

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES-ALVOS NA
PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*
COM ENFOQUE NO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III**

Elkin Fernando Rodas Mendoza

Microbiologista

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES-ALVOS NA
PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*
COM ENFOQUE NO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III**

Elkin Fernando Rodas Mendoza

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho

Coorientador: Dr. Prof. Roberto Hirochi Herai

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

2016

R685i Rodas, Elkin Fernando Mendoza
Identificação de genes-alvos na patogenicidade de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* com enfoque no sistema de secreção tipo III / Elkin Fernando
Rodas Mendoza. -- Jaboticabal, 2016

v, 137 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Banca examinadora: Henrique Ferreira, José Belasque Júnior, Marcos
Tulio Oliveira, Alessandro de Mello Varani

Bibliografia

1. Transcriptoma. 2. Mutagêneses. 3. Interação planta-patógeno.
4. RNA-Seq. 5. T3SS. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461:631.52



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO DE GENES-ALVOS NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COM ENFOQUE NO SISTEMA DE SECREÇÃO III

AUTOR: ELKIN FERNANDO RODAS MENDOZA

ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

CO-ORIENTADORA: FLAVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO

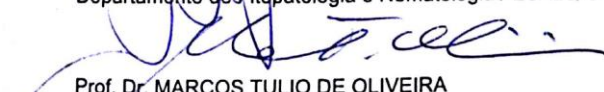
CO-ORIENTADOR: ROBERTO HIROCHI HERAI

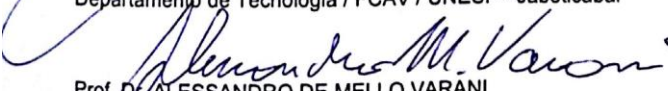
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP/IB - Câmpus Rio Claro


Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR
Departamento de Fitopatologia e Nematologia / ESALQ-USP - Piracicaba/SP


Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ELKIN FERNANDO RODAS MENDOZA - Nascido em 17 de dezembro de 1975, em Cúcuta, Norte de Santander, Colômbia. Filho de Amparo Mendoza de Rodas e Francisco Antonio Rodas Echavarria. Obteve o título de Microbiologista no ano 2002 pela Universidade de Pamplona (Colômbia) e o título de Engenheiro em Produção Biotecnológica no ano de 2010 pela Universidade Francisco de Paula Santander (Colômbia). Concluiu o mestrado em Biologia Celular na Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade dos Andes (Venezuela) no ano 2012 sob orientação do Prof. Dr. Juan Luis Concepción. Durante o Doutorado desenvolveu atividades científicas do projeto intitulado Identificação de genes-alvo envolvidos na virulência e patogênese de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* como uma alternativa para o controle do cancro cítrico sob orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação do Prof. Dr. Roberto Herai e a Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

À minha namorada Yeini Colombia Pineda Caicedo pelo apoio incondicional e
compressão durante estes anos, com amor

DEDICO

À memória de minha mãe Amparo Mendoza,
À minha tia Belen Mendoza,
Aos meus irmãos Liliana, Leonardo e Samir,
com carinho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida ao autor.

Ao professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela oportunidade, ensinamentos, sugestões e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Roberto Hirochi Herai pela coorientação, conselhos e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho, pela coorientação e valiosa ajuda nos experimentos de qRT-PCR, sugestões, correções do manuscrito e pela amizade... Meu agradecimento vai além de um muito obrigado.

Ao professor Dr. Daniel Guariz Pinheiro pela ajuda nas análises dos transcriptomas de *Xac*, pelas discussões científicas, por todos os aprendizados profissionais e pessoais durante estes anos de amizade.

À professora Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelos incentivos e pela oportunidade que me concedeu e a qual me permitiu chegar até aqui.

Aos membros da banca examinadora Dr. José Belasque Jr., Dr. Marcos Túlio Oliveira, Dr. Alessandro de Mello Varani e Dr. Henrique Ferreira por terem aceito o convite tão prontamente, contribuindo significativamente com o trabalho.

A minhas amigas especiais do LBM : Angela Niño Santisteban, Thaísa Martins, Aline Lopes, Helen Penha e Julie Anne. Tenham certeza que o prazer em conhecê-las foi, sem dúvida, meu.

Aos amigos do LBM da FCAV/UNESP/Jaboticabal, Agda Facincani , Rafael Marini, Danilo, Ana Buzinari, Tamiris Kempner, Michelle Penha, Bruna Tellez, Catarina Mardegan, Jéssica Mello, Juliana Vantini, Claudenia Ferreira e Flávia Campos, pela amizade e excelente convívio e apoio nos experimentos.

Aos meus amigos do Brasil: Elwi Machado, Wilmar Botello, Donicer Montes, Cruz Enriquez, Lumey Perez, Gustavo Sanchez, Soliris Corredor, Yani Aranguren, Edwin, Flor e Luis Teheram pelas discussões científicas, as risadas, o companheirismo e sua amizade.

À Colombia (minha namorada) e a minha família pelo carinho, torcida e incentivo. Amo vocês!

Muito obrigado Brasil pela oportunidade, o aprendizado e a hospitalidade durante estes quase quatro anos do meu doutorado. Foi uma experiência ótima e inesquecível que levarei para sempre comigo... Gratidão total!

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
CAPITULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Importância da Citricultura	2
2.2 Cancro cítrico	3
2.3 Interação Patógeno- Planta.....	4
2.4 Agente causal	6
2.5 T3SS em <i>Xanthomonas</i>	8
2.5.1 Categoria I: Aparato de secreção	9
2.5.2 CATEGORIA II : Chaperonas	19
2.5.3 CATEGORIA III: Efetores	21
2.5.4 CATEGORIA IV: Reguladores	22
2.6 O T3SS de <i>Xanthomonas</i> como possível alvo molecular.....	26
3. REFERÊNCIAS.....	31
Capítulo 2 - Análises transcricionais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> revelam mecanismos de adaptação e virulência durante o desenvolvimento do cancro cítrico	45
1. INTRODUÇÃO	46
2.1.1. Estirpe bacteriana e meios de cultura	48
2.1.2 Inoculação de Xac em folhas de citros e exsudação	49
2.2.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	50
2.2.4 RNA seq de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	50
2.2.5 Análise da expressão de genes	51
2.2.6 Validação e expressão de genes por qRT-PCR.....	52
3. RESULTADOS	53

3.1 Transcriptoma global e temporal de <i>Xac in vivo</i> direcionam a identificação de GDE envolvidos no desenvolvimento do cancro citrico.....	53
3.2 GDE em <i>Xac</i> revelam indícios sobre sua adaptação ao apoplasto de citros e seus principais fatores de virulência	57
3.3. Aspectos nutricionais e fisiológicos relacionados com a virulência e patogênese de <i>Xac</i> são identificados a partir dos GDE <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	61
3.4 O fósforo inorgânico e fontes de nitrogênio orgânicas reprimem a expressão de genes do T3SS <i>in vitro</i>	67
4. DISCUSSÃO	70
5 CONCLUSÕES	80
6. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR.....	81
REFERÊNCIAS.....	89
CAPITULO 3 – O sistema de dois componentes PhoR/phoB regula a expressão dos genes do sistema de secreção tipo III (T3SS) em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	97
1. INTRODUÇÃO	98
2. METODOLOGIA.....	101
2.1 Estirpes bacterianas e meios de cultura	101
2.1.2 Inoculação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> em folhas de citros e exsudação	101
2.1.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	102
2.1.4 RNA seq de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	102
2.1.5 Análise da expressão de genes	103
2.1.6 qRT-PCR	104
2.1.7 Geração do mutante $\Delta phoR$	104
2.1.8 Curva de crescimento <i>in vivo</i>	105
2.1.9 Curva de crescimento <i>in vitro</i>	105
2.3 Formação de Biofilme e teste de Autoagregação	106
2.3.1 Modelagem molecular	107
3. RESULTADOS	108
3.1 Análise de RNA-Seq revela a relação entre a expressão dos genes do T3SS e o regulon Pho em <i>Xac</i> em condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	108
3.2 A repressão do T3SS está relacionada com as concentrações de Pi extracelular	110
3.3 O regulon Pho tem um importante papel na virulência de <i>Xac</i>	111

3.4 O regulon Pho afeta a formação de biofilme e a autoagregação	113
3.5 O regulon Pho afeta a virulência da <i>Xac</i> principalmente através da regulação do T3SS	115
3.6 Modelagem molecular de PhoB e HrpG sugerem possível fosforilação por PhoR	117
4. DISCUSSÃO	121
5. CONCLUSÕES	126
6. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR	127
6. REFERÊNCIAS	131

IDENTIFICAÇÃO DE GENES-ALVOS NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COM ENFOQUE NO SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO III

RESUMO - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) é o agente causal do cancro cítrico, uma das principais doenças que acometem a citricultura mundial. Atualmente não há uma maneira eficiente de controle do cancro, e novos métodos devem ser desenvolvidos para o tratamento desta doença. Assim, o estudo dos mecanismos utilizados pela *Xac* durante o processo infeccioso pode revelar novos alvos para o desenvolvimento de compostos farmacológicos que possam eliminar ou controlar o patógeno. Neste estudo, a técnica de RNA-Seq foi utilizada para a identificação de genes diferencialmente expressos (GDE) na *Xac* em condições *in vivo* e *in vitro*. Para isso, cinco variedades de citros com níveis diferentes de suscetibilidade ao cancro cítrico, e meios de cultura indutores de fatores de virulência foram utilizados. Muitos dos genes que codificam para proteínas relacionadas ao sistema de secreção tipo 3 (T3SS), enzimas extracelulares, resposta ao estresse oxidativo, transportadores de ferro e fósforo foram induzidos pela *Xac* nas condições *in vivo*. No entanto, *in vitro*, os perfis de expressão para estes mesmos genes foram diferentes. Estes dados permitiram compreender melhor o ambiente intracelular do hospedeiro, e como este se relaciona com os mecanismos de ativação dos fatores de virulência e patogenicidade de *Xac*. Neste sentido, os dados apresentados neste estudo mostraram que o T3SS é o principal fator de virulência expresso por esta bactéria em condições *in vivo*. Além disso, nossos resultados sugerem também que as baixas concentrações de fósforo inorgânico (Pi) e nitrogênio que a bactéria percebe no apoplasto das plantas, são interpretadas como sinais para a ativação do T3SS. Mutações realizadas em genes relacionados com o transporte de Pi ($\Delta phoR$ e $\Delta pstB$) em *Xac* demonstraram a perda de virulência por alteração na expressão dos genes do T3SS. Assim, estes dados demonstram pela primeira vez em *Xac* um possível mecanismo de regulação entre o sistema de transporte de Pi e o T3SS. Este estudo revelou diferentes fatores de virulência e patogenicidade utilizados pela *Xac* para vencer as defesas da planta, o que permitirá levantar hipóteses sobre a identificação de possíveis alvos quimioterapêuticos para o tratamento do cancro.

Palavras-chave: transcriptoma, mutagêneses, interação planta-patógeno, RNA-seq, T3SS

IDENTIFICATION OF PATHOGENICITY TARGET GENES OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri* FOCUSED ON TYPE III SECRETION SYSTEM

ABSTRACT - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) is the causal agent of citrus canker, a major disease affecting citrus worldwide. Currently there is no effective way of cancer control, and new methods must be developed for the treatment of this disease. Thus, the study of the mechanisms used by *Xac* during the infectious process can reveal new targets for the development of pharmacologic compounds that can eliminate or control the pathogen. In this study, RNA-Seq technique was used to identify *Xac* differentially expressed genes (DEG) *in vivo* and *in vitro* conditions. For this purpose, five citrus varieties with different levels of susceptibility to citrus canker and culture mediums inducing virulence factors were used. Many of the genes encoding proteins of the type 3 protein secretion system (T3SS), extracellular enzymes, oxidative stress response, iron and phosphorus transport were induced in *Xac in vivo* conditions. However, the expression profiles for these same genes were different than observed *in vitro* conditions. These data allowed us to better understand the intracellular environment of the host, and how this relates to the activation mechanisms of pathogenicity and virulence factors in *Xac*. In this context, the data presented in this study show the T3SS as the main virulence factor expressed by the bacteria *in vivo* conditions. Furthermore, our results also suggest that low concentrations of inorganic phosphorus (Pi) and nitrogen, that bacteria sense in the plant apoplast, are interpreted as signals to activation of the T3SS. In this respect, mutations carried out in genes related to the transport of Pi ($\Delta phoR$ and $\Delta pstB$) in *Xac* demonstrated loss of virulence by altering the expression of T3SS genes. Thus, these data identifies for the first time in *Xac* a possible regulatory mechanism between Pi transport system and T3SS. This study revealed different virulence and pathogenicity factors used by *Xac* to overcome the plant defenses. These discoveries allow raise hypotheses about the identification of potential chemotherapeutic targets to canker treatment.

Keywords: transcriptome, mutagenesis, plant-pathogen interaction, RNA-Seq, T3SS

CAPITULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A produção de laranja e de suco concentrado é uma atividade agrícola que tem uma grande importância para o Brasil, em especial para o estado de São Paulo, gerando divisas para a balança comercial e emprego para milhares de trabalhadores. O cancro cítrico é uma doença que causa grandes prejuízos à citricultura brasileira e mundial, sendo que até o momento não há nenhum método curativo para esta doença (GRAHAM et al., 2004). Atualmente, as estratégias de controle utilizadas envolvem erradicação de plantas sintomáticas e aplicação de bactericidas a base de cobre (BEHLAU et al., 2010). Infelizmente, os produtos cúpricos aplicados, além de serem inespecíficos contra o controle de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Xac, gera preocupações sobre a contaminação do meio ambiente, a segurança alimentar e o surgimento de isolados resistentes (BEHLAU et al., 2012). Portanto, novos métodos de controle devem ser desenvolvidos.

Alternativas promissoras são baseadas no desenvolvimento de compostos antimicrobianos com atividade específica contra fatores de virulência e patogenicidade (RASKO; SPERANDIO, 2010). Consonante com esse pensamento, o entendimento dos mecanismos utilizados pela Xac durante o processo infeccioso para vencer as defesas das plantas de citros, pode revelar novos alvos para o desenvolvimento de compostos que possam eliminar ou controlar o patógeno, ou até mesmo que possam ser utilizados para o desenvolvimento de tecnologia de controle da doença baseado na transgenia. O primeiro passo nesse sentido foi dado pelo sequenciamento e anotação do genoma de Xac isolado 306, por pesquisadores do estado de São Paulo (DA SILVA et al., 2002). A disponibilidade da sequência genômica de Xac permitiu o início de estudos envolvidos na identificação de genes de patogenicidade e virulência dessa bactéria.

Mas, para avançar no conhecimento dos processos e mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da doença, há a necessidade de identificar alterações transcricionais de Xac sob condições *in vivo*, a fim de encontrar

o conjunto de genes que são requeridos pela bactéria para dar início ao processo infeccioso. Entender a expressão gênica ou o transcriptoma da *Xac* é essencial para compreender como o patógeno consegue vencer as defesas da planta e assim causar a doença. Com esse propósito, o grupo de pesquisa LBM (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular) vem utilizando técnicas de análises da expressão global de genes como o RNA-Seq , visando entender os mecanismos pelos quais a *Xac* consegue infectar, se multiplicar, se manter e desencadear cancro em citros.

Portanto, a informação obtida pelas análises da expressão global de genes da *Xac* pode auxiliar na compreensão dos mecanismos utilizados pela bactéria para o desenvolvimento da doença. Esse conhecimento é de suma importância para a tomada de decisão em utilizar tais genes como possíveis alvos de controle. Desta maneira, as vias envolvidas no processo assim determinadas poderão ajudar futuramente no desenvolvimento de princípio ativo para o controle do cancro cítrico. Por tanto, visto a importância que tem a identificação de genes de virulência e patogenicidade de *Xac*, o presente estudo teve como objetivo a análise global e temporal de seu transcriptoma em condições infectantes (*in vivo*) e não infectantes (*in vitro*).

No presente capítulo, apresentam-se as bases teóricas para a contextualização deste estudo, dando ênfase à revisão do Sistema de Secreção tipo III (T3SS), devido principalmente ao fato de que os resultados apresentados demonstraram que o T3SS é o principal fator de virulência expresso pela bactéria nas condições *in vivo*. Assim, o T3SS poderá vir a ser um alvo promissor no futuro para o tratamento do cancro; além disso, seu alto grau de conservação entre bactérias patogênicas poderia tornar possível seu uso para o controle de outras doenças.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância da Citricultura

O gênero *Citrus* é originário das regiões tropicais e subtropicais do continente asiático e do arquipélago malaio (ALVES; MELO, 2003) e abrange as famílias das Meliáceas, Simaruláceas e Rutáceas. A citricultura envolve o cultivo de várias

espécies de frutos, como laranjas, limão, tangerinas, mexerica, entre outras espécies (ALVES; MELO, 2003). A introdução do citros no Brasil ocorreu no início da colonização, e posteriormente, a citricultura expandiu-se por todo o território nacional. No entanto, foi apenas na década de 1980, com a união de uma citricultura desenvolvida e uma indústria competitiva que o Brasil tornou-se o maior produtor de laranjas do mundo, superando os Estados Unidos, não só em produção como também em tecnologia de citros (NEVES et al., 2010). O Brasil é hoje o maior produtor mundial de laranja e de suco de laranja concentrado, o qual é exportado praticamente em sua totalidade.

No Brasil, o estado de São Paulo é responsável por 74 % da produção de laranjas e de 95% da produção de suco concentrado (INVESTE, 2012). Portanto, a citricultura é muito importante para o país e para o estado de São Paulo, em particular. Atualmente, um dos problemas enfrentados pela citricultura brasileira é o cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

2.2 Cancro cítrico

O cancro cítrico afeta diversas espécies de citros de importância comercial, resultando em significativas perdas de produção e representando uma grande ameaça principalmente para os cultivos de laranja em larga escala (GOTTWALD; PIERCE; GRAHAM, 2002). Dados do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) registraram que a incidência do cancro cítrico passou de 1% no ano 2011, para 1,39 % em 2012, sendo o mais alto dos últimos 12 anos (FUNDECITRUS, 2012). Além disso, por ser uma doença quarentenária, dificulta e restringe o comércio mundial de frutas cítricas *in natura*.

O controle do cancro cítrico no Brasil baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação de plantas e pomares quando afetados pela doença (GRAHAM et al., 2004). Pela lei estadual em vigor (Resolução SAA - 147, publicada em 1º de novembro de 2013, no Diário Oficial), passa-se a adotar eliminação da planta contaminada e pulverização com cobre das outras plantas cítricas existentes

em um raio de 30 metros. A pulverização deve ser repetida a cada brotação. A erradicação de plantas doentes, e das suspeitas de infecção, não é obrigatória no sul do Brasil (Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), onde é permitida a adoção de práticas de manejo da doença, como a pulverização com agentes cúpricos e implantação de cortinas quebra-vento (LEITE; MOHAN, 1990). No entanto, o controle químico não é eficaz em barrar adequadamente o desenvolvimento da doença e seu uso pode ocasionar o surgimento de isolados resistentes (BEHLAU et al., 2012). Assim, novos métodos de controle devem ser buscados a fim de encontrar um mecanismo efetivo para o tratamento e controle da doença causada por *Xac*.

2.3 Interação Patógeno- Planta

Cada espécie vegetal interage de uma maneira específica com um determinado fitopatógeno. Por isso, o estudo das interações patógeno- planta é muito importante para compreender melhor os mecanismos utilizados pelo fitopatógeno para atacar a planta e os mecanismos utilizados pela planta para se defender. De um lado o patógeno tenta desativar o sistema de defesa da planta para sobreviver e, do outro, a planta tenta eliminar o patógeno no sítio de infecção por meio de diferentes mecanismos que envolvem a geração de espécies ativas de oxigênio (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994), apoptose de células no sítio de infecção (HR) (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996), deposição de glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (CORBIN; SAUER; LAMB, 1987), lignificação da parede celular (GRAND; SARNI; LAMB, 1987), síntese e acúmulo de fitoalexinas (GUSTINE, 1990), síntese de proteínas de defesa e produção de antimicrobianos (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994). O estabelecimento do patógeno no hospedeiro e sua habilidade em causar doenças dependem de um processo complexo que requer a atividade coordenada de muitos genes bacterianos ligados à patogenicidade e virulência. Os produtos desses genes são, em última análise, os responsáveis pela virulência e patogenicidade da bactéria, e na grande maioria dos casos, a identidade e o seu modo de ação ainda são desconhecidos.

As interações entre as plantas e os agentes patogênicos podem ser classificadas como compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível o patógeno ataca uma planta valendo-se de estratégias que envolvem a neutralização dos mecanismos de defesa do vegetal, produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta atacada, desenvolvendo-se então nos tecidos vegetais e levando à manifestação de sintomas da doença (WHITE; YANG; JOHNSON, 2000b). Na interação incompatível, o patógeno é restringido no sítio de infecção após o disparo dos mecanismos de defesa da planta (STASKAWICZ et al., 1995).

Em relação à bactérias fitopatogênicas, o sistema de defesa da planta reconhece características comuns presente nestas bactérias, tais como a flagelina, quitina, glicoproteínas e lipopolissacáridos (GÖHRE; ROBATZEK, 2008; POSTEL; KEMMERLING, 2009). Esses determinantes microbianos são conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns) (JONES; DANGL, 2006). Os PAMPs ativam os receptores de reconhecimento padrão (PRRs - Pattern-recognition receptors) localizados nas membranas das células do hospedeiro (JONES; DANGL, 2006). Esse mecanismo é considerado a primeira linha de imunidade inata em planta e iniciam uma resposta de defesa inespecífica, desencadeando a chamada PTI (PAMP-Triggered Immunity) (CHISHOLM et al., 2006). Como o processo de coevolução é contínuo entre as plantas e as bactérias, os patógenos desenvolveram moléculas efetoras que suprimem a PTI e promovem a virulência do patógeno. Esses compostos são normalmente transportados para as células do hospedeiro por meio de mecanismos de secreção especializados, resultando na chamada susceptibilidade induzida por efector (ETS - Effector Triggered Susceptibility) (CHISHOLM et al., 2006).

Os efetores, denominados proteínas de virulência (Avr) e codificados por genes de avirulência correspondentes (*avr*), podem ser reconhecidos pelas células da planta por meio de proteínas de resistência específicas, denominadas de proteínas R e codificadas por genes *R*, desencadeando uma resposta de resistência chamada de imunidade desencadeada por efetores – ETI (effector-triggered immunity) (BOYD et al., 2013). Esse reconhecimento via Avr/R tem sido comparado à resistência clássica gene a gene encontrado nas plantas (BOYD et al., 2013). O

mecanismo de reconhecimento via Avr/R é semelhante ao modelo chave-fechadura, no qual a proteína Avr do patógeno (chave) se encaixa no receptor (proteína R) da planta (fechadura) e, havendo o encaixe, o sistema de defesa é acionado. É por isso que a habilidade das plantas em reconhecer um patógeno e responder a ele é o que diferencia a susceptibilidade e resistência de uma interação. Desta forma, o conhecimento da biologia e dos mecanismos moleculares presentes em cada patossistema (patógeno-hospedeiro) é crucial para o entendimento das interações planta-patógeno a nível fisiológico, bioquímico e molecular, conhecimento esse que é necessário para o desenvolvimento de novos métodos para o controle da doença, incluindo aí o cancro cítrico.

