e Bonas, 1996; Wengelnik et al., 1996a; Zhu et al., 2000; Tsuge et al., 2005; Zhang et al., 2012; Teper et al., 2021).

Em *Xanthomonas* spp., o produto gênico HrpG, pertencente à família de OmpR do sistema de regulação de dois componentes, aciona a expressão de *hrpA* e *hrpX*. A proteína HrpX faz parte de um complexo de proteínas efetoras responsáveis pelo controle da expressão de outros genes *hrp* (*hrpA*, *hrpB*, *hrpC*, *hrpD* e *hrpF*) (Figura 3).

Foi identificado em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoo) o gene *hrpE3*, homólogo ao gene *hpaE*, presente em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). O *hpaE* não é mediado pelo SST3, porém têm a expressão controlada pelas proteínas HrpG e HrpX (Tsuge et al., 2005; Cui et al., 2013; Rashid et al., 2021).

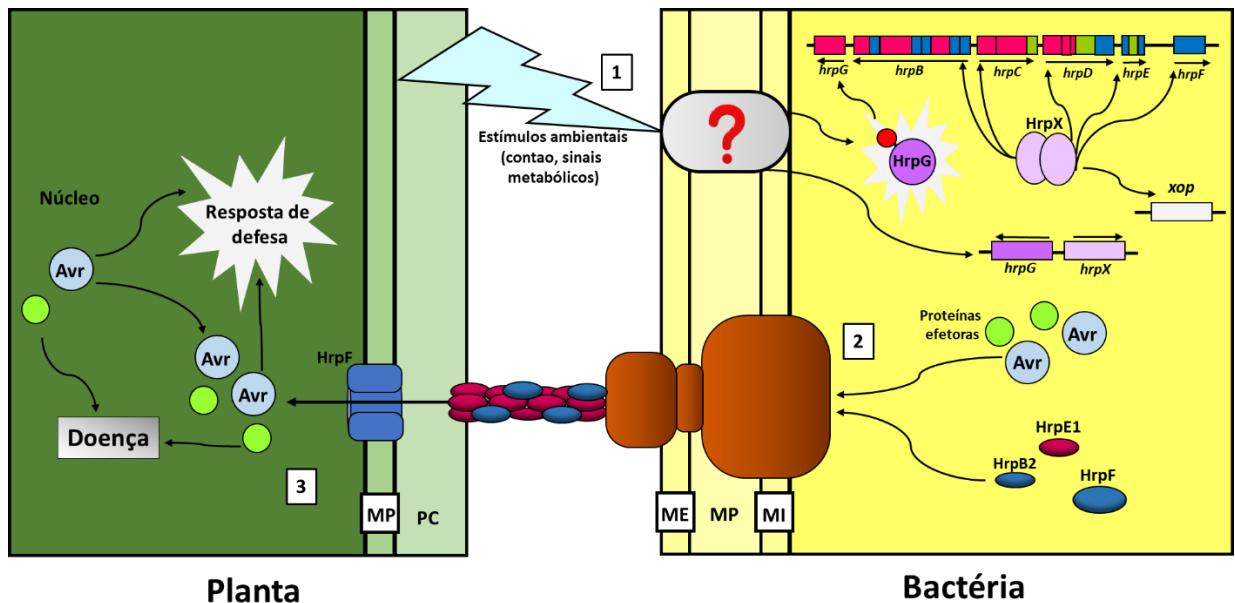


Figura 3- Modelo de regulação do gene *hrp* e SST3 em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). O sistema de transdução de sinal na parede e envelope bacteriano detecta estímulos ambientais, ativando HrpG. 2- Formação do aparato do SST3, através da membrana celular bacteriana, intervindo na secreção de Hrp e proteínas efectoras. 3- As proteínas efectoras (proteínas Avr) sendo direcionadas para diferentes locais na célula vegetal. (PC) Parede Celular; (MI) Membrana Interna, (ME) Membrana Externa, (MP) Membrana Plasmática. Fonte: Adaptado de Büttner e Bonas (2002).

Vários genes relacionados à patogenicidade e à virulência regulados por um homodímero HrpX em *Xanthomonas* spp. possuem um motivo de proteína denominado HTH (*helix-turn-helix*), que por sua vez interage com uma sequência consenso (TTCGC-N15-TTCGC) na região promotora, juntamente com componente que induz a expressão gênica na presença da planta denominado “PIP-box” (*Plant-Inducible Promoter box*) (Wengelin e Bonas, 1996; Wengelnik et al., 1996a; Li et al., 2012). Estudos em *R. solanacearum* detectaram um motivo semelhante (TTCG-N16-TTCG), com ação na regulação na expressão de genes *hrp* e proteínas efectoras (Cunnac et al., 2004).

A sequência PIP-box TTCGC-N15-TTCGC, identificada e descrita em diversos organismos, foi denominada sequência canônica ou PIP-box perfeito. Entretanto, constatou-se em *Xoo* a presença da sequência PIP-box canônica (TTCGC-N15-TTCGC) na região promotora (*upstream*) dos genes *hpa1* e *hrpB*, e uma sequência denominada PIP-box imperfeita (TTCGC...N15...TTCG**T**), havendo uma variação no último nucleotídeo da sequência consenso no gene *hpa2*. O gene *hpa1* possui produto gênico com funções semelhantes às proteínas harpin, presente nos fitopatógenos *P. syringae* e *Erwinia* ssp. e com a proteína PopA pertencente às *harpin-like* presente em *R. solanacearum*. (Wengelin e Bonas, 1996; Zhu et al., 2000). Em *Xoo*, Hpa1 contribui para a translocação de todos os efetores presentes em estirpes bacterianas, incluindo os efetores TAL, PthXo1 e AvrXa10 relacionados ao sistema de secreção tipo 3 (SST3) (Wang et al., 2018).

Uma varredura no genoma de *X. citri* 306 identificou a sequência PIP-box TTCG...N16...TTCG na região promotora de genes relacionados a patogenicidade e virulência (Da Silva et al., 2002). Um mapeamento através de ferramentas computacionais identificou em *R. solanacearum* o mesmo motivo TTCG...N16...TTCG conservado em regiões promotoras da bactéria, sendo chamadas de “hrp box”, sugerindo que os genes referentes às sequências analisadas estejam relacionados com a regulação via HrpX (Cunnac et al., 2004).

Estudos com enfoque nas sequências “PIP-box” despertaram grande interesse, principalmente após o sequenciamento completo do genoma de bactéria fitopatogênicas. Em *R. solanacearum* foi descrita alteração na expressão dos genes *hrpY* e *popABC*, controlados pela sequência “PIP-box” TTCG...N16...TTCG. Quando as bases conservadas TT foram deletadas confirmou-se a hipótese de que a ativação de *hrpYp* foi comprometida, enquanto outras substituições de nucleotídeos não conservados tiveram um efeito menor na atividade do promotor (Cunnac et al., 2004).

Carvalho et al. (2016) realizou um mapeamento no genoma da *X. citri* 306, identificando sequências promotoras “PIP-box” e genes associados utilizando técnicas de macroarranjos e cinética de infecção de *X. citri* em folhas de laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis*). Foram identificados cento e quatro genes, sendo trinta e dois genes diferencialmente expressos. Dentre estes, vinte seis apresentaram a sequência consenso “PIP-box” perfeita TTCGC....N15....TTCGC, sessenta e três a sequência imperfeita TTCGD....N15....TTCGD (**D** representa variação de bases entre A,T ou G),

e as quinze remanescente a sequência imperfeita TTCGC....N16....TTCGC. Este trabalho mostrou que promotores "PIP-box" podem tanto ativar (*upregulation*) como inibir (*downregulation*) a expressão gênica em *X. citri* 306 durante o processo infeccioso. Dessa forma, postula-se que os "PIP-box" desempenham um papel fundamental no sistema de regulação durante a interação planta - patógeno.

As sequências de nucleotídeos "PIP-box" podem ser marcadores eficazes para detecção de genes envolvidos na patogenicidade e virulência durante a interação planta-patógeno. Além disso, promotores "PIP-box" podem ser excelentes ferramentas para expressão de genes de interesse de uma forma controlada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e espécie vegetal

Neste estudo, foram utilizadas as cepas bacterianas *Escherichia coli* (*E. coli*) linhagem DH10B e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 (*X. citri* 306) provenientes do acervo do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FCAV/UNESP, e que se encontravam armazenadas a -80°C em meio criogênico contendo 20% de glicerol. O genoma da *X. citri* 306 foi sequenciado pelo projeto Genoma/FAPESP (Da Silva et al., 2002).

Os experimentos *in planta* foram realizados em plantas de laranja doce 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas em limão Cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck), mantidas em casa de vegetação. Para a execução dos experimentos, as plantas foram podadas e, após 40 dias, foram selecionadas as que apresentaram tamanho uniforme de expansão foliar em folhas jovens completamente expandidas na fase de desenvolvimento (V6) (Cifuentes-Arenas et al, 2018).

3.2 Análise “*in silico*” de genes contendo promotores induzíveis por planta “PIP-box”

O mapeamento dos genes da *X. citri* 306 contendo possíveis promotores “PIP-box” foi realizado com o auxílio da ferramenta de bioinformática “Perl”, pela bioinformata Renata Izabel Dozzi Tezza, durante o desenvolvimento do trabalho de Carvalho (2006) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da Unesp de Jaboticabal.

As sequências consenso das bases em posições degeneradas com intervalo de 15 ou 16 nucleotídeos posicionados de 10 a 1.000 pares de bases *upstream* do gene, foram utilizadas como critério para busca de “PIP-box” no genoma da bactéria *X. citri* (Figura 4). No consenso com intervalo de 15 nucleotídeos foram utilizados a 5ª base do consenso 5'-TTCGN...N15...TTCGN-3' para uma das fitas, assim degenerado para a fita complementar a 1ª base do consenso 5'- NCGAA...N15...NCGAA -3'. Todavia, para o intervalo de 16 nucleotídeos utilizou-se apenas o consenso 5'- GCGAA...N16...GCGAA-3' na fita senso, e 5'- TTCGC...N16...TTCGC -3' para a fita

complementar da molécula de DNA (Figura 5). As sequências “PIP-box” putativas escolhidas e testadas neste trabalho foram as presentes nos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 de *X. citri* 306.

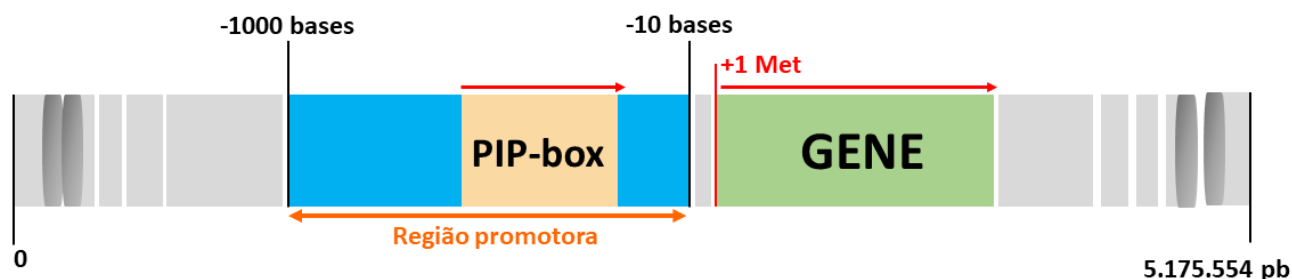


Figura 4- Esquema geral da localização do “PIP-box” no genoma de *X. citri* 306, representando a posição do PIP-box na sequência promotora em um gene. Fonte: Adaptado Carvalho, 2006.

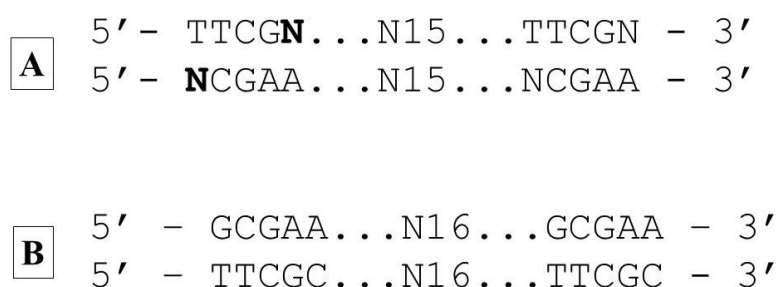


Figura 5– Sequências “PIP-box” mapeadas no genoma de *X. citri* 306. (A) Sequência consenso com bases degeneradas (N) com intervalo de 15 nucleotídeos; (B) Sequência consenso com intervalo de 16 nucleotídeos. Fonte: Carvalho, 2006.

3.3 Amplificação das sequências “PIP-box” por PCR

A partir da sequência da região intergênica contendo a sequência “PIP-box” do gene, disponível no INRA (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/xansp.cgi>) (Tabela 1), foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Tabela 2) para sua amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de DNA genômico de *X. citri* (Apêndice A - FS1, FS2, FS3), utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade

("high fidelity"). O planejamento e simulação para análise *in silico* dos *primers* foi feito utilizando o software SnapGene.

Tabela 1- Região e distância do PIP-box presente na região 3' não traduzida dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 de *X. citri* 306.

Identidade do gene	Produto gênico	Consenso PIP	Distância do "PIP"
XAC0360	glicerol-3-fosfato desidrogenase	nCGAA...N15...nCGA	38
XAC2370	proteína possivelmente secretada	TTCGn...N15...TTCGn	227
XAC2922	HrpW	TTCGn...N15...TTCGn	165

Tabela 2- Oligonucleotídeos desenhados para clonar a região PIP-box presente na região 3' não traduzida dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 de *X. citri* 306.

Sequência PIP-box putativos	Sequência (5'- 3', Sítio de restrição)*	Sítio de restrição**	Tamanho do fragmento (pb)
PIP-box XAC0360	F:GG <u>ACTAGT</u> GCCGATCTGCGTGGCGAAC R:TCATGA <u>ATTCC</u> GGTGCCTCCGTCAGGG	<i>Spe</i> I <i>Eco</i> RI	149
PIP-boxXAC2370	F:GG <u>ACTAGT</u> TACCAACATACCAACATC R:TCATGA <u>ATTCT</u> CTTAACCTGTATGTTTT	<i>Spe</i> I <i>Eco</i> RI	320
PIP-boxXAC2922	F:GG <u>ACTAGT</u> CATCGCGTCGAAGCTCAT R:TCATGA <u>ATTCA</u> ATGATCGTGTCTGGAAAA	<i>Spe</i> I <i>Eco</i> RI	393

*Primers com a sequência em destaque dos sítios de restrição. **Sítios de restrição. F: iniciador direto (*forward*); R: iniciador reverso (*reverse*).

3.4 Obtenção dos vetores plasmidiais contendo GFP (pRMF-GFP) sob o controle dos promotores "PIP-box" e de linhagens de *X. citri* geneticamente modificadas contendo os plasmídios

3.4.1 Construção dos vetores

O vetor pRMF-GFP, desenvolvido em nosso laboratório (LBM), é originário do plasmídeo replicativo pLAC2, resistente à gentamicina, e desenvolvido para a expressão de proteínas em *Xanthomonas citri* induzidas por arabinose e que possui 7537 pares de base (Sukchawalit et al., 1999; Lacerda et al., 2017). Para a construção

do vetor pRMF-GFP, o plasmídeo pLAC2 foi digerido com as enzimas de restrição *SpeI* e *HindIII* para a remoção dos genes *araC*, para *parB*, *acp* e *tap1479*. A seguir, uma sequência de nucleotídeos contendo a sequência do PIP-box do gene XAC0416 de *X. citri* 306 e sítio de restrição para *SpeI* na extremidade 5', fusionada à extremidade 5' do gene *gfp* de *Aequorea victoria* contendo sítio de restrição na extremidade 3', foi digerida com *SpeI* e *HindIII* e clonada no vetor pLAC2 digerido com as mesmas enzimas. A construção resultante foi o vetor plasmidial pRFM-GFP (Figura 6), com 5841 pares de bases, tendo como marcador de seleção a gentamicina e contém um promotor de *X. citri* 306 induzível por planta ("PIP-box") que está associado ao gene XAC0416 e cuja funcionalidade já foi validada (Carvalho et al., 2016).

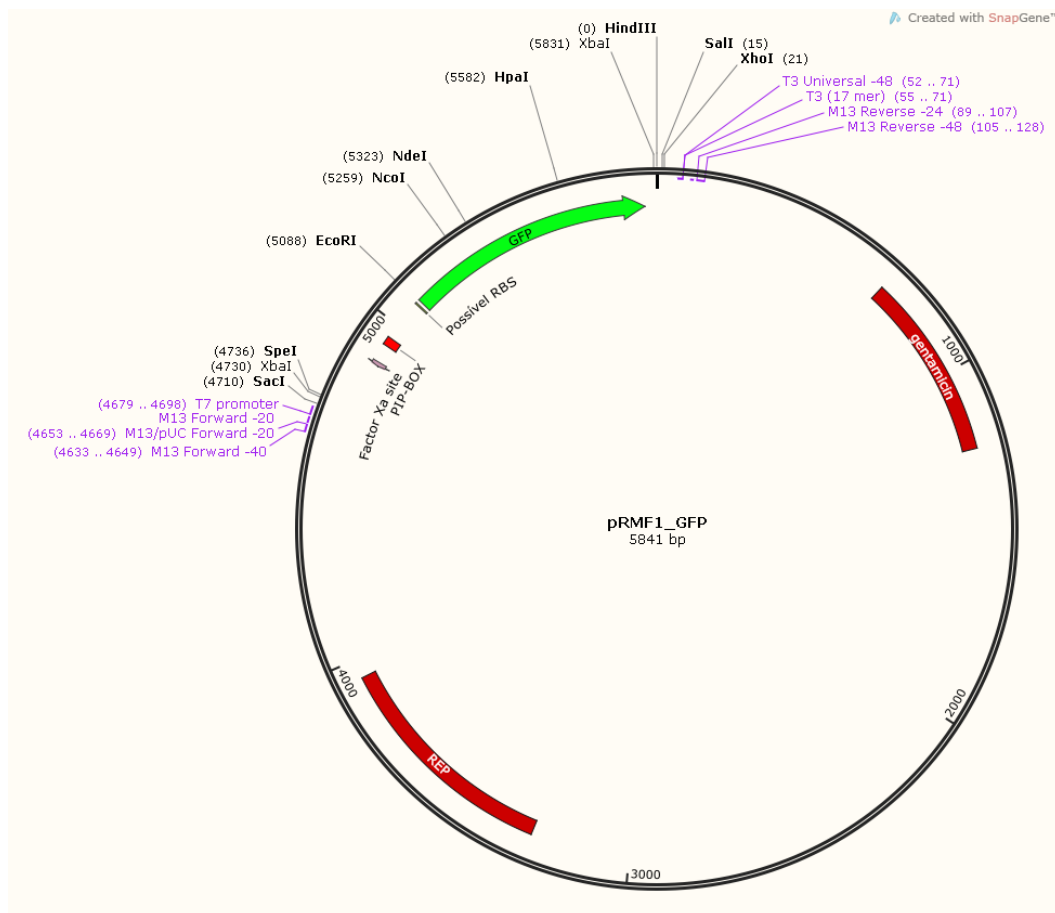


Figura 6: Mapa do vetor pRMF-GFP. O sítio múltiplo de clonagem (*polylinker*) é composto *SpeI*, *EcoRI*, *HindIII*, dentre outras enzimas de restrição. **Fonte:** Dados não publicados

As sequências “PIP-box” putativas dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922, após amplificação por PCR e digestão com as enzimas de restrição *SpeI* e *EcoRI* (Figura 7), foram clonadas no vetor pRMF-GPF também digerido com estas duas enzimas através da ligação pela T4 DNA ligase (Promega). Dessa maneira, a sequência “PIP-box” do gene XAC0416 como controle positivo contendo 25 pares de base presente no vetor pRMF1-GFP foi substituída pelas outras sequências “PIP-box” putativas, dando origem aos vetores pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 e pRMF1-GFP2922.



Figura 7- Esquema geral mostrando os sítios múltiplos de clonagem no vetor pRMF1-GFP, em que está clonado o gene *gfp*. As enzimas utilizadas estão em destaque com quadrado vermelho.

A reação de digestão do vetor pRMF1-GFP foi feita de forma sequencial com tampão específico para cada enzima (*SpeI* e *EcoRI*) na concentração de 1X em relação ao volume final (50 µL), cinco unidades de cada enzima (Promega) para cada 1 µg de DNA do vetor e água deionizada estéril para completar o volume. Os produtos de PCR das sequências “PIP-box” putativas dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 foram digeridas da mesma maneira. Após a digestão, o plasmídeo e os produtos de PCR foram visualizados no gel de agarose 0,8%. Os fragmentos de interesse (pRMF1-GFP e “PIP-box” da XAC0360, XAC2370 e XAC2922) foram purificados e eluídos do gel de agarose utilizando o Kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos e vetor (5.848 pb) purificados foram submetidos à reação de ligação.

A reação de ligação dos fragmentos de interesse (“PIP-box” da XAC0360, XAC2370 e XAC2922) com o vetor pRMF1 contendo o gene repórter *gfp* foi realizada utilizando a DNA ligase (Promega). Para o “PIP-box” XAC0360 utilizou-se uma proporção molar de vetor:inserto de 1:1 e 1:2, ou seja, foi utilizado 50 µg do vetor pRMF1-GFP e 4,64 ng e 9,28 ng do “PIP-box” XAC0360. Para as demais reações de ligação, optou-se por uma proporção molar de vetor:inserto de 1:3 e 1:5. Dessa maneira, foram utilizados 50 µg do vetor pRMF1-GFP, combinado com 8,73 ng e 14,55 ng do “PIP-box” XAC2370 e 10,74 ng e 17,9 ng do “PIP-box” XAC2922. A reação de ligação, em um volume final de 10 µL e 3 unidades de DNA ligase, foi mantida a 12 °C por 12 horas, seguida a 14°C por 2 horas posteriormente a 4°C até o momento da utilização.

3.4.2 Obtenção de *Escherichia coli* contendo vetores plasmidiais pRMF-GFP “PIP-box” e purificação dos plasmídios

Cada reação de ligação foi utilizada para transformar por eletroporação células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B. Para cada transformação foram utilizados 50 µL de células eletrocompetentes e 2 µL da reação de ligação (pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 ou pRMF1-GFP2922) e essa mistura foi submetida ao eletroporador Gene Pulser II (Biorad) nas condições de: 1,5 KV; 50 µF e 200 Ω. Em seguida, foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL e foi adicionado 1 mL de meio *Super Optimal Broth* (SOB) (2 % de triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM

de MgCl₂ e 10 mM MgSO₄, pH 7,5); 40 µL de glicose 20% e 40 µL de MgCl₂ 1M, seguido por incubação a 37°C sob agitação de 220 rpm por uma hora (Skaker New Brunswick). Após este período, um volume de 100 µL e de 200 µL foram plaqueados em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) (10 % tripton, 5 % extrato de levedura, 10 % NaCl, pH 7,4) acrescido de gentamicina (10 µg/mL), sendo então incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas. Foram coletadas e cultivadas colônias em meio de cultura LB líquido acrescido de gentamicina (10 µg/mL), num volume de aproximadamente 3 mL, a 37°C por 8 horas, sob agitação constante de 250 rpm (Skaker New Brunswick). A seguir, foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a confirmação das clonagens, o DNA plasmidial foi utilizado para reação de PCR com pares de iniciadores específicos (Tabela 1) para as sequências PIP-box e com pares iniciadores que se anelam no vetor plasmidial (M13/pUC *Forward* -20 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') e M13/pUC *Reverse* -24 (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'). A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega), com tampão específico para um volume final de 50 µL, seguindo as instruções do fabricante. Após a reação de PCR os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1,2%.

O DNA plasmidial foi submetido ao sequenciamento no sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer [Applied Biosystems, Foster City, California (CA)] para confirmar a exatidão da sequência de bases em relação à sequência presente no genoma. Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento foram o M13/PUC *Forward* -20. Os plasmídios com a sequência correta do “PIP-box” à montante da sequência codificadora da GFP foram utilizados para transformar células de *X. citri* isolado 306.

3.4.3 Obtenção de *X. citri* contendo vetores pRMF1-GFP

A obtenção de *X. citri* competente, a eletroporação para inserção dos plasmídios e a seleção dos recombinantes foram realizados como descrito por Do Amaral et al. (2005). Foram utilizados 2 µL de cada plasmídio e 50 µL de célula eletrocompetente de *X. citri*. A mistura foi submetida ao eletroporador Gene Pulser II (Biorad) utilizando um pulso elétrico de 2,5 KV, 200 Ω, etempo de condução de 2,6

milissegundos (ms). Em seguida, a mistura foi incubada a 29°C por 4 horas, a 250 rpm (Skaker New Brunswick). Em seguida, um volume de 100 µL e de 200 µL foram plaqueados em placas de Petri contendo meio *Nutrient Broth Yeast Extract* (NBY) (10 % triptona, 5 % extrato de levedura, 10 % NaCl, pH 7,4) acrescido de gentamicina (10 µg/mL), sendo então mantidas em incubadora (BOD) a 29°C por 48 horas. As colônias foram coletadas e cultivadas em meio de cultura NYG líquido acrescido de gentamicina (10 µg/mL), num volume de aproximadamente 3 mL, por um período de 16 horas e sob agitação constante de 250 rpm (Skaker New Brunswick). A seguir, foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O DNA dos clones foi extraído e a confirmação da clonagem foi realizada através da reação de PCR utilizando os *primers* M13/pUC *Forward* -20 M13/pUC *Reverse* -24 que se anelam no vetor.

Os clones de *X. citri* contendo os vetores pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 e pRMF1-GFP2922 foram então utilizados para os experimentos “*in vitro*” e “*in planta*”.