2.4 Agente causal

A *Xac* é uma bactéria Gram negativa que possui forma de bastonete, apresenta respiração aeróbica, metabolismo oxidativo e nunca fermentativo, não é fixadora de nitrogênio, não forma esporos, possui flagelo polar e forma colônias amarelas e mucoides em meio de cultura artificiais (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). A disseminação dessa bactéria em plantas de citros ocorre por meio das chuvas, restos de colheita, pessoas ou veículos transitando pela lavoura. Os sintomas do cancro cítrico são verificados nas folhas, ramos e frutos como lesões circulares, corticosas, eruptivas, de coloração parda e circundadas por um halo amarelo (BRUNINGS; GABRIEL, 2003) (Figura 1). A hiperplasia e hipertrofia são desencadeadas pelo patógeno ao alterar a transcrição de alguns genes do hospedeiro (CERNADAS; CAMILLO; BENEDETTI, 2008), diminuindo desse modo a produtividade das árvores afetadas. A colonização do hospedeiro pela *Xac*, inicialmente, é epífita, na superfície foliar. Posteriormente, o patógeno entra no hospedeiro através de aberturas naturais como os estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos, desencadeando os sintomas da doença (RYAN et al., 2011).



Figura 1. Sintomas de cancro cítrico causado por *Xac* em folhas, ramos e frutos
(Fonte: Fundecitrus)

O sequenciamento e anotação do genoma de *Xac* (DA SILVA et al., 2002), permitiu o início de abordagens de genômica funcional no estudo dos genes envolvidos na patogenicidade e virulência dessa bactéria. Assim, esse tipo de estudo tem permitido identificar uma série de genes relacionados com a virulência e patogenicidade da *Xac*. Alguns dos principais fatores incluem síntese de lipopolissacarídeos, síntese de goma xanthana, sistemas reguladores de dois componentes (TCS), transportadores dependentes de tonB, proteínas de vias de sinalização e sistemas de secreção (RYAN et al., 2011). Esses últimos tem alta relevância pois estão envolvidos na secreção e translocação de proteínas do patógeno ao hospedeiro, modulando assim diferentes níveis de patogenicidade da doença (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

No gênero *Xanthomonas* são descritos seis sistemas de secreção (tipo I ao VI) (BÜTTNER; BONAS, 2010). Desses sistemas, o sistema de secreção do tipo III (T3SS), além de apresentar alta conservação entre bactérias patogênicas de plantas, é considerado essencial para o início do desencadeamento de doenças em plantas hospedeiras (CORNELIS; FRÉDÉRIQUE VAN GIJSEGEM, 2000; HE; NOMURA; WHITTAM, 2004; TAMPAKAKI et al., 2010). Nesse aspecto, estudos baseados em mutagênese randômica de patógenos de *Xac* têm demonstrado que mutações

deletérias em genes do T3SS anulam a capacidade da bactéria infectar e colonizar citros (LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2012). A seguir, descreve-se em detalhes a organização do T3SS a nível de estrutura, função, regulação genética e tipo de efetores em bactérias do gênero *Xanthomonas*. Além disso, tenta-se explorar o T3SS como possível alvo farmacológico para o controle das doenças produzidas por essas bactérias.

2.5 T3SS em *Xanthomonas*

As *Xanthomonas* e outras bactérias fitopatogênicas Gram negativas utilizam o T3SS para injetar as proteínas efetoras dentro das células hospedeira, fazendo com que as vias de sinalizações dessas fiquem alteradas. Essas mudanças podem resultar em um desarmamento da resposta imune, criando um nicho celular para a estabilização e colonização da bactéria no interior da planta (HUECK, 1998) (Ver Figura 2).

A translocação das proteínas efetoras da bactéria até o citoplasma da célula hospedeira é feito pelo complexo proteico denominado aparato do T3SS ou injectossoma, no qual distinguem-se duas partes: um filamento com estrutura helicoidal, e uma base cilíndrica formada por dois complexos de anéis concêntricos denominados de estrutura basal, que ancora o filamento às membranas interna e externa da bactéria (YIP; STRYNADKA, 2006). Algumas proteínas da estrutura basal do T3SS de *Xanthomonas* são conservadas na maioria das bactérias patogênicas de animais e de plantas, e apresentam semelhanças com as proteínas do corpo basal do flagelo bacteriano (AIZAWA, 2001; CORNELIS, 2006; BÜTTNER, 2012). Embora haja uma similaridade estrutural entre as proteínas que compõem o injectossoma, as proteínas secretadas por este sistema (efetores), variam muito em tamanho, estrutura e função de acordo ao tipo de bactéria (HUECK, 1998; ANDERSON; SCHNEEWIND, 1999; GALÁN, 1999). Isso explica como um único mecanismo bacteriano pode dar lugar a uma variedade de respostas nas células hospedeiras (TAMPAKAKI et al., 2004).

Por não possuírem peptídeos sinais em sua porção aminoterminal as proteínas efetoras do T3SS são definidas como parte de um sistema independente, no qual os próprios constituintes do complexo de secreção encaminham os substratos para o meio externo (DUONG; WICKNER, 1997; REMAUT; WAKSMAN, 2004). Estudos de expressão gênica e proteômica realizados em *Xac* inoculadas em citros sugerem que os genes do T3SS são expressos nos estágios iniciais da doença (FACINCANI et al., 2014; JACOB et al., 2014), por outro lado, também tem sido demonstrado que mutações em tais genes causam perda da capacidade infecciosa da bactéria (LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2012). Na Figura 3, apresenta-se um resumo dos estudos mais relevantes a nível de expressão genica, proteômica e mutagêneses feitos com os genes do T3SS de *Xac*. O T3SS de *Xanthomonas* é formado por componentes proteicos subdivididos em quatro categorias, detalhadas a seguir: aparato de secreção ou injectossoma (Categoria I), chaperonas (Categoria II), efetores (Categoria III) e reguladores de transcrição (Categoria IV) (Wang et al., 2012). Na Tabela 1, pode-se observar a organização por categorias dos componentes proteicos dos T3SS mais estudados em algumas espécies de *Xanthomonas* e bactérias patogênicas de animais.

2.5.1 Categoria I: Aparato de secreção

A maquinaria molecular encarregada pelo processo de transporte no T3SS de *Xanthomonas* e de outras fitobactérias é denominada aparato de secreção tipo III (AST3) (Figura 4). Ela subdivide-se em diferentes componentes que apresentam uma estrutura supramolecular que é ainda pouco descrita em bactérias fitopatogênicas (BÜTTNER; HE, 2009). Entretanto, sua estrutura filamentosa denominada pilus Hrp, já tem sido caracterizada em bactérias fitopatogênicas (ROINE et al., 1997; VAN GIJSEGEM et al., 2000; JIN et al., 2001; WEBER et al., 2005). Em *Xanthomonas*, o AST3 é codificado por um grupo de 20 a 25 genes, localizados em um locus denominado *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity), os quais são essenciais para a patogenicidade e consequente multiplicação bacteriana dentro da célula hospedeira (ALFANO; COLLMER, 1997).

Nesse sentido, tem sido observado que as principais mutações que afetam o funcionamento do T3SS na *Xac* (e outras *Xanthomonas*), são aquelas que alteram especificamente o AST3 (Figura 3).

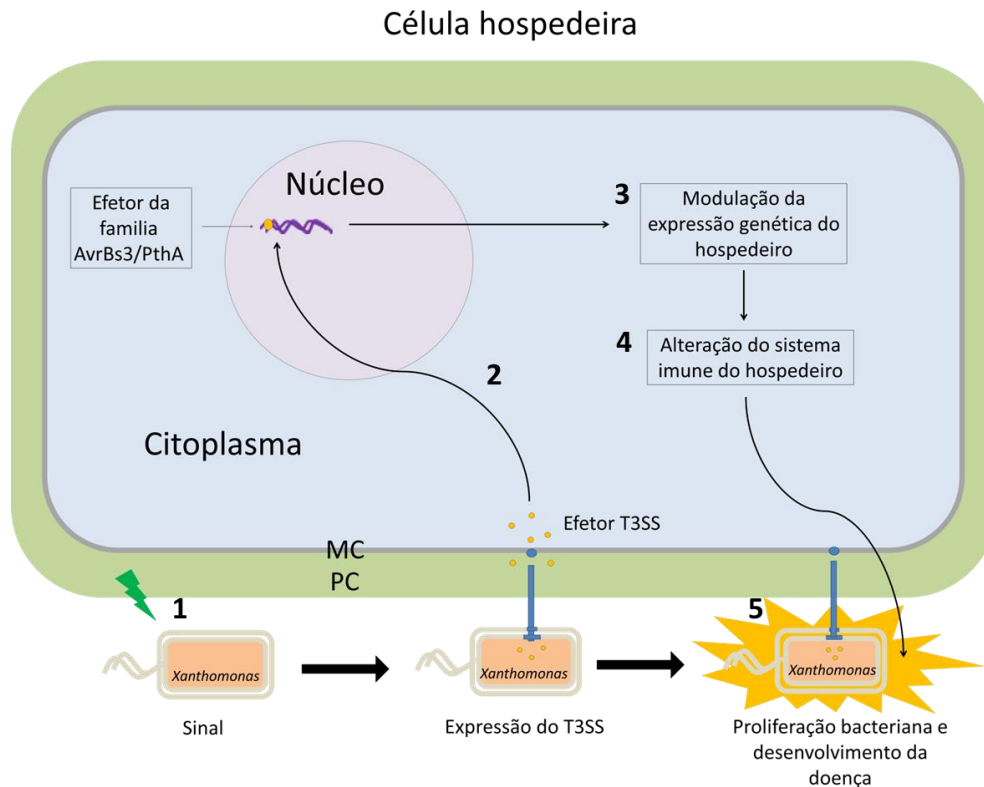


Figura 2. Representação geral do processo infeccioso da *Xanthomonas* em plantas hospedeiras. **1** Um estímulo ainda não identificado é percebido pela *Xanthomonas* dando lugar a expressão dos genes do T3SS. **2** Alguns dos efetores proteicos são secretados e outros como os da família AvrBs3/PthA são translocados e conduzidos ao núcleo da célula hospedeira. **3** Este tipo de efetores proteicos atuam no núcleo da célula como ativadores transcricionais que modulam a expressão de genes específicos. **4** Produz-se uma alteração do sistema de defesa da planta. **5** Isso leva à proliferação das bactérias e o desenvolvimento dos sintomas da doença. CM: membrana celular, CW: parede celular.

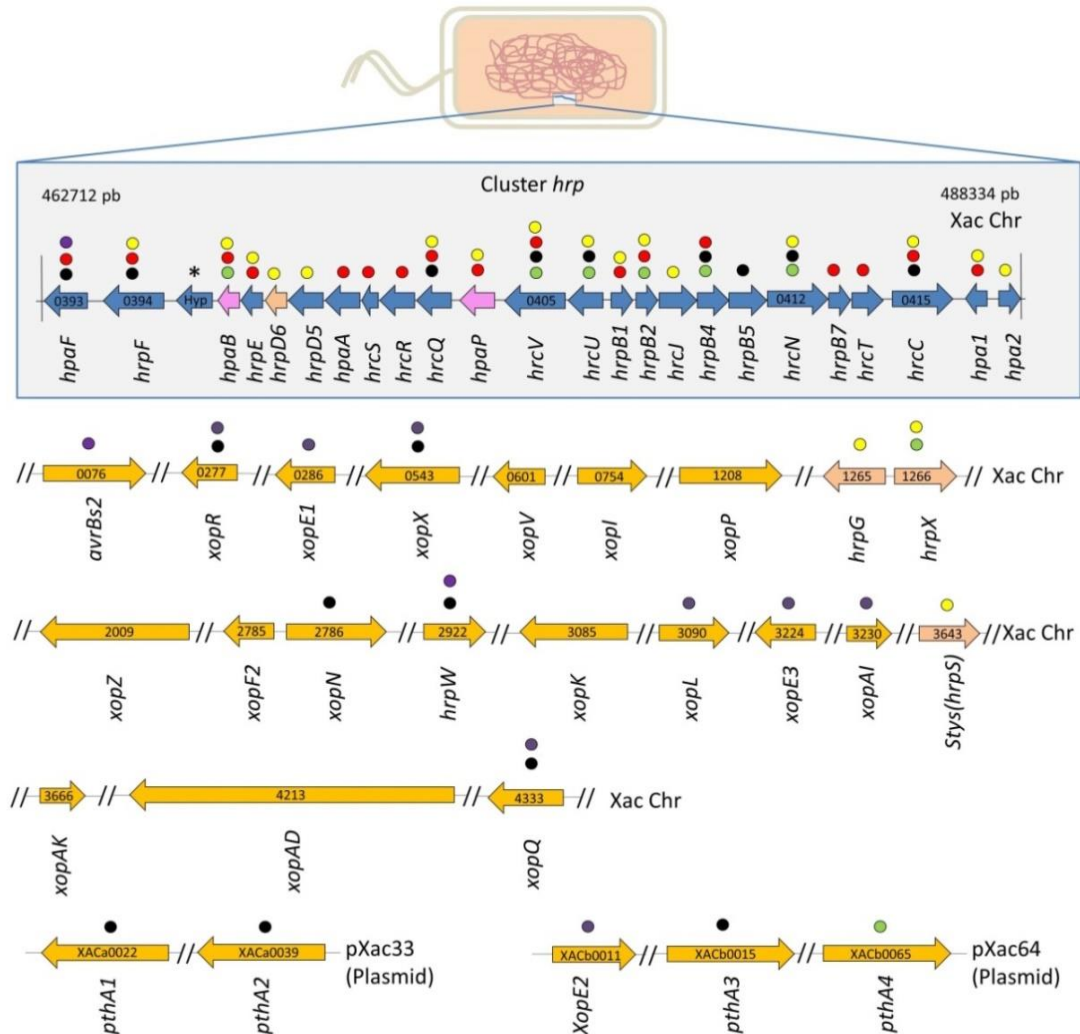


Figura 3. Organização genômica dos genes do T3SS em *Xac*. Os pontos coloridos acima dos genes indicam: (verde) genes cujas mutações ocasionam perda da patogenicidade em *Xac* (LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2012). (Preto) genes cujas proteínas foram detectadas em *Xac* infectando plantas de *citrus sinensis* durante nos dias 1,3 e 5 depois da inoculação (FACINCANI et al., 2014). (Vermelho) genes que apresentaram sobre-expressão em *Xac* após 72 horas da inoculação em *citrus sinensis* (JACOB et al., 2014). (Amarelo) genes cujas mutações ocasionam perda da patogenicidade em espécies de *Xanthomonas* diferentes da *Xac* (ROSSIER et al., 2000; QIAN et al., 2005; WEBER et al., 2005; WANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008; FURUTANI et al., 2009; LORENZ; BÜTTNER, 2009; WEN-XIANG et al., 2010; GUO et al., 2011; LORENZ; HAUSNER; BÜTTNER, 2012). (Roxo) genes cujas mutações não ocasionaram perda da patogenicidade em *Xac* (FIGUEIREDO et al., 2011). Os genes do cluster *hrp* em *Xac* estão localizados no mesmo loci cromossômico (genes demarcados na caixa cinza), os demais genes relacionados com T3SS encontram-se distribuídos ao longo do genoma do cromossomo e dos plasmídeos. * Gene hipotético.

Estudos de filogenia sugerem que o AST3 e o aparato flagelar foram originados de um mesmo ancestral comum (SAIER, 2004; MCCANN; GUTTMAN, 2008), com seus genes tendo evoluídos como grandes blocos genéticos intactos (TROISFONTAINES; CORNELIS, 2005). Isso permitiu que mesmo bactérias pouco relacionadas e com alta dissimilaridade filogenética possuam conservação de seus genes a nível do AST3. Neste sentido, sugere-se que os genes que codificam para esses sistemas foram transferidos horizontalmente entre espécies bacterianas pouco relacionadas (TROISFONTAINES; CORNELIS, 2005). Há descritas na literatura sete famílias de aparatos do tipo AST3, com genes e loci conservados entre espécies bacterianas (CORNELIS, 2006). No caso das bactérias patógenas de plantas, essas são agrupadas dentro de duas destas famílias, denominadas Hrp I e Hrp II (hypersensitive response and pathogenicity I e II)(CORNELIS, 2006). Embora a família HrpII do AST3 seja encontrada na maioria das espécies de *Xanthomonas*, algumas exceções são observadas, como em *X. albilineanse* e *X. axonopodis pv. phaseoli*, que pertencem à família de AST3 da ilha de patogenicidade de *Salmonella* (SPI-1) (MARGUERETTAZ et al., 2011).

Pilus. Uma das estruturas características do AST3 de bactérias fitopatogênicas é o pilus Hrp, que se projeta a partir da superfície bacteriana. O pilus Hrp apresenta um diâmetro externo similar ao do “complexo agulha” das bactérias patógenas de animais (aproximadamente 8 nm), porém com comprimento superior a 2 µm para que possa atravessar a parede celular vegetal (espessura maior que 100 nm) e atingir a membrana citoplasmática (GHOSH, 2004). Em *Xanthomonas campestris pv. versicatoria* (Xcv), o componente estrutural principal do pilus é uma pequena proteína denominada Hrp E (9 kDa), necessária para a patogênese, secreção e translocação de alguns fatores de virulência como Hrp F, AvrBs1 e AvrBs3 (WEBER et al., 2005).

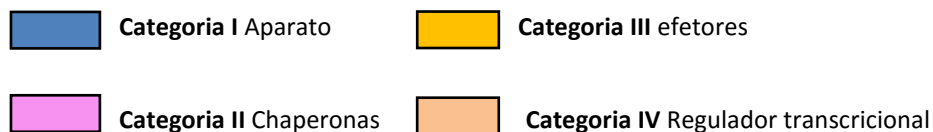
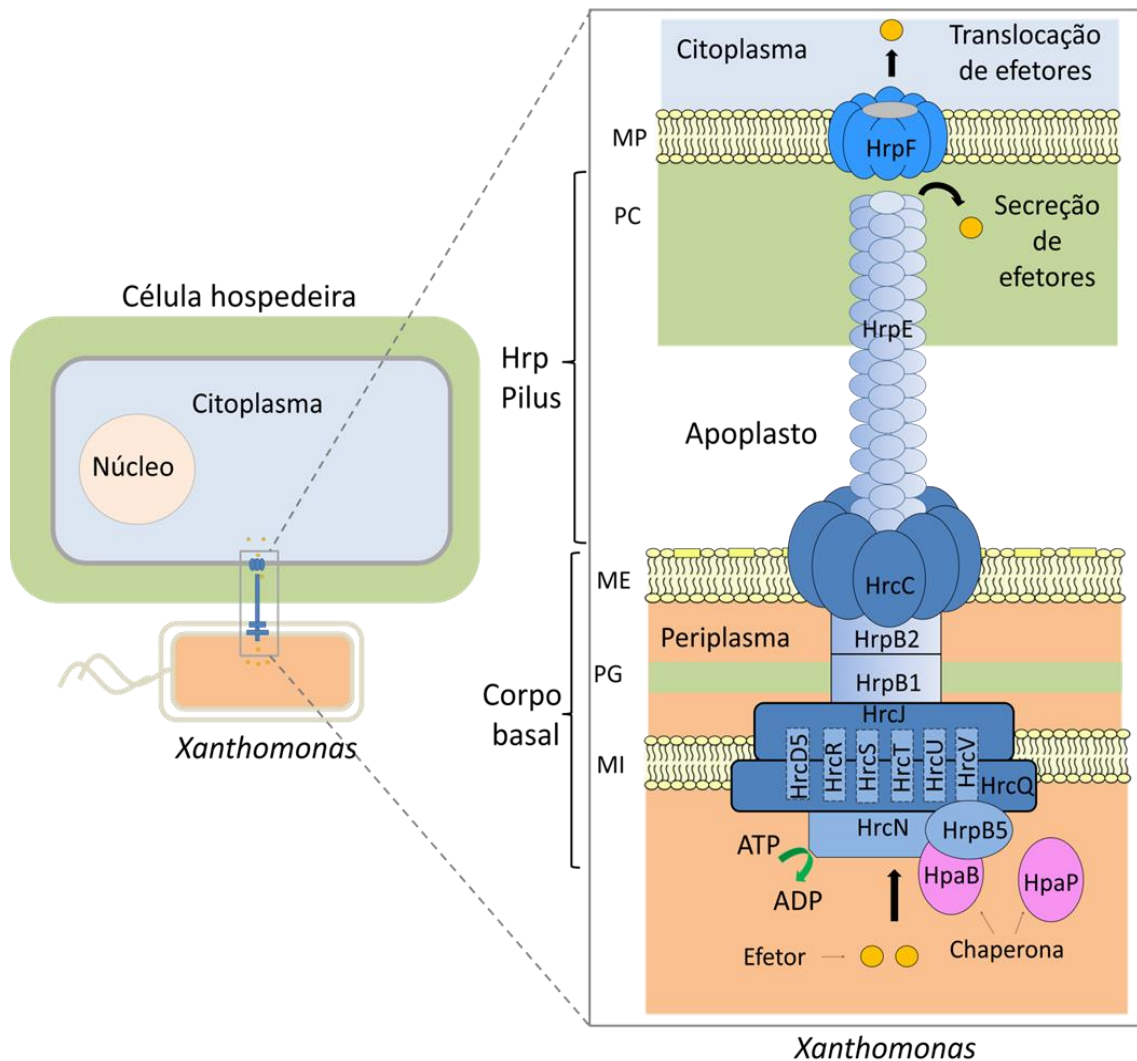


Figura 4. Modelo da estrutura do aparato do T3SS de *Xanthomonas*. Este modelo é baseado na informação apresentada neste capítulo. Alguns dos principais componentes funcionais do aparato T3SS descritos neste modelo são: Translocôm (HrpF), subunidade do pilus (HrpE), anel de membrana externa (HrcC, Secretina), anel de membrana interna (HrcJ), anel citoplasmático (HrcQ), aparato exportador (HrcD5, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU e HrcV), ATPase (HrcN) e chaperonas (HpaB, HpaP). O aparato do T3SS pode translocar ou secretar os efetores proteicos para o interior ou exterior da célula hospedeira (citoplasma). CM: membrana celular, PC: parede celular, ME: Membrana externa; PG: Peptidoglicano, MI: Membrana interna.

Tabela 1. Proteínas do T3SS classificadas de acordo a sua categoria em *Xanthomonas* e algumas bactérias patogênicas de animais

Categoria	Patógenos de Plantas			Patógenos Animais			Referência
	<i>Xac</i>	<i>Xcv</i>	<i>Xoo</i>	<i>Yersinia spp</i>	<i>Salmonella spp</i> (SPI-1/SPI-2)*	<i>Shigella spp</i>	
Categoria I Aparato							(BÜTTNER 2012; CORNELIS 2006; DIEPOLD, WAGNER 2014)
Translocon	HrpF			YopB-YopD	SipB-SipC/SseC-SseD	IpaB-IpaC	
Pilus Hrp	HrpE			YscF	PrgI/SsaG	MxiH	
Anel da membrana externa	HrcC			YscC	InvG/SsaC	MxiD	
Anel da membrana interna	HrcJ			YscJ	PrgK/SsaJ	MxiJ	
Anel citoplasmático	HrcQ			YscQ	SpaO/SsaQ	Spa33	
Aparato exportador	HrcD, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV			YscR, YscS, YscT, YscU, YscV	SpaP/SsaR, SpaQ/SsaS, SpaR/SsaT, SpaS/SsaU, InvA/SsaV	Spa24, Spa9, Spa29, Spa40, MxiA	
ATPase	HrcN			YscN	InvC/SsaN	Spa47	
Categoria II Chaperonas	HpaB, hpaC (hpaP in <i>Xac</i> and <i>Xoo</i>)			SycD, SycE, SycH, SycN, SycO, SycT, YscE, YscG, YscY, SycP, SycB.	SPI-1= InvB, SicA, SicP, SigE, SPI-2= SrcA, SscB, SseA, SsaE, SsaQs	IpgA, IpgC, IpgE, Spa15, IpaD	(BÜTTNER, 2012)
Categoria III Efectores	AvrBs2, AvrBs3/PthA (4 genes), XopC, XopE, XopF, XopI, XopK, XopL, XopN, XopP, XopQ, XopR, XopV, XopX, XopZ, XopAD, XopAE, XopAG, XopAI, XopAK	AvrBs1, AvrBs2, AvrBs3/PthA, XopB, XopC, XopD, XopE, XopF, XopG, XopH, XopI, XopJ, XopK, XopL, XopM, XopN, XopO, XopP, XopQ, XopR, XopS, XopV, XopX, XopZ, XopAA, XopAD, XopAE, XopAJ, XopAK	AvrBs2, AvrBs3/PthA (17genes), XopC, XopF, XopG, XopI, XopK, XopL, XopN, XopP, XopQ, XopR, XopT, XopU, XopV, XopX, XopY, XopZ, XopAA, XopAB, XopAD, XopAE.	YopE, YopH, YopP/J, YopM, YopT, YpkA/YopO	AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SopA, SopB, SopE, SopE2, SptP, SlrP, SopD, SspH1, SteA, SteB, GogB, PipB, SifA, SifB, SopD, SpiC, SseF, SseG, Ssel, SseJ, SseK, SspH, SteC, SpvB, SpvC	IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpaJ, IpgD, IpgB, IcsB, OspC, OspD, OspZ, OspB, OspF, VirA, OspE, OspG, IpaH family	(WHITE <i>et al.</i> 2009, DEAN 2011)
Categoria IV Reguladores	HrpG HrpX			LcrF	InvF SicA	MxiE IpgC	(GUO <i>et al.</i> 2011; GARRITY-RYAN <i>et al.</i> 2010; BÜTTNER 2012)

* SPI-1 e SPI-2 Ilhas de patogenicidade de *Salmonella* 1 e 2.

O pilus Hrp de *Xcv* tem diâmetro ($\cong 8$ a 10 nm) e comprimento ($\cong 4$ μ m) similar ao de bactérias fitopatogênicas como *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia amylovora* (ROINE et al., 1997; VAN GIJSEGEM et al., 2000; JIN et al., 2001). As proteínas HrpB1 e HrpB2 localizadas na base do pilus, desempenham um papel fundamental na sua formação em *Xanthomonas* (HARTMANN et al., 2012; HAUSNER et al., 2013) (Figura 4).

As principais subunidades que formam o pilus Hrp possuem sequência de aminoácidos hipervariáveis entre subespécies de bactérias patógenas (LEE et al., 2005; WEBER; KOEBNIK, 2005). Isso sugere que o pilus Hrp das bactérias fitopatogênicas pode evoluir rapidamente, dificultando assim, seu reconhecimento por parte do sistema de defesa do hospedeiro. Evidências desta rápida evolução foram observadas na geração de novos (seleção positiva) e de múltiplos alelos (seleção diversificada) de proteínas de pilus Hrp em *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria* e *P. syringae*, respectivamente (WEBER; KOEBNIK, 2005; GUTTMAN et al., 2006).

Anel da membrana interna. O anel da membrana interna corresponde a primeira estrutura oligomérica que se forma durante a montagem do AST3 (YIP; STRYNADKA, 2006). Uma das principais lipoproteínas que faz parte do anel de membrana interna em *Xanthomonas* é HrcJ. Essa lipoproteína encontram-se posicionadas sobre o lado periplasmático da membrana interna, interagindo com seu domínio N-terminal com a proteína HrcC, enquanto seu domínio C-terminal interage com a proteína HrcV , o que indica que essa proteína apresenta ligações entre a membrana externa e interna (WEN-XIANG et al., 2010).

Em bactérias patogênicas de animais sugere-se que a HrcV participa na formação de anéis multiméricos especializados em agrupar outros componentes da membrana interna do AST3 e servir como plataforma de reconhecimento e transporte de proteínas efetoras. (GHOSH, 2004). No caso de *Xanthomonas* estes componentes da membrana interna seriam as proteínas hrcD (hrpD5 em *Xac*), hrcR, hrcS, hrcT, hrcU e hrcV (Figura 4). Um primeiro modelo topológico composto por essas proteínas foi

estabelecido em *Xcv*, o que permite entender melhor como atua esse complexo na montagem, reconhecimento e transporte de proteínas do T3SS (BERGER et al., 2010).

Além disso, estudos também demonstraram que mutações na proteína HrcJ de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* inibem a habilidade de tal patógeno para ativar o complexo HR (resposta de hipersensibilidade) em plantas de tabaco e arroz (WEN-XIANG et al., 2010). Esses resultados sugerem que a proteína HrcJ é requerida para a patogênese e a montagem do AST3. Outra proteína da membrana interna de *Xanthomonas* é o HrcQ, homóloga das proteínas YscQ e Spa33, dos patógenos *Yersinia* e *Shigella*, respectivamente. Essas proteínas altamente conservadas no AST3 compartilham uma significativa homologia em seu extremo C-terminal, com as proteínas FliN e FliM do anel citoplasmático do flagelo (C-anél) (CORNELIS, 2006; YIP; STRYNADKA, 2006). Pesquisas feitas com HrcQ demonstraram que ela localiza-se na parte citoplasmática de *Xcv* e está associada a sua membrana interna (LORENZ; HAUSNER; BÜTTNER, 2012). Também foi demonstrado que a proteína HrcQ é essencial para a patogêneses, interagindo com outras proteínas, como HrcN, HrcL (HrpB5 em *Xac*), HrcV e HrcU.

Resultados semelhantes foram encontrados para a proteína Spa33 de *Shigella* sp, a qual também apresenta interações com a proteína de membrana interna MxiJ (ortóloga de HrcJ em *Xanthomonas*) (MORITA-ISHIHARA et al., 2006). Tais pesquisas sugerem que o anel-C putativo formado pela proteína HrcQ pode atuar como um mecanismo de translocação de efetores proteicos entre a interfase do citoplasma e a membrana interna da bactéria. Estudos de proteômica da interação planta-patógeno observaram a expressão das proteínas de membrana interna HrcV, HrcU, HrcQ, em *Xac* nos dias 3 e 5 após a infecção em plantas *Citrus sinensis* (FACINCANI et al., 2014). Tais resultados sugerem que as proteínas identificadas desempenham um papel importante nos ciclos iniciais da doença. No caso das proteínas de membrana interna HrcV e HrcU da *Xac* demonstraram ser essenciais para a virulência, atuando no reconhecimento e transporte de outras proteínas do AST3 como HrpB2 e HrpE (CAPPELLETTI et al., 2011; YAN; WANG, 2012; HARTMANN; BÜTTNER, 2013).

Anel da membrana externa. A base estrutural do AST3 é constituída de dois anéis concêntricos que unem o pilus Hrp às membranas interna e externa da bactéria. O menor desses anéis localiza-se na membrana externa da bactéria, sendo constituído por secretinas (GENIN; BOUCHER, 1994; KOROTKOV; GONEN; HOL, 2011). As secretinas são uma família de proteínas que formam poros na membrana externa das bactérias (KOROTKOV; GONEN; HOL, 2011). Elas são encontradas no AST3 e também em outros sistemas de transporte de macromoléculas como o aparato de secreção tipo II e IV (THANASSI; HULTGREN, 2000; YIP; STRYNADKA, 2006; KOROTKOV; GONEN; HOL, 2011).

Os monômeros das proteínas que formam as secretinas, incluindo as do injectossoma, associam-se em oligômeros de 12 a 14 subunidades formando uma estrutura em forma de anel com um canal central de 5 -10 nm (COLLINS et al., 2001; YIP; STRYNADKA, 2006; KOROTKOV; GONEN; HOL, 2011). O anel formado funciona então como um canal de passagem para as proteínas efetoras. As secretinas do AST3 (conhecidas como HrcC em bactérias fitopatogênicas) também podem ter a função de ancoragem e estabilização do pilus Hrp na membrana celular (YIP; STRYNADKA, 2006). A secretina HrpA tem sido descrita como a única proteína do injectossoma localizada na membrana externa de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (HrcC em *Xac*) (WENGELNIK et al., 1996; LORENZ; BÜTTNER, 2009). Também tem sido reportado que mutações no gene ortólogo hrcC de *Xoo* apresentam redução nos níveis de virulência em plantas de arroz (WANG et al., 2007).

Translocones. Os translocones são responsáveis pela translocação de proteínas efetoras da bactéria para o citoplasma de células eucariotas. Por ser ainda muito pouco compreendido este mecanismo, é descrito na forma de dois modelos (GALÁN; WOLF-WATZ, 2006). O primeiro sugere que o pilus Hrp gera uma abertura na membrana da célula hospedeira para que as proteínas efetoras atinjam o citoplasma (HOICZYK; BLOBEL, 2001).

Já, o segundo modelo sugere que o pilus Hrp utiliza uma série de proteínas secretadas pelo T3SS, denominados translocadores, que aderem-se à célula hospedeira para posteriormente formar poros na membrana para o transporte das proteínas efetoras ao interior das células (TARDY et al., 1999). Desta forma, translocadores com algum tipo de mutação não são considerados capazes de transportar proteínas ao interior das células, mesmo que seu AST3 esteja devidamente formado (GALÁN; WOLF-WATZ, 2006). Uma das proteínas translocadoras mais estudada em *Xanthomonas* é codificada pelo gene *hrpF* de *Xcv*. Embora fundamental para a patogênese e reconhecimento do efector AvrBs3, não é necessária para a secreção de proteínas efetoras (ROSSIER et al., 2000). A proteína HrpF possui regiões altamente hidrofóbicas em seu sítio C-terminal e duas repetições imperfeitas diretas em sua parte N- terminal, apesar de apenas uma repetição ser suficiente para o processo de translocação das proteínas efetoras para o interior das células (HUGUET; BONAS, 1997).

Pesquisas realizadas com os genes *hrpF* de *Xcv*, *Xcc* e *Xac*, demonstraram que esses genes podem restaurar a virulência do mutante *hrpF* de *Xoo* e vice-versa (SUGIO; YANG; WHITE, 2005). Esses dados sugerem que esta proteína não cumpre funções de especificidade nas interações patógeno-planta, porém são necessárias para a translocação de efetores proteicos.

As proteínas HrpF apresentam atividade de união a lipídeos e formação de poros em bicamadas lipídicas artificiais (BÜTTNER et al., 2002), permitindo que elas sejam inseridas na membrana celular da planta e, com isso, possibilitando a translocação de proteínas efetoras para o interior da célula hospedeira (BÜTTNER et al., 2002). A formação de poros em membranas celulares de plantas, também é característica das proteínas harpin do T3SS. Essas proteínas caracterizam-se por serem ricas em glicina e serem secretadas pelo T3SS de bactérias fitopatogênicas gram-negativas, sendo indutoras da HR (Hypersensitive response) em plantas não hospedeiras (CHOI et al., 2013). Estudos feitos com a proteína harpin Hpa1 do T3SS de *Xac* sugerem que essa proteína pode-se unir as membranas celulares de *Citrus sinensis*, além de estar

envolvida na agregação bacteriana e a formação de fibras (SGRO et al., 2012). Esse estudo também demonstrou que a região N- terminal e C- terminal da proteína Hpa1 está relacionada com a HR de plantas não hospedeiras. Resultados similares foram obtidos com a proteína harpin Hpa1 na bactéria *Xoo* (WANG et al., 2008).

ATPase. A ATPase do AST3 encontra-se associada periféricamente à membrana interna bacteriana, proporcionando assim energia para os processos de secreção dos efetores proteicos (POZIDIS et al., 2003; CORNELIS, 2006). Nesses processos, as ATPases também são necessárias para o reconhecimento e liberação das proteínas efetoras das chaperonas (AKEDA; GALÁN, 2005). Tais observações são consistentes com a identificação da atividade ATPase *in vitro* e também dissociativa dos complexos efector-chaperona da proteína HrcN (ATPase) de *Xcv* (LORENZ; BÜTTNER, 2009). Tal proteína também atua durante o processo de translocação de efetores proteicos, interagindo com outras proteínas, como HrcQ, HrcL e as proteínas chaperonas HpaB e HpaC (HpaP em *Xac*) (LORENZ; BÜTTNER, 2009; HARTMANN; BÜTTNER, 2013). Mutações na proteína HrcN de *Xanthomonas* incapacitam o patógeno de dar origem à doença nas respectivas plantas hospedeiras (LORENZ; BÜTTNER, 2009; YAN; WANG, 2012).

2.5.2 CATEGORIA II : Chaperonas

As chaperonas do T3SS (T3Cs) são proteínas que cumprem funções tanto na montagem como no funcionamento do AST3 (FELDMAN; CORNELIS, 2003; LOHOU et al., 2013). Atuando com pelo menos um efector proteico, tais proteínas são necessárias para que os efetores sejam secretados no citoplasma da célula hospedeira (LOHOU et al., 2013). Esse processo varia de acordo com o padrão de reconhecimento dos efetores por parte das T3Cs, que subdividem-se em três classes. A classe I de chaperonas é a principal em patógenos de plantas, e reconhece um (IA) ou vários (IB) efetores. A classe II interage com translocones específicos, e a classe III está

relacionada com as chaperonas do sistema de secreção flagelar (WATTIAU et al., 1994; PARSOT, 2003).

Chaperonas IA foram descritas nas bactérias da família dos injectossoma HrpI, *P. syringae* pv.*Syringae* (VAN DIJK et al., 2002), *P. syringae* pv *tomato* (BADEL et al., 2003), e *E. amilivora* (GAUDRIAULT et al., 1997). Os genes que codificam para as chaperonas encontram-se adjacentes aos efetores proteicos no genoma dessas bactérias (LOHOU et al., 2013). Em contrapartida, os genes das chaperonas da classe IB são encontradas em vários AST3 da família HrpII, e separados dos genes efetores, embora localizadas em um mesmo cluster hrp (LOHOU et al., 2013). Esse tipo de chaperonas pertencem aos grupos HpaB e HpaC (HpaP em espécies como *Xac* ou *Xoo*) de *Xanthomonas spp*, e participam da secreção de vários efetores proteicos e da patogênese de bactérias (BÜTTNER et al., 2004, 2006).

Estudos com efetores proteicos na bactéria *Xoo* demonstraram que mutantes das chaperonas HpaB e HpaC (HpaP em *Xcv*) são incapazes de secretar eficientemente a maioria dos efetores proteicos analisados (FURUTANI et al., 2009). Mutantes gerados por mutagêneses randômica com transposones no gene HpaB em *Xac* são incapazes de produzir sintomas do cancro cítrico em folhas de *Citrus paradise* (YAN; WANG, 2012). Entretanto, tais proteínas podem interagir com as proteínas ATPase HrcN, HrcU, HrcV, HpaC e HpaA, facilitando assim o contato do aparato exportador da membrana interna com os efetores proteicos durante sua secreção (LORENZ; BÜTTNER, 2009; HARTMANN; BÜTTNER, 2013).

O CBD (Chaperone Binding Domains) é uma regiões conservada no sítio N-terminal (primeiros 100 aa) de alguns efetores (CORNELIS, 2006; BÜTTNER, 2012). Tais domínios são necessários para secreção e reconhecimento das chaperonas e proteínas da membrana interna (BIRTALAN; PHILLIPS; GHOSH, 2002). Estes domínios têm sido identificados no regulador Hpac e os efetores HpaA, AvrBs1 e AvrBs3 de *Xcv* (BÜTTNER et al., 2004, 2006; LORENZ et al., 2008).

2.5.3 CATEGORIA III: Efetores

Os efetores proteicos são injetados no interior das células por meio do AST3. Eles alteram diferentes processos na planta como: supressão da apoptose, ativação da via do ácido jasmônico (AJ), supressão da remodelagem da parede celular, ativação da transcrição e supressão da ativação de proteínas de resistência (MUDGETT, 2005). Muitas destas funções têm sido observadas nos efetores proteicos de *Xanthomonas*, onde estima-se existir aproximadamente 40 efetores agrupados em diferentes famílias (WHITE et al., 2009).

Na Tabela 1, pode-se observar diversos efetores descritos tanto em *Xanthomonas* como em patógenos de animais. Mutagêneses sitio-dirigida realizadas em genes efetores de *Xac* demonstraram-se ineficientes para reduzir os efeitos do cancro cítrico em plantas de *Citrus paradise* e *Citrus aurantifolia* (FIGUEIREDO et al., 2011). Esses dados sugerem um possível papel redundante na função desses efetores. Em contrapartida, mutações nos genes das famílias AvrBs/PthA de efetores TAL (Transcription Activator-Like) de *Xanthomonas* têm sido bastante estudadas por produzirem fenótipos com diminuição da virulência, ocasionando perda da capacidade do patógeno em causar hiperplasia, water soaking e disseminação na planta (SWARUP et al., 1992; YANG; WHITE, 2004; SHIOTANI et al., 2007; YAN; WANG, 2012).

Os efetores TAL de bactérias atuam como ativadores transcricionais no núcleo da célula hospedeira (WHITE; YANG; JOHNSON, 2000a; KAY et al., 2007). Esses efetores apresentam regiões N-terminal e C-terminal altamente conservadas, com uma estrutura central que possuem repetições de 34 ou 35 aminoácidos, relacionadas com o reconhecimento de sequências específicas dentro do DNA da planta (WHITE; YANG; JOHNSON, 2000a; KAY et al., 2007). Tais efetores também possuem motivos conservados de sinais de localização nuclear (NLS nuclear localization signal), além de domínios de ativação transcricional que alteram o perfil de transcrição da planta infectada (AD activation domain) (YANG; DEANW.GABRIEL, 1995; ZHU et al., 1999; SZUREK et al., 2001).

Algumas das proteínas da família AvrBs/PthA em *Xanthomonas* são reconhecidas por proteínas de resistência (R) em plantas, o que também ocasiona a ativação de diferentes cascatas de sinalização que induzem a expressão de genes responsáveis pelos mecanismos de defesa nas plantas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). Em *Xcv*, a translocação de efetores tipo AvrBs3 por meio do AST3 depende de sinais localizados no sítio N-terminal das proteínas efectoras, cujas regiões CBD são reconhecidas por chaperonas e estão presentes na maioria dos efetores da família AvrBs3/PthA (DEAN, 2011).

2.5.4 CATEGORIA IV: Reguladores

Os reguladores transcricionais do T3SS controlam a expressão dos genes *hrp* para a sua montagem e funcionamento (HE; NOMURA; WHITTAM, 2004; GALÁN; WOLF-WATZ, 2006). Em *Xanthomonas*, as proteínas HrpG e HrpX regulam principalmente a expressão de genes que compõem o cluster *hrp*. A proteína HrpG é um regulador de resposta (RR) órfão do sistema de dois componentes (TCS = Two Component System). Em *Xanthomonas*, HrpG é considerada um RR órfão, devido a que não é conhecida a proteína histidina quinasa (HK) encargada de sua fosforilação e ativação. Quando a HrpG é ativada (fosforilada) pela respectiva HK, leva à expressão do regulador *hrpX* (WENGELNIK; ACKERVEKEN; BONAS, 1996; NOEL et al., 2001; GÜRLEBECK; THIEME; BONAS, 2006). HrpX é um tipo de ativador transcricional da família AraC, que regula a expressão de muitos genes do regulon HrpG, incluindo os operons *hrpB* a *hrpF* (WENGELNIK; ACKERVEKEN; BONAS, 1996; NOEL et al., 2001; GÜRLEBECK; THIEME; BONAS, 2006). Essa família de ativadores transcricionais AraC apresenta como característica estrutural a presença de dois domínios helix-turn-helix conservados de união ao DNA (EGAN, 2002).

Tem sido observado que muitos genes regulados por HrpX apresentam uma PIP-box (plant-inducible promoter box; consensus TTCGCN15-TTCGC) em sua região

promotora (FENSELAU; BONAS, 1995). Essa região tem sido proposta como um elemento regulatório, embora alguns estudos têm mostrado que genes com PIP-box imperfeitas ou sem PIP-box, são regulados igualmente por HrpX, o que sugere que este motivo não é suficiente para conferir a indução por este regulador (WENGELNIK; ACKERVEKEN; BONAS, 1996; NOEL et al., 2001).

A importância dos reguladores HrpG e HrpX durante o processo infeccioso de *Xac*, tem sido demonstrada com mutações randômicas e sítio dirigidas, essas alterações permitiram neutralizar os efeitos de virulência da bactéria em plantas de citros infectadas (LAIA et al., 2009; GUO et al., 2011). Análises baseadas em microarranjos com amostras de *Xac*, permitiram observar que a maioria dos genes do T3SS (além de outros fatores de virulência) são regulados principalmente por HrpG e HrpX (GUO et al., 2011). No entanto, ainda são pouco conhecidos os estímulos que dão origem à expressão do T3SS em plantas por meio das proteínas HrpG e HrpX. Uma das principais causas do desconhecimento destes estímulos, é o fato de não saber qual é a histidina quinasa (HK) encargada de perceber o sinal ambiental que ativa a HrpG (Figura 5). Nesse sentido, estudos de interação proteína-proteína realizados em *Xac* demonstraram que a HK putativa (XAC3683), interatua fisicamente com HrpG, o que pode sugerir um possível processo de ativação mediado por essa proteína (ALEGRIA et al., 2004). Pesquisas mais recentes realizadas em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) reportaram outra HK putativa denominada HpaS que fosforila a HrpG (LI et al., 2014). Todos esses resultados sugerem provavelmente que múltiplas vias de sinalização poderiam ativar esta proteína, como já tem sido observado na bactéria *Ralstonia solanacearum* (YOSHIMUCHI et al., 2009). Assim, de acordo com isso, diversas proteínas HK em resposta a sinais específicas (ambiente/planta), estariam fosforilando HrpG em *Xanthomonas* e ativando o T3SS via HrpX.

Embora a fosforilação de HrpG pela HK (provavelmente mais de uma) seja um dos eventos mais importantes na ativação dos genes do T3SS em *Xanthomonas*, tem sido demonstrado que essas redes de regulação são muito mais complexas e envolvem outras vias dos sistemas de dois componentes como : RpfC/RpfG, ColS/ColR, PhoP/

PhoQ entre outros (BÜTTNER; BONAS, 2010; TSUGE; FURUTANI; IKAWA, 2014) (Figura 5). No entanto, com toda essas informações disponíveis, ainda não é muito claro os tipos de sinais e o mecanismo utilizado pela *Xac* para ativar este fator de virulência. Por isso, um dos objetivos deste trabalho foi identificar um desses sinais ambientais captado pela *Xac* para dar início ao processo infeccioso via T3SS (ver capítulo 3).