3.5 Análise da força de expressão de promotores induzíveis pela planta (PIP-box)

3.5.1 Análise de expressão dos diferentes “PIP-box” *in vitro*

Para as análises *in vitro* foi utilizado o meio indutor de patogenicidade XVM2 (10 mM (NH₄)₂SO₄; 0,16 mM KH₂PO₄; 0,3 mM K₂HPO₄; 10 mM sacarose; 10 mM frutose; 0,03% casaminoácidos; 20 mM NaCl; 5 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂; 0,01 mM FeSO₄; pH 6,7) (Wengelnik et al., 1996b). O meio XVM2 foi desenvolvido para a indução de genes *hrp* e possui composição semelhante ao meio XVM1 (20 mM NaCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 5 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂; 0,16 mM; KH₂PO₄; 0,32 mM K₂HPO₄; 10 mM sacarose; 2 µg metionina; pH 6,5) (Schulte & Bonas, 1992), entretanto ambos se diferenciam já que o meio XVM2 possui frutose e casaminoácidos ao invés de metionina (Wengelnik et al., 1996).

Para indução *in vitro*, células de *X. citri* *wild-type* e das bactérias transformadas contendo as construções repórter (pRMF1-GFP0416, pRMF1-GFP0360, pRMF1-

GFP2370 e pRMF1-GFP2922) foram estricadas em meio NYG com ágar em placas de Petri acrescido de gentamicina (10 µg/mL), quando necessário, e mantidas em BOD a 29°C por 48 horas. Em seguida, uma massa de célula foi transferida para 20 mL de meio NYG (pré-inóculo) e mantida em *shaker* a 29°C por 16 horas, a 250 rpm (Skaker New Brunswick), quando então as suspensões bacterianas foram ajustadas para uma DO_{600nm} de 0,6 e inoculados 2 mL da *X. citri wild-type* e de cada transformante em 20 mL dos meios XVM2 (mimetiza o espaço apoplástico da planta) e NYG (meio rico), sendo então cultivados em *shaker* a 29°C a 250 rpm por 20 horas (Skaker New Brunswick).

As células induzidas foram fixadas imediatamente e utilizadas para a montagem de lâminas, seguido pela visualização no microscópio confocal.

3.5.2 Análise de expressão dos diferentes “PIP-box” *in planta*

As células de *X. citri wild-type* e os transformantes pRMF1-GFP0416, pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 e pRMF1-GFP2922 foram plaqueadas em meio NYG sólido, complementado de gentamicina (10 µg/mL) quando necessário, e mantidas em BOD a 29°C por 48 horas. Cada transformante foi individualmente coletado da placa com uma alça de platina. A concentração celular foi ajustada para uma DO_{600nm} de 0,3, correspondendo a 10⁸ UFC/mL, utilizando água deionizada estéril em um frasco estéril de 50 mL.

As inoculações foram feitas com uma seringa hipodérmica de 1 mL sem agulha. As suspensões bacterianas de cada isolado foram aplicadas na parte abaxial de folhas jovens totalmente expandidas, no estágio V6 (Cifuentes-Arenas et al., 2017), de laranja doce ‘Pêra’, utilizando o método de infiltração por pressão, garantindo o preenchimento completo do limbo foliar.

As plantas foram mantidas em um laboratório de segurança projetado para manejo e manipulação de bactérias fitopatogênicas. O laboratório possui um sistema controlado de temperatura, luminosidade e umidade, proporcionando ótimas condições para a planta e microrganismo em estudo. O sistema em questão incorpora uma filtragem absoluta do ar com filtros EPA, aliada a um mecanismo que gera

pressão negativa. Essa abordagem visa impedir efetivamente qualquer escape de organismos fitopatogênicos para o meio ambiente.

A recuperação das células bacterianas a partir das folhas foi efetuada 5 dias após a inoculação, empregando o método de exsudação. Para este propósito, aproximadamente 20 folhas foram coletadas, acondicionadas em envelopes de papel alumínio estéril e imediatamente submersas em gelo. A seguir, as folhas foram finamente picadas com um estilete estéril e imersas em 200 mL de água deionizada estéril e gelada em um béquer de vidro de 500 mL, seguido por agitação suave por 20 minutos com o béquer imerso em banho de gelo. Os resíduos foliares foram separados por filtração em três camadas de gaze, e as células bacterianas exsudadas foram recuperadas por centrifugação a 9.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Os exsudados foram prontamente fixados, conforme detalhado a seguir, visando a análise de fluorescência em microscopia confocal.

3.5.3 Preparação das lâminas para análise de fluorescência

As células bacterianas foram fixadas para preservar a fluorescência gerada pela proteína GFP. As amostras foram ajustadas para uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0,6 e centrifugadas, sendo 600 µL de cada isolado a 16.000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se 250 µL de paraformaldeído a 4%, seguido de uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente para a fixação das amostras. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 10 minutos a 20°C. O pellet resultante foi lavado com 100 µL de PBS 1X (*Phosphate-buffered saline*, pH 7,4) e submetido a centrifugação nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, as amostras foram então ressuspensas em 20 µL de PBS 1X.

Para a montagem das lâminas, foram utilizados 10 µL de cada isolado combinado com 10 µL de meio de montagem aquoso *Fluoromount* (Sigma). A lamínula foi posicionada sobre a mistura, e as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por 16 horas para a secagem. Após a secagem, as lâminas foram imediatamente visualizadas no microscópio confocal.

3.5.4 Quantificação da fluorescência emitida pelos diferentes promotores “PIP-box”

A intensidade de fluorescência foi avaliada calculando a fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) conforme descrito por Ansari et al. (2013). Cada lâmina foi fotografada em três regiões distintas e, em seguida, o contorno de três áreas de cada imagem foi delimitado utilizando a ferramenta de seleção de pixels no software Fiji (Schindelin et al., 2012). A média do background foi determinada usando a mesma ferramenta. O CTF foi calculado usando a seguinte fórmula: $CTF = \text{densidade integrada do esferóide} - (\text{área} \times \text{fluorescência média do } background)$.

As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio confocal Leica Sp8 com objetiva de 40X (zoom 3,16x) e um laser de 488 nm para detecção de GFP (GFP Ex./Em.: 488/525 nm). Configurações consistentes foram mantidas para capturar todas as amostras. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8 (Windows). Para análise de cada clone foi utilizado o teste t de Student e para análise comparativa das construções contendo os diferentes promotores PIP-box foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey após uma análise de variância (ANOVA) unifatorial, com nível de significância estabelecido em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos vetores contendo as sequências PIP-box putativas

O vetor pRMF1-GFP (5.841 pb), que contém a sequência PIP-box do gene XAC0416 de *X. citri* 306, foi digerido com as endonucleases de restrição *SpeI* e *EcoRI*. A análise em gel de agarose (Figura 8) mostrou que a digestão liberou um fragmento de 352 pb (correspondente à sequência PIP-box da XAC0416) e outros dois fragmentos, sendo o menor deles o vetor aberto sem a sequência PIP-box da XAC0416. O fato de que ainda aparece uma banda correspondente a uma das bandas do vetor não digerido, indica que a digestão foi parcial, mas o suficiente para obter o vetor sem a sequência da XAC0416.

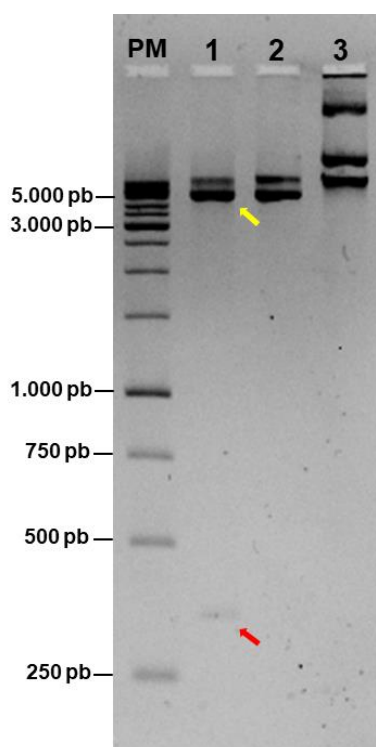


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) da digestão do vetor pRMF1-GFP com as enzimas de restrição *SpeI* e *EcoRI*. PM: Padrão Molecular (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas (Cat. Nº #SM0311/2/3)). 1: pRMF1-GFP0416 digerido com *SpeI* e *EcoRI*, 2: pRMF1-GFP0416 digerido apenas com *SpeI*. 3: pRMF1-GFP0416 não digerido. A seta amarela indica a banda correspondente ao vetor pRMF1-GFP sem a sequência PIP-box do gene XAC0416 de *X. citri* 306, enquanto a seta vermelha aponta para a banda correspondente à sequência PIPbox XAC0416.

O vetor pRMF1-GFP, sem a sequência PIP-box do gene XAC0416 e *X. citri* 306, com tamanho de 5.481 pb, foi recuperado do gel de agarose e purificado utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, esse vetor foi utilizado para clonagem dos potenciais "PIP box" pertencentes aos genes XAC0360 (149 pb), XAC2370 (320 pb) e XAC2922 (393 pb) também digeridos com as endonucleases de restrição *SpeI* e *EcoRI* após amplificação por PCR (Figura 9).

A amplificação dos PIP-box a partir do DNA genômico de *X. citri* 306 foi realizada através da enzima *High-Fidelity* DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific) utilizando um termociclador (PTC-100® Thermal Cycler – BIO RAD) e, após eletroforese, o produto foi eluído e purificado seguindo o mesmo protocolo utilizado para a purificação do vetor pRMF1-GFP. Após a ligação dos fragmentos digeridos no vetor pRMF1-GFP, os vetores recombinantes pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 e pRMF1-GFP2922 foram inseridos por eletroporação em células competentes de *E. coli* DH10B, como descrito em Materiais e Métodos.

A confirmação da presença dos dos vetores recombinantes foi realizada através da amplificação dos "PIP-box" utilizando os primers do plasmídio (M13/pUC – 20 *forward* e M13/pUC -24 *reverse*) e os primers específicos, uma vez que *E. coli* não possui a sequência desses promotores em seu genoma (Figura 10). Os resultados mostraram que os amplicons possuem o tamanho esperado, ou seja, XAC0360 (149 pb) (Figura 10 A), XAC2370 (320 pb) (Figura 10 B1) e XAC2922 (393 pb) (Figura 10 C1) quando amplificado com os primers específicos de cada sequência PIP-box e XAC0360 (1.071 pb) (Figura 10 A), XAC2370 (1.169 pb) (Figura 10 B2) e XAC2922 (1.325 pb) (Figura 10 C2) pb quando amplificado com os primers do vetor plasmídial.

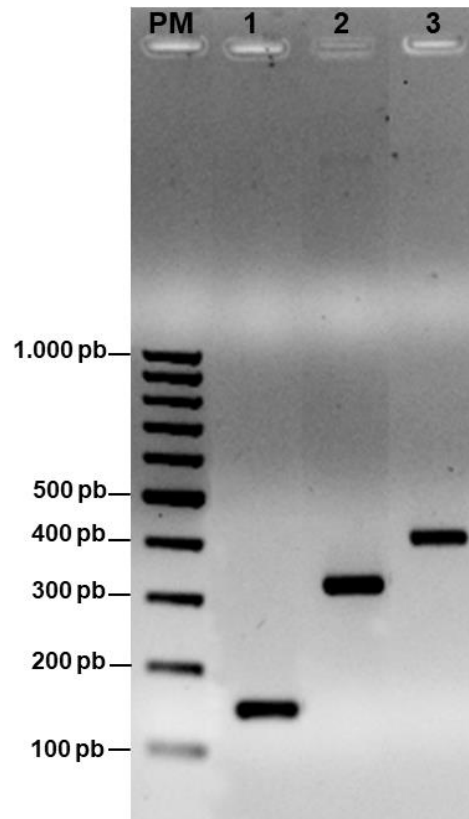


Figura 9- Eletroferese em gel de agarose (1,5%) dos fragmentos de PCR dos “PIP-box” putativos dos genes XAC0360, XAC2370, XAC2922 de *X. citri* 306. PM: Padrão de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Cellco (Cat. Nº MMK-133S)). 1: PIP-box XAC0360. 2: PIP-box XAC2370. 3: PIP-box XAC2922.

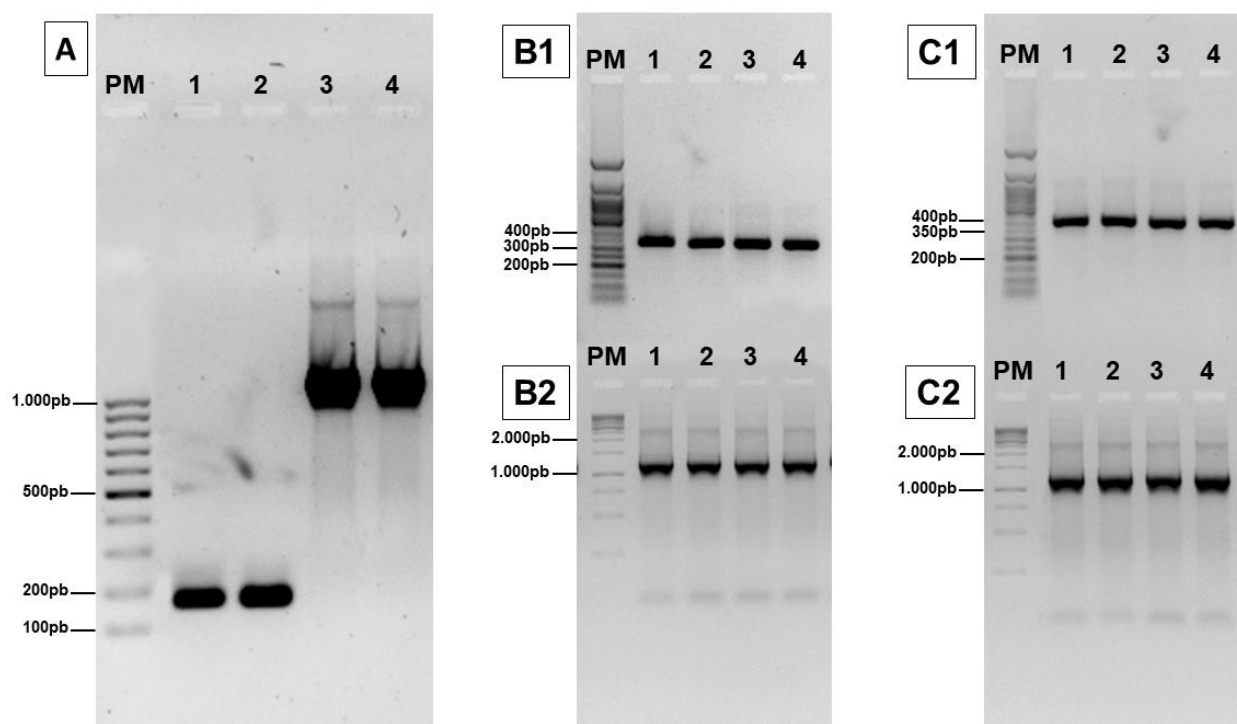


Figura 10- Eletroferese em gel de agarose (1,0%) dos fragmentos da amplificação por PCR das regiões promotoras dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 presentes nos vetores recombinantes. A: pRMF1-GFP0360. PM: Padrão de peso molecular (100 pb Plus DNA Ladder, Cellco (MMK-133S)); 1-2: Clones amplificados com os primers específicos; 3-4: os mesmos clones amplificados com os primers do plasmídio (M13/pUC – 20 *forward* e M13/pUC -24 *reverse*). B1: pRMF1-GFP2370. PM: Padrão de peso molecular (50 pb Plus DNA Ladder, Cellco (Cat. Nº MMK-132S)) 1-4: Clones amplificados com os primers específicos. B2: PM: Padrão de peso molecular (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas (Cat. Nº #SM0311/2/3)) os mesmos clones de B1 amplificados com os primers do plasmídio (M13/pUC – 20 *forward* e M13/pUC -24 *reverse*). C1: pRMF1-GFP2922. PM: Padrão de peso molecular (50 pb Plus DNA Ladder, Cellco (Cat. Nº MMK-132S)) 1-2: Clones amplificados com os primers específicos. C2: PM: Padrão de peso molecular (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas (Cat. Nº #SM0311/2/3)) os mesmos clones de C1 amplificados com os primers do plasmídio (M13/pUC – 20 *forward* e M13/pUC -24 *reverse*).

Confirmada a construção por PCR o DNA foi enviado para sequenciamento, o qual confirmou a integridade do vetor contendo o gene *gfp* e as regiões promotoras. Para o sequenciamento foi utilizado o kit “BigDye Terminator” (Applied Biosystem) e os primers M13/pUC – 20 *forward* e M13/pUC -24 *reverse*, que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pRMF1-GFP. As sequências de bases obtidas no sequenciamento foram submetidas à análise na interface BLASTn e BLASTx, contra o banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os dados resultantes confirmaram que os insertos correspondiam às sequências promotoras

dos genes XAC0360, XAC2370 e XAC2922 de *X. citri* 306. O sequenciamento mostrou claramente a metionina inicial da proteína GFP fusionada ao sítio de restrição da endonuclease *EcoRI*. As construções virtuais dos vetores, elaboradas com o auxílio do *software* SnapGene, estão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13.

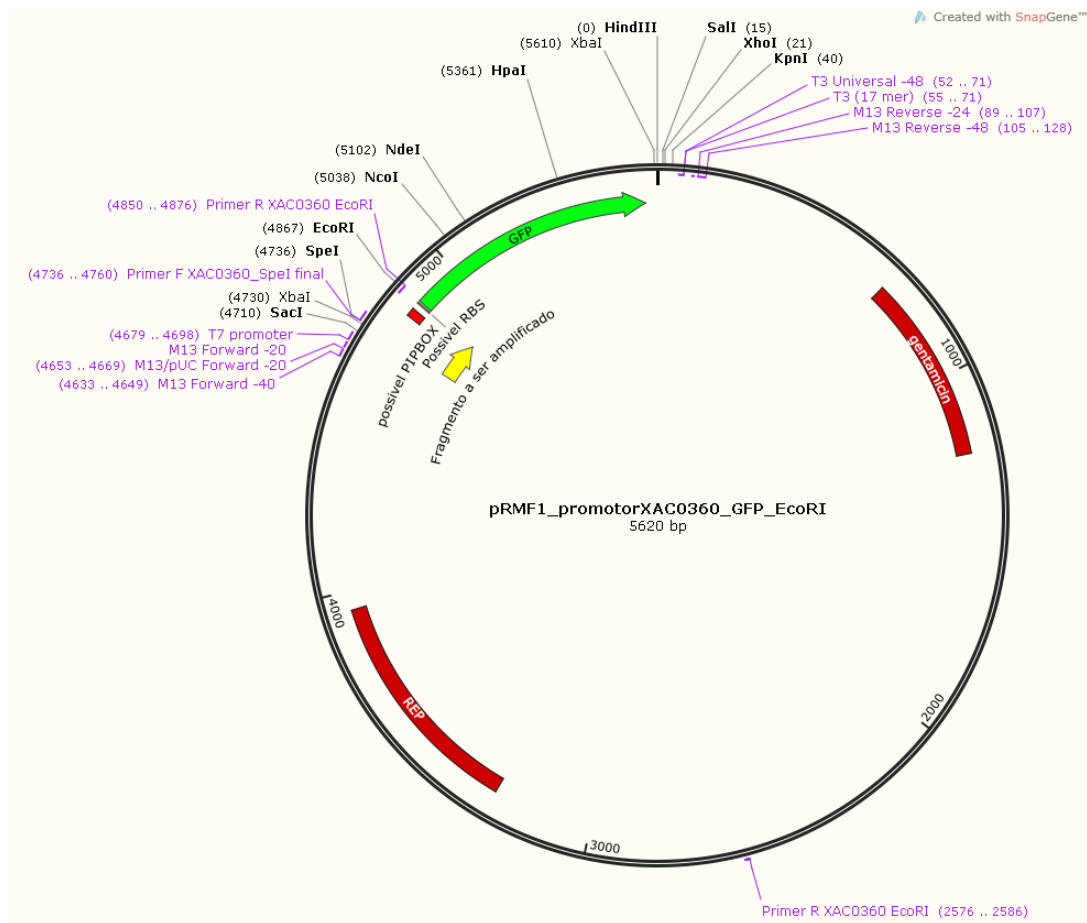


Figura 11- Mapa do vector pRMF1-GFP0360. A Figura mostra o PIP-box *upstream* ao gene repórter *gfp*, o sítio múltiplo de clonagem (*SacI*, *SpeI*, *EcoRI*, etc), o local dos primers M13/pUC forward -20, M13/pUC forward -40, M13/pUC reverse -24, M13/pUC reverse -48, os promotores T7 e T3, o sítio de replicação em *X. citri* e o sítio de resistência à gentamicina.

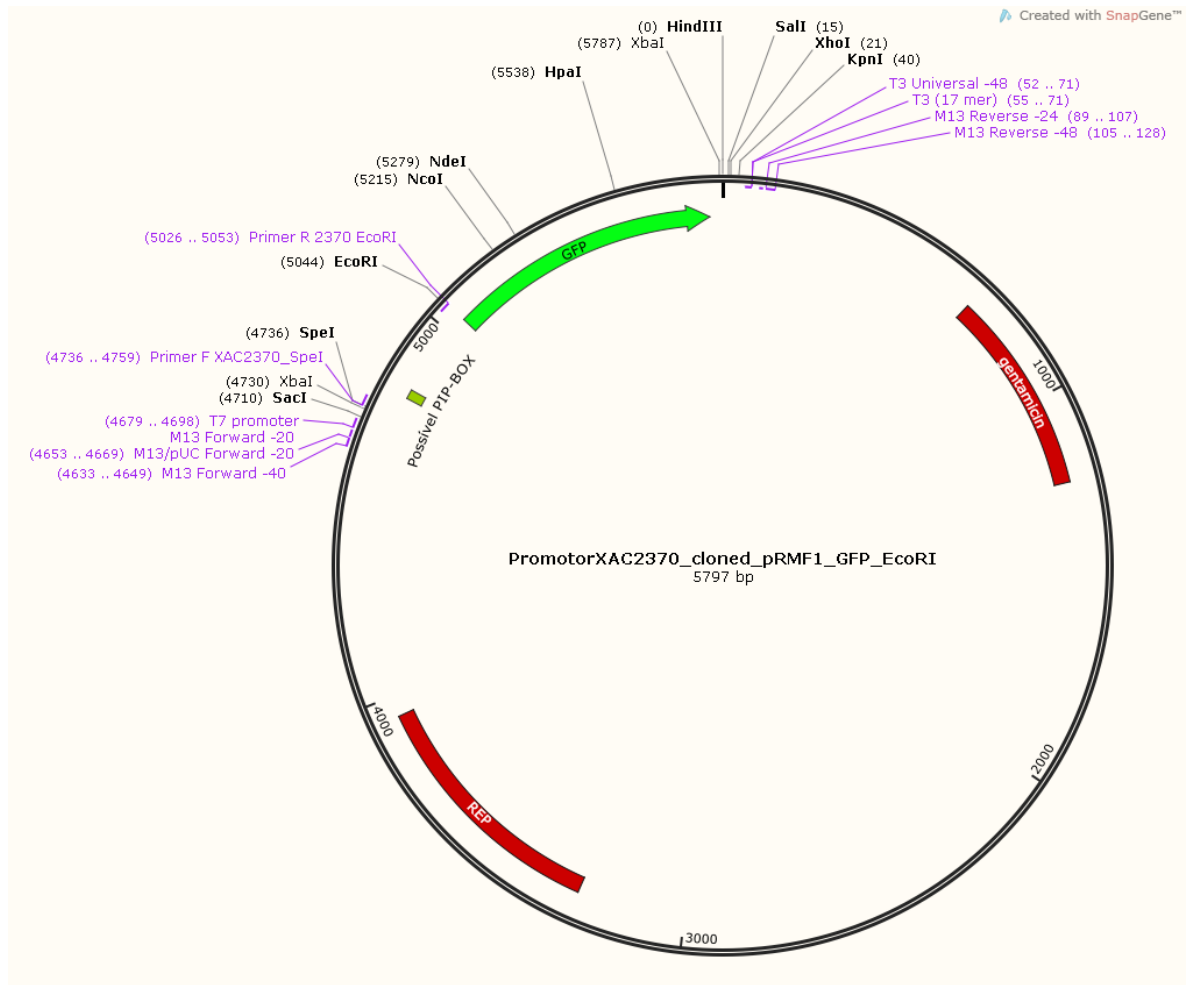


Figura 12- Mapa do vector pRMF1-GFP2370. A Figura mostra o PIP-box *upstream* ao gene repórter *gfp*, o sítio múltiplo de clonagem (*SacI*, *SpeI*, *EcoRI*, etc), o local dos *primers* M13/pUC *forward* -20, M13/pUC *forward* -40, M13/pUC *reverse* -24, M13/pUC *reverse* -48, os promotores T7 e T3, o sítio de replicação em *X. citri* e o sítio de resistência à gentamicina.