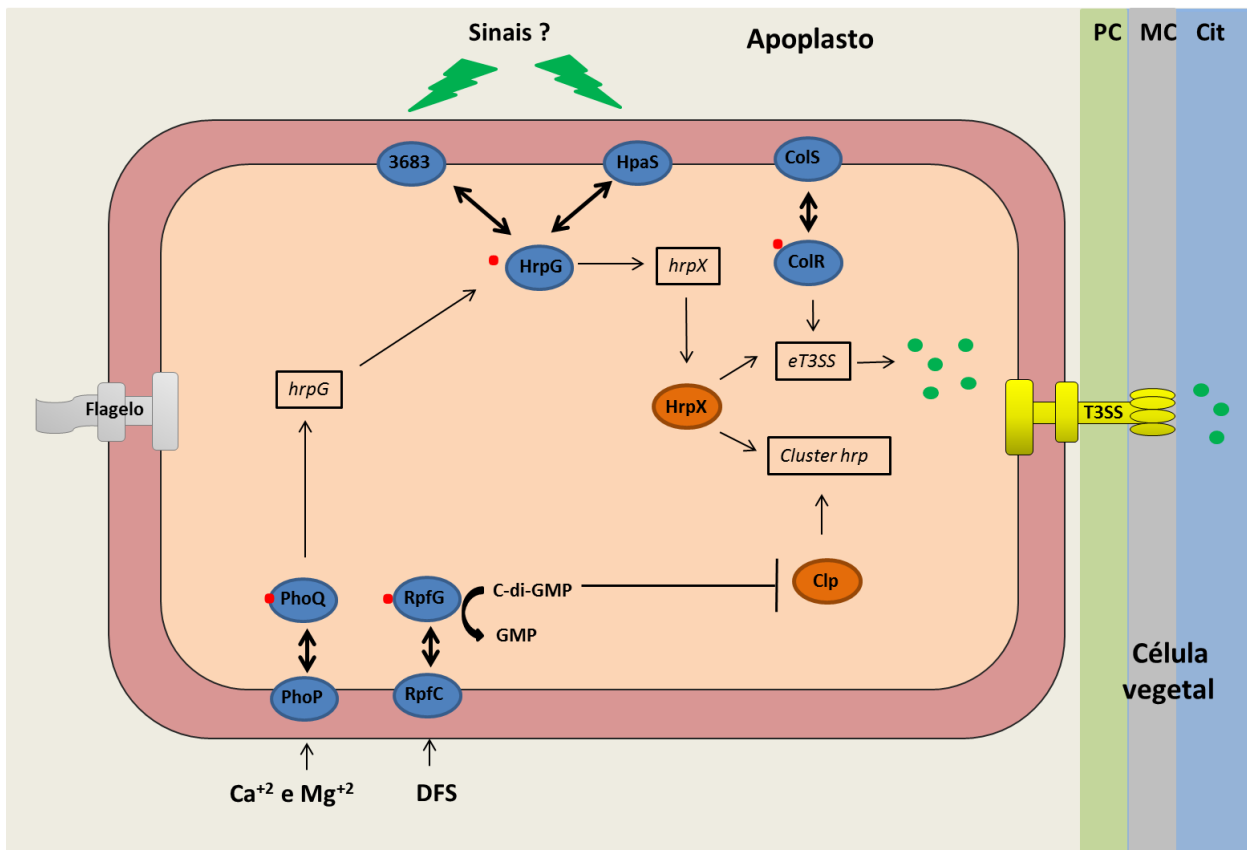


Figura 5. Modelo geral da cascata de regulação do T3SS no gênero *Xanthomonas*. Um sinal externo do ambiente/planta ativa a proteína sensor quinase e essa se autofosforila. O grupo fosfato é transferido à proteína HrpG e essa é ativada induzindo a transcrição e tradução de HrpX. Posteriormente, HrpX ativa a expressão do cluster *hrp* e dos efetores proteicos tipo III. Alguns efetores do T3SS também podem ser regulados por meio do TCS ColS/ColR. A expressão do gene *hrpG* também pode ser regulada pelo TCS PhoP/PhoQ em baixas concentrações de Cálcio e Magnésio. O TCS RpfC/RpfG ativado pelo DFS (Diffusible Signal Molecules) regula os níveis do segundo mensageiro cyclic-di-GMP. Um importante alvo do cyclic-di-GMP é o regulador transricional Clp. O cyclic-di-GMP se liga à Clp para prevenir sua união ao DNA e evitar a transcrição de genes relacionados com o T3SS. As caixas representam genes, os círculos azuis representam proteínas dos Sistemas de Dois Componentes (TCS) e o círculo laranja representam reguladores transcripcionais. As setas em duas direções representam processos de fosforilação ou desfosforilação e o ponto vermelho sobre os reguladores de resposta do TCS representa o grupo fosfato. c-di-GMP= di-guanosina monofosfato cíclico, GMP= guanosina monofosfato, PM= parede celular, MC=membrana celular e Cit= citoplasma.

2.6 O T3SS de *Xanthomonas* como possível alvo molecular

Alternativas atuais para o tratamento de doenças geradas por bactérias são baseadas no desenvolvimento de compostos antimicrobianos com atividade específica contra fatores de virulência e patogenicidade (RASKO; SPERANDIO, 2010). Nesse aspecto, resultados do transcriptoma de *Xac* inoculada em variedades de citros com níveis diferentes de susceptibilidade ao cancro identificaram que o T3SS é o principal fator de virulência expresso *in vivo* (Ver Capítulo 2).

Além disso, diferentes estudos baseados em mutagênese de patógenos de *Xanthomonas* têm demonstrado que alterações nos genes do T3SS anulam a capacidade da bactéria infectar e colonizar as células do hospedeiro (QIAN et al., 2005; WANG et al., 2007; LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2012) (Figura 3). Em virtude do T3SS apresentar alta especificidade (presente geralmente nas bactérias patogênicas) e baixa pressão seletiva (não é necessário para a sobrevivência da bactéria), o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos para o T3SS pode vir a ser de grande interesse para o tratamento de doenças produzidas pelas *Xanthomonas*. Ademais, o risco de surgimento de estirpes bacterianas resistentes também é reduzido.

Neste aspecto, algumas pesquisas com patógenos de animais têm sido desenvolvidas com algum tipo de sucesso (FELISE et al., 2008; KEYSER et al., 2008; AIELLO et al., 2010; SWIETNICKI et al., 2011; KLINE et al., 2012). Por sua vez, a comprovação de que o T3SS é altamente conservado entre diferentes famílias de bactérias tornará possível o uso de alvos válidos em patógenos de plantas para o controle de doenças causadas também por patógenos animais.

Uma vez que o T3SS é um complexo estrutural em que interatuam múltiplas proteínas, um conhecimento prévio dessas interações poderia facilitar a identificação de sítios de contato físico que possam ser utilizados no desenho de inibidores para a desestabilização deste sistema (ARKIN; WELLS, 2004). Uma primeira aproximação experimental ao conhecimento de tais interações no T3SS foi realizada em *Xac*

utilizando sistemas de duplo-híbrido em leveduras (ALEGRIA et al., 2004). Outro tipo de estudo baseado em simulações computacionais para predição das interações proteína-proteína foi realizado em Xoo com propósitos quimioterapêuticos, o que mostra a importância desse tipo de conhecimento no desenvolvimento de compostos antimicrobianos (KIM et al., 2008). Uma das proteínas do AST3 da membrana externa de *Xanthomonas* que é essencial para a patogênese e que poderia ser bloqueada por intermédio de compostos químicos é o HrpC (família das secretinas). A compreensão da arquitetura e montagem das secretinas faz com que se tornem alvos atrativos para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos (KOROTKOV; GONEN; HOL, 2011).

O uso das secretinas como alvo farmacológico já foi demonstrado no screening funcional de inibidores do T3SS na bactéria *Salmonella typhimurium* (FELISE et al., 2008). Nesse estudo, foi constatado que o composto 2-imino-5-arylidene thiazolidinone bloqueia a secreção e a virulência de diversas bactérias patogênicas de animais e plantas, como *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *F. novicida* e *P. syringae*. A proteína ATPase (HrcN) do AST3 de *Xanthomonas* também é considerada um alvo válido para o controle de doenças causadas por essas bactérias. Pesquisas com propósitos terapêuticos baseadas em docking molecular identificaram inibidores funcionais da atividade ATPase das proteínas YscN e BsaS (ortólogas de HrcN de *Xac*) de *Y. pestis* e *B. mallei* respectivamente (SWIETNICKI et al., 2011).

Para as proteínas chaperonas (categoria II), ainda não foram reportados compostos antimicrobianos que possam ser utilizados para combater bactérias que afetam plantas ou animais. Entretanto, já há a disponibilidade de estruturas tridimensionais de diferentes chaperonas e a identificação de domínios de interação efetor-chaperona que podem facilitar a compreensão das interações proteína-proteína (BIRTALAN; GHOSH, 2001; EVDOKIMOV et al., 2001; BIRTALAN; PHILLIPS; GHOSH, 2002; CORNELIS et al., 2005; CORNELIS, 2006; BÜTTNER, 2012). Neste aspecto, a obstrução das interações chaperona-efetores poderia representar uma aproximação experimental no desenvolvimento de inibidores do T3SS. A inibição de tais interações

foi observada entre a proteína chaperona eucariota Hsp90 e a proteína HOP, cuja obstrução causou a supressão de células tumorais *in vivo* (YI; REGAN, 2008). A chaperona eucariota Hsp90 atua no processo de dobramento e reconhecimento de domínios de proteínas oncogênicas por meio de interações proteína-proteína.

No caso dos efetores proteicos do tipo III de *Xanthomonas* (Categoria III), a descoberta da estrutura cristalina do efector AvrBs3 de *Xoo* (MAK et al., 2012) permite que sejam identificados e testados sítios de interação para inativação da interação entre ela e as proteínas chaperonas. Outra aproximação experimental válida é o desenho de inibidores voltados para a interação entre AvrBs3 e o DNA da planta. Nesse caso, a inibição de efetores AvrBs3 poderia afetar a interação entre as regiões promotoras do DNA de plantas, permitindo assim que o sistema de defesa atue de forma esperada.

Finalmente, também já foi relatado que as proteínas HrpG e HrpX são necessárias para a expressão de genes de virulência associados com o T3SS de *Xanthomonas*. Dessa forma, tais genes podem ser empregados como alvos moleculares para o controle de doenças causadas por *Xanthomonas*. Inibidores de reguladores transcricionais pertencentes à família de genes AraC das bactérias *Shigella flexneri* e *E. coli* permitiram atenuar efeitos de doença causada em animais (Koppolu et al. 2013; Skredenske et al. 2013). Tais experimentos sugerem que os compostos com atividade antimicrobiana inibem os domínios de ligação entre os reguladores transcricionais e o DNA das bactérias. O uso dessa estratégia tem sido bastante viável no desenvolvimento de agentes antimicrobianos para o controle de patógenos animais (Skredenske et al. 2013; Koppolu et al. 2013). Estudos desenvolvidos especificamente em patógenos de plantas com o fim de bloquear as proteínas de regulação do T3SS foram realizados em *Erwinia amylovora*, o agente causal do fogo bacteriano (fire blight in rosaceous plants) (KHOKHANI et al., 2013). Utilizando os compostos fenólicos ácido 4-methoxy-cinnâmico (TMCA) e ácido benzoico (BA), foi inibida a expressão de genes da via regulatória HrpS-HrpL nesta bactéria.

Tabela 2. Possíveis alvos e estratégias para o desenvolvimento de compostos anti-T3SS em *Xanthomonas*.

Categoria I: Aparato		
Componente funcional	Mutantes com deficiência na virulência *	Possíveis estratégias para o desenvolvimento do composto química
Tranlocon	<i>hrpF</i>	Inibição de interações proteína-proteína
Subunidad Pilus Hrp	<i>hrpE</i>	
Montagem Pilus Hrp	<i>hrpB1, hrpB2, hpaB4</i>	
Anel membrana externa	<i>hrcC</i> (Secretina)	
Anel membrana interna	<i>hrcI</i>	
Anel citoplasmático	<i>hrcQ</i>	
Aparato exportador	<i>hrpD5, hrcU, hrcV</i>	
Proteína harpins	<i>hpa1</i>	
Transglycosylase-like	<i>hpa2</i>	Inibição enzimática
ATPase	<i>hrcN</i>	

Categoria II: Chaperonas		
Componente funcional	Mutantes com deficiência na virulência *	Possíveis estratégias para o desenvolvimento do composto químico
Chaperona	<i>hpaB, hpaP</i>	Inibição de interações Chaperona-efetor

Categoria III: Efetores		
Componente funcional	Mutantes com deficiência na virulência *	Possíveis estratégias para o desenvolvimento do composto química
Efetores da família AvrBs3/PthA	<i>pth4</i>	Inibição de interações Pth4– chaperona ou Pth4-DNA (planta)

Categoria IV : Reguladores transcricionais		
Componente funcional	Mutantes com deficiência na virulência *	Possíveis estratégias para o desenvolvimento do composto química
Sistema de Dois Componentes (TCS)	<i>hpaS, hrpG</i>	Inibição de interações TCS
Regulador transcricional AraC-type	<i>hrpX</i>	Inibição de interações HrpX–DNA

*Genes cujas mutações produzem fenótipos incapazes de originar doenças em plantas suscetíveis (ver Figura 3).

Também foi reportado que compostos derivados da silicylidene acylhydrazides e o ácido p-coumarico inibem a expressão dos genes reguladores do T3SS em *Erwinia amylovora* e *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*) respectivamente (KHOKHANI et al., 2013; YANG et al., 2014).

Tais estudos demonstram a factibilidade de explorar o T3SS como alvo molecular para o controle de bactérias fitopatogênicas como *Xanthomonas*, e também em bactérias animais que utilizam o sistema T3SS como via de infecção para causar doenças. Na Tabela 2, apresenta-se um resumo das possíveis estratégias que poderiam se utilizadas no estudo de compostos antimicrobianos contra o T3SS de *Xanthomonas*.

3. REFERÊNCIAS

AIELLO, D.; WILLIAMS, J. D.; MAJGIER-BARANOWSKA, H.; PATEL, I.; PEET, N. P.; HUANG, J.; LORY, S.; BOWLIN, T. L.; MOIR, D. T. Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1988–99, maio 2010.

AIZAWA, S. I. Bacterial flagella and type III secretion systems. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 2, p. 157–64, 21 ago. 2001.

AKEDA, Y.; GALÁN, J. E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. **Nature**, v. 437, n. 7060, p. 911–5, 6 out. 2005.

ALEGRIA, M. C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; SILVA, A. C. R.; FARAH, C. S. New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates of the Type III Secretion System of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6186–6197, 2004.

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 18, p. 5655–5662, 1997.

ALVES, P. R. B.; MELO, B. **Cultura dos Citros. In: Núcleo de estudo em fruticultura no cerrado**. Disponível em: <www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>.

ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 1, p. 18–24, mar. 1999.

ARKIN, M. R.; WELLS, J. a. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 4, p. 301–17, abr. 2004.

BADEL, J. L.; NOMURA, K.; BANDYOPADHYAY, S.; SHIMIZU, R.; COLLMER, A.; HE, S. Y. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1239–1251, 27 ago. 2003.

BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, n. 3, p. 300–305, mar. 2010.

BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, p. 949–963, 2012.

BERGER, C.; ROBIN, G. P.; BONAS, U.; KOEBNIK, R. Membrane topology of conserved components of the type III secretion system from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 156, n. Pt 7, p. 1963–74, jul. 2010.

BIRTALAN, S. C.; PHILLIPS, R. M.; GHOSH, P. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. **Molecular cell**, v. 9, n. 5, p. 971–80, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049734>>.

BIRTALAN, S.; GHOSH, P. letters Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. v. 8, n. 11, p. 974–978, 2001.

BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O’SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. **Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture** **Trends in Genetics**, 2013. .

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

BÜTTNER, D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 76, n. 2, p. 262–310, jun. 2012.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 107–33, mar. 2010.

BÜTTNER, D.; GÜRLEBECK, D.; NOËL, L. D.; BONAS, U. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. **Molecular microbiology**, v. 54, n. 3, p. 755–68, nov. 2004.

BÜTTNER, D.; HE, S. Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant physiology**, v. 150, n. 4, p. 1656–64, ago. 2009.

BÜTTNER, D.; LORENZ, C.; WEBER, E.; BONAS, U. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 2, p. 513–27, jan. 2006.

BÜTTNER, D.; NENNSTIEL, D.; KLÜSENER, B.; BONAS, U. Functional Analysis of HrpF , a Putative Type III Translocon Protein from *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria*. **jour**, v. 184, n. 9, p. 2389–2398, 2002.

CAPPELLETTI, P. a; DOS SANTOS, R. F.; DO AMARAL, A. M.; HOMEM, R. A.; SOUZA, T. D. S.; MACHADO, M. a; FARAH, C. S. Structure-function analysis of the HrpB2-HrcU interaction in the *Xanthomonas citri* type III secretion system. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17614, jan. 2011.

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

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, p. 803-814, 2006.

CHOI, M.; KIM, W.; LEE, C.; OH, C. Harpins , Multifunctional Proteins Secreted by Gram-Negative Plant-Pathogenic Bacteria. v. 26, n. 10, p. 1115–1122, 2013.

COLLINS, R. F.; DAVIDSEN, L.; DERRICK, J. P.; FORD, R. C.; TØNJUM, T. Analysis of the PilQ Secretin from *Neisseria meningitidis* by Transmission Electron Microscopy Reveals a Dodecameric Quaternary Structure. **Journal of bacteriology**, 2001.

CORBIN, D. R.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Differential Regulation of a Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Gene Family in Wounded and Infected Plants. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 7, n. 12, p. 4337– 4344, 1987.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. November, p. 811–825, 2006.

CORNELIS, G. R.; FRÉDÉRIQUE VAN GIJSEGEM. A SSEMBLY AND F UNCTION OF T YPE III S ECRETORY S YSTEMS. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 735–774, 2000.

CORNELIS, G. U. Y. R.; HEINZ, D. W.; BU, C. R.; NIEMANN, H. H. Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. p. 1993–2002, 2005.

DA SILVA, a C. R.; FERRO, J. a; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. a; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, a M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. a; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, a J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.;

FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, a; KATSUYAMA, a M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. a; MADEIRA, a M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. a; ROSSI, a; SENA, J. a D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. a F.; TAKITA, M. a; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–63, 2002.

DEAN, P. and their roles in infection. **FEMS microbiology reviews**, p. 1–26, 2011.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479–501, 1994.

DUONG, F.; WICKNER, W. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. **The EMBO journal**, v. 16, n. 16, p. 4871–9, 1997.

EGAN, S. M. Growing Repertoire of AraC / XylS Activators GUEST COMMENTARY Growing Repertoire of AraC / XylS Activators. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5529–5532, 2002.

EVDOKIMOV, A. G.; TROPEA, J. E.; ROUTZAHN, K. M.; COPELAND, T. D.; WAUGH, D. S. Structure of the N-terminal domain of *Yersinia pestis* YopH at 2.0 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 57, n. 6, p. 793–799, 2001.

FACINCANI, A. P.; MOREIRA, L. M.; SOARES, M. R.; FERREIRA, C. B.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. a; GOZZO, F. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F. 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**, v. 14, n. 1, p. 205–17, 2014.

FELDMAN, M. F.; CORNELIS, G. R. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 2, p. 151–158, 2003.

FELISE, H. B.; NGUYEN, H. V; PFUETZNER, R. a; BARRY, K. C.; JACKSON, S. R.; BLANC, M.-P.; BRONSTEIN, P. a; KLINE, T.; MILLER, S. I. An inhibitor of gram-negative bacterial virulence protein secretion. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 4, p. 325–36, 2008.

FENSELAU, S.; BONAS, U. Sequence and expression analysis of the hrpB pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 8, n. 6, p. 845–854, 1995.

FIGUEIREDO, J. F. L.; MINSAVAGE, G. V.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; JONES, J. B. Mutational analysis of type III effector genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 130, n. 3, p. 339–347, 23 mar. 2011.

FUNDECITRUS. **Incidência de cancro cítrico aumenta 39% no Estado de São Paulo.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/incidencia-de-cancro-citrico-aumenta-39-no-estado-de-sao-paulo/13>>.

FURUTANI, A.; TAKAOKA, M.; SANADA, H.; NOGUCHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; OCHIAI, H.; TSUGE, S. Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 22, n. 1, p. 96–106, . 2009.

GALÁN, J. E. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1322–1328, 21 maio 1999.

GALÁN, J. E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 567–73, 2006.

GAUDRIAULT, S.; MALANDRIN, L.; PAULIN, J. P.; BARNY, M. a. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. **Molecular microbiology**, v. 26, n. 5, p. 1057–69, 1997.

GENIN, S.; BOUCHER, C. A. A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 243, n. 1, p. 112–118, 1994.

GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 4, p. 771–795, 2004.

GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual review of phytopathology**, v. 46, p. 189–215, 2008.

GOTTWALD, T. R.; PIERCE, F.; GRAHAM, J. H. Citrus Canker : The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress. **Plant Management Network**, v. 1993, n. August, 2002.

GRAHAM, J. H.; R., G. T.; CUBERO, J.; DIANN S., A. *Xanthomonas axonopodis* pv . citri : factors affecting successful. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

GRAND, C.; SARNI, F.; LAMB, C. J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. **European Journal of Biochemistry I**, v. 169, p. 73–77, 1987.

GUO, Y.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX Play Global Roles in Coordinating Different Virulence Traits of *Xanthomonas axonopodis* pv . citri. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649–661, 2011.

GÜRLEBECK, D.; THIEME, F.; BONAS, U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 3, p. 233–55, mar. 2006.

GUSTINE, D. L. Metabolites from *Pseudomonas corrugata* Elicit Phytoalexin Biosynthesis in White Clover. **Phytopathology**, v. 80, p. 1427, 1990.

GUTTMAN, D. S.; GROPP, S. J.; MORGAN, R. L.; WANG, P. W. Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 12, p. 2342–54, 2006.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1773–91, 1996.

HARTMANN, N.; BÜTTNER, D. The Inner Membrane Protein HrcV from *Xanthomonas* spp . Is Involved in Substrate Docking During Type III Secretion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 10, p. 1176–1189, 2013.

HARTMANN, N.; SCHULZ, S.; LORENZ, C.; FRAAS, S.; HAUSE, G.; BÜTTNER, D. Characterization of HrpB2 from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria identifies protein regions that are essential for type III secretion pilus formation. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 5, p. 1334–49, 2012.

HAUSNER, J.; HARTMANN, N.; LORENZ, C.; BÜTTNER, D. The periplasmic HrpB1 protein from *Xanthomonas* spp. binds to peptidoglycan and to components of the type III secretion system. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 20, p. 6312–24, 2013.

HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1694, n. 1-3, p. 181–206, 11 nov. 2004.

HOICZYK, E.; BLOBEL, G. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4669–74, 10 abr. 2001.

HUECK, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 2, p. 379–435, 1998.

HUGUET, E.; BONAS, U. hrpF of *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria* Encodes an 87-kDa Protein with Homology to NolX of *Rhizobium fredii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 4, p. 488–498, 1997.

INVESTE. **Laranja**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.investe.sp.gov.br/setores-de-negocios/agronegocios/laranja/>>.

JACOB, T. R.; LAIA, M. L. De; MOREIRA, L. M.; GONÇALVES, J. F.; MARIA, F.; CARVALHO, D. S.; INÊS, M.; FERRO, T.; FERRO, J. A. Type IV Secretion System Is Not Involved in Infection Process in Citrus. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

JACOBS, J. M.; BABUJEE, L.; MENG, F.; MILLING, A.; ALLEN, C. The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. **mBio**, v. 3, n. 4, p. e00114–12, 2012.

JIN, Q.; HU, W.; BROWN, I.; MCGHEE, G.; HART, P.; JONES, a L.; HE, S. Y. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. **Molecular microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1129–39, jun. 2001.

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

KAY, S.; HAHN, S.; MAROIS, E.; HAUSE, G.; BONAS, U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, n. 5850, p. 648–51, 26 out. 2007.

KEYSER, P.; ELOFSSON, M.; ROSELL, S.; WOLF-WATZ, H. Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. **Journal of internal medicine**, v. 264, n. 1, p. 17–29, jul. 2008.

KHOKHANI, D.; ZHANG, C.; LI, Y.; WANG, Q.; ZENG, Q.; YAMAZAKI, A.; HUTCHINS, W.; ZHOU, S.-S.; CHEN, X.; YANG, C.-H. Discovery of plant phenolic compounds that

act as type III secretion system inhibitors or inducers of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5424–36, 2013.

KIM, J.-G.; PARK, D.; KIM, B.-C.; CHO, S.-W.; KIM, Y. T.; PARK, Y.-J.; CHO, H. J.; PARK, H.; KIM, K.-B.; YOON, K.-O.; PARK, S.-J.; LEE, B.-M.; BHAK, J. Predicting the interactome of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* for target selection and DB service. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 41, jan. 2008.

KLINE, T.; FELISE, H. B.; SANOWAR, S.; MILLER, S. I. The type III secretion system as a source of novel antibacterial drug targets. **Current drug targets**, v. 13, n. 3, p. 338–51, 2012.

KOPPOLU, V.; OSAKA, I.; SKREDENSKE, J. M.; KETTLE, B.; HEFTY, P. S.; LI, J.; EGAN, S. M. Small-molecule inhibitor of the *Shigella flexneri* master virulence regulator VirF. **Infection and immunity**, v. 81, n. 11, p. 4220–31, nov. 2013.

KOROTKOV, K. V.; GONEN, T.; HOL, W. G. J. Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 8, p. 433–43, ago. 2011.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I. T.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. F. and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC microbiology**, v. 17, p. 1–17, 2009.

LEE, B.-M.; PARK, Y.-J.; PARK, D.-S.; KANG, H.-W.; KIM, J.-G.; SONG, E.-S.; PARK, I.-C.; YOON, U.-H.; HAHN, J.-H.; KOO, B.-S.; LEE, G.-B.; KIM, H.; PARK, H.-S.; YOON, K.-O.; KIM, J.-H.; JUNG, C.; KOH, N.-H.; SEO, J.-S.; GO, S.-J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 2, p. 577–86, 2005.

LEITE, R. P.; MOHAN, S. K. **Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paran??, Brazil** *Crop Protection*, 1990. .

LI, R.-F.; LU, G.-T.; LI, L.; SU, H.-Z.; FENG, G.; CHEN, Y.; HE, Y.-Q.; JIANG, B.-L.; TANG, D.-J.; TANG, J.-L. Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2053–71, 2014.

LOHOU, D.; LONJON, F.; GENIN, S.; VAILLEAU, F. Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. November, p. 435, 2013.

LORENZ, C.; BÜTTNER, D. Functional Characterization of the Type III Secretion ATPase HrcN from the Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* □. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 5, p. 1414–1428, 2009.

LORENZ, C.; HAUSNER, J.; BÜTTNER, D. HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e51063, jan. 2012.

LORENZ, C.; KIRCHNER, O.; EGLER, M.; STUTTMANN, J.; BONAS, U.; BÜTTNER, D. HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. **Molecular microbiology**, v. 69, n. 2, p. 344–60, 2008.

MAK, A. N.; BRADLEY, P.; CERNADAS, R. A.; BOGDANOVE, A. J.; STODDARD, B. L. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. **Science**, v. 335, n. 6069, p. 716–719, 2012.

MARGUERETTAZ, M.; PIERETTI, I.; GAYRAL, P.; PUIG, J.; BRIN, C.; COCIANCICH, S.; POUSSIER, S.; ROTT, P.; ROYER, M. Genomic and Evolutionary Features of the SPI-1 Type III Secretion System That Is Present in *Xanthomonas albilineans* but Is Not Essential for Xylem Colonization and Symptom Development of Sugarcane Leaf Scald. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 246–259, 2011.

MCCANN, H. C.; GUTTMAN, D. S. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. **The New phytologist**, v. 177, n. 1, p. 33–47, 2008.

MORITA-ISHIHARA, T.; OGAWA, M.; SAGARA, H.; YOSHIDA, M.; KATAYAMA, E.; SASAKAWA, C. Shigella Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 1, p. 599–607, 6 2006.

MUDGETT, M. B. New Insights to the Function of Phytopathogenic Bacterial Type III Effectors in Plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 56, p. 509–531, 2005.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R.
No Title. [s.l: s.n.]. Disponível em:
 <http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf>
 .

NOEL, L.; THIEME, F.; NENNSTIEL, D.; BONAS, U. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1271–1281, 2001.

PARSOT, C. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 7–14, 2003.

POSTEL, S.; KEMMERLING, B. **Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2009.

POZIDIS, C.; CHALKIADAKI, A.; GOMEZ-SERRANO, A.; STAHLBERG, H.; BROWN, I.; TAMPAKAKI, A. P.; LUSTIG, A.; SIANIDIS, G.; POLITOU, A. S.; ENGEL, A.; PANOPOULOS, N. J.; MANSFIELD, J.; PUGSLEY, A. P.; KARAMANOU, S.; ECONOMOU, A. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25816–24, 11 jul. 2003.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S.-X.; HE, Y.-Q.; FENG, J.-X.; LU, L.-F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D.-J.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B.-L.; ZENG, S.; GU, W.-Y.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G.-P.; TANG, J.-L.; HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome research**, v. 15, n. 6, p. 757–67, 2005.

RASKO, D. a.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. FeBRUARY, p. 117–128, 2010.

REMAUT, H.; WAKSMAN, G. Structural biology of bacterial pathogenesis. **Current opinion in structural biology**, v. 14, n. 2, p. 161–70, 2004.

ROINE, E.; WEI, W.; YUAN, J.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; KALKKINEN, N.; ROMANTSCHUK, M.; HE, S. Y. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3459–64, 1997.

ROSSIER, O.; ACKERVEKEN, G. Van Den; VE, S.; GENETIK, È. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 828–838, 2000.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M.-A.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344–55, 2011.

SAIER, M. H. Evolution of bacterial type III protein secretion systems. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 3, p. 113–5, 2004.

SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G.; SCARPECI, T. E.; VALLE, E. M.; CORTADI, A.; ORELLANO, E. G.; GOTTIG, N.; OTTADO, J. Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv . citri to pathogen virulence. v. 13, p. 1047–1059, 2012.

SHIOTANI, H.; FUJIKAWA, T.; ISHIHARA, H.; TSUYUMU, S.; OZAKI, K. A pthA homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri responsible for host-specific suppression of virulence. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3271–9, 2007.

SKREDENSKE, J. M.; KOPPOLU, V.; KOLIN, A.; DENG, J.; KETTLE, B.; TAYLOR, B.; EGAN, S. M. Identification of a small-molecule inhibitor of bacterial AraC family activators. **Journal of biomolecular screening**, v. 18, n. 5, p. 588–98, 2013.

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

SUGIO, A.; YANG, B.; WHITE, F. F. Characterization of the hrpF Pathogenicity Peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv . oryzae. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 6, p. 546–554, 2005.

SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. W. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 5, n. 3, p. 204–213, 1992.

SWIETNICKI, W.; CARMANY, D.; RETFORD, M.; GUELTA, M.; DORSEY, R.; BOZUE, J.; LEE, M. S.; OLSON, M. a. Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* Type III secretion system YscN ATPase. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19716, 2011.

SZUREK, B.; MAROIS, E.; BONAS, U.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 523–34, jun. 2001.

TAMPAKAKI, a P.; FADOULOGLOU, V. E.; GAZI, a D.; PANOPOULOS, N. J.; KOKKINIDIS, M. Conserved features of type III secretion. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 9, p. 805–16, 2004.

TAMPAKAKI, A. P.; SKANDALIS, N.; GAZI, A. D.; BASTAKI, M. N.; SARRIS, P. F.; CHAROVA, S. N.; KOKKINIDIS, M.; PANOPOULOS, N. J. Playing the “Harp”: evolution of our understanding of hrp/hrc genes. **Annual review of phytopathology**, v. 48, n. 73, p. 347–70, 2010.

TARDY, F.; HOMBLÉ, F.; NEYT, C.; WATTIEZ, R.; CORNELIS, G. R.; RUYSSCHAERT, J. M.; CABIAUX, V. Yersinia enterocolitica type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. **The EMBO journal**, v. 18, n. 23, p. 6793–9, 1999.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Current opinion in cell biology**, v. 12, n. 4, p. 420–30, 2000.

TROISFONTAINES, P.; CORNELIS, G. R. Type III Secretion: More Systems Than What Is Type III Secretion ?. 2005.

TSENG, T.-T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC microbiology**, v. 9 Suppl 1, p. S2, 2009.

TSUGE, S.; FURUTANI, A.; IKAWA, Y. Regulatory network of hrp gene expression in Xanthomonas oryzae pv. oryzae. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 4, p. 303–313, 5 2014.

VAN DIJK, K.; TAM, V. C.; RECORDS, A. R.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; ALFANO, J. R. The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of Pseudomonas syringae. **Molecular microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1469–81, 2002.

VAN GIJSEGEM, F.; VASSE, J.; CAMUS, J. C.; MARENDIA, M.; BOUCHER, C. Ralstonia solanacearum produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. **Molecular microbiology**, v. 36, n. 2, p. 249–60, 2000.

WANG, L.; MAKINO, S.; SUBEDEE, A.; BOGDANOVE, A. J. Novel candidate virulence factors in rice pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzicola as revealed by mutational analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 24, p. 8023–7, 2007.

WANG, X.; SONG, C.; MIAO, W.; JI, Z.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; HU, J. S.; BORTH, W.; WANG, J. Mutations in the N-terminal coding region of the harpin protein Hpa1 from Xanthomonas oryzae cause loss of hypersensitive reaction induction in tobacco. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 359–69, 2008.

WATTIAU, P.; BERNIER, B.; DESLÉE, P.; MICHELIS, T.; CORNELIS, G. R. Individual chaperones required for Yop secretion by Yersinia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10493–7, 1994.

WEBER, E.; KOEBNIK, R. Domain Structure of HrpE , the Hrp Pilus Subunit of *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 6175–6186, 2005.

WEBER, E.; OJANEN-REUHS, T.; HUGUET, E.; HAUSE, G.; ROMANTSCHUK, M.; KORHONEN, T. K.; BONAS, U.; KOEBNIK, R. The Type III-Dependent Hrp Pilus Is Required for Productive Interaction of *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria* with Pepper Host Plants. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2458–2468, 2005.

WENGELNIK, K.; ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. Hrp, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 9, n. 8, p. 704–712, 1996.

WENGELNIK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; BONAS, U.; WENGELNIK, K. A. I.; MARIE, C.; RUSSEL, M. Expression and localization of HrpA1 , a protein of *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction . These include: Expression and Localization of HrpA1 , a Protein of *Xanthomonas campestris*. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 4, p. 1061–1071, 1996.

WEN-XIANG, Z.; YANG-CHUN, H.; YI-PING, C.; MEI-QIN, Z.; YU-RONG, L.; LI-FANG, Z.; GONG-YOU, C. HrcJ is Involved in Type-III Apparatus Formation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* for Hypersensitive Response in Nonhost Tobacco and Pathogenicity in Rice. **Scientia Agricultura Sinica**, v. 1, p. 1–2, 2010.

WHITE, F. F.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; KOEBNIK, R.; WHITE, F. F. The type III effectors of *Xanthomonas*. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 6, p. 749–766, 2009.

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 291–298, 2000a.

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current opinion in plant biology**, v. 3, n. 4, p. 291–8, ago. 2000b.

YAN, Q.; WANG, N. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 1590–1599, 2011.

YAN, Q.; WANG, N. High-Throughput Screening and Analysis of Genes of *Xanthomonas citri* subsp . *citri* Involved in Citrus Canker Symptom Development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 69–84, 2012.

YANG, B.; WHITE, F. F. Diverse Members of the AvrBs3 / PthA Family of Type III Effectors Are Major Virulence Determinants in Bacterial Blight Disease of Rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 11, p. 1192–1200, 2004.

YANG, F.; KORBAN, S. S.; PUSEY, P. L.; ELOFSSON, M.; SUNDIN, G. W.; ZHAO, Y. Small-molecule inhibitors suppress the expression of both type III secretion and amylovoran biosynthesis genes in *Erwinia amylovora*. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 1, p. 44–57, 2014.

YANG, Y.; DEANW.GABRIEL. Xanthomonas avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 8, n. 4, p. 627–631, 1995.

YI, F.; REGAN, L. A Novel Class of Small Molecule Inhibitors of Hsp90. v. 3, n. 10, p. 645–654, 2008.

YIP, C. K.; STRYNADKA, N. C. J. New structural insights into the bacterial type III secretion system. **Trends in biochemical sciences**, v. 31, n. 4, p. 223–230, 2006.

YOSHIMUCHI, T.; ZHANG, Y.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; OHNISHI, K. Expression of hrpG and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 196–204, 2009.

ZHANG, J.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.; WANG, J. A conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 4, p. 605–16, jun. 2008.

ZHU, W.; YANG, B.; WILLS, N.; JOHNSON, L. B.; WHITE, F. F. The C terminus of AvrXa10 can be replaced by the transcriptional activation domain of VP16 from the herpes simplex virus. **The Plant cell**, v. 11, n. 9, p. 1665–74, set. 1999.

Capítulo 2 - Análises transcricionais *in vivo* e *in vitro* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* revelam mecanismos de adaptação e virulência durante o desenvolvimento do cancro cítrico

Resumo - O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que infecta todas as espécies de citros de importância econômica. Para compreender melhor como o patógeno consegue vencer as defesas da planta, e assim causar a doença, há a necessidade de identificar alterações transcricionais de Xac sob condições *in vivo*. No presente estudo, o transcriptoma de Xac durante o crescimento em diferentes variedades de citros foi realizado pela técnica de RNA-Seq. Para isso, a Xac foi inoculada em cinco variedades de citros com diferentes níveis de suscetibilidade ao cancro, e análises de seu perfil transcricional foram feitas durante os períodos de 48 e 72 horas após a inoculação (hai). O número de genes diferencialmente expresso (GDE) pela Xac em todas as variedades no tempo de 48 e 72 (hai), foi de 149 e 108, respectivamente. Os principais grupos de genes induzidos na Xac nos tempos de 48 e 72 hai codificam para proteínas relacionadas com o sistema de secreção tipo III (T3SS), processos metabólicos, tradução, resposta a estresse oxidativo, enzimas extracelulares e transporte de ferro e fósforo. Por outro lado, os genes reprimidos na Xac para esses mesmos tempos, apresentam relação com elementos genéticos móveis, conjugação, recombinação do DNA e fosforilação oxidativa. Também foi identificado que as principais vias metabólicas ativadas pela Xac durante o processo infeccioso estão relacionadas com o ciclo do ácido cítrico, a gliconeogênese e a degradação da pectina. Os GDE identificados na Xac em condições *in vivo* apresentaram um perfil de expressão diferente do encontrado em meios de cultura indutores de patogenicidade. Essas comparações permitiram estabelecer que o fósforo inorgânico (Pi) e o nitrogênio (fontes orgânicas), estão relacionados com a ativação do T3SS, mas não o citrato ou o ferro. Esses dados foram comprovados por qRT-PCR e sugerem que a Xac reconhece sinais nutricionais específicas (fonte de P e N) do ambiente para ativar o T3SS, que é o principal fator de virulência induzido pela bactéria em condições *in vivo*. Este estudo fornece informação sobre as características do ambiente intracelular que a Xac percebe, assim como, as estratégias usadas pela bactéria para se desenvolver e promover a doença.

Palavras-chave: Genes diferencialmente expressos, interação planta - patógeno, RNA-Seq, transcriptoma

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma doença que ataca uma ampla gama de espécies comerciais de citros e tem causado perdas significativas nos países produtores (GRAHAM et al., 2004). Embora responsáveis por grandes prejuízos na citricultura mundial, ainda não há medidas de controle eficientes contra o cancro cítrico. As tentativas de controle baseiam-se na erradicação e principalmente na pulverização cúprica de áreas afetadas (GOTTWALD et al., 2001; GOTTWALD; PIERCE; GRAHAM, 2002), o que leva ao surgimento de isolados bacterianos resistentes (ALVA, 1993; COOKSEY, 1994; BEHLAU et al., 2010). Neste sentido, uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados pela Xac durante o processo infeccioso poderia ajudar a desenvolver estratégias para combater este patógeno. Com a disponibilidade da sequência do genoma de Xac (DA SILVA et al., 2002), estudos de genômica funcional têm permitido a identificação de genes relacionadas com a virulência e patogenicidade desta bactéria. Alguns dos principais fatores de virulência e patogenicidade em Xac incluem o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), Sistema de Secreção Tipo II (T2SS), formação de biofilme e goma xantana, *quorum-sensing* (QS), sistemas reguladores de dois componentes (TCS) e transportadores dependentes de tonB (LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2011, 2012). No entanto, ainda é pouco conhecido o padrão de expressão destes fatores de virulência na Xac durante a interação com plantas cítricas.

Alguns métodos têm sido utilizados para identificar genes diferencialmente expressos em diferentes fitopatógenos durante sua interação com a planta, por exemplo, a tecnologia de expressão *in vivo* (*In vivo* expression. technology -IVET) e a modificação desta técnica, denominada RIVET (recombinase-based *in vivo* expression technology). Essas técnicas foram utilizadas em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) para identificar genes diferencialmente expressos durante sua interação com plantas de brócolis e tomate, respectivamente (OSBOURN; BARBER; DANIELS, 1987; TAMIR-ARIEL; NAVON; BURDMAN, 2007). A IVET é uma outra de suas variantes, denominada HIRS (habitat-inducible rescue of survival - HIRS), também

tem sido empregada para avaliar a expressão das bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *P. syringae* pv. *syringae* inoculadas em plantas de *Arabidopsis thaliana* e folhas de feijoeiro, respectivamente (BOCH et al., 2002; MARCO; LEGAC; LINDOW, 2005). Outras bactérias fitopatógenas estudadas *in vivo* através da metodologia IVET são *Erwinia amylovora* (ZHAO; BLUMER; SUNDIN, 2005) e *Ralstonia solanacearum* (BROWN; ALLEN, 2004). Embora estes métodos tenham fornecido uma visão geral sobre as mudanças na expressão dos genes das bactérias interagindo com as plantas, ainda a informação é incompleta, pois estas metodologias identificam apenas os genes que apresentam aumento na expressão (induzidos) e não aqueles reprimidos. Recentemente, o uso dos microarranjos permitiu estudar os padrões de expressão gênica de *X. oryzae* pv. *oryzae* (SOTO-SUÁREZ et al., 2010), *P. s. pv. syringae* (YU et al., 2013) e *R. solanacearum* (JACOBS et al., 2012) em plantas, permitindo a identificação de genes induzidos e reprimidos. Entretanto, esta técnica apresenta outras desvantagens como, a falta de sensibilidade com os transcritos de baixa abundância, e a necessidade de se conhecer previamente a sequência genômica do patógeno em estudo (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Com os avanços técnicos em transcriptoma surgiu a tecnologia do RNA-Seq, que, é uma ferramenta poderosa para o estudo da expressão gênica, sendo capaz de revelar transcritos raros e até mesmo transcritos ainda não identificados em banco de dados, proporcionando assim um quadro mais preciso e acurado do transcriptoma (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Muitos dos estudos de RNA-Seq existentes na atualidade em bactérias fitopatogênicas têm sido realizados a partir do cultivo em meios de cultura. Neste sentido, alguns estudos envolvendo membros do gênero *Xanthomonas* foram realizados, como por exemplo nas bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 e AW12879 (JALAN et al., 2013), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (LIU et al., 2013) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (KIM et al., 2016). No entanto, poucos trabalhos têm sido realizados a partir da obtenção direta do transcriptoma do fitopatógeno a partir dos tecidos da planta infectada. Isso, está relacionado principalmente com as dificuldades encontradas na separação dos RNAs da bactéria, devido a baixa abundância destes em relação com os da planta hospedeira

(SKVORTSOV; AZHIKINA, 2010). Recentemente, estudos de RNA-Seq realizados na bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) infectando tecidos folhares de soja, demonstraram uma alta expressão de genes relacionadas com o T3SS, efetores do T3SS, enzimas degradadoras de parede celular, consumo de malonato, transporte de fósforo e bombas de efluxo (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). Por outro lado, estudos realizados com a bactéria *Burkholderia glumae*, o agente causal da podridão do grão e da raiz do arroz, apresentaram uma alta expressão de genes envolvidos na motilidade mediada por quimiotaxia, metabolismo do ascorbato, metabolismo da trealose e transportadores de açúcar como a L-arabinose e D-xilose (KIM et al., 2014). Estes dados permitem compreender melhor o ambiente intercelular dos fitopatógenos e os mecanismos utilizados por estes para dar início à doença.

Assim, a identificação de genes responsáveis pelo desenvolvimento do cancro cítrico é um dos passos essenciais para o entendimento dos mecanismos moleculares que a *Xac* utiliza para vencer as barreiras de defesa dos diferentes hospedeiros cítricos que ela infecta. Nesse estudo, analisou-se o transcriptoma de *Xac* através de uma cinética de infecção em hospedeiros citros com diferentes níveis de susceptibilidade ao cancro cítrico. Esta informação pode revelar novos alvos moleculares, para futuras pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de estratégias de controle da doença.

2. METODOLOGIA

2.1.1. Estirpe bacteriana e meios de cultura

A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*), isolado 306, foi cultivada nos meios, **caldo nutriente** (Difco™ **NB**—5 g/L peptona e 3 g/L extrato de carne), **ágar nutriente** (Difco™ **NA**—5 g/L peptona, 3 g/L extrato de carne e 15g/L de agar), **XVM2** (20 mM NaCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 0,16 mM KH₂PO₄, 0,32 mM K₂HPO₄, 0,01 mM FeSO₄, 10 mM frutose, 10 mM sacarose, 0,03% casamino ácidos pH 6.7) e **XAM1** (7.4 mM (NH₄)₂SO₄, 33 mM KH₂PO₄, 60 mM, K₂HPO₄, 1,6 mM citrato de

sódio, 10 mM frutose, 10 mM sacarose, 0.03% casamino ácidos, 1 mg/mL de albumina, pH 5.4). Quando necessário, o meio **XVM2** foi ajustado para as concentrações de fósforo inorgânico a 93 mM (33 mM KH_2PO_4 + 60 mM K_2HPO_4), citrato de sódio 1,6 mM ou albumina 1 mg/mL.

2.1.2 Inoculação de *Xac* em folhas de citros e exsudação

Xac foi inoculada pelo método de infiltração por pressão, com o uso de uma seringa hipodérmica sem agulha em folhas jovens de citros numa concentração de 10^8 UFC/mL ($\text{OD}_{600} = 0,3$). As variedades de citros utilizadas neste estudo e suas características estão descritas na tabela 1. Três plantas de cada variedade foram inoculadas e mantidas em casa de vegetação em condições de temperatura (28°C) e fotoperíodo controladas (períodos de luz / escuridão de 12 horas). As folhas foram coletadas nos tempos de 48 e 72 hai após a inoculação (hai) e foi realizado um pool de cada tempo a partir das réplicas biológicas. A recuperação das células bacterianas de *Xac* do tecido folhar foi feita por exsudação. Para isso, as folhas foram cortadas em pedaços pequenos com bisturi estéril e imersas em água gelada (4°C), seguido de agitação por 30 minutos. Os restos foliares foram separados por filtração com gaze e as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min. O RNA total foi extraído imediatamente, como descrito em seguida.