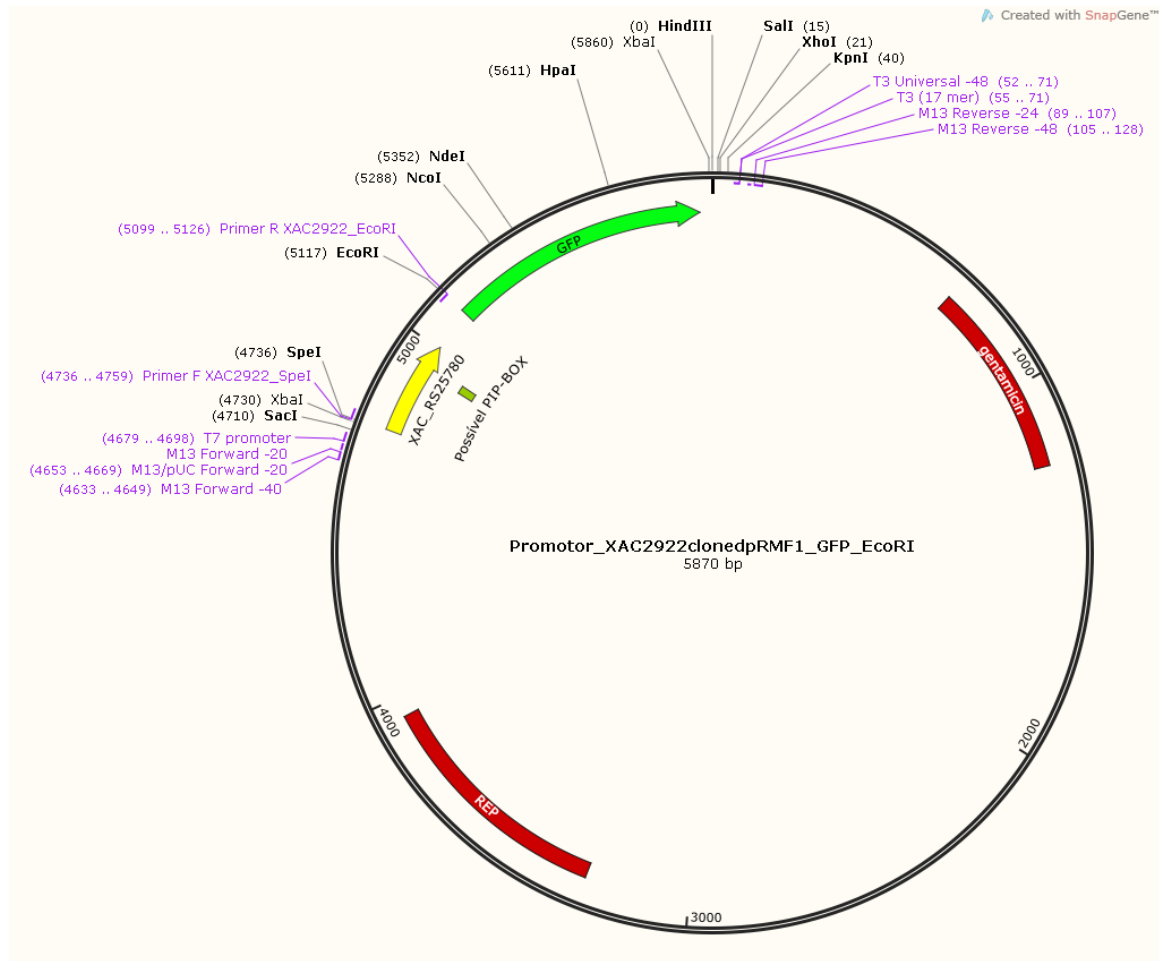


Figura 13- Mapa do vector pRMF1-GFP2922. A Figura apresenta mostra o PIP-box *upstream* ao gene repórter *gfp*, o sítio múltiplo de clonagem (*SacI*, *SpeI*, *EcoRI*, etc), o local dos *primers* M13/pUC *forward* -20, M13/pUC *forward* -40, M13/pUC *reverse* -24, M13/pUC *reverse* -48, os promotores T7 e T3, o sítio de replicação em *X. citri* e o sítio de resistência à gentamicina.

Após verificar que as construções estavam corretas, o DNA plasmidial foi introduzido em células competentes de *X. citri* 306 por meio de eletroporação. As colônias portadoras das construções foram meticulosamente coletadas e isoladas do meio NYG sólido, suplementado com o antibiótico gentamicina. As colônias de *X. citri* que abrigavam as construções pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 e pRMF1-GFP2922 foram confirmadas por PCR utilizando os primers do vetor plasmídial (dado não mostrado) e selecionadas para a avaliação da expressão do gene repórter *gfp* em condições tanto não infectante quanto infectante, por meio da análise de fluorescência utilizando microscópio confocal.

4.2 Análise de microscopia de fluorescência de GFP

4.2.1 Após crescimento em meios de cultura (*In vitro*)

A quantificação da expressão do gene repórter *gfp*, conforme descrito nos Materiais e Métodos, foi realizada mediante a mensuração da intensidade total corrigida da fluorescência da proteína GFP. Esse processo envolveu o delineamento de três áreas por meio da ferramenta de seleção de pixels no *software* Fiji. Para executar essa análise, foram utilizados 20 µL de suspensão bacteriana (DO_{600nm}= 0,3) contendo *X. citri wild-type* e cepas transformadas com os plasmídios pRMF1-GFP0416 (controle positivo já validado em nosso laboratório), pRMF1-GFP0360, pRMF1-GFP2370 e pRMF1-GFP2922. Os isolados foram cultivados em meios NYG e XVM2 e também obtidos a partir da exsudação da folha da laranja doce 'Pêra' após 5 dias de inoculação. Foi estabelecida uma padronização em relação ao volume e concentração de bactérias em solução para garantir que essa variável não influenciasse na determinação da intensidade de fluorescência calculada.

A análise *in vitro* demonstrou que após vinte horas de crescimento em meio de cultura a cepa pRMF1-GFP0416 (Figura 14A) exibiu baixa fluorescência evidente, ao contrário do que ocorreu quando cultivada em meio indutor XVM2 (Figura 14B). Por outro lado, a cepa pRMF1-GFP0360 (Figura 15) e a cepa pRMF1-GFP2370 (Figura 16) tiveram a expressão de GFP induzida no meio de indução à virulência XVM2 e também no meio rico NYG. A cepa pRMF1-GFP2922 (Figura 17) apresenta expressão do gene repórter apenas quando na presença do meio XVM2. Este resultado sugere que a expressão de GFP esteja sendo controlada apenas pelo promotor PIP-box XAC2922. Como esperado, a *X. citri* 306 *wild-type* (controle negativo) não apresentou fluorescência em ambos os meios de cultura (Figura 18). Entretanto, a fluorescência observada nas cepas contendo pRMF1-GFP0360 e pRMF1-GFP2370 em meio NYG não era esperado. Uma possível explicação seria que nas suas sequências de nucleotídeo, além da região PIP-box poderia haver a sequência de um outro promotor ativado por ambos os meios de cultura.

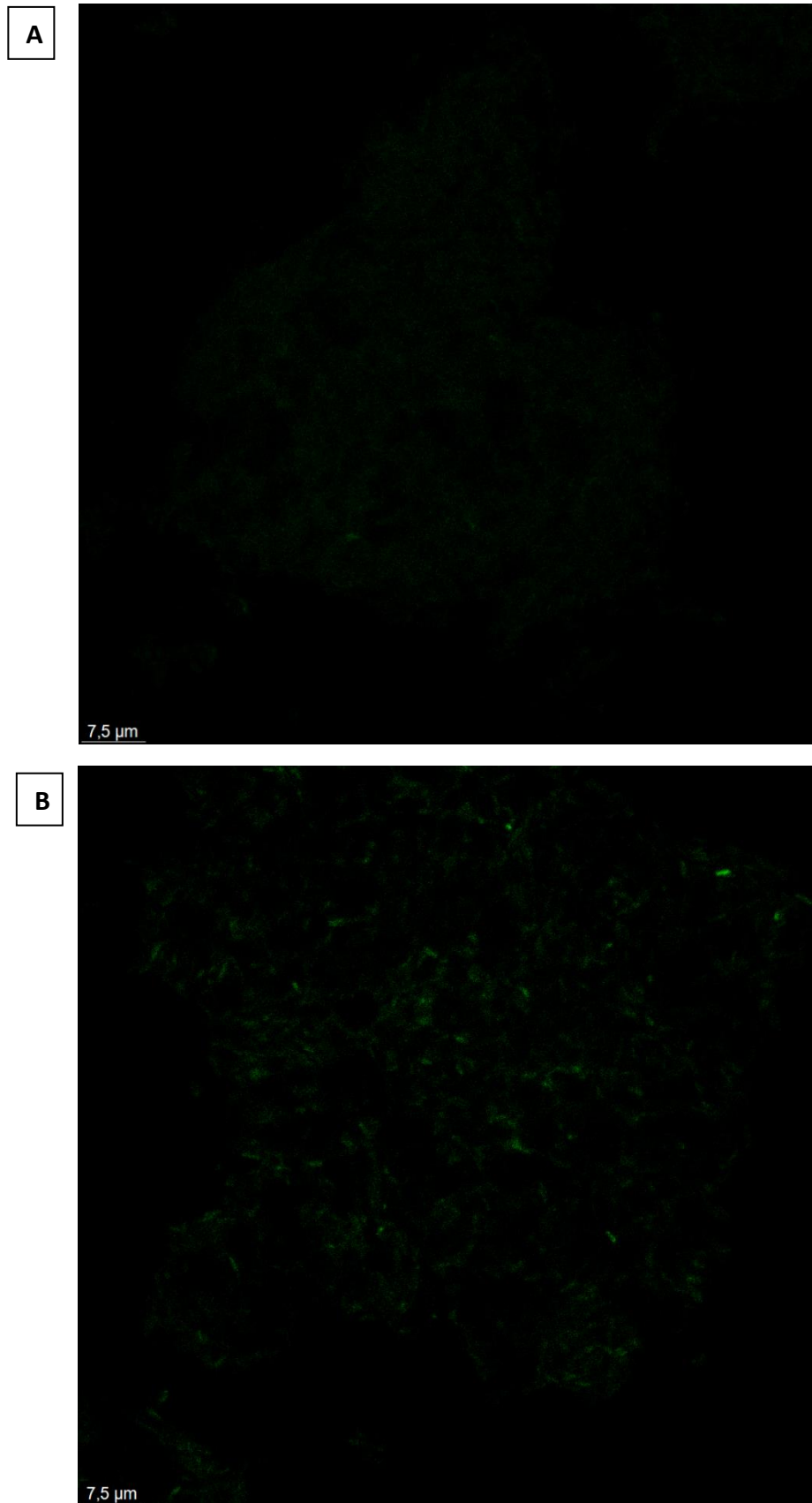


Figura 14- As imagens mostram a expressão de GFP controlada pelo promotor PIP-box XAC0416 em *X. citri* 306 após 20 horas de crescimento no meio de cultura. A: Meio NYG. B: Meio XVM2.

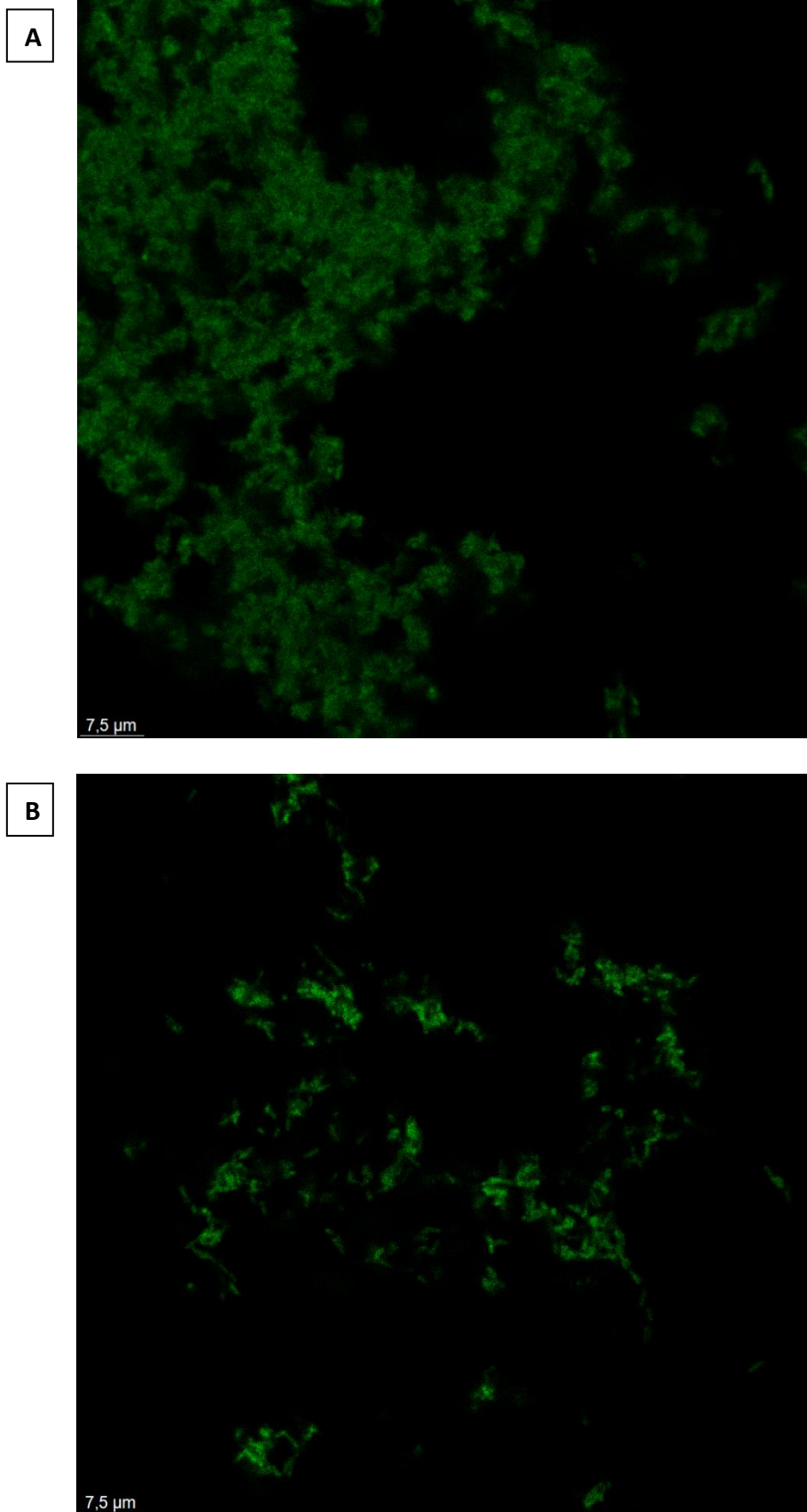


Figura 15- As imagens mostram a expressão de GFP controlada pelo promotor PIP-box XAC0360 em *X. citri* 306 após 20 horas de crescimento no meio de cultura. A: Meio NYG. B: Meio XVM2.

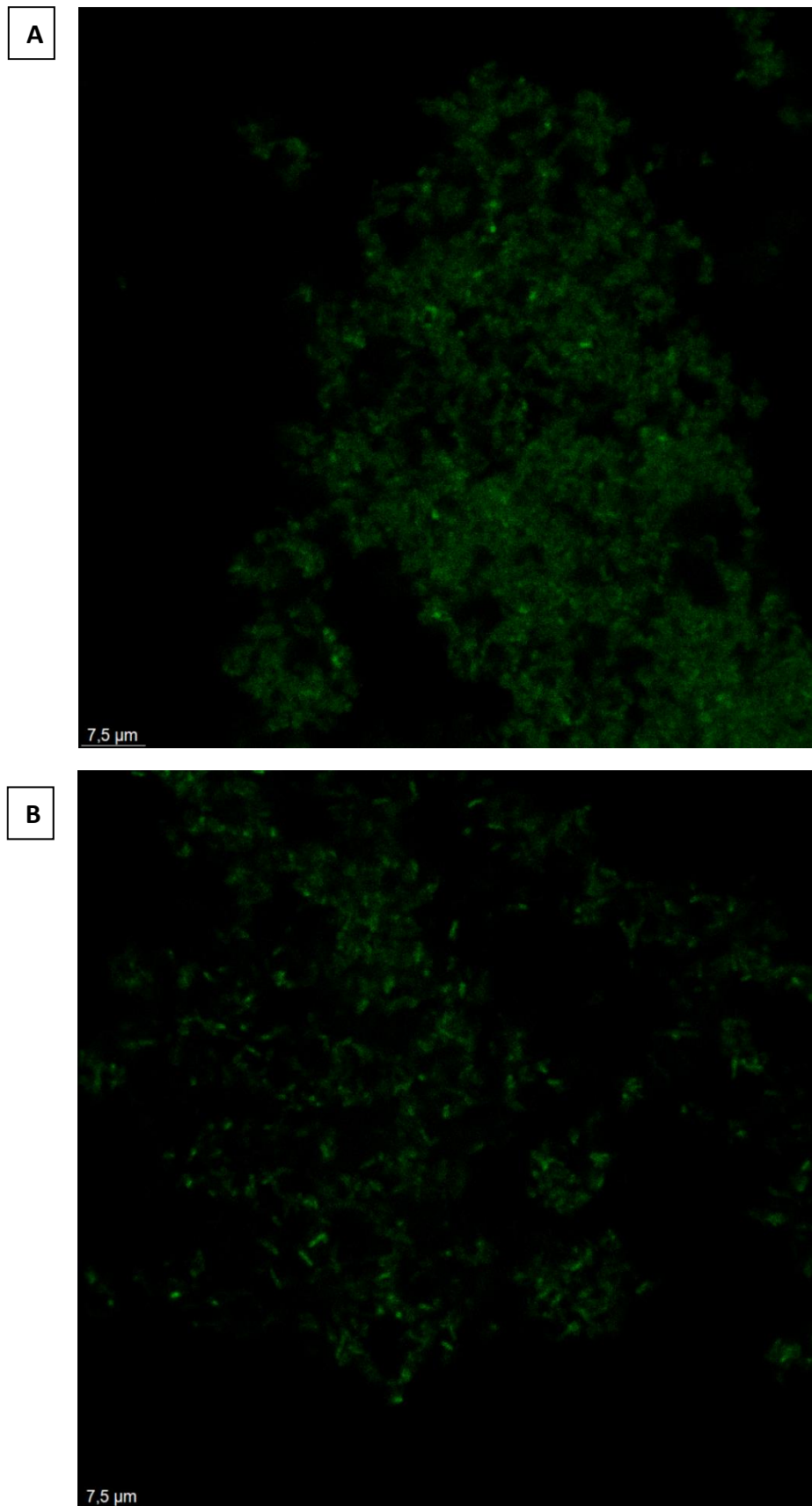


Figura 16- As imagens mostram a expressão de GFP controlada pelo promotor PIP-box XAC2370 em *X. citri* 306 após 20 horas de crescimento no meio de cultura. A: Meio NYG. B: Meio XVM2.

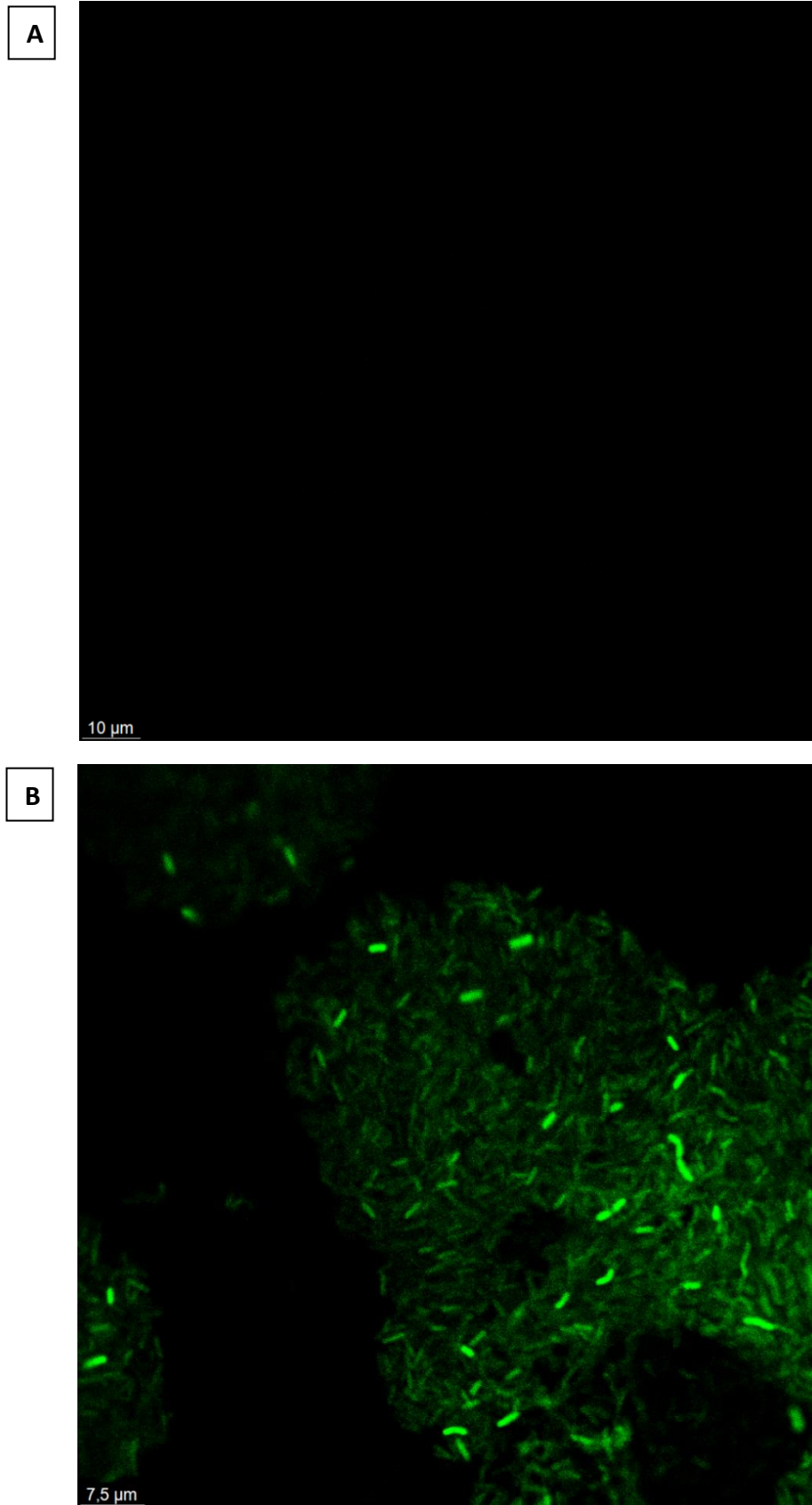


Figura 17- As imagens mostram a expressão de GFP controlada pelo promotor PIP-box XAC2922 em *X. citri* 306 após 20 horas de crescimento no meio de cultura. A: Meio NYG. B: Meio XVM2.



Figura 18- As imagens mostram a expressão de GFP *X. citri* 306 *wild-type* após 20 horas de crescimento no meio de cultura. A: Meio NYG. B: Meio XVM2.

A bactéria contendo a construção pRMF1-GFP0416 (Figura 14A) exibiu uma fluorescência discreta após 20 horas de cultivo em meio nutritivo NYG, em comparação com a expressiva fluorescência observada quando cultivada no meio de indução XVM2 (Figura 14B). No entanto, uma análise mais detalhada, realizada por meio da ferramenta Fiji, revelou uma presença sutil, quase imperceptível, de fluorescência. A análise quantitativa demonstra diferença estatisticamente significativa quando a bactéria portadora do vetor pRMF1-GFP0416 é cultivada em meio que mimetiza o apoplasto da planta (Figura 19A).

A construção pRMF1-0360 exibiu fluorescência tanto em meio rico NYG (Figura 15A) quanto em meio indutor XVM2 (Figura 15B). No entanto, ao ser submetida a análise estatística, não evidenciou diferença significativa na fluorescência emitida entre os dois meios (Figura 19B). Da mesma maneira, a construção pRMF1-GFP2370 exibiu fluorescência em ambos os meios de cultivo (Figura 16), porém a análise estatística demonstrou que há diferença significativa na intensidade da fluorescência emitida pela proteína GFP no meio de cultivo XVM2 em relação à emitida no meio NYG (Figura 19C).

A cepa que carrega a construção pRMF1-GFP2922 exibiu fluorescência exclusivamente no meio indutor XVM2 (Figura 17B). A análise estatística revelou uma significância estatística notável, distinguindo-se das outras construções, quando o gene repórter *gfp* estava sob o controle do promotor do PIP-box da XAC2922 (Figura 19D).

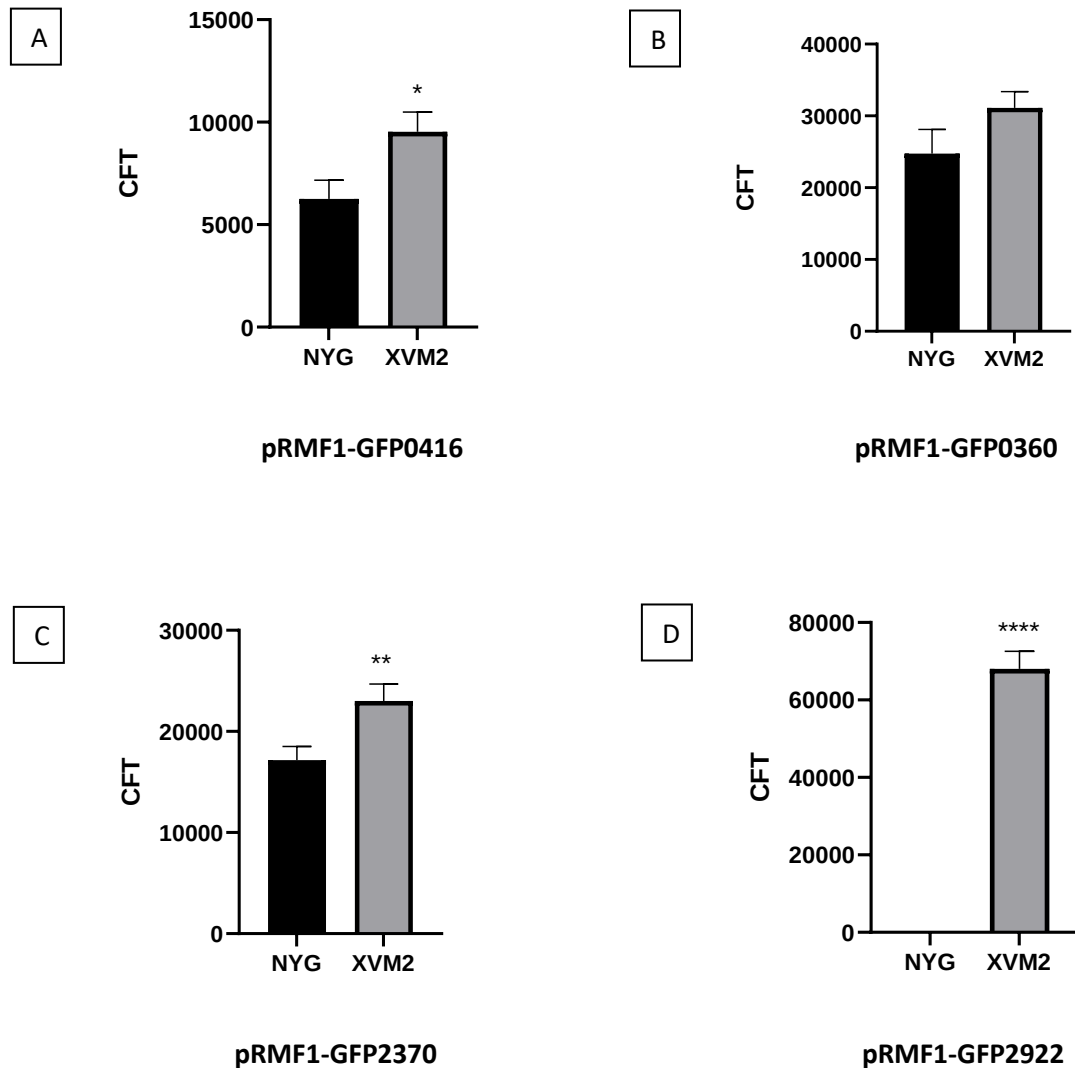


Figura 19 - Intensidade de fluorescência de GFP controlada pelos diferentes promotores PIP-box na presença do meio rico NYG e meio de indução a virulência XVM2, após 20 horas de indução. Os dados acompanhados por asterisco indicam (*) significativo, (**) muito significativo, (****) extremamente significativo segundo o teste t de Student. A: pRMF1-GFP0416. B: pRMF1-GFP0360. C: pRMF1-GFP2370. D: pRMF1-GFP2922. CTF: Fluorescência Total Corrigida.