Tabela 1. Variedades de citros utilizados neste estudo.

Nível de resistência	Genótipo de citros	Espécie
Altamente resistente	'Kumquat'	<i>Fortunella spp</i>
Resistente	Tangerina 'Ponkan'	<i>Citrus reticulata</i>
Moderadamente resistente	Laranja doce 'Pera Rio'	<i>Citrus sinensis</i>
Suscetível	Laranja doce 'Hamlin'	<i>Citrus sinensis</i>
Altamente suscetível	Lima ácida 'Galego'	<i>Citrus aurantifolia</i>

2.2.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total de “pellets” bacterianos exsudados de folhas de citros e das bactérias cultivadas nos meios de cultura XAM1, XVM2 e NB foi extraído utilizando o “kit RNeasy Protect Bacteria Mini” (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) e o kit Qubit® RNA BR Assay (Invitrogen) e, a ausência de DNA nas amostras foi verificada através do kit Qubit® DNA HS Assay (Invitrogen). A integridade do RNA total nas amostras foi avaliada através do Bioanalyzer 2100 (Agilent) e o kit RNA 6000 Nano LabChip. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando 1 ug de RNA total e o RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segundo instruções do fabricante.

2.2.4 RNA seq de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

As bibliotecas para o sequenciamento dos mRNAs de *Xac* selvagem em condições *in vivo* e *in vitro* foram obtidas com o kit TruSeq RNA Sample Preparation v2

(Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O mRNA foi fragmentado, seguido da síntese da primeira e segunda fita de cDNA, reparo das extremidades e ligação dos adaptadores. Em seguida foi realizada a etapa de clusterização utilizando o Kit *TruSeq™ SR Cluster Kit v3* (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) e o aparelho cBot (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA). Após o processo de clusterização, os “clusters” presentes na “flow cell” foram sequenciados na Facility de sequenciamento da FCAV/UNESP utilizando a plataforma HiScanSQ System Illumina, seguindo as instruções do fabricante para sequenciamento de fragmentos do tipo *single end* de 50 pb em cada extremidade. No caso da *Xac* cultivada em meio de cultura XVM2 (indutor de genes de patogenicidade) os dados de sequenciamento foram obtidos na base de dados de Gene Expression Omnibus do NCBI (número de acesso GSE41519) (JALAN et al., 2013).

2.2.5 Análise da expressão de genes

Após o sequenciamento (single-end) de cada amostra (*in vivo* e *in vitro*) as leituras foram submetidas a uma etapa de pré-processamento, onde as sequências remanescentes de moléculas adaptadoras foram removidas, e as bases das leituras que foram reconhecidas com baixa qualidade foram descartadas. Os programas Scythe v.0.991 (<https://github.com/ucdavis-bioinformatics/scythe>) e CutAdapt v.1.4.1 (cutadapt-1.4.1-goof-1.4.10-Python-2.7.5.eb) foram aplicados na identificação e remoção de resquícios de moléculas adaptadoras (mínimo de 5 pb de correspondência com até 1% de erro) e o programa PrinSeq v.0.20.3 (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) foi aplicado na identificação e remoção de bases de baixa qualidade (< Q25). Por fim, as leituras sem o tamanho mínimo de 15 pb ou com mais de 80% de bases não reconhecidas (Ns) foram filtradas com o programa PrinSeq. As leituras de alta qualidade foram mapeadas sobre o genoma de *Xac* utilizando Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) por meio da ferramenta EDGE-Pro v.1.3.1 (MAGOC; WOOD; SALZBERG, 2013) sem alteração nos parâmetros originais. O programa EDGE-Pro fornece as contagens normalizadas

em RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) para cada gene. Os cálculos de variação da expressão gênica nas diferentes condições experimentais foram realizados com o pacote R DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

2.2.6 Validação da expressão de genes por qRT-PCR

A validação do RNA-seq e a quantificação da expressão relativa dos genes nas diferentes condições (*in vivo* e *in vitro*) foram realizadas por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) usando o kit Master Mix SYBR green (Applied Biosystems) e seguindo as especificações do fabricante. As reações foram feitas no aparelho 7500 Software V.2.0.6. (Applied Biosystems) e os dados obtidos foram analisados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram analisadas três réplicas biológicas para as condições *in vitro* e um *pool* (proveniente de três réplicas biológicas) para a condição *in vivo*. Os genes *atpD*, *gyrB* e *rpoB* foram utilizados como endógenos (JACOB et al., 2014). Todos os iniciadores usados neste estudo estão listados na tabela 2.

Tabela 2 . Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo

ID Gene	Iniciadores	Sequência 5' - 3'
XAC3649	atpD_F	CGGCGCACCGTCGTAT
	atpD_R	CCGGTTTCCAGCAATTTCG
XAC0004	gyrB_F	CGTCCCGGCATGTATTTCG
	gyrB_R	ACCACCTCGAACACATGTGA
XAC0965	rpoB_F	GGATTCCTATCGCGAATTCCT
	rpoB_R	TGTAGCTGGAAATCGGGAACA
XAC1266	hrpX_F	GCCTACAGCTACATGATCACCAAT
	hrpX_R	TGCGGCCCACTTCGTTGA
XAC0416	hrpA1_F	GCAGCAGGCCCGGTCAGT
	hrpA1_R	TTCATCAGCATCTGGGTGTATTG
XAC0398	hrpD6_F	ACCGATACGGTCACCCAAGA
	hrpD6_R	GATCCGCCCGCCTTGGT
XAC0435	virK_F	ATGCCACGTCTTGTTTCCTG
	virK_R	GTGCTCACACTGACATCG
XAC1211	katE_F	AGCTTCCGTTTCCTCAATGA
	katE_R	GACGCCAATGGAATTTGAC
XAC2336	cydA_F	TGGCGATCGAGGGACTGA
	cydA_R	GCGATTCCAGCCAAGAAAGA
XAC2337	cydB_F	GTTGTTTCGTCGGCGGTTT
	cydB_R	GTGTAGAACGTGCGCATGCT

3. RESULTADOS

3.1 Transcriptoma global e temporal de *Xac* *in vivo* direcionam a identificação de GDE envolvidos no desenvolvimento do cancro citrico

A comparação do transcriptoma de *Xac* em genótipos de citrus com diferentes níveis de susceptibilidade ao cancro cítrico, pode auxiliar numa identificação mais precisa dos genes relacionados com os mecanismos de patogenicidade da bactéria e no desenvolvimento da doença. Além disso, o estudo transcricional de *Xac* durante o processo infeccioso (análises temporais), pode fornecer informação sobre os mecanismos de adaptação e ativação dos principais fatores de virulência utilizados pela bactéria. Assim, este tipo de conhecimento é de suma importância para a tomada

de decisão em utilizar tais genes como possíveis alvos de controle. Neste estudo foram utilizadas cinco variedades de citros com níveis diferentes de suscetibilidade ao cancro cítrico (Tabela1). A identificação de GDE na *Xac* durante a sua interação com as plantas foi realizada pela metodologia de RNA-seq. As folhas de citros inoculadas com *Xac* estirpe 306 foram coletadas 48 e 72 hai e, posteriormente, foi feito um *pool* a partir de 3 réplicas biológicas para cada um dos tempos utilizados. Como controle foi utilizado o transcriptoma de *Xac* crescida em meio nutritivo NA (Nutriente Agar). Os resultados da quantidade de leituras (Reads) para cada uma das bibliotecas sequenciadas, assim como, a quantidade de leituras alinhadas contra o genoma de referencia de *Xac* 306 estão apresentados na tabela 3. Como critério para a seleção de genes diferencialmente expressos (GDEs) na *Xac* foi considerado um valor de alteração absoluta (Fold-change) de duas vezes (>2 ou $< 0,5$) e um valor $< 0,001$ de FDR (*False Discovery Rate*). O número de genes induzidos (Fold-change >2) e reprimidos (Fold-change $> 0,5$) pela *Xac* em cada uma das variedades de citros analisadas foi determinado para os tempos de 48 e 72 hai (Figura 1A e1B). Pode-se observar também, que o número de genes induzidos na *Xac* que são comuns para todas as variedades de citros, corresponde a 133 e 78 genes para os tempos de 48 e 72 hai, respectivamente (Figura 1A).

Tabela 3. Reads brutos e mapeados contra o genoma de referência

<i>Xac</i> / *Tratamentos	Reads brutos	Reads alinhados	Reads alinhados unicamente	Reads Multialinhadas
<i>Xac</i> / AN (Controle)	17804274	17016789	4992002	12024787
<i>Xac</i> / LG 48 h	19473518	18656370	16683555	1972815
<i>Xac</i> / LG 72 h	14916362	14312618	14263706	48912
<i>Xac</i> / H 48 h	18849442	18168351	18067247	101104
<i>Xac</i> / H 72 h	20022830	18995605	18915011	80594
<i>Xac</i> / PR 48 h	16184319	19314088	19282121	31967
<i>Xac</i> / PR 72 h	14443283	15550808	15517214	33594
<i>Xac</i> / P 48 h	18691816	18021427	17973952	47475
<i>Xac</i> / P72 h	13391897	12897326	12500028	397298
<i>Xac</i> / K 48 h	17787721	16883891	16827414	56477
<i>Xac</i> / K 72 h	15806103	14848702	14781181	67521

*AN= Agar nutriente, LG= lima ácida Galego, H= Hamlin, PR= Pera Rio, P= Ponkan, K= Kunqua

Por outro lado, o número de genes reprimidos comuns para todas as variedades estudadas corresponde a 16 e 30 genes, para os tempos de 48 e 72 hai, respectivamente (Figura 1B). É possível observar a partir destas análises que genes induzidos e reprimidos na *Xac* são compartilhados nos dois tempos avaliados (Figura 1C). Os dados aqui apresentados também sugere uma maior dinâmica na regulação genética da *Xac* inoculada nas variedades consideradas mais tolerantes (Ponkan e Kunquat), pois apresentam um maior número de genes induzidos e reprimidos nos diferentes tempos analisados (Figura 1A e 1B). Este aumento no número de GDEs pela *Xac* nestas variedades pode estar relacionado com os mecanismos que a bactéria utiliza para poder sobrepor as barreiras de defesa oferecidas por estes hospedeiros mais tolerantes. No entanto, o grupo de GDE pela *Xac*, objeto de nosso estudo, foi direcionado para os genes que foram comuns para todas as variedades de citros (Figura 1C).

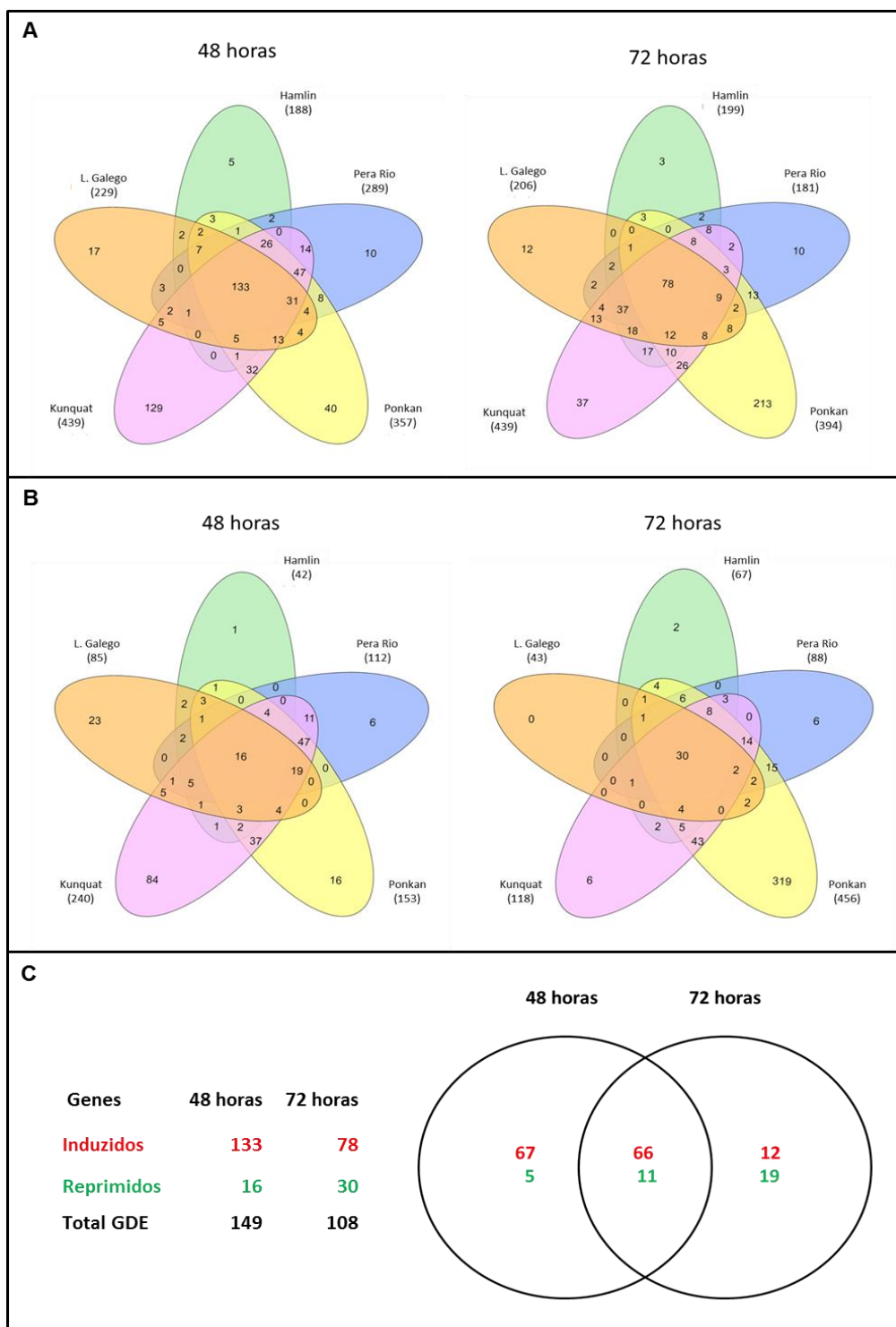


Figura 1. Diagramas de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos (GDE) em *Xac* inoculada nas diferentes variedades de citros. (A) Genes induzidos na *Xac* nos tempos de 48 e 72 horas após a inoculação em cada um das variedades. (B) Genes reprimidos na *Xac* nos tempos de 48 e 72 horas após a

inoculação em cada um das variedades. (C) Genes induzidos e reprimidos que foram expressos em comum pela Xac para todas as variedades nos tempos de 48 e 72 horas. Entre parêntesis se apresenta o número total de genes (induzido ou reprimido) identificado para cada variedade de citros.

3.2 GDE em Xac revelam indícios sobre sua adaptação ao apoplasto de citros e seus principais fatores de virulência

Para uma melhor compreensão dos processos adaptativos da Xac ao ambiente intracelular dos diferentes hospedeiros, foi realizada a identificação dos GDE que foram comuns nos períodos de 48 e 72 hai. Assim, foi realizada a anotação dos 149 GDE (133 induzidos e 16 reprimidos) identificados nos tempos de 48 hai, e os 108 GDE (78 induzidos e 30 reprimidos) para o tempo de 72 hai (Figura 1C). O maior número de genes induzidos em Xac nos tempos de 48 e 72 hai correspondem principalmente a genes relacionados com o T3SS, processos metabólicos, tradução, estresse oxidativo, enzimas extracelulares, proteínas de transporte de ferro e fósforo (Figura 2A). Além disso, outros genes relacionados com reguladores transcricionais, proteólises, fosforilação oxidativa e adesão também foram identificados (Figura 2A).

Por outro lado, foi possível identificar genes reprimidos para os tempos de 48 e 72 hai relacionados principalmente com elementos genéticos móveis, conjugação, recombinação do DNA e fosforilação oxidativa entre outros (Figura 2B). Também foi observado que os genes considerados hipotéticos representam a maior parte dos GDE, tanto induzidos como reprimidos (figura 2A e 2B). Uma descrição completa dos GDE identificados para cada uma destas categorias pode ser observada nas tabelas suplementares S1 e S2. É interessante observar que a categoria de genes relacionados aos processos metabólicos foi a que apresentou uma maior variação em função do tempo para os genes induzidos (além das proteínas hipotéticas). Nesta categoria, 23 genes induzidos foram identificados no tempo de 48 hai e apenas 10 genes no período de 72 hai (Figura 2A). Para identificar os processos metabólicos associados a este grupo de genes foi realizada uma análise de enriquecimento de vias utilizando o programa KOBAS (XIE et al., 2011).

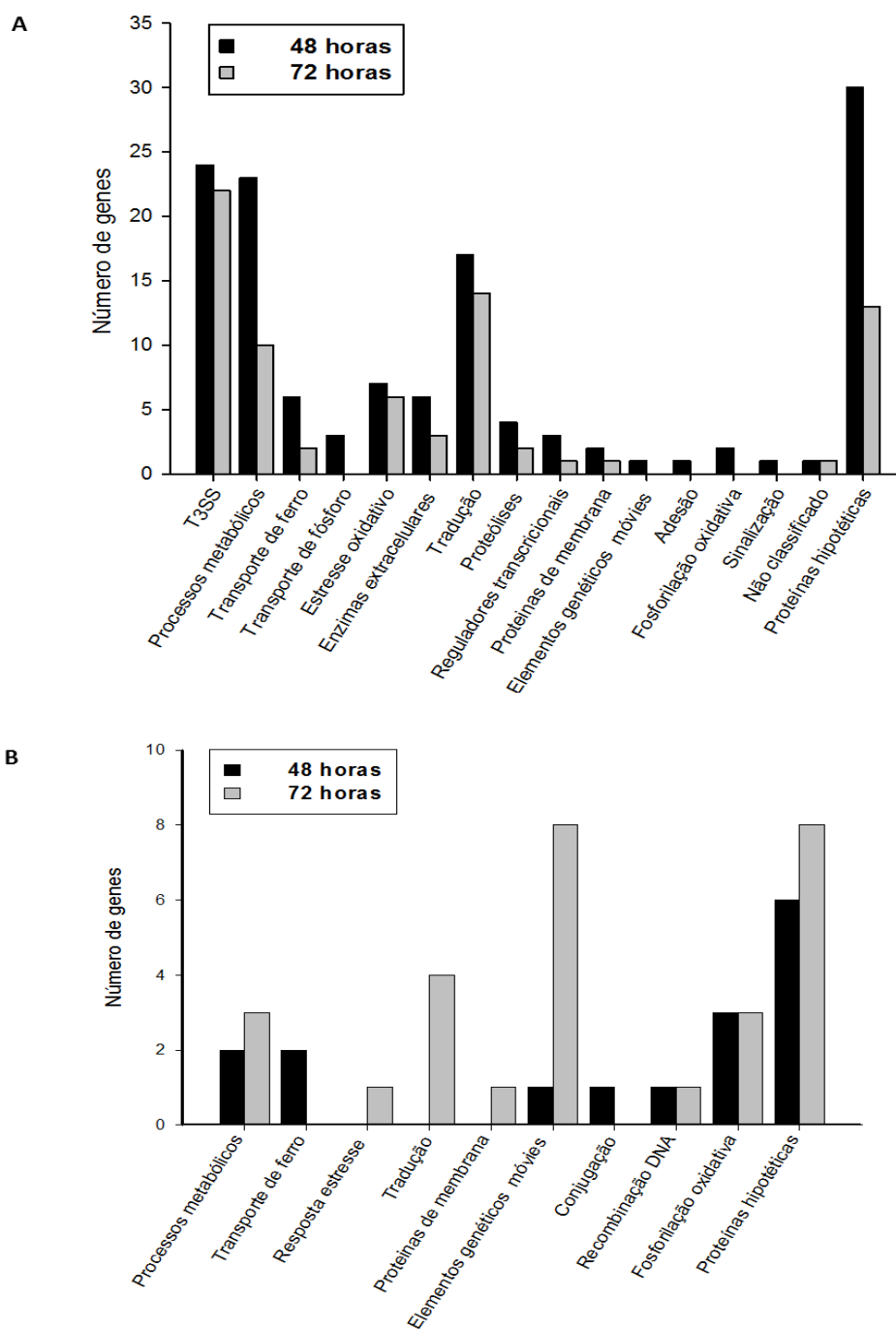


Figura 2. Categorização dos GDE identificados em Xac que foram comuns para todas as variedades de citros nos tempos de 48 e 72 horas após a inoculação. (A) Genes induzidos. (B) Genes reprimidos. Os genes foram categorizados de acordo com a função biológica na qual participam.

As principais vias metabólicas ativadas pela *Xac* no tempo de 48 hai envolvem principalmente metabólitos do ciclo do ácido cítrico, piruvato, propanoato, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos (Tabela 4). Também foi possível evidenciar processos de biossínteses de ácidos graxos e alguns aminoácidos (Tabela 4). Por outro lado, as vias metabólicas enriquecidas para o tempo de 72 hai foram mais restritas, envolvendo principalmente fontes de carbono relacionadas com a degradação da pectina, ciclo do ácido cítrico, amido e sacarose, além de ácidos orgânicos e aminoácidos (Tabela 4). Estes dados sugerem que *Xac* aproveita inicialmente as fontes de carbono mais simples disponíveis no apoplasto, como ácidos orgânicos (provavelmente ácido cítrico e malato), açúcares e aminoácidos. Posteriormente, quando estas fontes de carbono começam diminuir, a *Xac* busca aproveitar fontes de carbono mais complexas como os polissacarídeos (pectina, celulase) e proteínas que são os principais constituintes da parede celular das células vegetais. Desta forma, é possível evidenciar uma adaptação temporal da *Xac* a nível nutricional uma vez que consegue colonizar o apoplasto das folhas de citros. Neste aspecto, a expressão induzida de genes relacionados com o transporte de ferro e fósforo, sugere uma baixa disponibilidade destes íons no apoplasto das folhas de citros (Figura 2A). Este tipo de ambiente caracterizado pela ampla disponibilidade de fontes de carbono e baixa concentração de íons, poderia estar relacionada com a indução de genes de virulência na *Xac*, como o T3SS e o sistema de secreção tipo II (T2SS), cuja função é a secreção de efetores e enzimas extracelulares hidrolíticas (celulases, proteases, pectinases), respectivamente. Tem sido identificado que a expressão de genes do T3SS e enzimas extracelulares secretadas pelo T2SS são reguladas pela proteína HrpX (GUO et al., 2011), cujos genes foram identificados neste estudo em todas as variedades e tempos analisados (Ver Tabela S1).