Ao comparar a intensidade de fluorescência emitida em meio XVM2 sob o controle dos promotores PIP-box XAC0416, PIP-box XAC0360, PIP-box XAC2370 e PIP-box XAC2922, observa-se que eles pertencem a diferentes classes estatísticas (Figura 20). Os promotores PIP-box XAC0360 e PIP-box XAC2922, no entanto, apresentaram resultados especialmente relevantes, sugerindo que, ao regularem a expressão de *gfp*, a eficiência na produção da proteína GFP é significativamente maior. O promotor PIP-box XAC2922 induziu uma fluorescência 2,4 vezes superior à

observada sob o controle do PIP-box XAC0360 (Figura 20). Em contraste, a expressão de *gfp* sob o controle do PIP-box XAC0416 resultou em uma fluorescência significativamente menor (Figura 20).

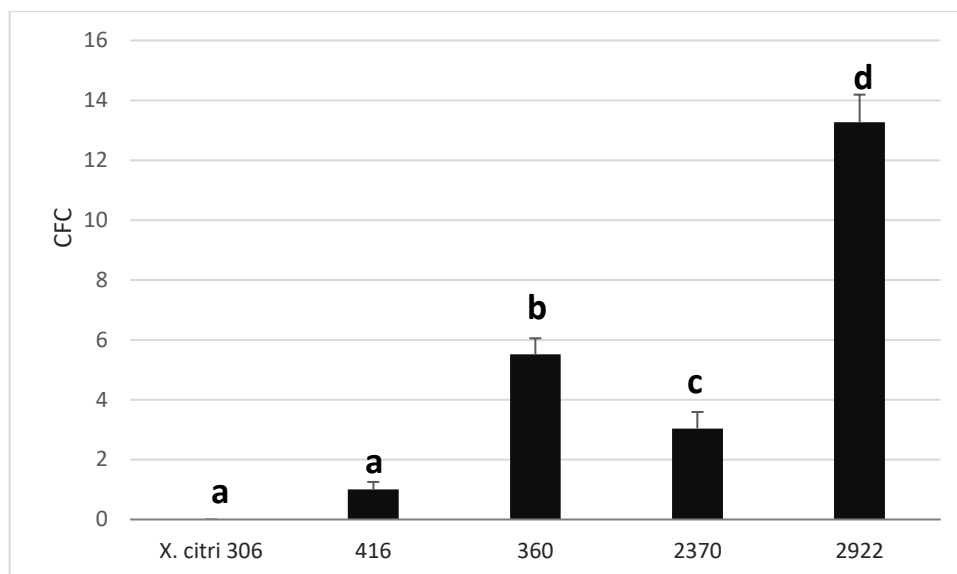


Figura 20- Intensidade de fluorescência de GFP induzida pelos diferentes promotores PIP-box em meio indutor XVM2 após 20 horas de incubação. Os pontos de dados representam médias $\pm$ desvios padrão de 3 a 11 réplicas biológicas. As letras a-d indicam classes estatísticas distintas ($p < 0,05$), conforme determinado pela análise de variância (ANOVA) unifatorial, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CTC: Fluorescência Total Corrigida.

Carvalho et al. (2016) analisou e comparou a força de expressão dos promotores PIP-box XAC0416 e XAC0424 após 20 horas em meio indutor XAM1 (XVM2 com modificações, contendo 7,4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 16 mM KH_2PO_4 ; 30 mM K_2HPO_4 ; 1,6 mM citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 10 mM frutose; 10 mM sacarose; 1mg/mL BSA; pH5,4) e constatou que XAC0416 foi capaz de induzir fortemente a expressão do gene *gus*, através da quantificação enzimática da proteína GUS produzida. Neste trabalho, o PIP-box XAC0416 induziu fracamente a expressão do gene *gfp*, quantificada pela medida da fluorescência. Tal diferença pode estar relacionada ao meio indutor utilizado. O meio XAM1 possui o sal citrato de sódio e BSA como fonte de nitrogênio, já XVM2 possui os sais NaCl , FeSO_4 e MgSO_2 , e casamisoácidos como fonte de nitrogênio.

No genoma de *X. citri* isolado 306, o gene *hpa1* (XAC0416) é responsável pela codificação da proteína de virulência Hpa1, que consiste em 138 aminoácidos e é rica em resíduos de glicina (Tabela 3). Em *Xoo*, a presença do gene *hpa1* é marcada por um motivo "PIP-box" localizado a 135 pb *upstream* da metionina inicial. Experimentos de mutagênese revelaram que a exclusão desse gene resultou em uma significativa redução na patogenicidade sobre a planta hospedeira. Além disso, os autores sugerem que, devido ao elevado teor de glicina na proteína Hpa1, esta pode ser secretada pelo SST3 no citoplasma da célula hospedeira (Zhu et al., 2000).

O gene XAC0360 codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, cujo produto é a dihidroxicetona fosfato (Tabela 3). Essa enzima desempenha um papel crucial na via dos glicerofosfolipídeos, responsável pela biossíntese dos constituintes fosfolipídicos da membrana. Por outro lado, o gene XAC2370, inicialmente anotado como hipotético, codifica uma proteína putativa secretada, evidenciada pela presença de um peptídeo de sinal na porção N-terminal (Tabela 3) (Carvalho et al., 2016).

A construção pRMF1-GFP2922, que apresentou maior expressão em relação às outras construções (Figura 20) está *upstream* do gene XAC2922, o qual codifica a proteína pectato liase, uma enzima hidrolítica de polissacarídeos da parede vegetal, importante integrante pelo SST3 (Tabela 3) (Charkowski et al., 1998)

Tabela 3 - Genes controlados por "PIP-box" em *X. citri* 306. A: Sistema de secreção tipo III. B: Metabolismo de membrana e parede celular. C: Proteínas secretadas putativas. I: Metabolismo intermediário. II: Patogênicidade, virulência e adaptação. III: Hipotética. IV: Indefinido. (Carvalho et al., 2016)

Classe funcional	gi*	Identidade do gene**	Produto gênico	Categoria***	Consenso PIP	Distância do PIP
A	gij3052488	XAC0416	Hpa1	II	nCGAA...N15...nCGA	135
	gij2123067	XAC2922	HrpW	IV	TTCGn...N15...TTCGn	165
B	gij2122983	XAC0360	glicerol-3-fosfato desidrogenase	I	nCGAA...N15...nCGA	38
C	gij2310044	XAC2370	proteína possivelmente secretada	III	TTCGn...N15...TTCGn	227

O SST3 é controlado por dois reguladores transcricionais principais, HrpX e HrpG. HrpX induz a transcrição ligando-se diretamente ao PIP-box localizado no elemento *cis* de cinco operons estruturais e efetores do SST3. Estudos realizados em

Xanthomonas euvesicatoria (*Xeu*), *X. citri* e *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*) demonstraram que HrpG e HrpX medeiam em parte a expressão de genes efetores TAL (“transcription activator-like”). Alguns efetores estão associados à supressão da resposta imune do hospedeiro, além do que efetores TAL controlam efluxo de açúcar e reconhecimento celular (Perez-Quitero e Szurek, 2019; Teper et al., 2021).

A indução da expressão dos genes de regulação *hrpG/hrpX* é mediada durante a interação com o sistema de sinalização da planta (Bernonville et al., 2014; Kim et al., 2016). Meios de cultura artificiais utilizados para cultivos dos microrganismos comuns, como os meios LB e NB (Nutrient Broth), suprimem a expressão dos genes *hrp*. Todavia, alguns meios que mimetizam o espaço apoplástico da planta induzem a expressão dos genes *hrp*, proporcionando condições semelhantes à do hospedeiro (Teper et al., 2021). Esses meios possuem fontes de carbono de baixo peso molecular (mono e dissacarídeos ou ácido carbono), minerais e pH levemente ácido. As fontes de nitrogênio utilizadas nos meios indutores podem variar de acordo com as espécies de microrganismo. O meio XVM1 tem como fonte de carbono sacarose e metionina, já XVM2 possui sacarose e frutose, mas utiliza casaminoácidos. XVM1 é utilizado para induzir a expressão dos *hrp* em *Xeu* enquanto XVM2 é utilizado para *X. citri* (Guo et al. 2011, Schulte e Bonas, 1992). A presença de certos açúcares, como sacarose, galactose, frutose e glicose, induz a expressão de *hrpG* e *hrpX* (Rashid et al., 216). Em contrapartida, os componentes estruturais do SST3 são transcritos e expressos de maneira específica na presença de xilose, sugerindo uma possível estabilização da proteína HrpX (Ikawa e Tsuge, 2016; Rashid et al., 216)

4.2.2 Após crescimento em planta hospedeira (*in planta*)

Os resultados qualitativos das análises *in planta* (Figuras 21 a 24) mostraram nitidamente que a maior intensidade de fluorescência foi apresentada pelo PIP-box XAC0416 (Figura 21), enquanto a menor intensidade de fluorescência foi apresentada a pelo PIP-box XAC0360 (Figura 22). Os PIP-box XAC2370 (Figura 23) e XAC2922 (Figura 24) induziram fluorescência maior do que a do XAC0360, porém menor do que a do XAC0416. Por outro lado, a *X. citri* wild-type (Figura 25) não apresentou fluorescência, semelhante ao resultado observado na análise *in vitro* (Figura 18).

Estes resultados indicam que, na presença hospedeiro, a fluorescência observada é resultante da ativação dos promotores “PIP-box” que estão controlando a expressão do gene *gfp*. No genoma da *X. citri wild-type* isolado 306 (Da Silva et al., 2002) não foi identificado nenhuma proteína com similaridade à GFP (Da Silva et al., 2002).

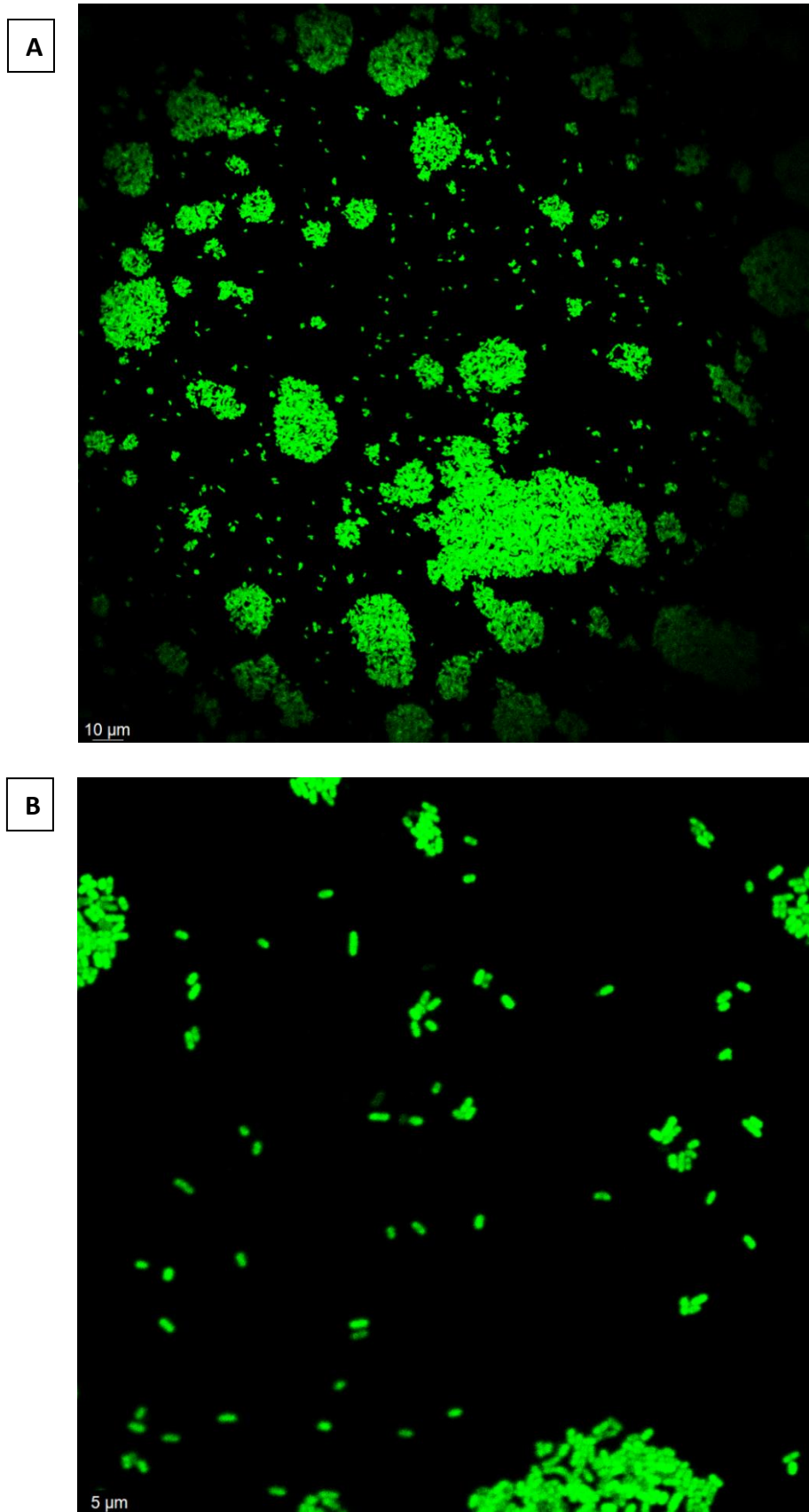


Figura 21 -Fluorescência produzida por *X. citri* 306 contendo o plasmídio que possui o gene *gfp* sob o controle do promotor PIP-box XAC0416, 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. A:10 µm. B: 5 µm.

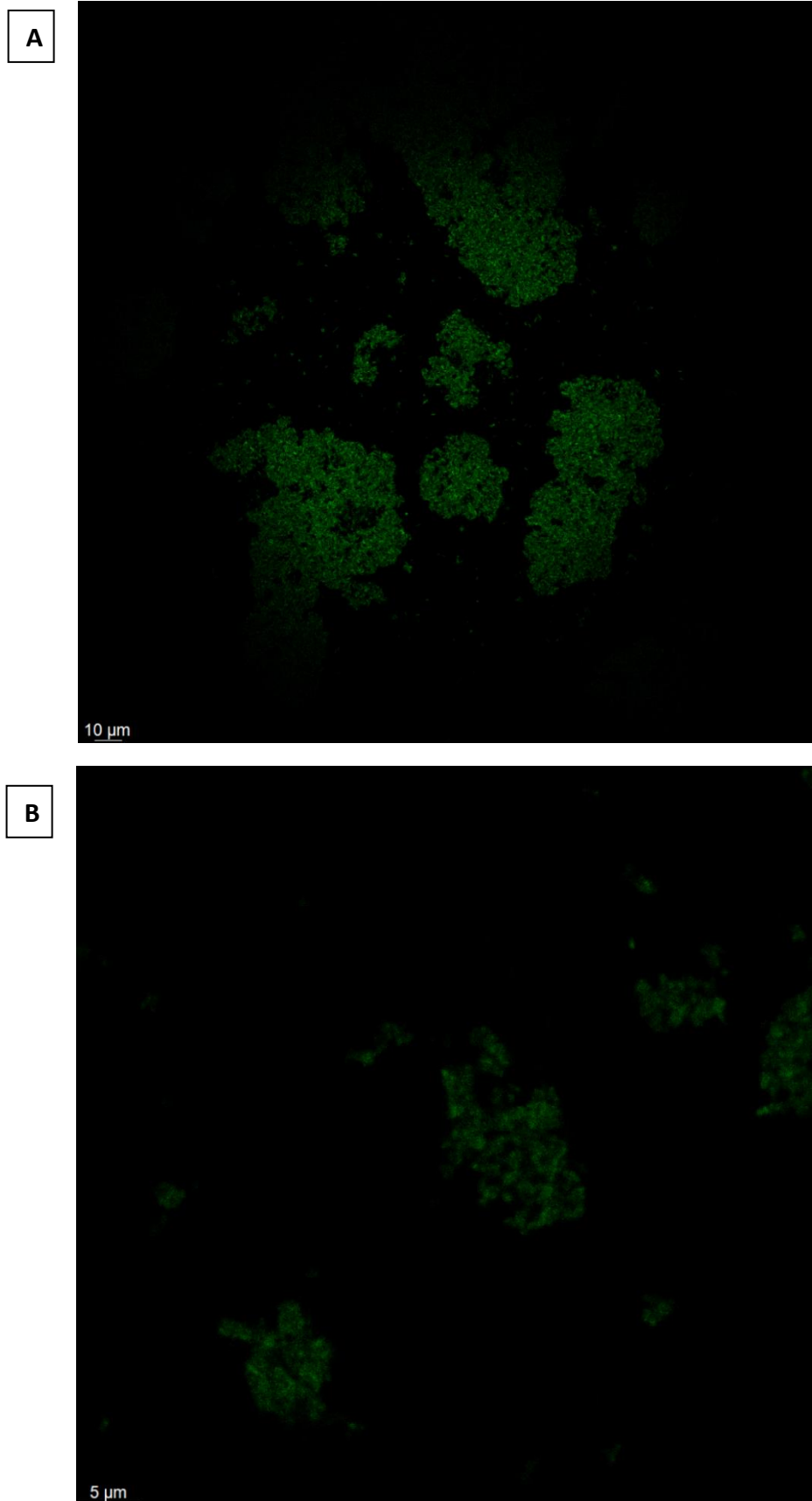


Figura 22 - Fluorescência produzida por *X. citri* 306 contendo o plasmídio que possui o gene *gfp* sob o controle do promotor PIP-box XAC0360, 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. A: 10 µm. B: 5 µm.

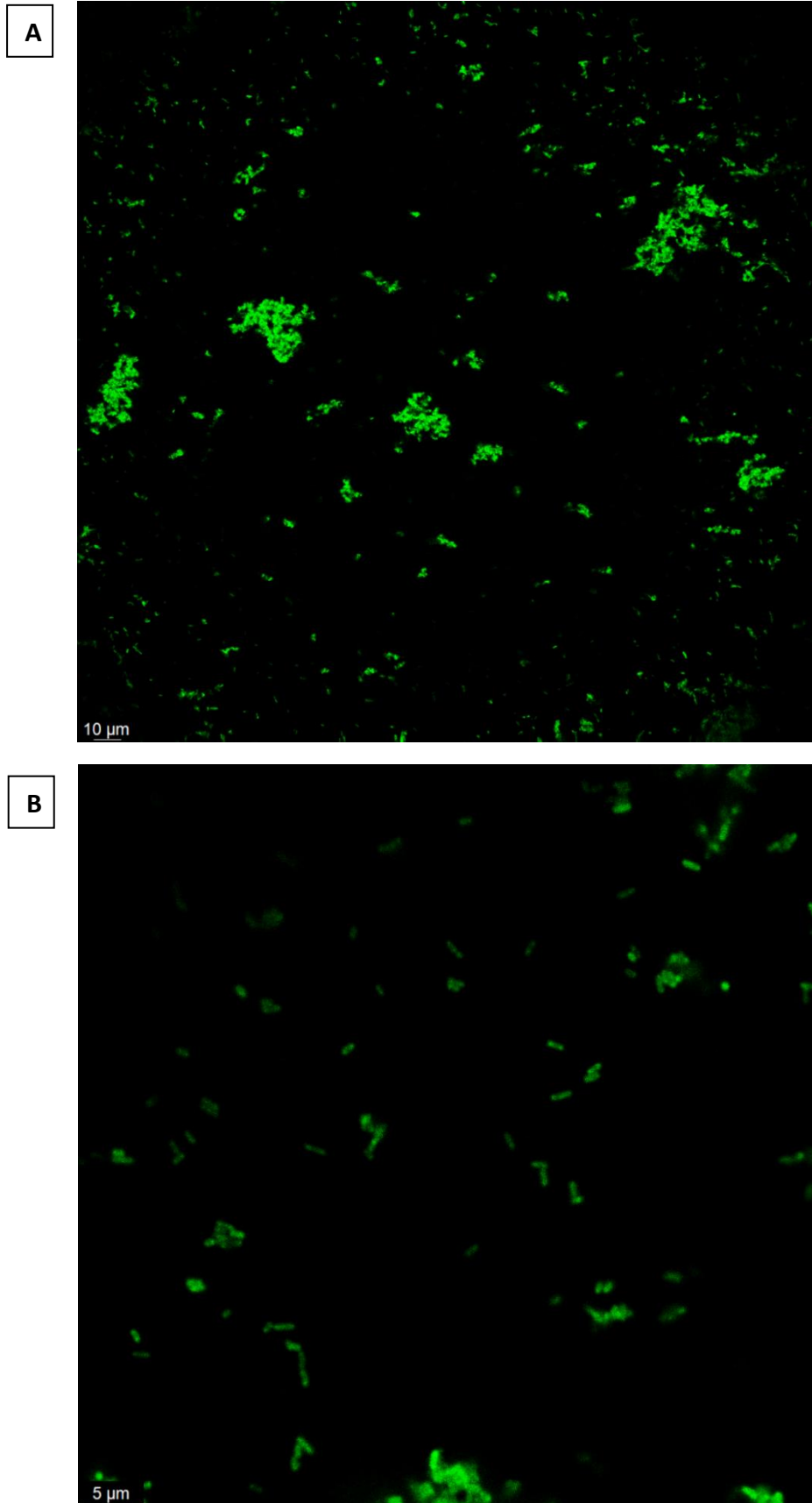


Figura 23 - Fluorescência produzida por *X. citri* 306 contendo o plasmídio que possui o gene *gfp* sob o controle do promotor PIP-box XAC2370, 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. A: 10 µm. B: 5 µm.

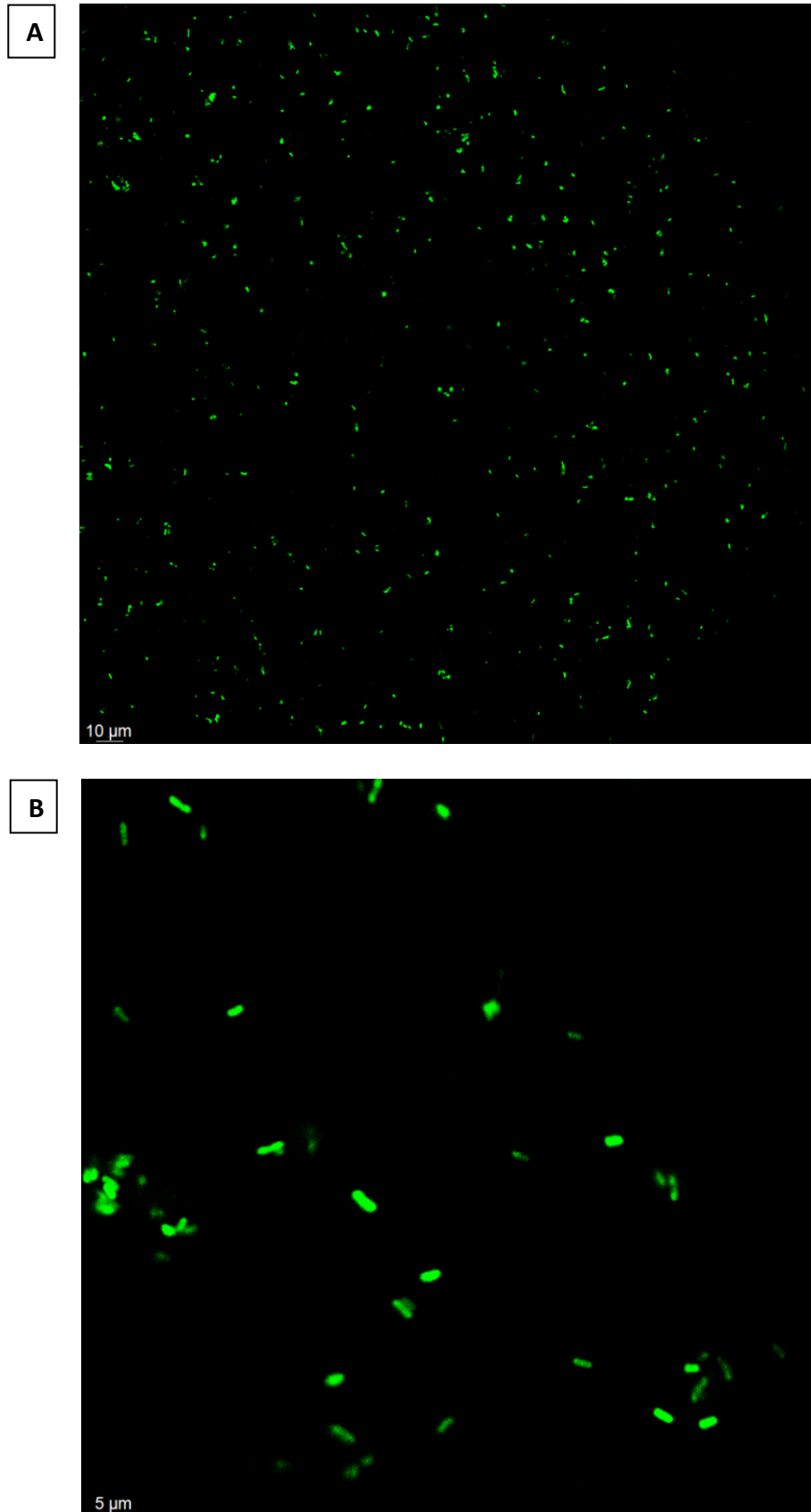


Figura 24 - Fluorescência produzida por *X. citri* 306 contendo o plasmídio que possui o gene *gfp* sob o controle do promotor PIP-box XAC2922, 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. A:10 µm. B: 5 µm.

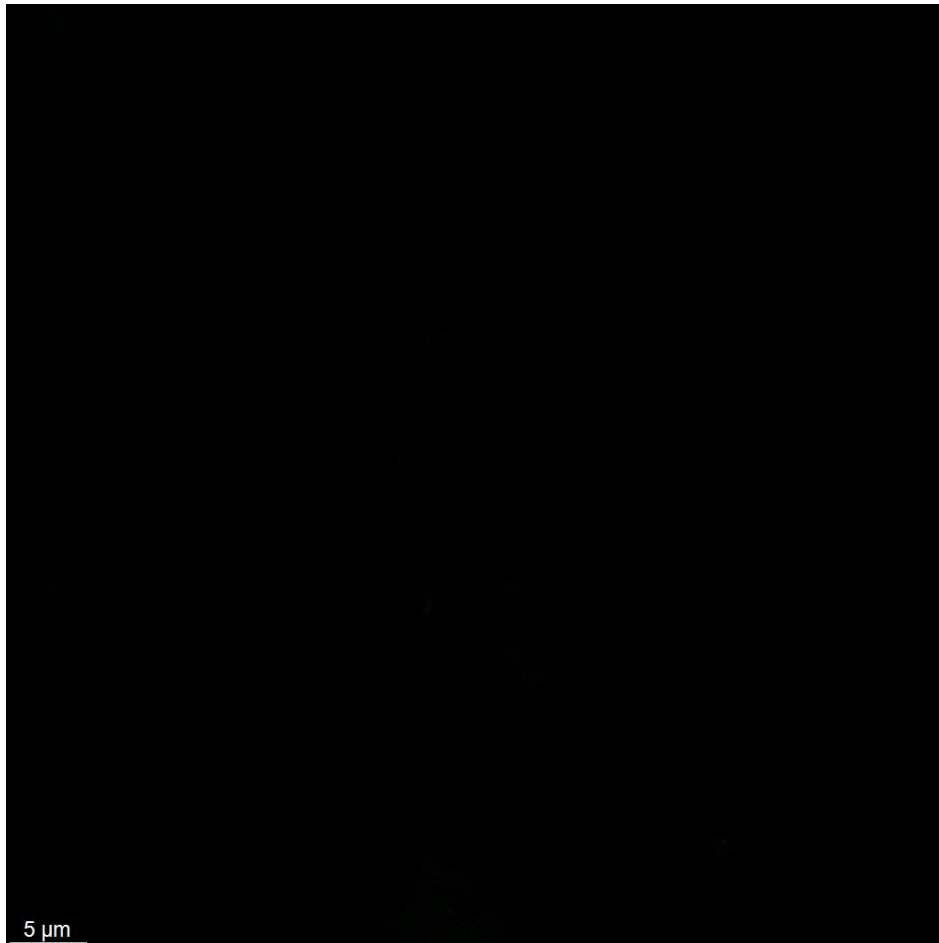


Figura 25 - Fluorescência produzida por *X. citri* 306 *wild-type*, 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. A: 10 μm . B: 5 μm .

Quando os resultados são analisados em termos de fluorescência total corrigida (FTC), observa-se que a cepa que contém o gene *gfp* sob o controle do promotor PIP-box XAC0416 apresentou a maior intensidade de fluorescência, destacando-se em uma classe estatística distinta dos demais promotores (Figura 26). Esse resultado provavelmente reflete uma maior transcrição do gene *gfp*, culminando em maior quantidade de proteína GFP sintetizada pela maquinaria celular. Por outro lado, os promotores PIP-box XAC2370 e PIP-box XAC2922 (Figura 26) foram agrupados na mesma classe estatística, indicando que ambos apresentam níveis equivalentes de expressão. No entanto, quando a expressão de *gfp* foi regulada pelo promotor PIP-box XAC0360, a fluorescência foi significativamente mais baixa, distinguindo-se das classes estatísticas dos demais promotores.

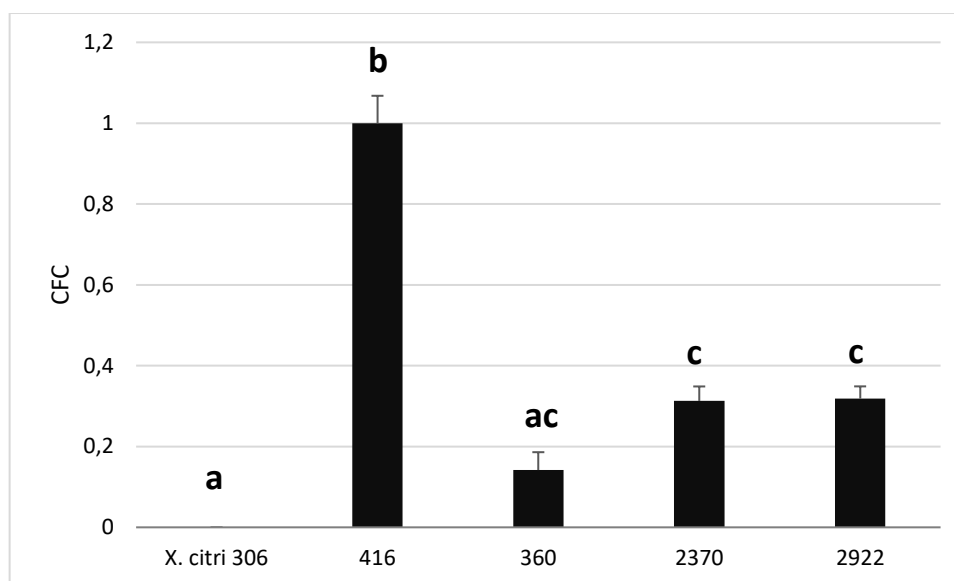


Figura 26- Intensidade de fluorescência induzida pelos diferentes promotores e por *X. citri* 306 *wild type* (controle) em 'Pêra' (*Citrus sinensis*), 5 dias (120 horas) após a inoculação. As letras a-c indicam classes estatísticas distintas ($p < 0,05$), conforme determinado pela análise de variância (ANOVA) unifatorial, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. CTF: Fluorescência Total Corrigida.

Neste trabalho foi utilizado o meio de cultura XVM2 (*in vitro*) e a inoculação em planta hospedeira (*in planta*) para avaliar a indução da expressão do gene *gfp* por diferentes promotores PIP-box putativos de *X. citri* 306. O resultado obtido *in vitro* foi que a construção contendo o PIP-box XAC2922 foi a que induziu maior expressão, seguida pelas construções contendo os PIP-box XAC2370 e XAC0360 (Figura 20). Por outro lado, quando os PIP-box foram avaliados *in planta*, a construção contendo o PIP-box XAC0416 foi a que induziu maior expressão de *gfp* (Figura 26). Esse resultado vai de encontro com os obtidos por Carvalho et al. (2016), onde o "PIP-box" da XAC0416 induziu maior expressão do gene repórter *gus* *in planta* do que o PIP-box da XAC0424, verificado pela determinação da atividade enzimática da proteína GUS. Carvalho et al. (2016) verificou também que a expressão do gene XAC0416 através da técnica de RT-PCR mostrou um aumento na sua expressão durante a cinética de infecção de 3 a 5 dias após a infecção em laranjas 'Pêra'.

Os PIP-box dos genes XAC0360, XAC2370, XAC2922 de *X. citri* 306 induziram, *in planta*, menor expressão do gene *gfp* do que o PIP-box do gene XAC0416 (Figura 26). A fluorescência induzida pelo PIP-box do gene XAC0416 foi 3 vezes maior do que a dos genes XAC2370 e XAC2922 e seis vezes maior do que a do XAC0360.

Promotores com diferentes forças de expressão são extremamente úteis tanto para uso em pesquisas como para fins biotecnológicos (Xu, Wei, and Liu, 2019). Nem sempre um promotor forte é o mais adequado para o fim a que se destina. Promotores fortes são vantajosos quando se busca alta produção de proteínas, mas podem ser inadequados se a superexpressão causar toxicidade ou se for necessária uma regulação precisa da expressão gênica (Alberts et al., 2017). Por outro lado, promotores mais fracos ou com maior controle regulatório são preferíveis quando a expressão gênica precisa ser ajustada de forma mais sutil ou em menores quantidades (Alberts et al., 2017). Dessa forma, a seleção de um promotor deve ser cuidadosamente considerada com base nas necessidades específicas do estudo ou aplicação biotecnológica.

A ativação dos promotores PIP-box da *Xanthomonas* spp. está diretamente relacionada com o SST3, um componente crucial no sistema flagelar e na secreção de proteínas efetoras no citoplasma da planta. Este sistema desempenha um papel fundamental na virulência e patogenicidade da bactéria (Verma et al., 2018). O SST3 influencia diretamente a motilidade, formação de biofilme e movimento quimiotático por meio do sistema flagelar. Por outro lado, o sistema de secreção de proteínas efetoras no citoplasma da planta contribui para a disseminação da bactéria nos tecidos vegetais, afetando a sinalização e o metabolismo do hospedeiro. (Verma et al., 2018; Teper et al., 2021).

A diferença entre a força de expressão dos diferentes promotores PIP-box testados neste trabalho em meio que mimetiza o espaço apoplasto da planta (*in vitro*) como na presença da planta (*in planta*) pode estar relacionada com o metabolismo de *X. citri* e disposição de composto no meio, além de proteínas reguladoras que interagem com o SST3. Em *Xanthomonas* spp., embora os principais elementos reguladores do SST3 sejam conservados, a regulação durante a expressão de *hrp* no sistema metabólico é diferente entre as espécies do mesmo gênero (Büttner e Bonas, 2010). Para exemplificar, o regulador transcricional da família GntR, HpaR1/YtrA, presente em *Xcc* e *X. citri*, exerce uma regulação negativa ao reprimir a expressão dos genes associados ao SST3 em meios que mimetizam a planta. Em contrapartida, essa regulação se apresenta de maneira positiva ao induzir a expressão desses genes na presença da planta (An et al., 2011; Zhou et al., 2017).

5 CONCLUSÃO

A utilização do gene repórter *gfp* permitiu verificar a funcionalidade e mensurar a força de promotores de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 (*X. citri* 306) induzíveis por planta (PIP-box), através da medida da fluorescência da proteína GFP, tanto em meio de cultura que mimetiza o espaço apoplástico do tecido vegetal (*in vitro*) quanto em condições infectantes (*in planta*).

Dos quatro PIP-box testados, XAC2922 foi o que apresentou maior indução em meio de cultura XVM2, seguido por XAC0360, que apresentou indução 2,4 vezes menor.

In planta, os PIP-box XAC0360, XAC0416, XAC2370 e XAC2922 foram capazes de induzir a expressão do gene *gfp*. O PIP-box XAC0416 induziu 3 vezes mais do que XAC2370 e XAC2922 e 6 vezes mais do que XAC0360.

Estes promotores, com diferentes forças de expressão, podem ser usados tanto no estudo de genes com função desconhecida em diferentes fitopatógenos de citros bem como ferramenta biotecnológica.

6 REFERÊNCIAS

- Abdulridha J, Batuman O, Ampatzidis Y (2019) UAV-Based Remote Sensing Technique to Detect Citrus Canker Disease Utilizing Hyperspectral Imaging and Machine Learning. **Remote Sensing** 11:1-22.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J and Hunt T (2017) Molecular Biology of the Cell. Artemed, Porto Alegre.
- Alvarez-Martinez CE, Sgro GG, Araujo, GG, Paiva, MRN, Matsuyama, BY, Guzz CR., Andrade, MO, Farah, CS (2021). Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. 19: 279–302.
- An SQ, Lu GT, Su HZ, Li RF, He YQ, Jiang BL, Tang DJ, Tang JL (2011) Systematic mutagenesis of all predicted *gntR* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reveals a GntR family transcriptional regulator controlling hypersensitive response and virulence. **Mol. Plant–Microbe Interact**. 24:1027-1039.
- Ansari N, Müller S, Stelzer EHK, Pampaloni F (2013) Chapter 13 - Quantitative 3D Cell-Based Assay Performed with Cellular Spheroids and Fluorescence Microscopy, Editor(s): P. Michael Conn, Methods in Cell Biology, Academic Press 113.
- Ashmawy NA, Shoeib AA, Youssef HFB, Mahmoud SM (2020) Pathological, biochemical and molecular characterization of the seed-borne bacteria "*Pantoea* spp., *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp." from solanaceous plants in egypt. **J Microbiol Biotech Food Sci** 10:289-295.
- Balint-Kurti P (2019) The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular Plant Pathology** 20:1163-1178.
- Bernonville TD, Noël LD, SanCristobal M, Danoun S, Becker A, Soreau P, Arlat M, Lauber E (2014) Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. **FEMS Microbiology Ecology** 89: 527–54.
- Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H (2013) Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics** 29:1-8.

Büttner D, Bonas U (2002) Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the cell. **The EMBO Journal** 21:5313-5322.

Büttner D, Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews** 34:107-33.

Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng WL, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM, Collmer (2003) A The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **PNAS** 100:10181-10186.

Bradbury JF (1993) **Guide to plant Pathogenic Bacteria**. Slough: CAB International: 332p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 21, DE 25 DE ABRIL DE 2018.

Brunings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, 4:141-157.

Carvalho FMS (2006) **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* p.v. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 190 f. Tese (Doutorado em Genética) – USP, Ribeirão Preto.

Carvalho FMS, Oliveira JCF, Laia ML, Jacob TR, Ferreira RM, Ferro MIT, Tezza RID, Zingaretti SM, Silva CF, Ferro JA (2016) Mapping and validation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* genes regulated by putative plantinducible promoter box (PIP-box). **Genetics and Molecular Research** 15:1-17.

Cifuentes-Arenas JC, De Goes A, De Miranda MP, Beattie GAC, Lopes SA (2018) Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **Plos one** 1-17.

Chan JWYF, Goodwin PH (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances** 17: 489–508.

Charkowski AO, Alfano JR, Preston G, Yuan J, He SY & Collmer A (1998) The *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* Hrpw protein has domains similar to harpins and

pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate.

Journal of Bacteriology 180:5211-5217.

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz, BJ (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell** 124: 803-814.

Coplin DL, Cook D (1990) Molecular Genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 3: 271-279.

Cubero J, Graham JH (2002) Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Appl. Environ. Micro.** 68:1257–1264.

Cui Y, Zou L, Zou H, Li Y, Zakria M, Chen G (2013) HrpE3 is a type III effector protein required for full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in rice. **Molecular Plant Pathology** 14:678-692.

Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S (2004) Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. **Molecular Microbiology** 53: 115-128.

Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, Do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LEA, Camarotte G, Cannavan F, Cardoso J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RMB, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC, Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EGM, Lemos MVF, Locali EC, Machado MA, Madeira AMBN, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CFM, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MTM, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JAD, Silva C, De Souza RF, Spinola LAF, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RID, Dos Santos MT, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417:459-463.

Dalio RJD, Magalhães DM, Rodrigues CM, Arena GD, Oliveira TS, Souza-Neto RR, Picchi SC, Martins PMM, Santos PJC, Maximo HJ, Pacheco IS, De Souza AA,

Machado MA (2017) PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus-pathogen interactions. **Annals Botany** 119:749-774.

Do Amaral AM, Carvalho AS, Domingues AD, Dezotti DF, Batista JC & Machado MA (2003) Reações de acessos de citros à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sob condições de casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira** 28:S284.

Do Amaral AM, Toledo CP, Baptista JC, Machado MA (2005) Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira** 30:292- 294.

Dobrindt U, Hacker J (2001) Whole genome plasticity in pathogenic bacteria.

Current Opinion in Microbiology 4: 550-557.

Egel DS, Graham JH, Stall RE (1991) Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing disease of citrus. **Applied and Environmental Microbiology** 57:2724–30.

EMBRAPA. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. 2008 Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/746695/1/documento234.pdf> Acesso em: 17 jan. 2024.

EMBRAPA. Sistema Integrado de Medidas Fitossanitárias para o Manejo do Cancro Cítrico do Rio Grande do Sul. 2017 Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170734/1/Documentos-451.pdf> Acesso em: 17 jan. 2024.

Facincani AP, Moreira L M, Soares M R, Ferreira C B, Ferro M I, Ferro J A, Gozzo FC & De Oliveira J (2014). Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Functional & Integrative Genomics** 14: 205–217

Ference CM, Manthey JA, Narciso JA, Jones JB, Baldwin EA (2020) Detection of phenylpropanoids in citrus leaves produced in response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology** 110:287-296.

Ferreira MF, Moreira LM, Ferro JA, Soares MRR, Laia ML, Varani AM, Oliveira JCF, Ferro MIT (2016) Unravelling potential virulence factor candidates in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by secretome analysis. **PeerJ** 4:e1734.

Fonseca NP, Patané JSL, Varani AM, Felestrino EB, Caneschi WL, Sanchez AB, Cordeiro IF, Lemes CGC, Assis RAB, Garcia CCM, Belasque Jr. J, Martins Jr. J, Facincani AG, Ferreira RM, Jaciani FJ, De Almeida NF, Ferro JA, Moreira LM, Setubal JC (2019) Analyses of Seven New Genomes of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* Strains, Causative Agents of Citrus Canker B and C, Show a Reduced Repertoire of Pathogenicity-Related Genes. **Front Microbiol** 10:1-15.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. Doenças e Pragas. 2018. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em: 17 jan. 2024.

Garrity GM, Holt JG (2000) **An overview of the road map to the manual**. Systematic Bacteriology. 2ed. New York: Springer, p.20.

Guo Y, Figueiredo F, Jones J, Wang N (2011) HrpG and HrpX Play Global Roles in Coordinating Different Virulence Traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol Plant Microbe Interact** 24:649-661.

GRAHAM JH, GOTTWALD TR (1990) Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology** 80:190–196.

Hartung JS, Civerolo EL (1989) Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Phytopathology** 79:783-799.

Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Mol Biol. Rev.** 62: 379-433.

Ikawa Y, Tsuge S (2016) The quantitative regulation of the hrp regulator HrpX is involved in sugar-source-dependent hrp gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **FEMS Microbiology Letters** 363: 1-6.

Irving SE, Choudhury NR, Corrigan RM (2021) The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. **Nat Rev Microbiol** 19: 256-271.

Joe A, Stewart V, Ronald PC (2021) The HrpX Protein Activates Synthesis of the RaxX Sulfopeptide, Required for Activation of XA21-Mediated Immunity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **MPMI** 34:1307-1315.

- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. **Nature** 444:323–329.
- Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T (2012) Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. **Plos One** 7: 49423.
- Kim S, Cho YJ, Song ES, Lee SH, Kim JG, Kang LW (2016) Time-resolved pathogenic gene expression. analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **BMC Genomics** 17:1-15.
- Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U (2006) Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. **Journal Bacteriology** 188:7652-7660.
- Lacerda LA, Cavalca LB, Martins PMM, Govonec JS, Bacci JR M.; Ferreira H (2017) Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid** 90: 44-52.
- Leite JR RP, Mohan SK (1990) Integraed management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop-Protection** 9:3-7.
- Leyns F, De Cleene M, Swings JG, De Ley J (1984) The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review** 50:308-356.
- Li Y, Xiao Y, Zou L, Zou H, Chen G (2012) Identification of HrpX regulon genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* using a GFP visualization technique. **Arch Microbiol** 194: 281-291.
- Licciardello G, Caruso P, Bella P, Boyer C, Smith MW, Pruvost O, Robene I, Cubero J, Catara V (2022) Pathotyping Citrus Ornamental Relatives with *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *X. citri* pv. *aurantifolii* Refines Our Understanding of Their Susceptibility to These Pathogens. **Microorganisms** 10:1-14.
- Martins PMM, Andrade MO, Benedetti CE, De Souza AA (2020) *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology** 45: 213-236.

Moreira LM, De Souza RF, Almeida Jr NF, Setubal JC, Oliveira JCF, Furlan LR, Ferro JA, Da Silva ACR (2004) Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol** 42: 163-184.

Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Jones JDG (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. **Nature** 592:110–115.

Perez-Quintero AL, Szurek B (2019) A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research. **Annual Review of Phytopathology** 57:459-481.

Rani TS, Takahashi D, Uemura M, Podile AR (2015) Proteins associated with oxidative burst and cell wall strengthening accumulate during citrus-*Xanthomonas* non-host interaction. **Plant Molecular Biology Reporter** 33:1349-1360.

Rashid MM, Ikawa Y, Tsuge S (2016) GamR, the LysR-Type Galactose Metabolism Regulator, Regulates hrp Gene Expression via Transcriptional Activation of Two Key hrp Regulators, HrpG and HrpX, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology** 82: 3987-3958.

Rashid MM, Nihad SAI, Khan MAI, Haque A, Ara A, Ferdous T, Hasan MA-I, Latif MA (2021) Pathotype profiling, distribution and virulence analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial blight disease of rice in Bangladesh. **J Phytopathol.** 169:438–446.

Rosseti V (1977) Citrus canker in Latin América: a review. **Proceedings of the International Society of Citriculture** 3:918-24.

Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Van Sluys MA, Bogdanove AJ, Dow JM (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology** 9:344–55.

Sakamoto S, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S (2014) Application of Green Fluorescent Protein in Immunoassays. **Advances in Bioscience and Biotechnology** 5: 557-563.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods** 9:676-682.

Schulte R, Bonas U (1992) A *Xanthomonas* Pathogenicity Locus Is Induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. **The Plant Cell** 4: 79-86.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglus S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie** 75:687-706.

Simpson AJG, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LMC, Araya JE, Baia GS, Baptista CS, Barros MH, Bonaccorsi ED, Bordin S, Bove JM, Briones MRS, Bueno MRP, Camargo AA, Camargo LEA, Carraro DM, Carrer H, Colauto NB, Colombo C, Costa FF, Costa MCR, Costa-Neto CM, Coutinho LL, Cristofani M, Dias-Neto E, Docena C, El-Dorry H, Facincani AP, Ferreira AJS, Ferro JA, Fraga JS, Fraga SC, Franco MC, Frohme M, Furlan LR, Garnier M, Goldman GH, Goldman MH, Gomes SL, Gruber A, Ho PL, Hoheisel JD, Junqueira MK, Kemper EL, Kitajima JP, Krieger JE, Kuramae EE, Laigret F, Lambais MR, Leite LCC, Lemos EGM, Lemos MVF, Lopes AS, Lopes CR, Machado JA, Machado MA, Madeira AMBN, Madeira HMF, Marino CL, Marques MV, Martins EAL, Martins EMF, Matsukuma AY, Menck CFM, Miracca EC, Miyaki CY, Monteiro-Vitorello CB, Moon DH, Nagai MA, Nascimento ALTO, Netto LES, Nhani Jr A, Nobrega FG, Nunes LR, Oliveira MA, De Oliveira MC, De Oliveira RC, Palmieri DA, Paris A, Peixoto BR, Pereira GAG, Pereira Jr HA, Pesquero JB, Quaggio RB, Roberto PG, Rodrigues V de M, Rosa AJ, De Rosa VEJR, De Sa RG, Santelli RV, Sawasaki HE, Da Silva ACR, Da Silva AM, Da Silva FR, Silva Jr WA, Da Silveira JF, Silvestri MLZ, Siqueira WJ, De Souza AA, De Souza AP, Terenzi MF, Truffi D, Tsai SM, Tsuhako MH, Vallada H, Van Sluys MA, Verjovski-Almeida S, Vettore AL, Zago MA, Zatz M, Meidanis J & Setubal JC (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature** 406:151-157.

Sukchawalit R, Vattanaviboon P, Sallabhan R, Mongkolsuk S (1999) Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Letters** 181: 217-223.

Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ (2010) Playing the “Harp”: Evolution of our understanding of hrp/hrc genes. **Annual review of phytopathology** 48:347–70.

Tang JL, Tang DJ, Dubrow ZE, Bogdanove A, An SQ (2021) *Xanthomonas campestris* Pathovars. **Trends in Microbiology** 2: 182-183.

Teper D, Pandey SS, Wang N (2021) The HrpG/HrpX Regulon of *Xanthomonads*—An Insight to the Complexity of Regulation of Virulence Traits in Phytopathogenic Bacteria. **Microorganisms** 9:1-16.

Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Büttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klösigen U, Patschkowski T, Rückert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorhölter F-J, Weber E, Pühler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology** 187:7254-7266.

Tsuge S, Terashima S, Furutani A, Ochiai H, Oku T, Tsuno K, Kaku H, Kub Y (2005) Effects on Promoter Activity of Base Substitutions in the cis-Acting Regulatory Element of HrpXo Regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology** 187: 2308-2314.

Timilsina S, Potnis N, Newberry EA, Liyanapathirana P, Iruegas-Bocardo F, White FF, Goss EM, Jones JB (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. **Nature** 18:415-427.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45:472-489.

Vanholme R, De Meester B, Ralph J, Boerjan W (2019) Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology** 56:230-239.

Verma RK, Samal B, Chatterjee S (2018) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* chemotaxis components and chemoreceptor Mcp2 are involved in the sensing of constituents of xylem sap and contribute to the regulation of virulence-associated functions and entry into rice. **Molecular Plant Pathology** 19:2397-2415.

Vernière C, Hartung JS, Pruvost OP, Civerolo EL, Alvarez AM, Maestri P, Luisetti J (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology** 104: 477-487.

Vicente JG, Holub EB (2013) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Mol Plant Pathol** 14: 2-18.