Tabela 4. Vias enriquecidas identificadas nos processos metabólicos de Xac

Tempo	Vías metabólicas	ID KEGG	Genes identificados	Genes da Via	P-Value corregido
48 hai	Ciclo do ácido cítrico	xac00020	6	24	0.0025475
	Metabolismo de carbono	xac01200	11	95	0.0025475
	Metabolismo do piruvato	xac00620	6	33	0.00660342
	Metabolismo propanoato	xac00640	4	17	0.01759374
	Glicólise / gluconeogénese	xac00010	4	34	0.11905589
	Metabolismo de ácidos dibásico de 5C	xac00660	2	8	0.11905588
	Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	xac00630	3	31	0.21284809
	interconversões glucuronato e Pentoses	xac00040	2	21	0.30702653
	Biossíntese de arginina	xac00220	1	15	0.75077390
	Metabolismo amido e da sacarose	xac00500	2	48	0.76085554
	Degradação da valina, leucina e isoleucina	xac00280	1	21	0.76085554
	Biossíntese do ácido graxo	xac00061	1	22	0.76085554
	frutose e manose metabolismo	xac00051	1	24	0.76085554
	Metabolismo butanoato	xac00650	1	25	0.76085554
	Metabolismo de ácidos graxos	xac01212	1	30	0.76085554
	Metabolismo glicina, serina e treonina	xac00260	1	33	0.76085554
	Met. de amino açúcar e de nucleotíde	xac00520	1	33	0.76085554
	Metabolismo da cisteína e metionina	xac00270	1	34	0.76085554
	Biossíntese de aminoácidos	xac01230	2	110	0.85043178
	Metabolismo das purinas	xac00230	1	65	0.85043178
72 hai	Interconversões glucuronato e Pentoses	xac00040	2	21	0.090323148
	Ciclo do ácido cítrico	xac00020	2	24	0.090323148
	Metabolismo amido e da sacarose	xac00500	2	48	0.20571656
	Metabolismo de ácidos dibásico de 5C	xac00660	1	8	0.20757341
	Metabolismo propanoato	xac00640	1	17	0.27709898
	Metabolismo de carbono	xac01200	2	95	0.27709898
	Glioxilato e metabolismo dicarboxilato	xac00630	1	31	0.29722141
	Metabolismo do piruvato	xac00620	1	33	0.29722141
	Metabolismo da cisteína e metionina	xac00270	1	34	0.29722141

O principal fator de virulência expresso pela *Xac* durante os tempos de 48 e 72 hai nas diferentes variedades de citros, foi o T3SS, e tanto genes estruturais quanto efetores foram identificados (Ver Tabela S1). A expressão de genes relacionada com resposta ao estresse oxidativo na *Xac*, sugere um alto conteúdo de H_2O_2 no apoplasto das células hospedeiras, originado provavelmente pelo sistema gerador de ROS (*Reactive Oxygen Species*) das plantas para se defenderem do ataque bacteriano. O gene *oxyR*, um dos principais genes que está envolvido no metabolismo e proteção contra peróxidos foi identificado neste estudo. Este gene codifica para uma proteína reguladora sensível ao H_2O_2 que esta envolvida na regulação de genes de resposta ao estresse oxidativo como *katG*, *ahpC* e *ahpF*, todos estes, também identificados como genes induzidos neste estudo (Tabela S1) (DUBBS; MONGKOLSUK, 2012).

Outro aspecto interessante, foi a repressão de genes envolvidos em processos de transferência horizontal de genes (elementos genéticos móveis e conjugação) e recombinação do DNA (figura 2B). Isso pode sugerir que o apoplasto de citros não é apropriado para a geração de diversidade genética em *Xac*, e sim, um ambiente com pressão seletiva. Neste aspecto, os ambientes nutricionalmente ricos favoreceriam o processo de heterogeneidade bacteriana.

Todos estes dados sugerem um complexo processo adaptativo da *Xac* ao ambiente intracelular das células hospedeiras, caracterizado principalmente pelas diversas fontes de carbono, baixa disponibilidade de íons (especialmente P, Fe^{+3}) e a forte resposta da planta através de processos de defesa que envolve espécies reativas de oxigênio.

3.3. Aspectos nutricionais e fisiológicos relacionados com a virulência e patogênese de *Xac* são identificados a partir dos GDE *in vivo* e *in vitro*

Ainda tem sido pouco explorado os fatores nutricionais e fisiológicos que determinam a expressão de genes de virulência e patogenicidade em *Xac* durante a doença. Neste sentido, os grupos de GDE identificados na *Xac* em condições

infectantes (*in vivo*) foram comparados com os transcriptomas de *Xac* inoculada em meios mínimos de composição conhecida. Os meios utilizados foram o XVM2 e XAM1, os quais induzem a expressão de genes de virulência e patogenicidade em *Xac*, mas apresentam componentes nutricionais diferentes (ver composição em materiais e métodos). O transcriptoma de *Xac* inoculada em meio XAM1 foi realizado como descrito em materiais e métodos. No caso de *Xac* inoculada em meio XVM2 os dados do transcriptoma foram obtidos na base de dados de Gene Expression Omnibus do NCBI (número de acesso GSE41519) (JALAN et al., 2013).

Os principais grupos de genes induzidos e reprimidos identificados na *Xac* em condições infectantes (ver figura 2), também foi determinada nas condições *in vitro*. Pode-se observar que o perfil de expressão deste grupo de genes na *Xac*, apresentou pouca variação nas condições *in vivo*, tanto entre variedades quanto nos tempos de avaliação (48 ou 72 hai) (Figura 3). Devido à semelhança no perfil transcricional apresentado pelas plantas para estes grupos de GDE, foi realizada uma validação por qRT-PCR utilizando só as variedades lima ácida ‘Galego’ (Altamente suscetível) e laranja doce ‘Pêra Rio’ (Moderadamente resistente) para os dois tempos utilizados (Figura 1S). Entretanto, o perfil transcricional da *Xac* cultivada nos meios XAM1 e XVM2 para este mesmo grupo de genes foi diferente, tanto entre estes meios, quanto ao apresentado nas plantas (Figura 3).

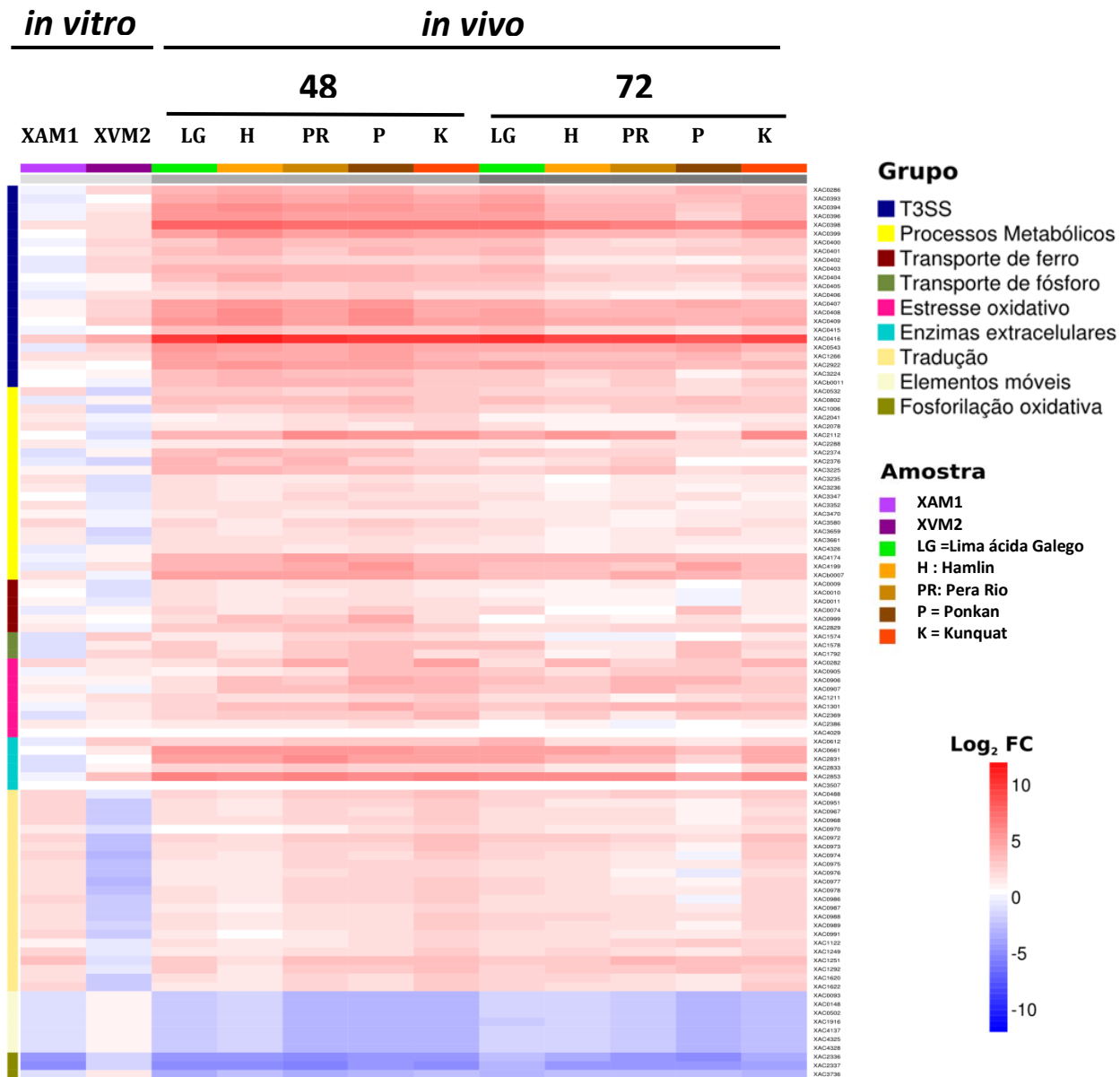


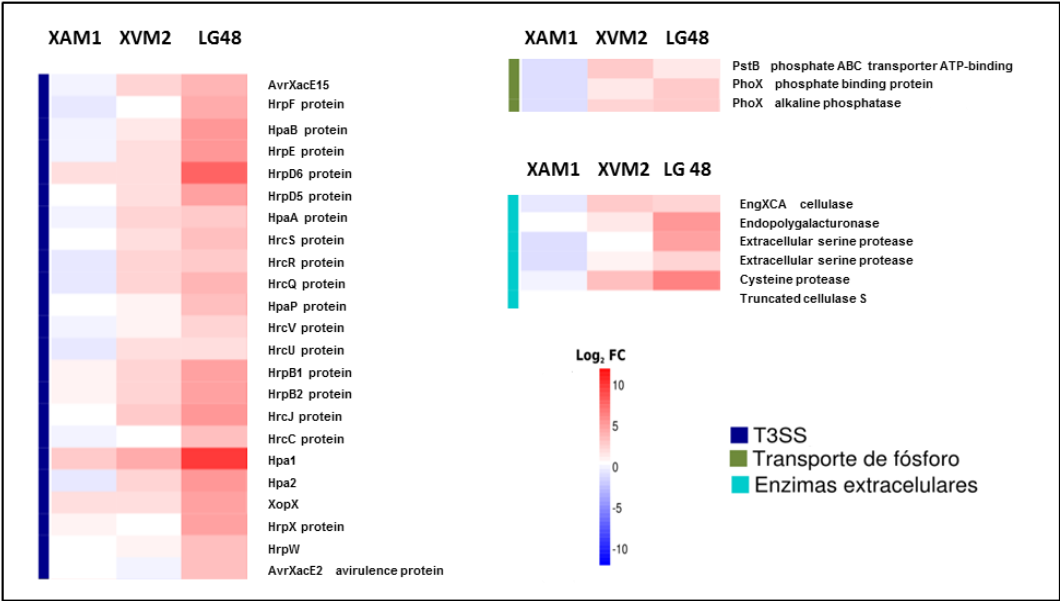
Figura 3. Comparação dos principais grupos de GDE identificados em *Xac* em condições *in vivo* com relação a sua expressão *in vitro*. No heatmap cada linha horizontal representa um único gene e a cor indica o nível de expressão relativa de cada condição avaliada (colunas). Altos níveis de expressão são representados em vermelho e baixos níveis de expressão são representados em azul. A escala de cor dos níveis de expressão genética está representada como o log₂ Foldchange. Os grupos de GDE identificados em *Xac* estão representados em barras de diferentes cores. As variedades de citros estão organizadas da mais suscetível (esquerda) à mais resistente (direita) em cada um dos tempos analisados.

É interessante observar, que a maioria dos genes relacionados com T3SS, proteínas extracelulares (T2SS) e transportadores de fósforo, foram reprimidos na *Xac* cultivada no meio XAM1, perfis estes que contrastam com os apresentados no meio XVM2 e nas condições *in vivo*, onde foram induzidos (figura 4A). Baseados neste perfil transcricional, estes dados sugerem uma possível participação do fósforo inorgânico (Pi) na indução e /ou repressão dos genes do T3SS e nas enzimas extracelulares de *Xac*.

De forma similar, genes relacionados com os processos metabólicos, tradução e transporte de ferro foram reprimidos na *Xac* cultivada no meio XVM2, e induzidos no meio XAM1 e plantas (figura 4B). Estes resultados sugerem a presença de fontes de carbono e ferro no meio XVM2, diferentes das encontradas no meio XAM1 e nas plantas. Assim, estes dados mostram que estas fontes de nutrientes (carbono e ferro) poderiam estar influenciando a expressão de genes do metabolismo e processos de tradução na *Xac*, mas provavelmente não sua virulência e patogenicidade. Por outro lado, o grupo de genes relacionados com elementos genéticos móveis e fosforilação oxidativa (genes reprimidos) não apresentaram perfis de expressão contrastantes em nenhuma das condições avaliadas (Figura 3).

Finalmente, os genes relacionados com resposta ao estresse oxidativo na *Xac* não apresentaram um perfil de expressão contrastante entre as condições *in vivo* e *in vitro* que foram avaliadas. No entanto, foi possível observar um aumento na expressão destes genes no período de 48 hai, proporcional à tolerância das espécies de citros avaliadas (figura 5). Estes dados sugerem provavelmente uma resposta de defesa mediada por ROS muito mais ativa em plantas tolerantes que em plantas mais suscetíveis ao cancro.

A



B

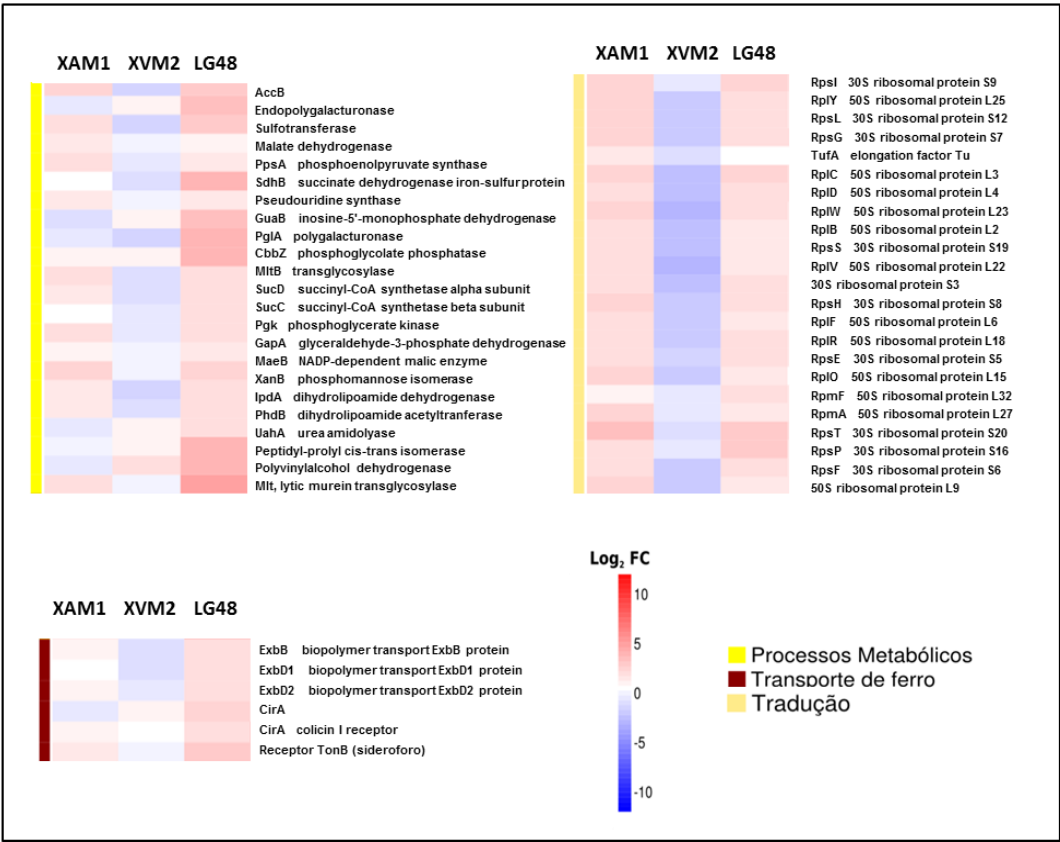


Figura 4. Grupos de GDE identificados *in vivo* com padrões de expressão similares aos presentes *in vitro*. (A) Perfil de expressão de GDE em *Xac* cultivada em meio XVM2, com padrão similar ao observado *in vivo*. Os grupos de genes correspondem ao T3SS, transporte de fósforo e enzimas extracelulares. (B) Perfil de expressão de GDE em *Xac* cultivada em meio XAM1, com padrão similar ao observado *in vivo*. Os grupos de genes correspondem a processos metabolicos, transporte de ferro e tradução. No heatmap cada linha horizontal representa um único gene e a cor indica o nível de expressão relativa de cada condição avaliada (colunas). Altos níveis de expressão são representados em vermelho e baixos níveis de expressão são representados em azul. A escala de cor dos níveis de expressão genética está representada como o log2 Foldchange. Neste gráfico, a condição *in vivo* só é representada pelos GDE de *Xac* inoculada na variedade lima ácida galego (LG) no período de 48 horas após inoculação. Cabe dizer que, qualquer uma das condições *in vivo* apresenta um perfil de expressão semelhante para realizar esta comparação.

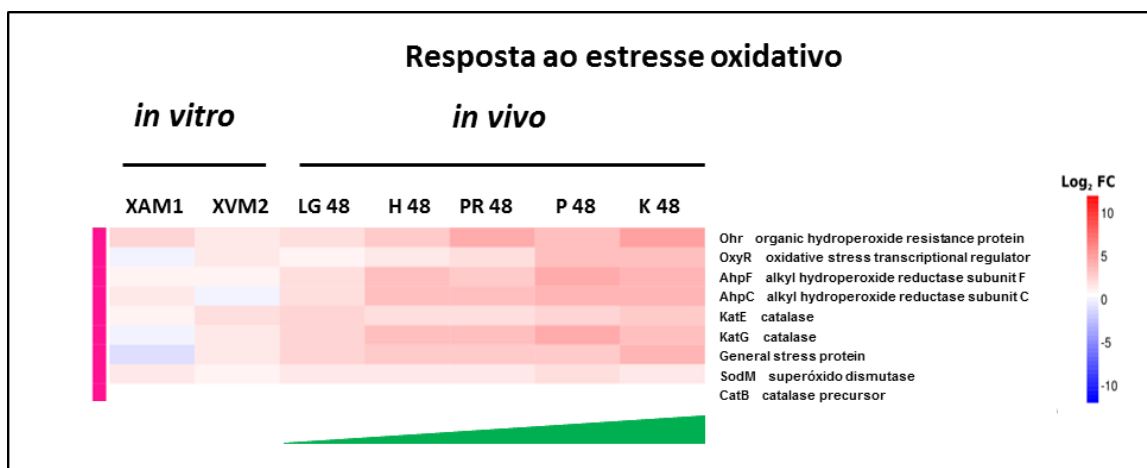


Figura 5. Perfil de expressão dos genes de resposta ao estresse oxidativo na *Xac* em condições *in vitro* e *in vivo*. As variedades de citros (*in vivo*) estão organizadas da mais suscetível (esquerda) à mais resistente (direita). O tempo de análises deste grupo de genes corresponde ao período de 48 horas após a inoculação para as amostras *in vivo*. No heatmap cada linha horizontal representa um único gene e a cor indica o nível de expressão relativa de cada condição avaliada (colunas). Altos níveis de expressão são representados em vermelho e baixos níveis de expressão são representados em azul. A escala de cor dos níveis de expressão genética está representada como o log2 Foldchange. As abreviaturas correspondem a LG= lima ácida Galego, H = Hamlin, PR= Pera Rio, P = Ponkan e K = Kunquat. O triangulo verde representa o aumento da expressão dos genes de resposta ao estresse oxidativo em função da tolerância ao cancro das variedades utilizadas.

3.4 O fósforo inorgânico e fontes de nitrogênio orgânicas reprimem a expressão de genes do T3SS *in vitro*

Comparações do transcriptoma de *Xac* realizada em condições *in vivo* e *in vitro* sugeriram que fontes de carbono, ferro e fósforo, poderia estar afetando a expressão de genes associados à virulência e patogenicidade desta bactéria (Figura 3 e 4). Por essa razão, foi avaliado o efeito destes nutrientes (C, Fe e P) na expressão do T3SS na *Xac* por análises de qRT-PCR. O T3SS foi selecionado por ser o principal fator de virulência e patogenicidade identificado neste estudo. Para isso, foi avaliada a expressão dos genes *hrpX*, *hpa1* e *hrpD6* do T3SS na *Xac* cultivada nos meios XVM2 e XAM1 (Figura 6A). Observou-se que a expressão destes genes na *Xac* é menor no meio XAM1, como foi determinado previamente a partir dos dados do transcriptoma (figura 3 e 4A). Estes resultados sugerem que as altas concentrações de Pi presentes no meio XAM1 provavelmente estejam afetando a expressão dos genes do T3SS e os genes do transporte de Pi. Esta hipótese surgiu porque as principais diferenças entre o meio XAM1 e o XVM2 são as concentrações de Pi que os meios apresentam, sendo eles, 93 mM e 0,48 mM, respectivamente. Para testar esta hipótese, a concentração de Pi do meio XVM2 foi ajustada a 93 mM (equivalente à do meio XAM1) e posteriormente avaliada a expressão de genes do T3SS de *Xac* neste meio. Um efeito de repressão dos genes do T3SS de *Xac* foi observado, confirmando a regulação destes genes pela presença de altas concentrações de fósforo inorgânico (Figura 6B).

Da mesma forma foi avaliado o efeito do ferro (presente em XVM2, ausente em XAM1) na expressão dos genes do T3SS na *Xac*. Para isso, a bactéria foi cultivada no meio XVM2 em presença (0,01 mM de FeSO₄) ou ausência de ferro (sem ferro). Os resultados obtidos neste teste não apresentaram diferenças significativas ($p < 0.01$) sobre o efeito do ferro na expressão dos genes do T3SS na *Xac* (figura 6C).

Também foram avaliados o citrato e a albumina como fontes de carbono para testar seus efeitos na expressão do T3SS da bactéria. Estas fontes de carbono estão presentes no meio XAM1, mas ausentes no meio XVM2, por isso, este último foi

suplementado com citrato e albumina nas concentrações de 1,6 mM e 1g/L, respectivamente. Comprovou-se que a albumina teve um efeito significativo de repressão sobre os genes do T3SS da *Xac*, mas o citrato não resultou em diferenças significativas na expressão dos mesmos (Figura 6D e 6E). Estes dados sugerem que diferentes fontes de carbono podem afetar diferencialmente a expressão de genes do T3SS na *Xac*, em particular, as fontes de nitrogênio orgânico (como por exemplo, a albumina).

Na tentativa de reverter o efeito que o Pi e a albumina causa sobre a expressão dos genes do T3SS de *Xac* quando cultivada no meio XAM1, estes compostos foram ajustados ou retirados. Assim, a concentração de Pi do meio XAM1 foi ajustada para 0,48 mM (a mesma presente no meio XVM2) e a albumina foi removida de sua composição. Foi possível observar que a diminuição da concentração do Pi e a ausência da albumina no meio XAM1 alterou a expressão dos genes do T3SS na *Xac*, aumentando de 20 a 30 vezes seu nível de expressão (Figura 6F). Estes dados sugerem que fontes de fósforo e nitrogênio (orgânico) podem estar envolvidas na ativação e expressão do T3SS na *Xac*, servindo como possíveis sinais ambientais captadas pela bactéria para dar início ao processo infeccioso.