Wagner N, Avram O, Gold-Binshtok D, Zerah B, Teper D, Pupko T (2022) Effectidor: an automated machine-learning-based web server for the prediction of type-III secretion system effectors. **Bioinformatics** 38:2341–2343.

Wang X, Zhang L, Ji H, Mo X, Li P, Wang J, Dong H (2018) Hpa1 is a type III translocator in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **BMC Microbiology** 18:1-11.

Wang D, Wei L, Liu T, Ma J, Huang K, Guo H, Huang Y, Zhang L, Zhao J, Tsuda K, Wang Y (2023) Suppression of ETI by PTI priming to balance plant growth and defense through an MPK3/MPK6-WRKYs-PP2Cs module. **Molecular Plant** 16, 903–918.

Wengelnik K, Bonas U (1996) HrpXv, an AraC-type regulator activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology** 178:3462-3469.

Wengelnik K, Arckerveken GVD, Bonas U (1996a) HrpG, a Key *hrp* Regulatory Protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is Hologous to Two-Component Response Regulators. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 9:704-712.

Wengelnik K, Marie C, Russel M, Bonas U (1996b) Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology** 178: 1064-1069.

Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, Okura VK, Zhou Y, Chen L, Wood GE, Almeida Jr NF, Woo L, Chen Y, Paulsen IT, Eisen JA, Karp PD, Bovee Sr D, Chapman P, Clendenning J, Deatherage G, Gillet W, Grant C, Kutayavin T, Levy R, Li MJ, McClelland E, Palmieri A, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Wu Z, Romero P, Gordon D, Zhang S, Yoo H, Tao Y, Biddle P, Jung M, Krespan W, Perry M, Gordon-Kamm B, Liao L, Kim S, Hendrick C, Zhao ZY, Dolan M, Chumley F, Tingey SV, Tomb JF, Gordon MP, Olson MV, Nester EW (2001) The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science** 294: 2317-2323.

Xu N, Wei L and Liu J (2019) Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 35:1-10.

Ye Z, Ting JP-Y (2008) NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. **Current Opinion in Immunology** 20:3-9

Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou JM, He SY & Xin XF (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. **Nature** 592: 105–109.

Zhang J, Kan J, Zhang J, Guo P, Chen X, Fang R, Jia Y (2012) Synergistic Activation of the Pathogenicity-Related Proline Iminopeptidase Gene in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by HrpX and a LuxR Homolog. **Applied and Environmental Microbiology** 78: 7069-7074.

Zhang Y, Teper D, Xu J, Wang N (2019) Stringent response regulators (p)ppGpp and DksA positively regulate virulence and host adaptation of *Xanthomonas citri*. **Molecular Plant Pathology** 20: 1550–1565.

Zhang B, Liu M, Wang Y, Yuan W, Zhang H (2022) Plant NLRs: Evolving with pathogen effectors and engineerable to improve resistance. **Front. Microbiol.** 13: 1-13.

Zhou X, Yang Q., Wang N (2017) Deciphering the regulon of a GntR family regulator via transcriptome and ChIP-exo analyses and its contribution to virulence in *Xanthomonas citri*. **Molecular Plant Pathology** 18:249-262.

Zhu W, Magbanua MM, White FF (2000) Identification of two novel hrp-associated genes in the hrp gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology** 182:1844-1853.

APÊDICE

Apêndice A- Sequências clonadas contendo a região PIP-box presente na região 3' não traduzida dos genes XAC0360 (FS1), XAC2370 (FS2) e XAC2922 (FS3).

>NC_003919:430966:431096:-len=131

GCCGATCTGCGTGGCGAACGCTGTTGGCACAGGCCACGGACATCTTCACGTCTCCGCAAGGT
TCGATGTTTGAATATG**TTCGAACATGACAACCTGGGTTCG**CTCATCGGCGCA**CCCTGACGGA**
GGCACCG

Figura Suplementar 1 (FS1): Sequência correspondente aos nucleotídeos 430966 a 431096 do genoma de *X. citri* 306, com região PIP-box destacada em amarelo. Cinza: Oligonucleotídeo direto ("Forward"). Azul: Oligonucleotídeo reverso ("Reverse").

>NC_003919:2763166:2763467:+len=302

TACCAACATACCAACATCGTCACCAGCGCGCGCCTTGGCAGAGGATGGTGGCGAAC**TTCGCA**
CACGCACCCTTGCAATTCGCAAAAAAAGAATCAAATAAGCGGATCACGGTTATAGTACAAACG
CTACTGATGCAGCGCATCTGCGCGCGAAAGAAAAAACAGTAGCGCCGATGGTAGAAGCGACG
AAAATCAGCCATAAACATGGGCACACACTGCGATTTAATCGTAAATTATTTATTTTATATAA
TTTTAATTAATCCACTCAGATCGCCCACTCCAAGC**AAAACATACAGGTTAAGA**

Figura Suplementar 2 (FS2): Sequência correspondente aos nucleotídeos 2763166 a 2763467 do genoma de *X. citri* 306, com região PIP-box destacada em amarelo. Cinza: Oligonucleotídeo direto ("Forward"). Azul: Oligonucleotídeo reverso ("Reverse").

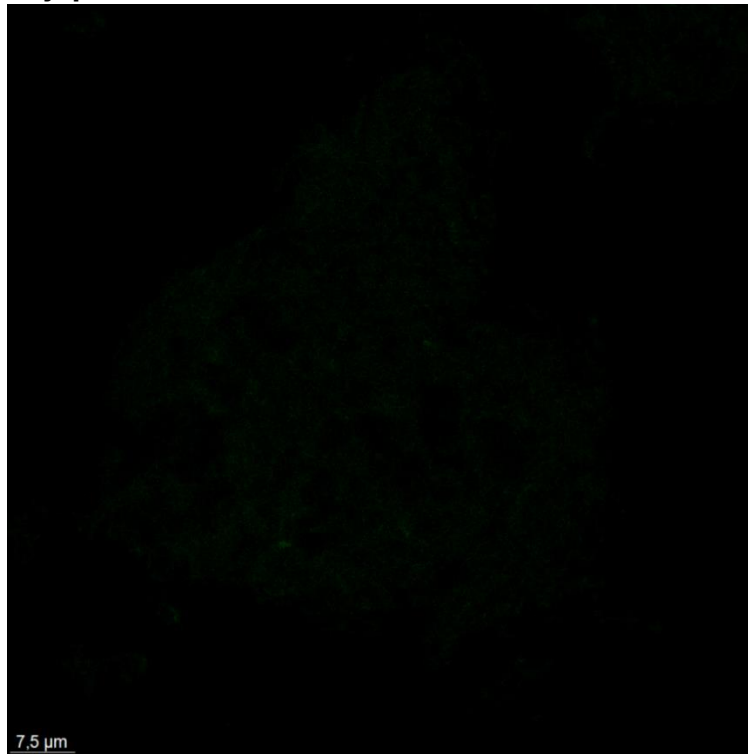
>NC_003919:3428312:3428686:+len=375

CATCGCGTCGAAGCTCATTCGTGCGGCACAGCAACCCCATCCCGGCATCGCCGCCGATCATC
GGCCCGCTCTTGGCAAATGCCGTCAGGCCAGCGAGGCACCAGGGCCGCAAGCGCCATCGCC
CTGGATGTCTTTGGCCAACACACTGCGCACTGGGGCGGACATAACGCGCCAGACGCGCTCGT
TTCGCTACACGCAACCGCACTTCGGCTTGGCATCGATCAGCACAAATCAGCACGCACGATGAT
CGTCGAATAGCCGACCACGATGGGAGAGCCTCAGATGATTTCTCAATCAACCCCTATATCA
GTGCTAACCCACTCCTCAACCACACGCTTCAGACGAAGCAGCCCGCA**TTTTCCGACACGATC**
ATT

Figura Suplementar 3 (FS3): Sequência correspondente aos nucleotídeos 3428312 a 3428686 do genoma de *X. citri* 306, com região PIP-box destacada em amarelo. Cinza: Oligonucleotídeo direto ("Forward"). Azul: Oligonucleotídeo reverso ("Reverse").

Apêndice B - Imagens utilizadas para calcular a fluorescência total corrigida (Corrected Total Fluorescence -CTF) utilizando a ferramenta de seleção depixels no software Fiji para análise *in vitro*.

1



2

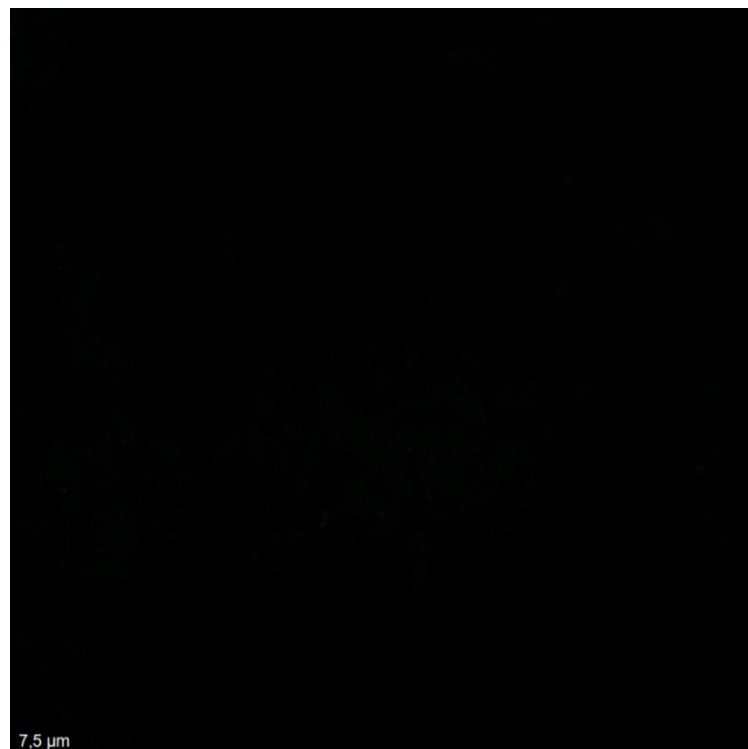


Figura suplementar 1 (FS1)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0416 após 20 horas de indução em meio NYG. 1 e 2: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

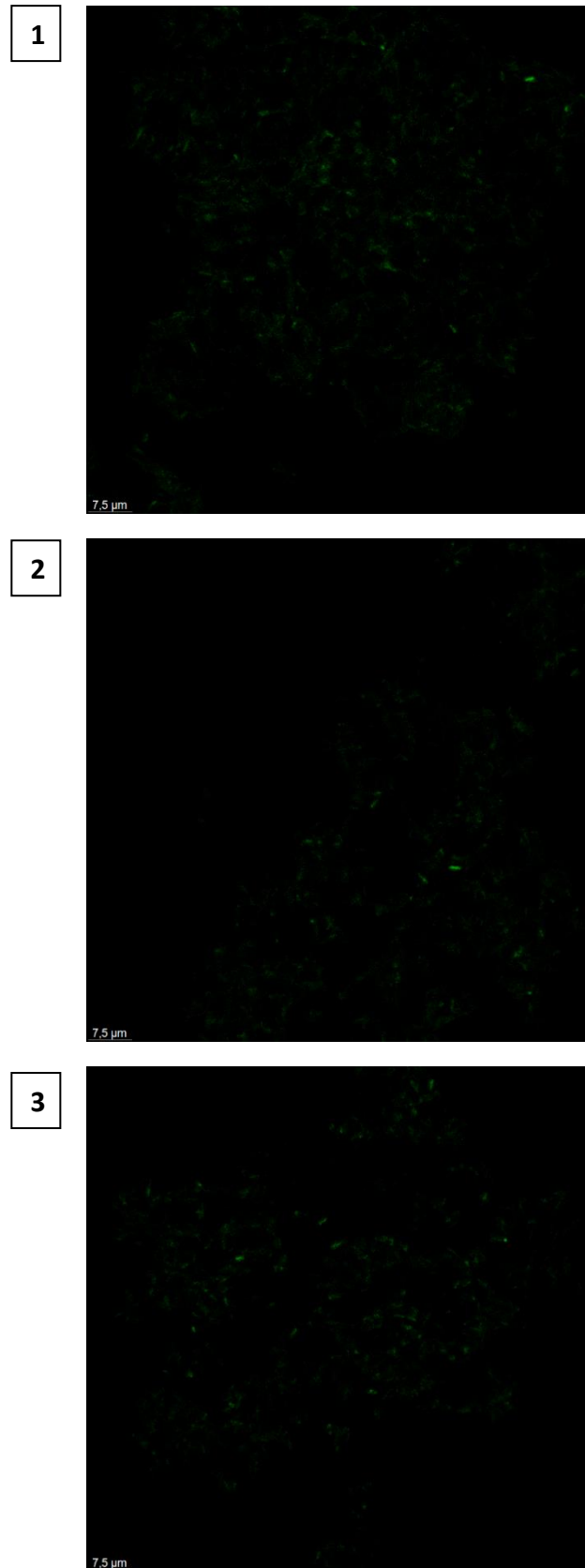


Figura suplementar 2 (FS2)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0416 após 20 horas de indução em meio XVM2. 1 e 2: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

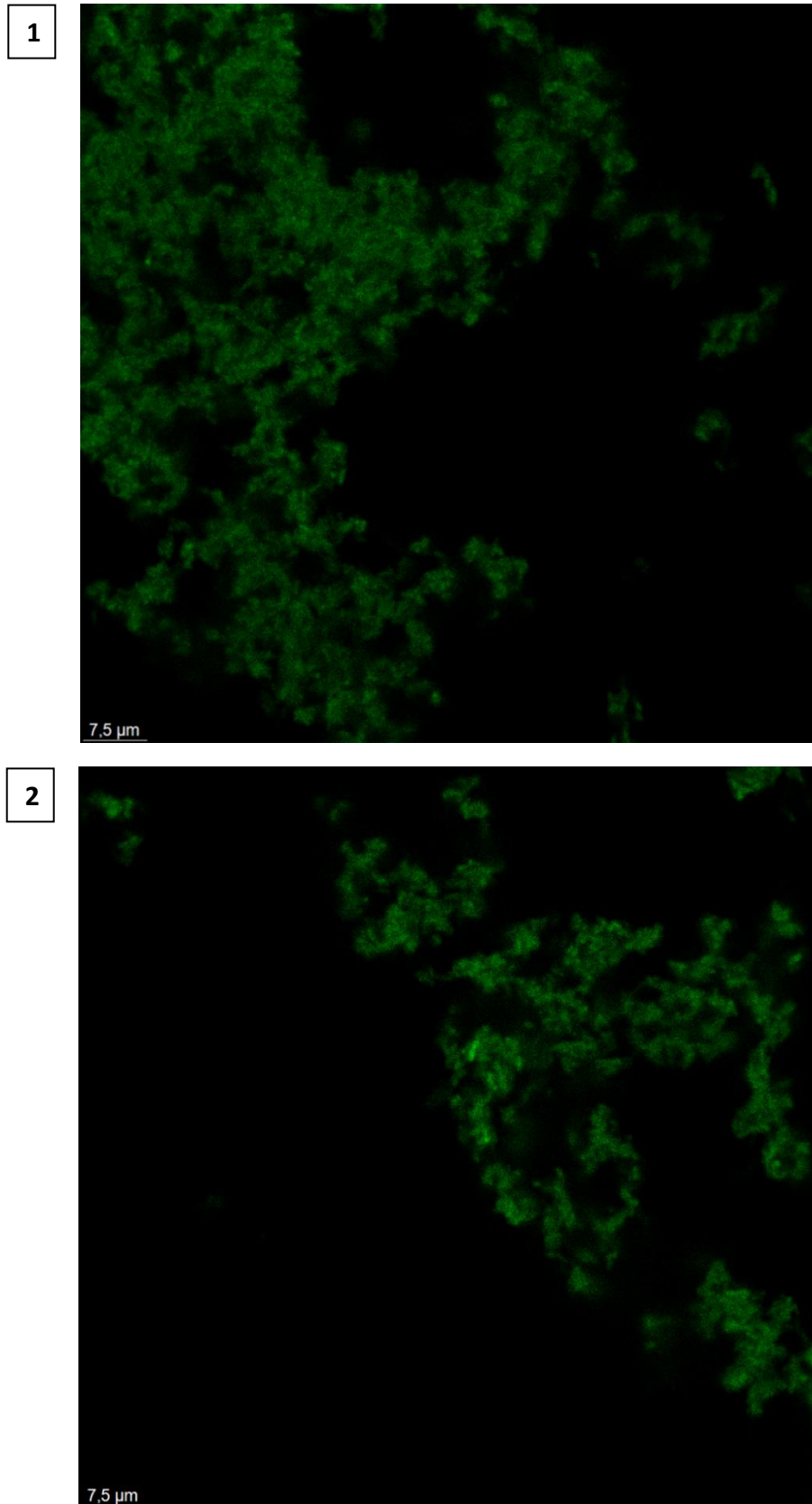


Figura suplementar 3 (FS3) - Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0360 após 20 horas de indução em meio NYG. 1 e 2: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

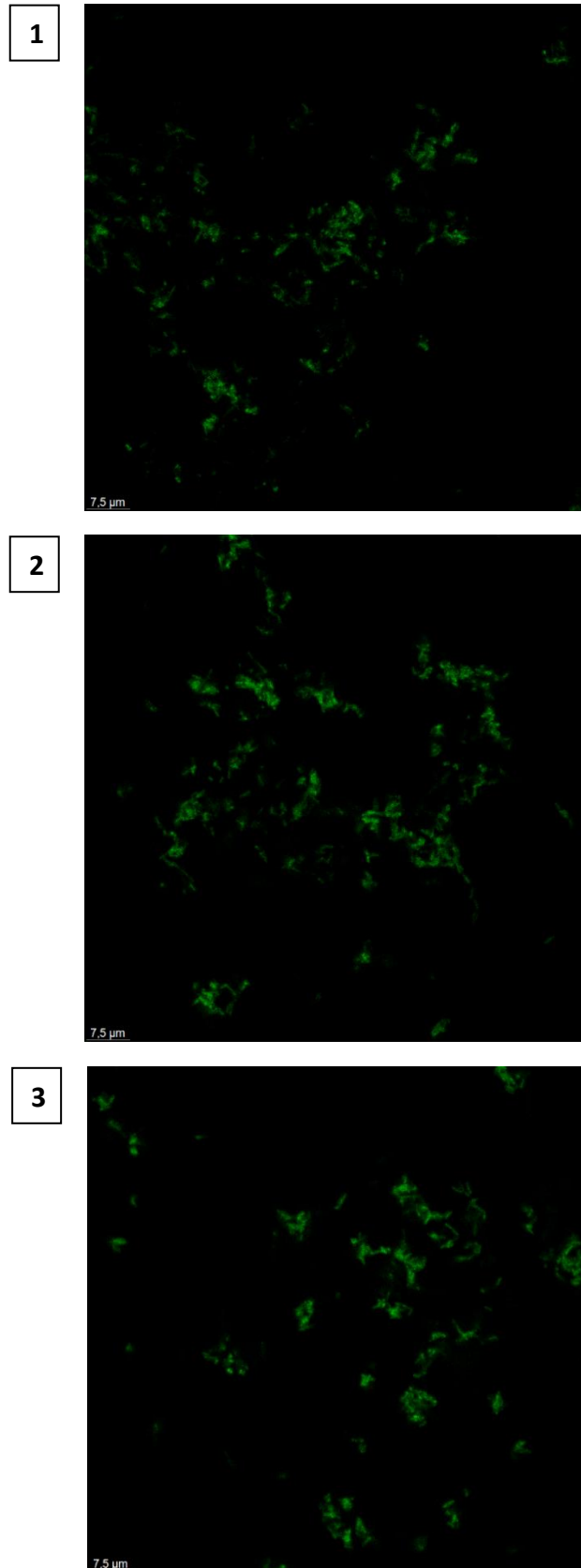


Figura suplementar 4 (FS4)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0360 após 20 horas de indução em meio XVM2. 1, 2, 3: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

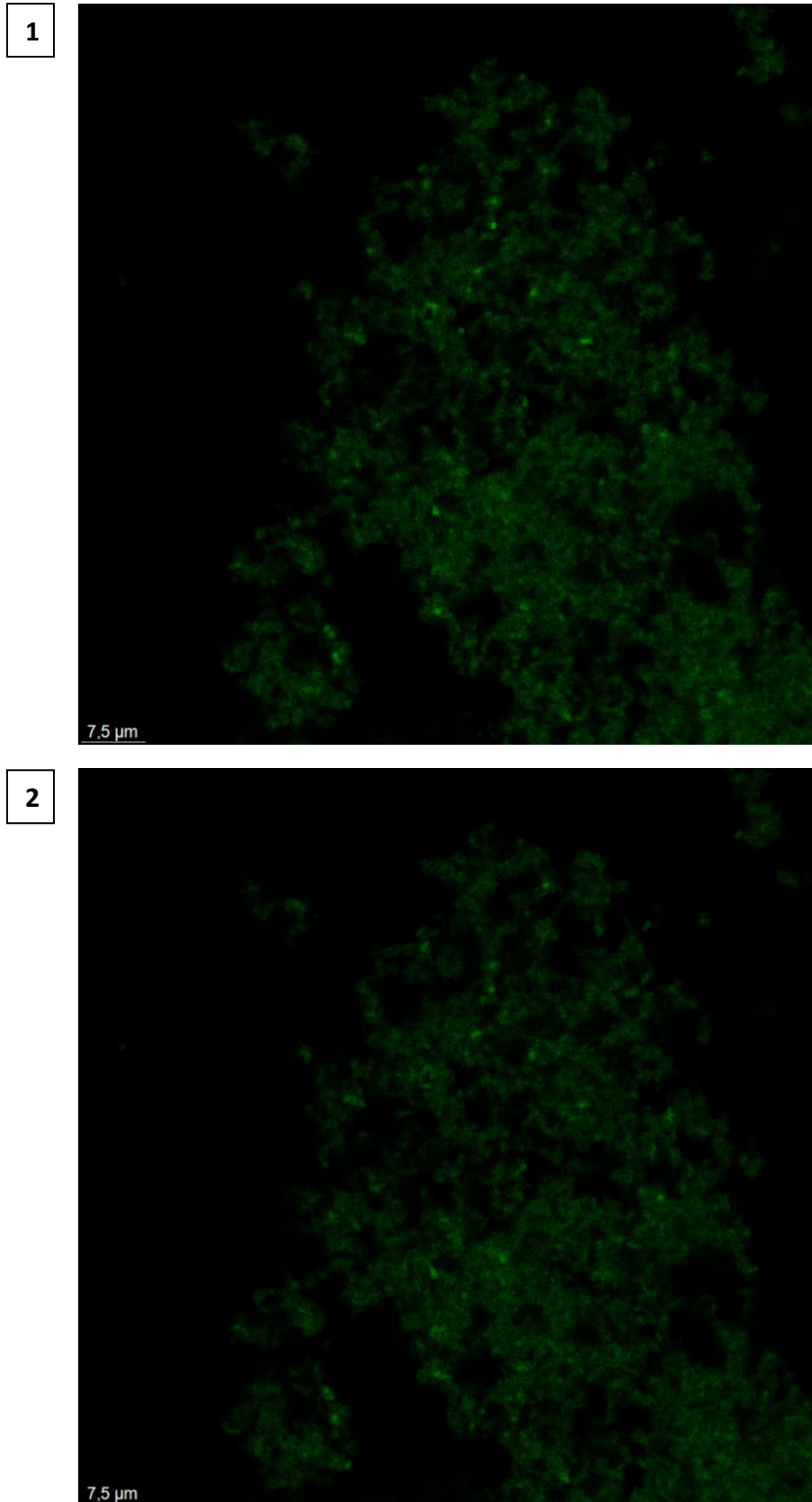


Figura suplementar 5 (FS5) - Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2370 após 20 horas de indução em meio NYG. 1 e 2: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

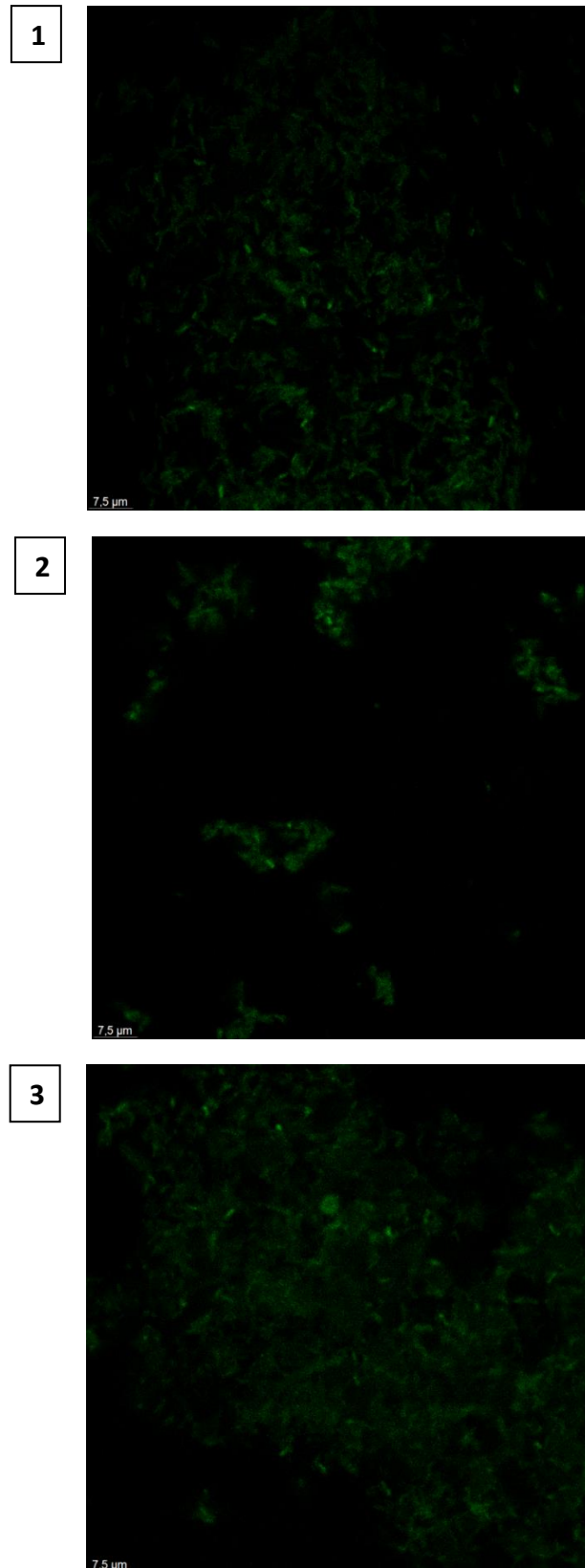


Figura suplementar 6 (FS6)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2370 após 20 horas de indução em meio XVM2. 1, 2, 3: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.



Figura suplementar 7 (FS7)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2922 após 20 horas de indução em meio NYG. 1 e 2: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

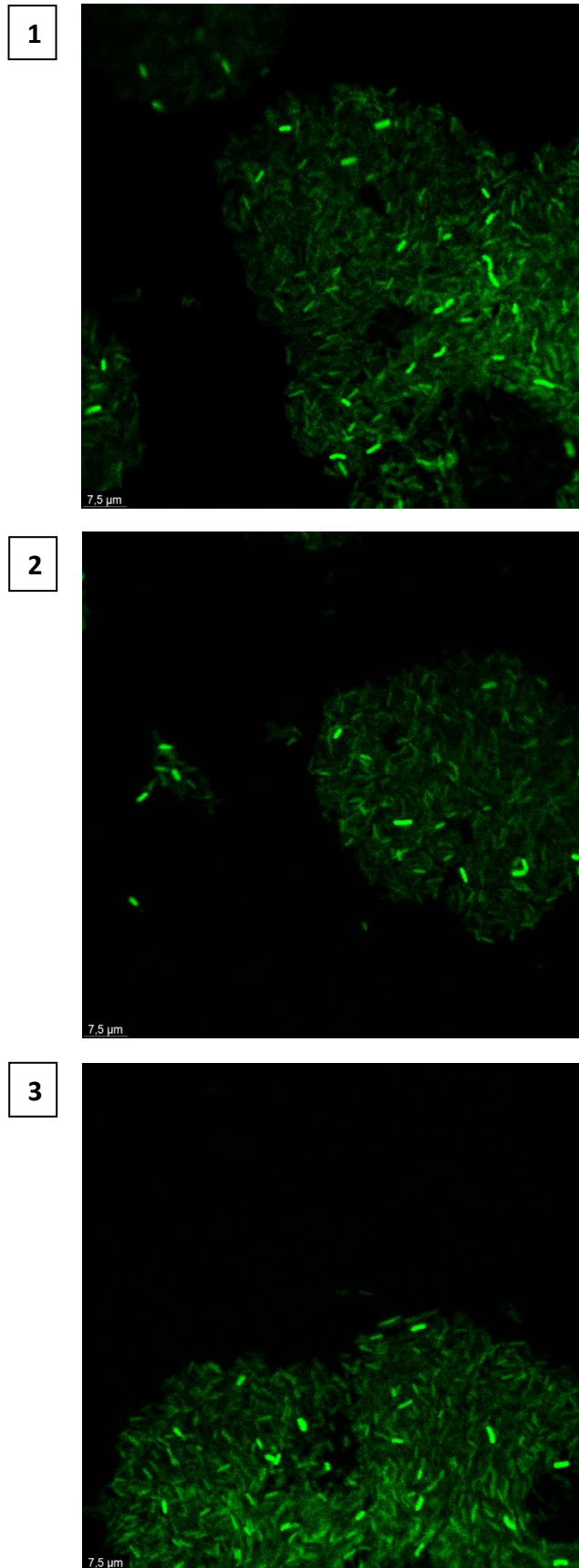


Figura suplementar 8 (FS8) - Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2922 após 20 horas de indução em meio XVM2. 1, 2, 3: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

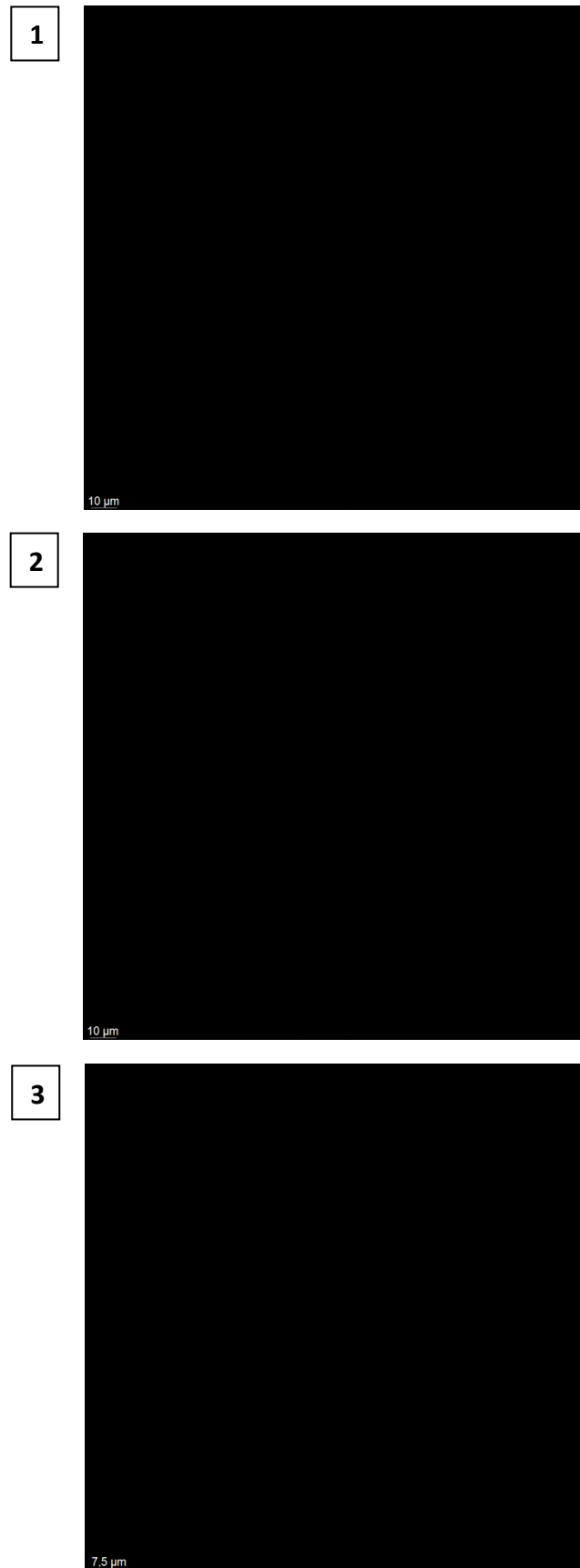


Figura suplementar 9 (FS9)- Expressão de GFP da *X. citri* 306 *wild-type* após 20 horas de indução em meio NYG. 1,2,3: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.



Figura suplementar 10 (FS10)- Expressão de GFP da *X. citri* 306 *wild-type* após 20 horas de indução em meio XVM2. 1 e 2: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

Apêndice C- Valores gerados pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji para calcular a fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) para análise *in vitro*.

Tabela suplementar 1(TS1) - Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0416 após 20 horas de indução em meio NYG.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,9	7.203	6.482	33603		6481,19	7174,19
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,9	7.613	6.851	35514		6850,19	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,9	9.104	8.192	42469		8191,19	
Background (área 1)	4	0,9	0,212	0,191	991			
Background (área 2)	5	0,9	0,222	0,199	1034			
Background (área 3)	6	0,9	0,228	0,205	1063			
Média do <i>background</i>		0,9						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,853	5.095	4.345	22526		4344,272391	3518,272391
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,853	4.020	3.428	17.771.000		3427,272391	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,853	3.265	2.784	14.433.000		2783,272391	
Background (área 1)	4	0,853	0,379	0,323	1.675.000			
Background (área 2)	5	0,853	0,197	0,168	873.000			
Background (área 3)	6	0,853	0,282	0,24	1.245.000			
Média do <i>background</i>		0,853						

Tabela suplementar 2 (TS2)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0416 após 20 horas de indução em meio XVM2.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,946	8.095	7.657	39696		7656,105084	8574,771751
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,946	10.241	9.688	50.222.000		9687,105084	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,946	8.860	8.382	43.451.000		8381,105084	
Background (área 1)	4	0,946	0,022	0,021	109.000			
Background (área 2)	5	0,946	0,025	0,024	122.000			
Background (área 3)	6	0,946	0,033	0,031	162.000			
Média do <i>background</i>		0,946						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,982	10.218	10.032	52008		10031,03568	10496,36901
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,982	12.826	12.593	65284		12592,03568	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,982	9.031	8.867	45.968.000		8866,035676	
Background (área 1)	4	0,982	0,014	0,013	69.000			
Background (área 2)	5	0,982	0,013	0,013	68.000			
Background (área 3)	6	0,982	0,02	0,02	103.000			
Média do <i>background</i>		0,982						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,888	8.319	7.388	38301		7387,211456	6542,544789
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,888	7.340	6.519	33793		6518,211456	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,888	6.444	5.723	29666		5722,211456	
Background (área 1)	4	0,888	0,022	0,019	101			
Background (área 2)	5	0,888	0,017	0,015	79.000			
Background (área 3)	6	0,888	0,015	0,014	70.000			
Média do <i>background</i>		0,888						

Tabela suplementar 3 (TS3)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0360 após 20 horas de indução em meio NYG.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,922	41.377	38.152	197782		38151,14992	28124,81658
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,922	15.031	13.860	71850		13859,14992	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,922	35.100	32.365	167780		32364,14992	
Background (área 1)	4	0,922	0.260	0.239	1241			
Background (área 2)	5	0,922	0.207	0.191	988			
Background (área 3)	6	0,922	0.217	0.200	1.035			
Média do <i>background</i>		0,922						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,901	20.779	18.715	97016		18714,1882	21343,85487
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,901	16.070	14.473	75.030		14472,1882	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,901	34.249	30.846	159.907		30845,1882	
Background (área 1)	4	0,901	0,251	0,226	1.170			
Background (área 2)	5	0,901	0,277	0,249	1.293			
Background (área 3)	6	0,901	0,537	0,483	2.506			
Média do <i>background</i>		0,901						

Tabela suplementar 4 (TS4)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTCF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0360 após 20 horas de indução em meio XVM2.

Imagem 1		Area	Mean	Integrated Density	Raw Integrated Density		CTCF= Int. Den. -(Area of sel. Cell X Mean Fluor. of Back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,932	0,067	0,062	323		-0,806624	-0,812290667
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,932	0,07	0,066	340		-0,802624	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,932	0,044	0,041	215		-0,827624	
Background (área 1)	4	0,932	0,041	0,038	196			
Background (área 2)	5	0,932	0,085	0,079	412			
Background (área 3)	6	0,932	0,007	0,007	35			
Média do <i>background</i>		0,932						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,951	0,005	0,004	23		-0,900401	-0,872734333
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,951	0,03	0,028	147		-0,876401	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,951	0,066	0,063	325.000		-0,841401	
Background (área 1)	4	0,951	0,017	0,016	84.000			
Background (área 2)	5	0,951	0,073	0,069	359.000			
Background (área 3)	6	0,951	0,022	0,021	107.000			
Média do <i>background</i>		0,951						
Imagem 3		Area	Mean	Integrated Density	Raw Integrated Density		CTCF= Int. Den. - (Area of sel. Cell X Mean Fluor. of Back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,958	0,02	0,019	97.000		-0,898764	-0,862764
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,958	0,126	0,121	625.000		-0,796764	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,958	0,026	0,025	129.000		-0,892764	
Background (área 1)	4	0,958	0,054	0,052	269.000			
Background (área 2)	5	0,958	0,045	0,043	224.000			
Background (área 3)	6	0,958	0,014	0,013	68.000			
Média do <i>background</i>		0,958						

Tabela suplementar 5 (TS5)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2370 após 20 horas de indução em meio NYG.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,946	21.187	20.042	103.899.000		20041,10508	18510,10508
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,946	13.873	13.123	68.031.000		13122,10508	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,946	23.645	22.368	115.955.000		22367,10508	
Background (área 1)	4	0,946	0,491	0,465	2.409.000			
Background (área 2)	5	0,946	0,428	0,405	2.101.000			
Background (área 3)	6	0,946	0,509	0,481	2.495.000			
Média do <i>background</i>		0,946						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,983	12.825	12.602	65330		12601,03371	15793,03371
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,983	16.814	16.522	85649		16521,03371	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,983	18.580	18.258	94647		18257,03371	
Background (área 1)	4	0,983	0,433	0,426	2206			
Background (área 2)	5	0,983	0,449	0,441	2287			
Background (área 3)	6	0,983	0,367	0,36	1868			
Média do <i>background</i>		0,983						

Tabela suplementar 6 (TS6)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2370 após 20 horas de indução em meio XVM2.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,997	17.030	16.981	88028		16980,00599	21105,67266
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,997	19.959	19.901	103168		19900,00599	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,997	26.515	26.438	137057		26437,00599	
Background (área 1)	4	0,997	0,106	0,106	550			
Background (área 2)	5	0,997	0,174	0,174	901			
Background (área 3)	6	0,997	0,127	0,127	656			
Média do <i>background</i>		0,997						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,982	21.907	21.518	111550		21517,03568	23939,70234
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,982	27.167	26.685	138335		26684,03568	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,982	24.046	23.619	122441		23618,03568	
Background (área 1)	4	0,982	0,353	0,347	1798			
Background (área 2)	5	0,982	0,338	0,332	1720			
Background (área 3)	6	0,982	0,149	0,147	760.000			
Média do <i>background</i>		0,982						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,955	26.863	25.661	133027		25660,08798	24025,08798
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,955	23.470	22.420	116224		22419,08798	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,955	25.121	23.997	124399		23996,08798	
Background (área 1)	4	0,955	0,294	0,281	1456			
Background (área 1)	5	0,955	0,159	0,152	786			
Background (área 1)	6	0,955	0,24	0,229	1189			
Média do <i>background</i>		0,955						

Tabela suplementar 7(TS7)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2922 após 20 horas de indução em meio NYG.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,958	0,025	0,024	122		-0,893764	-0,801764
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,958	0,101	0,096	499		-0,821764	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,958	0,239	0,228	1184		-0,689764	
Background (área 1)	4	0,958	0,008	0,008	39			
Background (área 2)	5	0,958	0,018	0,017	89			
Background (área 3)	6	0,958	0,021	0,02	105			
Média do <i>background</i>		0,958						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,958	0,024	0,023	120		-0,894764	-0,819430667
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,958	0,136	0,131	677		-0,786764	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,958	0,147	0,141	731		-0,776764	
Background (área 1)	4	0,958	0,026	0,025	128			
Background (área 2)	5	0,958	0,015	0,015	76			
Background (área 3)	6	0,958	0,014	0,013	68			
Média do <i>background</i>		0,958						

Tabela suplementar 8(TS8)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2922 após 20 horas de indução em meio XVM2.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,946	88.336	83.564	433198		83563,10508	72565,77175
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,946	50.245	47.531	246401		47530,10508	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,946	91.550	86.605	448959		86604,10508	
Background (área 1)	4	0,946	0,69	0,652	3382			
Background (área 1)	5	0,946	0,24	0,227	1179			
Background (área 1)	6	0,946	0,265	0,251	1302			
Média do <i>background</i>		0,946						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,932	60.741	56.617	293501		56616,13138	51764,79804
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,932	58.701	54.715	283645		54714,13138	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,932	47.168	43.965	227914		43964,13138	
Background (área 1)	4	0,932	1.447	1.348	6990			
Background (área 2)	5	0,932	1.432	1.335	6921			
Background (área 3)	6	0,932	1.502	1.400	7258			
Média do <i>background</i>		0,932						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,951	70.096	66.662	345575		66661,0956	63558,42893
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,951	75.367	71.674	371557		71673,0956	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,951	55.038	52.342	271339		52341,0956	
Background (área 1)	4	0,951	1.969	1.872	9706			
Background (área 2)	5	0,951	1.960	1.864	9664			
Background (área 3)	6	0,951	1.751	1.666	8634			
Média do <i>background</i>		0,951						

Tabela suplementar 9 (TS9)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 *wild-type* após 20 horas de indução em meio NYG.

Imagem 1		Area	Mean	Integrated Density	Raw Integrated Density		CTCF= Int. Den. -(Area of sel. Cell X Mean Fluor. of Back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,932	0,067	0,062	323		-0,806624	-0,812290667
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,932	0,07	0,066	340		-0,802624	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,932	0,044	0,041	215		-0,827624	
Background (área 1)	4	0,932	0,041	0,038	196			
Background (área 2)	5	0,932	0,085	0,079	412			
Background (área 3)	6	0,932	0,007	0,007	35			
Média do <i>background</i>		0,932						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,951	0,005	0,004	23		-0,900401	-0,872734333
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,951	0,03	0,028	147		-0,876401	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,951	0,066	0,063	325.000		-0,841401	
Background (área 1)	4	0,951	0,017	0,016	84.000			
Background (área 2)	5	0,951	0,073	0,069	359.000			
Background (área 3)	6	0,951	0,022	0,021	107.000			
Média do <i>background</i>		0,951						
Imagem 3		Area	Mean	Integrated Density	Raw Integrated Density		CTCF= Int. Den. - (Area of sel. Cell X Mean Fluor. of Back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,958	0,02	0,019	97.000		-0,898764	-0,862764
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,958	0,126	0,121	625.000		-0,796764	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,958	0,026	0,025	129.000		-0,892764	
Background (área 1)	4	0,958	0,054	0,052	269.000			
Background (área 2)	5	0,958	0,045	0,043	224.000			
Background (área 3)	6	0,958	0,014	0,013	68.000			
Média do <i>background</i>		0,958						

Tabela suplementar 10 (TS10)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 *wild-type* após 20 horas de indução em meio XVM2.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,911	5.931	5.405	28019		5404,170079	5012,503412
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,911	4.890	4.456	23102		4455,170079	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,911	5.683	5.179	26846		5178,170079	
Background (área 1)	4	0,911	1.364	1.243	6444			
Background (área 2)	5	0,911	1.331	1.213	6.290.000			
Background (área 3)	6	0,911	1.286	1.172	6.074.000			
Média do <i>background</i>		0,911						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	0,934	4.665	4.359	22.599		4358,127644	4519,460977
Célula Bacteriana (área 2)	2	0,934	4.860	4.541	23.542		4540,127644	
Célula Bacteriana (área 3)	3	0,934	4.988	4.661	24.163		4660,127644	
Background (área 1)	4	0,934	1.565	1.463	7.583			
Background (área 2)	5	0,934	1.547	1.446	7.494.000			
Background (área 3)	6	0,934	1.720	1.607	8.332.000			
Média do <i>background</i>		0,934						

Tabela suplementar 11 (TS11)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* - CTF) da expressão de GFP GFP em *X. citri 306 wild-type* após 20 horas de indução nos meios NYG e XVM2.

Amostras	Média 1	Média 2	Média 3	Ajuste de média	Média Geral	XVM2-NYG	Desvio Padrão	Erro Padrão	Coefficiente de Variação
<i>X. citri</i> 306_NYG	0	0	0	-	0	4765,982195	0	0	-
<i>X. citri</i> 306_XVM2	5012,503412	4519,460977	4765,982195	-	4765,982195		246,5212175	5,233664719	5,17%
pRMF1-GFP0416_NYG	7174,19	3518,272391	5346,231196	6260,210598	6260,210598	3275,359782	913,9794023	10,07736409	14,60%
pRMF1-GFP0416_XVM2	8574,771751	10496,36901	6542,544789	9535,57038	9535,57038		960,7986293	10,33225064	10,08%
pRMF1-GFP0360_NYG	28124,81658	21343,85487	24734,33572	-	24734,33572	6367,354913	3390,480859	19,40927859	13,71%
pRMF1-GFP0360_XVM2	28620,14622	33128,13138	31556,79431	-	31101,69064		2288,191873	15,94501619	7,36%
pRMF1-GFP2370_NYG	18510,10508	15793,03371	17151,5694	-	17151,5694	5871,918261	1358,535687	12,28610636	7,92%
pRMF1-GFP2370_XVM2	21105,67266	23939,70234	24025,08798	-	23023,48766		1661,425129	13,58686101	7,22%
pRMF1-GFP2922_NYG	0	0	0	0	0	68062,10034	0	0	-
pRMF1-GFP2922_XVM2	72565,77175	51764,79804	63558,42893	68062,10034	68062,10034		4503,671409	22,3697996	6,62%

Apêndice D- Imagens utilizadas para calcular a fluorescência total corrigida (Corrected Total Fluorescence -CTF) utilizando a ferramenta de seleção de pixels no software Fiji para análise *in planta*.

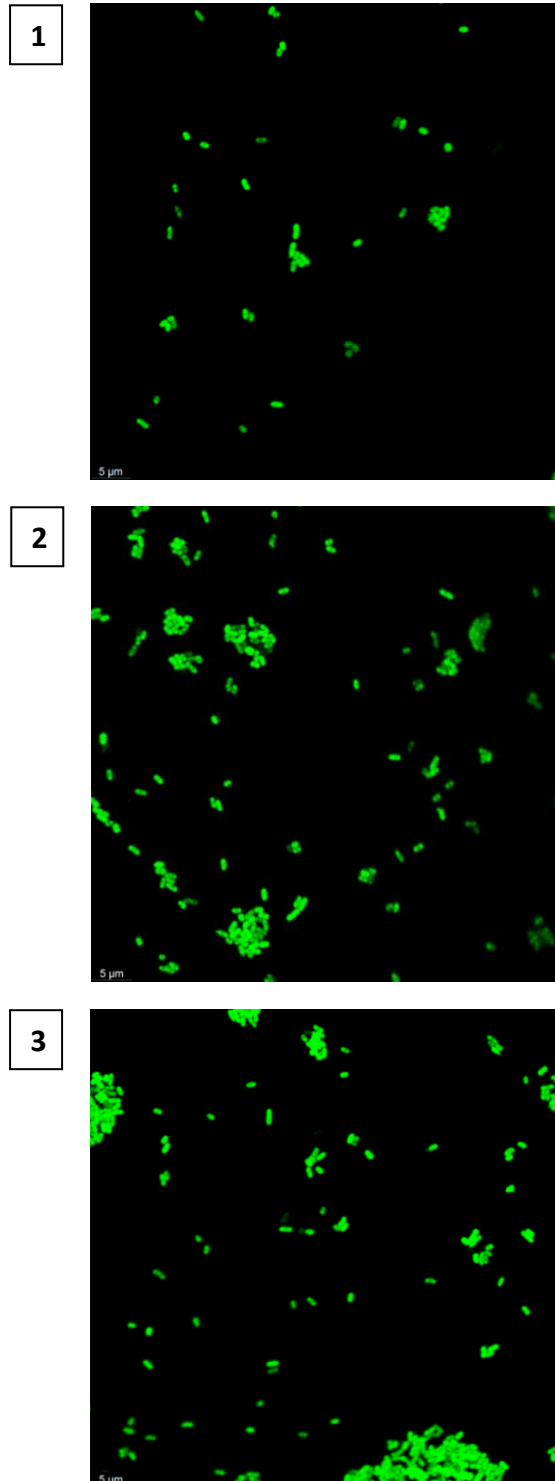


Figura suplementar 1(FS1)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0416 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. 1,2,3: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

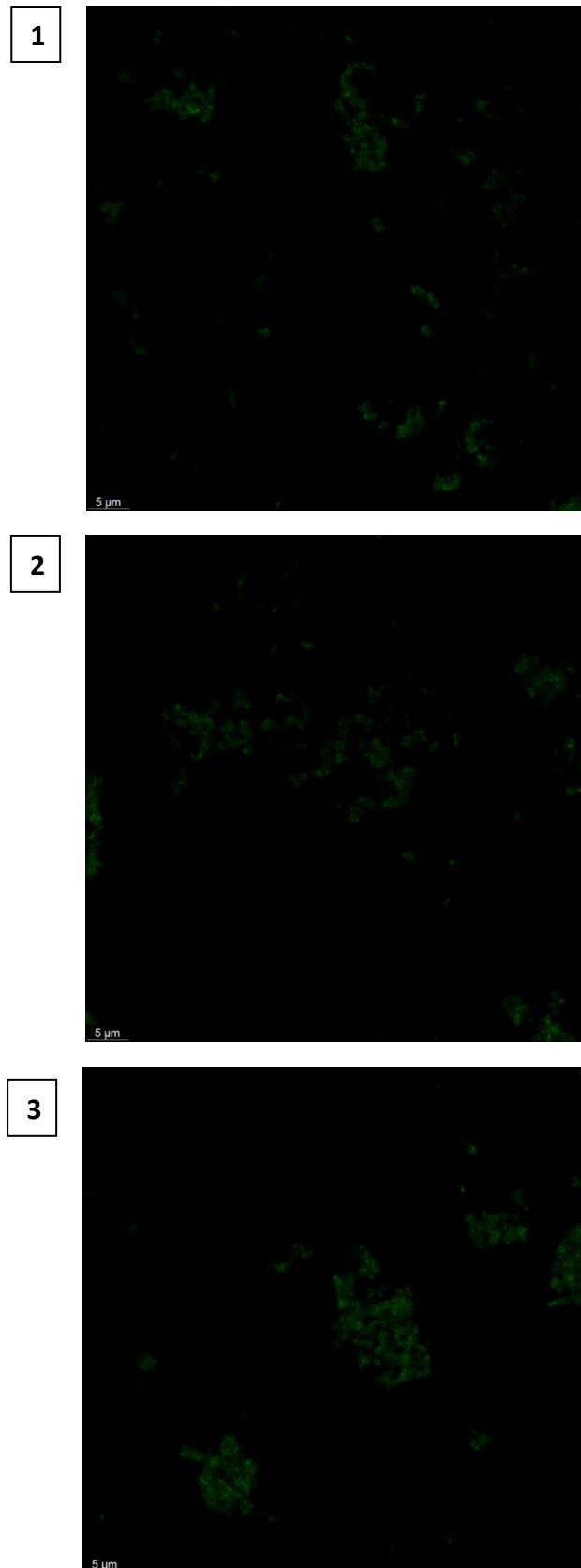


Figura suplementar 2 (FS2)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0360 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. 1,2,3: Imagens utilizada para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

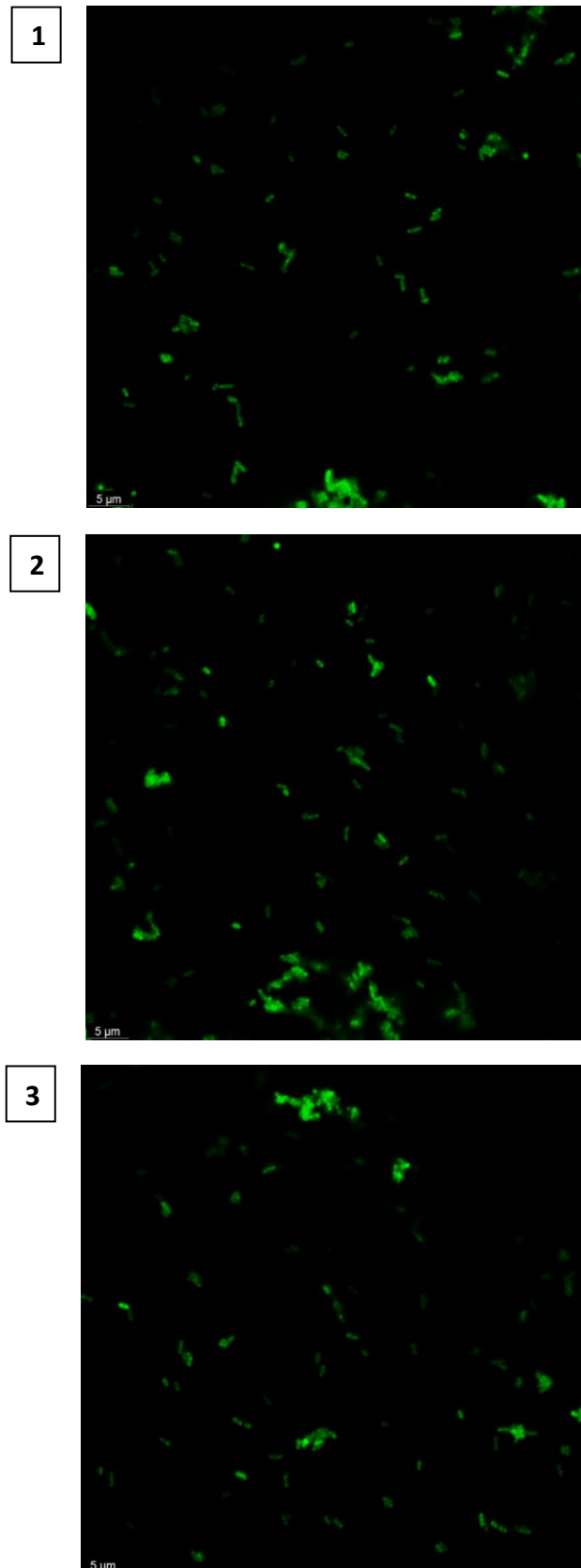


Figura suplementar 1 (FS3)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2370 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. 1,2,3: Imagens utilizadas para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

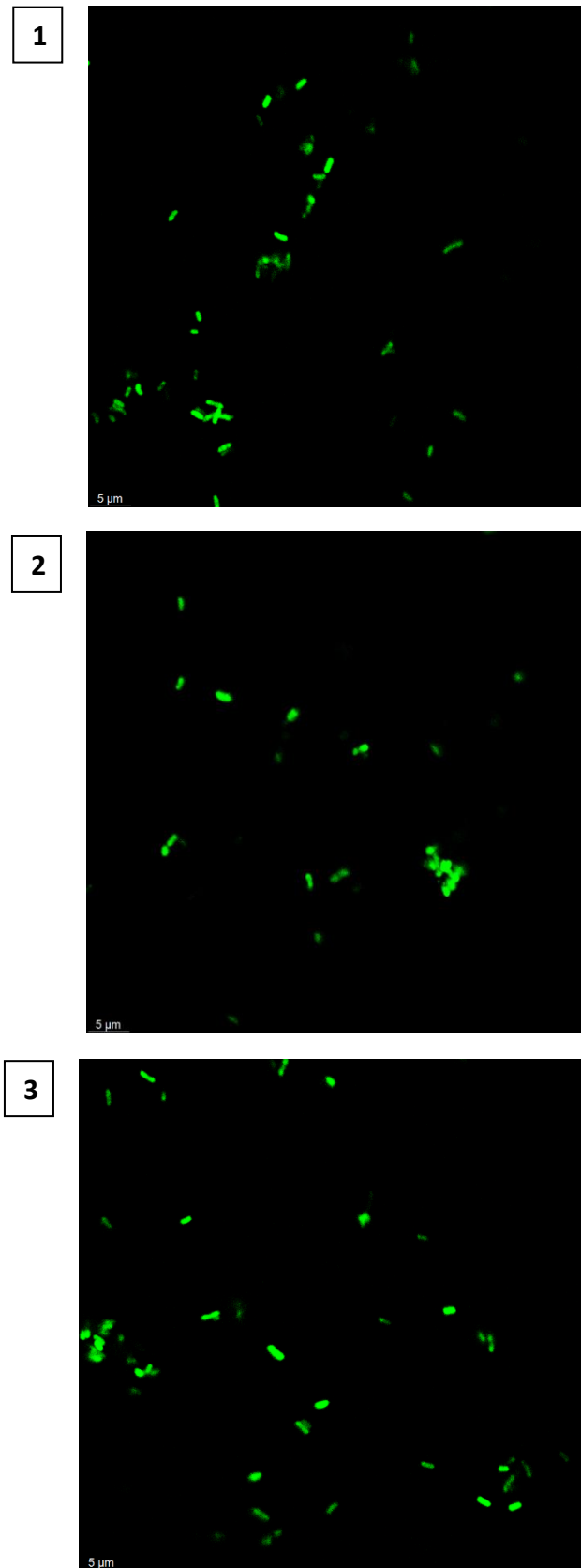


Figura suplementar 4 (FS4)- Expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2922 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. 1,2,3: Imagens utilizadas para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

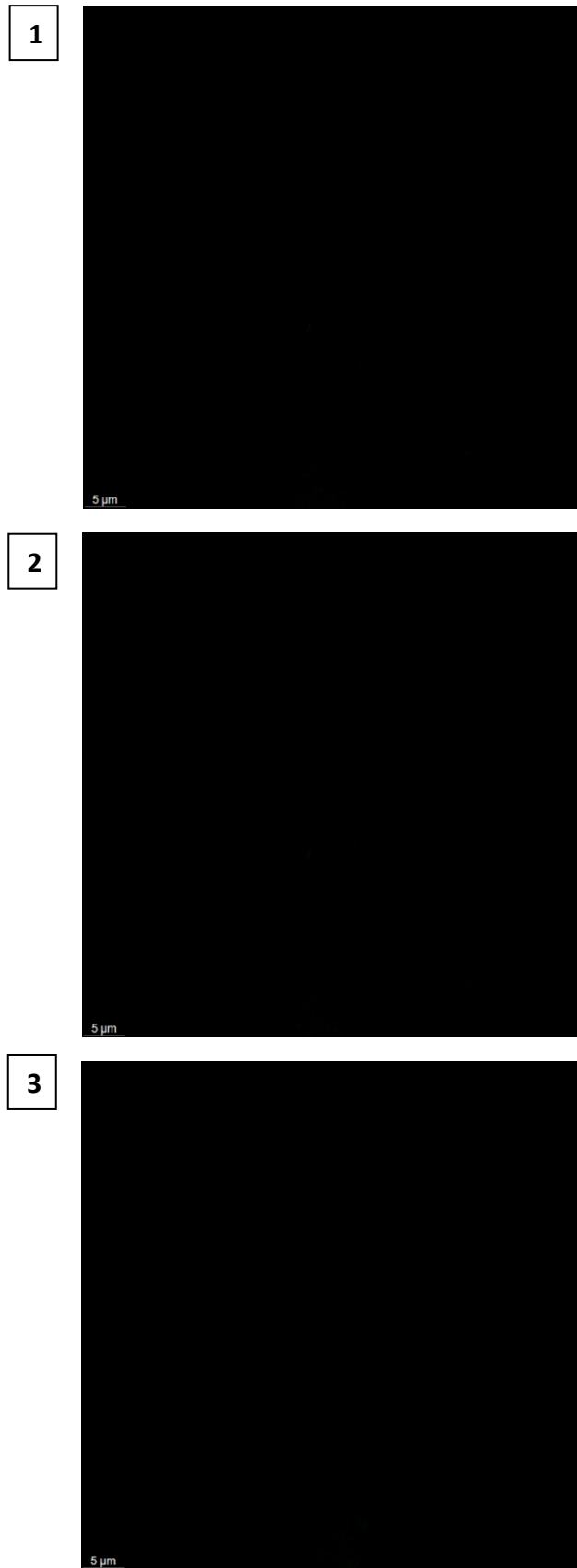


Figura suplementar 5 (FS5)- Expressão de GFP da *X. citri* 306 *wild-type* 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'. 1,2,3: Imagens utilizadas para mensurar a fluorescência pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji.

Apêndice E- Valores gerados pela ferramenta de seleção de pixels no software Fiji para calcular a fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) para análise *in planta*.

Tabela suplementar 1 (TS1)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0416 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce ‘Pêra’.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,072	58752,000	62956,000	326366,000		62954,85082	54572,85082
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,072	64896,000	69541,000	360500000,000		69539,85082	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,072	29140,000	31225,000	161871000,000		31223,85082	
Background (área 1)	4	1,072	0,256	0,274	1423000,000			
Background (área 2)	5	1,072	0,231	0,248	1284000,000			
Background (área 3)	6	1,072	0,459	0,492	2550000,000			
Média do <i>background</i>		1,072						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,057	140379,000	148340,000	768995,000		148338,8828	142822,8828
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,057	172574,000	182361,000	945358,000		182359,8828	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,057	92524,000	97771,000	506846,000		97769,88275	
Background (área 1)	4	1,057	0,570	0,602	3120,000			
Background (área 2)	5	1,057	0,642	0,678	3515,000			
Background (área 3)	6	1,057	1039,000	1098,000	5690,000			
Média do <i>background</i>		1,057						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,055	208682,000	220114,000	1141071,000		220112,887	163600,887
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,055	99352,000	104795,000	543259,000		104793,887	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,055	159913,000	165897,000	860012,000		165895,887	
Background (área 1)	4	1,055	0,460	0,485	2513,000			
Background (área 2)	5	1,055	0,542	0,571	2962,000			
Background (área 3)	6	1,055	0,346	0,365	1891,000			
Média do <i>background</i>		1,055						

Tabela suplementar 3 (TS3)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP0360 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,094	22991,000	25160,000	130429,000		25158,80316	21314,1365
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,094	22429,000	24545,000	127242000,000		24543,80316	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,094	13014,000	14241,000	73827000,000		14239,80316	
Background (área 1)	4	1,094	0,130	0,142	736000,000			
Background (área 2)	5	1,094	0,704	0,770	3992000,000			
Background (área 3)	6	1,094	0,910	0,996	5164000,000			
Média do background		1,094						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,092	14793,000	16151,000	83728,000		16149,80754	15139,14087
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,092	11915,000	13009,000	67438,000		13007,80754	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,092	14994,000	16261,000	84295,000		16259,80754	
Background (área 1)	4	1,092	0,247	0,269	1397,000			
Background (área 2)	5	1,092	0,309	0,337	1749,000			
Background (área 3)	6	1,092	0,132	0,144	746,000			
Média do background		1,092						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,096	25250,000	27686,000	143523,000		27684,79878	28687,46545
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,096	30200,000	33113,000	171656,000		33111,79878	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,096	24185,000	25267,000	130985,000		25265,79878	
Background (área 1)	4	1,096	0,183	0,201	1041,000			
Background (área 2)	5	1,096	0,269	0,295	1531,000			
Background (área 3)	6	1,096	0,184	0,202	1046,000			
Média do background		1,096						

Tabela suplementar 4 (TS4)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 contendo a construção pRMF1-GFP2370 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,055	104725,000	110463,000	572638,000		110461,887	53815,55364
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,055	17933,000	18916,000	9806000,000		18914,88698	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,055	30406,000	32071,000	166258000,000		32069,88698	
Background (área 1)	4	1,055	0,158	0,167	865000,000			
Background (área 2)	5	1,055	1827,000	1927,000	9990000,000			
Background (área 3)	6	1,055	0,817	0,862	4467000,000			
Média do <i>background</i>		1,055						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,044	42391,000	44255,000	229420,000		44253,91006	42927,2434
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,044	52314,000	54614,000	283121,000		54612,91006	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,044	28656,000	29916,000	155087,000		29914,91006	
Background (área 1)	4	1,044	0,169	0,177	917,000			
Background (área 2)	5	1,044	0,288	0,301	1561,000			
Background (área 3)	6	1,044	0,363	0,379	1965,000			
Média do <i>background</i>		1,044						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,095	69694,000	76308,000	395581000,000		76306,80098	46995,80098
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,095	34915,000	38228,000	198176000,000		38226,80098	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,095	24162,000	26455,000	137144000,000		26453,80098	
Background (área 1)	4	1,095	0,191	0,209	1084000,000			
Background (área 2)	5	1,095	0,227	0,248	1288000,000			
Background (área 3)	6	1,095	0,216	0,237	1228000,000			
Média do <i>background</i>		1,095						

Tabela suplementar 5 (TS5)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em X. citri 306 contendo a construção pRMF1-GFP2922 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce 'Pêra'.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,044	27921,000	29154,000	151136,000		29152,91006	45572,91006
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,044	65774,000	68679,000	356033,000		68677,91006	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,044	37244,000	38889,000	201600,000		38887,91006	
Background (área 1)	4	1,044	0,023	0,024	124,000			
Background (área 2)	5	1,044	0,015	0,016	81,000			
Background (área 3)	6	1,044	0,110	0,115	595,000			
Média do background		1,044						
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,043	108786,000	113487,000	588317,000		113485,9122	54126,24548
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,043	22659,000	23638,000	122539,000		23636,91215	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,043	24210,000	25257,000	130930,000		25255,91215	
Background (área 1)	4	1,043	0,529	0,552	2862,000			
Background (área 2)	5	1,043	0,761	0,794	4118,000			
Background (área 3)	6	1,043	0,310	0,324	1679000,000			
Média do background		1,043						
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta		FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do back.)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,043	32515,000	33920,000	175841000,000		33918,91215	46667,57882
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,043	31428,000	32785,000	169960000,000		32783,91215	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,043	70264,000	73301,000	379990000,000		73299,91215	
Background (área 1)	4	1,043	0,014	0,014	74000,000			
Background (área 2)	5	1,043	0,012	0,013	65000,000			
Background (área 3)	6	1,043	0,023	0,024	124000,000			
Média do background		1,043						

Tabela suplementar 6 (TS6)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 *wild-type* 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce ‘Pêra’.

Imagem 1		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta	FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,044	0,088	0,092	475,000	-0,997936	-0,997269333
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,044	0,113	0,118	613,000	-0,971936	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,044	0,065	0,068	353000,000	-1,021936	
Background (área 1)	4	1,044	0,079	0,083	429000,000		
Background (área 2)	5	1,044	0,074	0,078	402000,000		
Background (área 3)	6	1,044	0,068	0,071	369000,000		
Média do <i>background</i>		1,044					
Imagem 2		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta	FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,083	0,089	0,096	500,000	-1,076889	-1,016889
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,083	0,086	0,094	485000,000	-1,078889	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,083	0,256	0,278	1440000,000	-0,894889	
Background (área 1)	4	1,083	0,064	0,070	362000,000		
Background (área 2)	5	1,083	0,069	0,074	386000,000		
Background (área 3)	6	1,083	0,067	0,073	379000,000		
Média do <i>background</i>		1,083					
Imagem 3		Área	Média	Densidade integrada	Densidade integrada bruta	FTC= Den.Int. - (Área da célula sel. X Fluor. média do <i>back.</i>)	Média
Célula Bacteriana (área 1)	1	1,055	0,151	0,160	828,000	-0,953025	-0,942691667
Célula Bacteriana (área 2)	2	1,055	0,163	0,172	894,000	-0,941025	
Célula Bacteriana (área 3)	3	1,055	0,170	0,179	927000,000	-0,934025	
Background (área 1)	4	1,055	0,065	0,068	355000,000		
Background (área 2)	5	1,055	0,068	0,072	373000,000		
Background (área 3)	6	1,055	0,039	0,041	213000,000		
Média do <i>background</i>		1,055					

Tabela suplementar 7(TS7)- Normalização de dados. Cálculo da fluorescência total corrigida (*Corrected Total Fluorescence* -CTF) da expressão de GFP em *X. citri* 306 *wild-type* 5 dias após a inoculação em folhas de laranja doce ‘Pêra’.

	Amostras	Média 1	Média 2	Média 3	Ajuste de média	Média Geral	Desvio Padrão	Erro Padrão	Coeficiente de Variação
<i>in planta</i> (120 horas)	<i>X. citri</i> 306	0	0	0	-	0	0	0	
	pRMF1-GFP0416	54572,85082	142822,8828	163600,887	153211,8849	153211,8849	10389,00211	33,97548481	6,78%
	pRMF1-GFP0360	21314,1365	15139,14087	28687,46545	25000,80097	25000,80097	3686,664477	20,23930301	14,75%
	pRMF1-GFP2370	53815,55364	42927,2434	46995,80098	-	47912,866	5501,779821	24,72466115	11,48%
	pRMF1-GFP2922	45572,91006	54126,24548	46667,57882	-	48788,91146	4654,559681	22,7414445	9,54%

Apêndice F- Análise estatísticas após o crescimento de *X. citri* em meios de cultura (*in vitro*).

Tabela suplementar 1 (TS1)- Test t de Student referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelo promotor PIP-box da construção pRMF1-GFP0416 na presença do meio rico NYG e meio de indução a virulência XVM2, após 20 horas de indução, realizado no software PRISMA.

Table Analyzed	pRMF1GFP0416
Column B	XVM2
vs.	vs,
Column A	NYG
Unpaired t test	
P value	0,0129
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4,278, df=4
How big is the difference?	
Mean of column A	6260
Mean of column B	9536
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	3275 $\pm$ 765,6
95% confidence interval	1150 to 5401
R squared (eta squared)	0,8206
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1,105, 2, 2
P value	0,9501
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	3
Sample size, column B	3

Tabela suplementar 2 (TS2)- Test t de Student referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelo promotor PIP-box da construção pRMF1-GFP0360 na presença do meio rico NYG e meio de indução a virulência XVM2, após 20 horas de indução, realizado no software PRISMA.

Table Analyzed	pRMF1-GFP0360
Column B	XVM2
vs.	vs,
Column A	NYG
Unpaired t test	
P value	0,0543
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2,696, df=4
How big is the difference?	
Mean of column A	24734
Mean of column B	31102
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	6367 $\pm$ 2362
95% confidence interval	-189,4 to 12924
R squared (eta squared)	0,6451
F test to compare variances	
F, DF _n , Df _d	2,196, 2, 2
P value	0,6259
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	3
Sample size, column B	3

Tabela suplementar 3 (TS3)- Test t de Student referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelo promotor PIP-box da construção pRMF1-GFP2370 na presença do meio rico NYG e meio de indução a virulência XVM2, após 20 horas de indução, realizado no software PRISMA.

Table Analyzed	pRMF1-GFP2370
Column B	XVM2
vs.	vs,
Column A	NYG
Unpaired t test	
P value	0,009
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4,739, df=4
How big is the difference?	
Mean of column A	17152
Mean of column B	23023
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	5872 $\pm$ 1239
95% confidence interval	2432 to 9312
R squared (eta squared)	0,8488
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1,496, 2, 2
P value	0,8014
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	3
Sample size, column B	3

Tabela suplementar 4 (TS4)- Test t de Student referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelo promotor PIP-box da construção pRMF1-GFP2922 na presença do meio rico NYG e meio de indução a virulência XVM2, após 20 horas de indução, realizado no software PRISMA.

Table Analyzed	pRMF1GFP2922
Column B	XVM2
vs.	vs,
Column A	NYG
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=26,18, df=4
How big is the difference?	
Mean of column A	0
Mean of column B	68062
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	68062 $\pm$ 2600
95% confidence interval	60843 to 75281
R squared (eta squared)	0,9942
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	Infinity, 2, 2
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	3
Sample size, column B	3

Tabela suplementar 5 (TS5)- Análise de variância (ANOVA) referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelos diferentes promotores PIP-box e por *X. citri* 306 *wild type* (controle) em meio indutor XVM2 após 20 horas de incubação, realizado no software PRISMA.

Table Analyzed	Teste ANOVA e Tukey				
Data sets analyzed	A-E				
ANOVA summary					
F	282.1				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R squared	0.9912				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1.270 (4, 10)				
P value	0.3443				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)					
P value					
P value summary					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?					
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	7683820209	4	1920955052	F (4, 10) = 282.1	P<0.0001
Residual (within columns)	68087053	10	6808705		
Total	7751907262	14			
Data summary					
Number of treatments (columns)	5				
Number of values (total)	15				

Tabela suplementar 6 (TS6)- Test de Tukey referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelos diferentes promotores PIP-box e por *X. citri* 306 *wild type* (controle) em meio indutor XVM2 após 20 horas de incubação, realizado no software PRISMA.

Number of families	1							
Number of comparisons per family	10							
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value			
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0416	-4770	-11781 to 2242	No	ns	0.2413	A-B		
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0360	-26336	-33347 to -19324	Yes	****	<0.0001	A-C		
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2370	-14486	-21497 to -7474	Yes	***	0.0004	A-D		
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2922	-63296	-70308 to -56284	Yes	****	<0.0001	A-E		
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC0360	-21566	-28578 to -14554	Yes	****	<0.0001	B-C		
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2370	-9716	-16728 to -2704	Yes	**	0.0072	B-D		
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2922	-58527	-65538 to -51515	Yes	****	<0.0001	B-E		
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2370	11850	4838 to 18862	Yes	**	0.0017	C-D		
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2922	-36960	-43972 to -29949	Yes	****	<0.0001	C-E		
PIPbox XAC2370 vs. PIPbox XAC2922	-48811	-55822 to -41799	Yes	****	<0.0001	D-E		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0416	0.000	4770	-4770	2131	3	3	3.166	10
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0360	0.000	26336	-26336	2131	3	3	17.48	10
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2370	0.000	14486	-14486	2131	3	3	9.615	10
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2922	0.000	63296	-63296	2131	3	3	42.02	10
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC0360	4770	26336	-21566	2131	3	3	14.32	10
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2370	4770	14486	-9716	2131	3	3	6.449	10
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2922	4770	63296	-58527	2131	3	3	38.85	10
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2370	26336	14486	11850	2131	3	3	7.866	10
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2922	26336	63296	-36960	2131	3	3	24.53	10
PIPbox XAC2370 vs. PIPbox XAC2922	14486	63296	-48811	2131	3	3	32.40	10

Apêndice G- Análise estatísticas após crescimento de *X. citri* em planta hospedeira (*in planta*).

Tabela suplementar 1 (TS1)- Análise de variância (ANOVA) referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelos diferentes promotores PIP-box e por *X. citri* 306 *wild type* (controle) em 'Pêra' (*Citrus sinensis*), 5 dias (120 horas) após a inoculação, realizado no software PRISMA

Table Analyzed	Teste ANOVA e Tukey				
Data sets analyzed	A-E				
ANOVA summary					
F	16.20				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R squared	0.6184				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	6.853 (4, 40)				
P value	0.0003				
P value summary	***				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	401.6				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	74045162092	4	18511290523	F (4, 40) = 16.20	P<0.0001
Residual (within columns)	45693643136	40	1142341078		
Total	119738805228	44			
Data summary					
Number of treatments (columns)	5				
Number of values (total)	45				

Tabela suplementar 2 (TS2)- Teste de Tukey referente a intensidade de fluorescência de GFP induzida pelos diferentes promotores PIP-box e por *X. citri* 306 *wild type* (controle) em 'Pêra' (*Citrus sinensis*), 5 dias (120 horas) após a inoculação, realizado no software PRISMA

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold	Summary	Adjusted P Value			
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0416	-120332	-165838 to -74827	Yes	****	<0.0001	A-B		
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0360	-21714	-67219 to 23792	No	ns	0.6543	A-C		
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2370	-47913	-93418 to -2407	Yes	*	0.0347	A-D		
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2922	-48789	-94294 to -3283	Yes	*	0.0303	A-E		
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC0360	98619	53113 to 144124	Yes	****	<0.0001	B-C		
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2370	72419	26914 to 117925	Yes	***	0.0005	B-D		
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2922	71543	26038 to 117049	Yes	***	0.0005	B-E		
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2370	-26199	-71705 to 19306	No	ns	0.4789	C-D		
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2922	-27075	-72581 to 18430	No	ns	0.4459	C-E		
PIPbox XAC2370 vs. PIPbox XAC2922	-876.0	-46382 to 44629	No	ns	>0.9999	D-E		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0416	1.300e-006	120332	-120332	15933	9	9	10.68	40
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC0360	1.300e-006	21714	-21714	15933	9	9	1.927	40
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2370	1.300e-006	47913	-47913	15933	9	9	4.253	40
<i>X. citri</i> 306 vs. PIPbox XAC2922	1.300e-006	48789	-48789	15933	9	9	4.331	40
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC0360	120332	21714	98619	15933	9	9	8.754	40
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2370	120332	47913	72419	15933	9	9	6.428	40
PIPbox XAC0416 vs. PIPbox XAC2922	120332	48789	71543	15933	9	9	6.350	40
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2370	21714	47913	-26199	15933	9	9	2.325	40
PIPbox XAC0360 vs. PIPbox XAC2922	21714	48789	-27075	15933	9	9	2.403	40
PIPbox XAC2370 vs. PIPbox XAC2922	47913	48789	-876.0	15933	9	9	0.07776	40