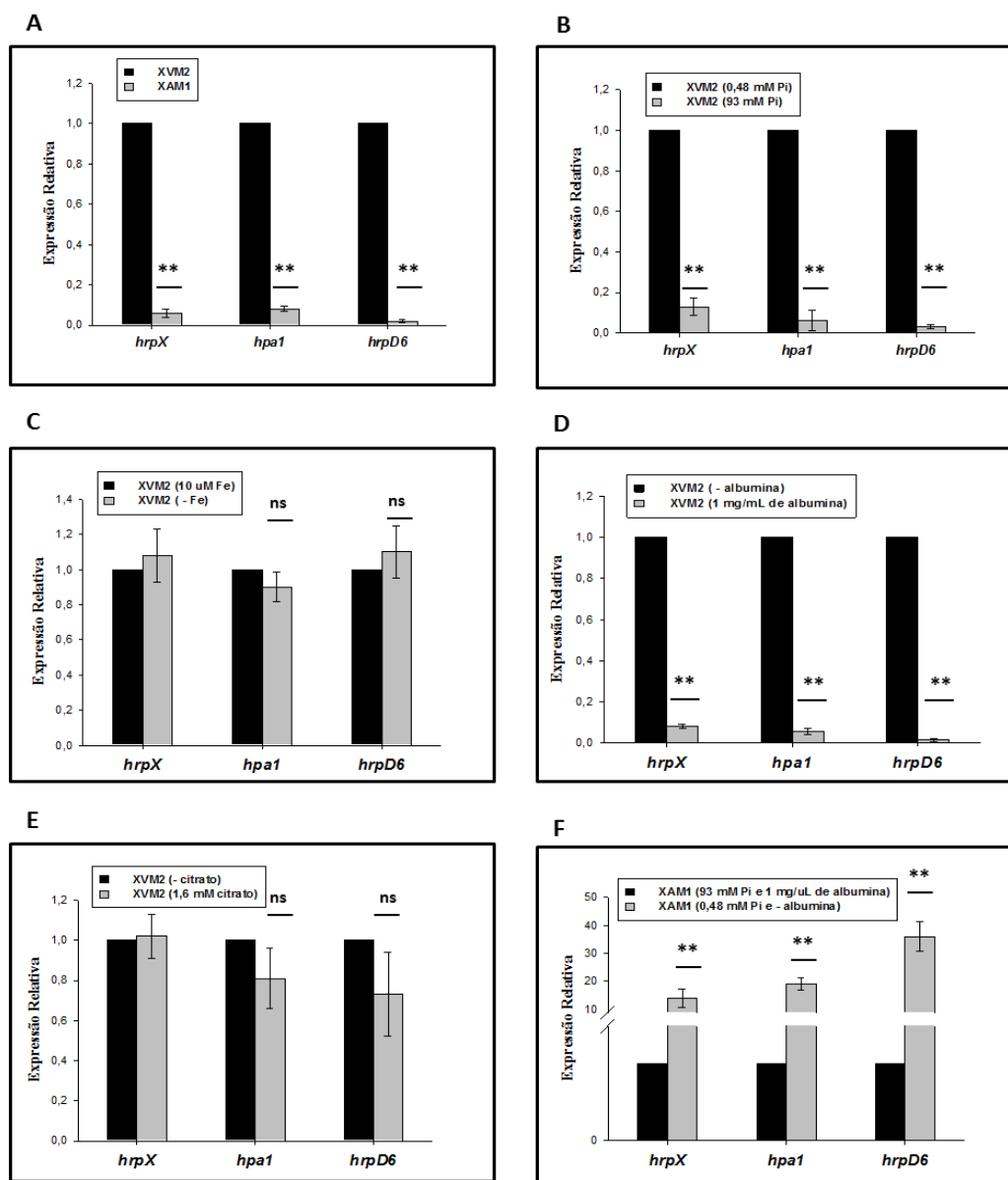


Figura 6. Efeito do fósforo, ferro e fonte de carbono sobre a expressão do T3SS em *Xac* em condições *in vitro*. (A) comparação da expressão de genes do T3SS de *Xac* cultivada em meio XVM2 e XAM1. (B) Efeito do fósforo sobre a expressão de genes do T3SS em *Xac* no meio de cultura XVM2 suplementado com 93 mM de Pi. O meio XVM2 normal tem uma concentração de fósforo inorgânico de 0,48 mM. (C) Efeito do ferro, (D) da albumina, (E) do ácido cítrico sobre a expressão de genes do T3SS em *Xac* no meio de cultura XVM2. (F) Efeito das baixas concentrações de fósforo e a ausência de albumina sobre a expressão de genes do T3SS em *Xac* no meio de cultura XAM1. Neste último caso, a albumina foi retirado do meio XAM1 e a concentração de fosforo foi ajustada a 0,48 mM. Os asteriscos representam uma significância estatística de $p < 0,01$ segundo o teste de Tukey. Os valores representam o desvio padrão de três réplicas biológicas.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliado o transcriptoma global e temporal de *Xac* infectando cinco genótipos de citros com diferentes níveis de suscetibilidade ao cancro. Os dados aqui apresentados tem identificado de forma mais precisa, o grupo de genes relacionados com os mecanismos de virulência, patogenicidade e adaptabilidade utilizados pela bactéria para infetar hospedeiros cítricos. Esta informação vai permitir compreender melhor o ambiente intracelular de plantas cítricas (a nível químico e físico), assim como, revelar novos alvos moleculares associados a fatores de virulência e patogenicidade na *Xac* para o desenvolvimento de estratégias de controle do cancro (RASKO; SPERANDIO, 2010).

O grupo de genes diferencialmente expressos (GDE) pela *Xac* objeto de nosso estudo foi direcionado para os genes que foram comuns para todas as interações *Xac*:variedades de citros (Figura 1C). Estes genes foram induzidos (ou reprimidos) independentemente do grau de susceptibilidade das plantas hospedeiras. Assim, esta informação permite estabelecer os mecanismos essenciais que a *Xac* utiliza para sobrepujar as barreiras de defesa em qualquer uma das planta cítricas estudadas que desenvolvem o cancro. A identificação dos GDE revelaram que *Xac* ativa principalmente no interior de todas as células hospedeiras genes relacionados com o T3SS (Figura 2A). O T3SS é utilizado pelas bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* para injetar efetores no citoplasma da célula hospedeira, sendo critico para a patogenicidade e virulência em todas as espécies estudadas (RYAN et al., 2011). No caso de *Xac*, muitos estudos baseados em mutagêneses (randômica e sitio dirigida) tem demonstrado a sua importância no processo infeccioso de citros (LAIA et al., 2009; GUO et al., 2011; YAN; WANG, 2012). Neste estudo, foi possível identificar em *Xac* a expressão de *hrpX* em todas as variedades e tempos analisados, este gene codifica a proteína HrpX, um dos principais reguladores do T3SS (Ver tabela S1).

Entretanto, o gene *hrpG* (regulador máster do T3SS), que ativa *hrpX* não foi identificado na *Xac* em nenhuma das interações *Xac*:citros que foram estudadas, o que sugere provavelmente uma baixa expressão deste gene. O gene *hrpG* codifica a

proteína reguladora de resposta (RR) do sistema de dois componentes (TCS-*Two Component System*) e sua atividade esta diretamente relacionada com sua fosforilação por uma histidina quinase. Isto poderia explicar como uma baixa expressão do gene *hrpG* não implica necessariamente na redução da transcrição de *hrpX*, pois a forma ativa da proteína HrpG é sua forma fosforilada. Resultados similares na expressão dos genes *hrpG* e *hrpX* também foram observados recentemente em estudos transcricionais realizados na bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), o agente causal da pústula bacteriana da soja (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). No entanto, estes dados são contrastantes aos determinados na bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*, onde utilizando o gene repórter *gfp* (*green fluorescent protein*) foi observado que a expressão de *hrpX* e *hrpG* são similares em condições infectantes (ZHANG et al., 2009).

Muitos dos genes do T3SS identificados neste estudo estão relacionados com o aparato secretor (AST3 ou injectossoma) deste sistema (ver tabela S1). No entanto, genes efetores secretados pelo T3SS também foram induzidos. Um exemplo interessante é o gene *hpa1*, que apresentou o nível de expressão mais alto de todos os transcritos identificados neste estudo. Este gene codifica para uma proteína altamente hidrofóbica “harpin” que tem como propriedades se unir a membranas celulares de células vegetais, além de permitir a agregação e formação de fibras em *Xac* (SGRO et al., 2012). Outros dos genes que codificam para proteínas efetoras do T3SS e que foram identificadas neste estudo são a *avrXacE1* (XAC0286), *hpaF* (Xac0393), *xopX* (XAC0543), *hrpW* (XAC2922), *avrXacE2* (XAC3224) e *avrXacE3* (XACb0011).

Os transcritos *avrXacE1*, *avrXacE2* e *avrXacE3* são classificados como genes que codificam para proteínas que apresentam domínios SUMO-protease (Small Ubiquitin Like Modifier-protease) presentes também na família de efetores XopD e C48 protease (WHITE et al., 2009). Uma vez que estes efetores são translocados pelo T3SS para no núcleo da célula hospedeira, realizam funções relacionadas com sumoilação de proteínas, regulação transcricional de genes de defesa e alteração de processos celulares de resposta ao estresse (KAY; BONAS, 2009; WHITE et al., 2009). Mutações individuais destes genes (*avrXacE1*, *avrXacE2* e *avrXacE3*) não apresentaram perda de

virulência em *Xac*, o que sugere provavelmente uma atividade redundante entre eles (FIGUEIREDO et al., 2011). De forma similar os demais genes efetores do T3SS identificados neste estudo, *hpaF*, *xopX* e *hrpW* não causam perda de patogenicidade para *Xac* quando são alterados por mutagêneses (FIGUEIREDO et al., 2011). Embora as proteínas HpaF, XopX e HrpW terem sido identificadas em estudos de proteômica na bactéria *Xac* em condições infectantes (FACINCANI et al., 2014), sua função ainda não está muito clara (WHITE et al., 2009). No caso da proteína HrpW tem sido identificado um domínio homólogo à pectato liase (enzima pectinolítica), que poderia sugerir uma função relacionada com a degradação do polissacarídeo pectina, presente nas paredes celulares das células vegetais. Neste aspecto, as enzimas degradadoras de parede celular, como as celulases, poligalacturonases (PG) e proteases secretadas pelo T2SS (Type II Secretion System) são importantes fatores de virulência para os patógenos de plantas (LIU et al., 2005).

Neste estudo foram induzidos em todas as condições infectantes 2 celulases (XAC0612, XAC3507), 3 proteases (XAC2831, XAC2833 e XAC2853) e 2 poligalacturonases (XAC0661, XAC2374), todas elas relacionadas com enzimas extracelulares transportadas pelo T2SS. É interessante que muitas destas enzimas secretadas pelo T2SS são reguladas pelas proteínas HrpG e HrpX (principais reguladoras do T3SS) o que explica a influência destes reguladores na indução de vários fatores de virulência na *Xac* (GUO et al., 2011). O papel de algumas destas enzimas extracelulares no processo infeccioso ainda permanece desconhecido em *Xac*, mas mutações no gene da celulase *engXCA* (XAC0612) e endopoligalacturonase *phe-1* (XAC0661) não resultou em perda de virulência da bactéria (YAN; WANG, 2012; XIA et al., 2016). No entanto, mutações no gene *XOC_1601* (homólogo à cisteína protease de *Xac*) da *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ocasionaram perda da virulência nesta bactéria (XUE et al., 2014). O uso destas enzimas extracelulares pela *Xac*, além de permitir degradar pectina (poligalacturonases), celulose (celulases) e proteínas (proteases) para a liberação de fontes de carbono, também facilita a translocação de efetores ao interior das células hospedeiras durante o processo infeccioso.

Nossos resultados sugerem com relação às fontes de carbono utilizadas pela *Xac*, uma adaptação temporal provavelmente dependente de sua disponibilidade no apoplasto celular (Tabela 4). É possível que a *Xac* utilize inicialmente metabólitos relacionados com o ciclo do ácido cítrico (citrato, piruvato, malato e aminoácido) e posteriormente passe a degradar fontes de carbono mais complexas e menos disponíveis como a pectina. Sugere-se que a pectina seja uma das fontes de carbono utilizada pela *Xac* devido à ativação de vias metabólicas relacionadas com a interconversão de glucuronato e pentoses às 72 hai (Tabela 4). Esta via se caracteriza por participar na degradação da pectina através de genes que codificam para poligalacturonases como *phe-1* e *pglA*, os dois, identificados como genes super expressos pela *Xac*.

As vias metabólicas identificadas neste estudo sugerem que o ácido cítrico e a pectina sejam as principais fontes de carbono utilizadas pela *Xac* no apoplasto. Os citros caracterizam-se por apresentar altas concentrações destes compostos o que explicaria a ativação destas rotas durante o processo infeccioso (ALBERTINI et al., 2006; YWASSAKI; CANNIATTI-BRAZACA, 2011; HU et al., 2015). A *Xac* também apresentou uma super expressão dos genes que codificam para a enzima málica (XAC3470) e fosfoenolpiruvato sintetase (XAC1006), o que sugere uma ativação dos processos de gliconeogênese nesta bactéria. A via enzima málica- fosfoenolpiruvato sintetase (MaeB-PpsA), tem sido identificada como a principal via para a produção de fosfoenolpiruvato (PEP) no processo de gliconeogênese em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, sendo requerida também para virulência e patogêneses desta bactéria (TANG et al., 2005). Estudos realizados em *Escherichia coli* demonstraram que mutações em genes envolvidos no ciclo do ácido cítrico e a gliconeogênese dificultaram sua colonização no trato urinário, entretanto, alterações nas vias como a glicólise, pentose fosfato e Entner-Duodoroff não impedem à bactéria colonizar e desenvolver o processo infeccioso (ALTERI; SMITH; MOBLEY, 2009). Estes dados sugerem que a *Xac* estaria utilizando principalmente em condições infectantes as vias do ácido cítrico e a gliconeogênese como processos para obtenção de energia e sínteses de glicose, respectivamente.

Outro grupo de transcritos associados a fatores nutricionais que foram super expressos pela *Xac* em condições infectantes, são os relacionados ao transporte de ferro e fósforo (Figura 2A, Tabela S1). Com relação ao transporte do ferro os dados aqui apresentados sugerem que a forma predominante deste íon no apoplasto dos cítricos é a forma férrica (Fe^{+3}). Isto, devido principalmente à ausência de genes relacionados com o transporte do íon ferroso como *feoA* e *feoB*. Estudos recentes mostraram que isolados da bactéria *Xanthomonas oryzae* que exibem diferente especificidade e estilos de vida no hospedeiro (xilema ou parênquima) utilizam estratégias contrastantes para a captação de ferro (ferrosa e férrica) de acordo a sua disponibilidade no tecido infectado. Neste estudo, foram induzidos em *Xac* genes relacionados com proteínas receptores de membrana TonB dependentes (principalmente família CirA) e as proteínas auxiliares ExbB, ExbD1 e ExbD2 no tempo de 48 hai (ver tabela S1). Todos estes genes codificam para proteínas relacionadas com o transporte do íon férrico nas bactérias Gram negativas fitopatogênicas (FRANZA; EXPERT, 2013). A importância destas proteínas no transporte de íon férrico e sua relação com a virulência já tem sido reportada na bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (PRIEFER; WIGGERICH, 1997; WIGGERICH; PU, 2000).

De acordo com nossos resultados, a *Xac* também percebe uma baixa disponibilidade de fosfato inorgânico (Pi) durante a infecção e responde induzindo genes envolvidos no transporte deste composto. Resultados similares foram reportados recentemente em estudos *in vivo* realizados na bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) a partir das análises de RNA-seq (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). Nas bactérias, o mecanismo utilizado para detectar e transportar o Pi extracelular é controlado pelo sistema de dois componentes (TCS) PhoR/PhoB (LAMARCHE et al., 2008; HSIEH; WANNER, 2010). A função deste TCS é regular a expressão dos genes que estão relacionados com o transporte de Pi (regulon Pho) quando as concentrações deste composto são limitadas para a bactéria. Tem sido descrito que além da regulação no transporte do Pi, o regulon Pho também está relacionado com a virulência em muitas bactérias (JACOBSEN et al., 2008; LAMARCHE et al., 2008; CRÉPIN et al., 2011; CHEKABAB; HAREL; DOZOIS, 2014).

Neste aspecto, mutações realizadas nos genes relacionados com o transporte do Pi nas bactérias *Xag* e *Xac* tem demonstrado perda de virulência nestes fitopatógenos, no entanto, ainda não são muito bem compreendidas as bases moleculares deste mecanismo (MOREIRA et al., 2015; CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). Mais adiante vai ser descrita uma possível explicação ao mecanismo que relaciona a virulência com o regulon Pho na *Xac*, entretanto, uma abordagem mais ampla será apresentada no capítulo 3 deste trabalho.

Também foi possível identificar uma grande quantidade de genes induzidos envolvidos no processo de tradução na *Xac*, em particular, os relacionados com a expressão de proteínas ribossomais (Figura 2A e Tabela S1). Estes dados sugerem que a *Xac* provavelmente realiza uma alta taxa de síntese de proteínas em condições infectantes, o que é contraditório, pois o conteúdo nutricional do apoplasto é pobre. Neste aspecto, já tem sido reportado que condições limitadas de aminoácidos levam a uma repressão dos genes relacionados com a síntese de proteínas e a indução dos genes relacionados com a sínteses de aminoácidos (PAUL; BERKMEN; GOURSE, 2005). Assim, pode-se inferir que o apoplasto de citros possivelmente não apresente fortes restrições a nível de concentrações de aminoácidos, ou que o “pool nutricional” requerido pela *Xac* é sintetizado a partir de intermediários metabólicos obtidos de outras fontes de carbono disponíveis (Por exemplo, ácido cítrico). O gene *dksA* que codifica para um dos principais reguladores da expressão de genes relacionados com a síntese de proteínas foi identificado como induzido neste estudo (Tabela S1). Em condições de estresse nutricional a proteína DksA regula a expressão do RNA ribossomal e genes que codificam para proteínas ribossomais (PAUL et al., 2004; SRIVATSAN; WANG, 2008; LEMKE et al., 2011). A importância do gene *dksA* na virulência de bactérias já tem sido reportada em patógenos de animais como *Escherichia coli* e *Pseudomonas auriginosa* (JUDE et al., 2003; PAUL et al., 2004). Estudos recentes de mutagênese randômica realizados em *Xac* demonstraram que o gene *dksA* é essencial para a virulência (YAN; WANG, 2012), no entanto, a relação da proteína DksA com a virulência em patógenos de plantas ainda não é muito bem compreendida.

Outra característica que o apoplasto de citros parece apresentar, de acordo com as análises dos perfis transcricionais de *Xac* é o alto conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Neste sentido, foi observado em *Xac* infectante a indução de vários genes relacionados com a resposta ao estresse oxidativo, de particular importância, o gene regulador *oxyR*, o qual codifica para uma proteína reguladora sensível ao peróxido de hidrogênio (TARTAGLIA; STORZ; AMES, 1989). A proteína OxyR, codificada pelo gene *oxyR*, possui dupla função, agindo tanto como sensor de estresse causado por peróxidos e como ativadora de transcrição de um regulon de genes induzidos por H₂O₂ (DUBBS; MONGKOLSUK, 2012). Alguns dos genes do regulon OxyR estão relacionados especificamente com a desintoxicação do H₂O₂ produzido pelas células hospedeiras como *katG*, *ahpC* e *ahpF* (DUBBS; MONGKOLSUK, 2012). Todos estes transcritos foram identificados neste estudo, além de outros regulados pelo regulon OxyR (Tabela S1). Tem sido reportado na bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que os genes *katA*, *katG*, *katE* e *ahpC* estão envolvidos na degradação de H₂O₂, sendo que a proteína KatG tem melhor capacidade para desintoxicar elevados níveis de H₂O₂ (JITTAWUTTIPOKA et al., 2009). Por outro lado, tem sido observado em *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que as catalases *katA*, *katE* e *katG*, são coletivamente necessárias para a patogênese em plantas de *Arabidopsis thaliana* (GUO et al., 2012).

Nossos resultados também sugerem que o nível de suscetibilidade das diferentes variedades de citros está relacionado com a concentração de H₂O₂ produzido pela planta em resposta ao ataque do patógeno. Isto foi deduzido a partir dos níveis de expressão dos genes de resposta ao estresse oxidativo, os quais foram maiores nas plantas consideradas mais tolerantes (Figura 5). Recentes estudos realizados em nosso laboratório, demonstraram que as plantas de citros mais resistentes apresentam maiores níveis de peróxido de hidrogênio nas folhas, o que está em concordância, com uma maior expressão de genes envolvidos na eliminação de ROS na *Xac* (Dados ainda não publicados). Neste sentido, em estudos recentes utilizando métodos baseados na quantificação de H₂O₂ em variedades de citros que foram inculadas com a proteína flagelina (*flg22*) de *Xac*, objetivou-se selecionar as variedades

mais tolerantes ao cancro (PITINO; ARMSTRONG; DUAN, 2015). Estes estudos demonstraram que as variedades mais resistentes produziam uma maior quantidade de H_2O_2 em resposta à exposição da flagelina de *Xac*. Todos estes dados sugerem que a resistência dos citros ao cancro provavelmente está relacionada com a produção de ROS, o que pode-se utilizar no futuro para o desenvolvimento de variedades melhoradas por métodos de transgenia.

Os dados apresentados anteriormente mostraram que a *Xac* reconhece múltiplas condições de estresse no apoplasto celular (nutricionais e físico-químicos), o que leva à expressão de múltiplas vias metabólicas para se adaptar. No entanto, ainda é pouco conhecido que tipo de sinais a *Xac* percebe no apoplasto para expressar seu principal fator de virulência, o T3SS. Estudos comparativos do transcriptoma de *Xac* em condições *in vivo* e *in vitro* realizados neste estudo mostraram que o Pi poderia estar afetando a expressão dos genes do T3SS (Figura 4A). Posteriormente, o efeito do Pi sobre a expressão dos genes do T3SS foi comprovada em condições *in vitro* através de análises de qRT-PCR (Figura 6B). Assim, estes dados sugerem que o Pi poderia ser um dos principais sinais ambientais captados pela *Xac* para dar início ao processo infeccioso através da expressão do T3SS. Em concordância com estes resultados, estudos realizados com a bactéria *Edwardsiella tarda* demonstraram que o Pi está relacionado com a expressão do T3SS (CHAKRABORTY et al., 2011). Da mesma forma, foi demonstrado na bactéria *E. coli* que mutações no gene *phoB*, o principal regulador do sistema de transporte de Pi, levaram a alterações na expressão de genes de virulência relacionados com o T3SS (CHEKABAB et al., 2014). Têm sido demonstrado recentemente, que mutações em genes que envolvem o transporte de Pi nas bactérias *Xag* ($\Delta pstSCAB-phoU$) e *Xac* ($\Delta pstB$) exibiram perda de virulência, no entanto, os autores não reportam o possível mecanismo de virulência associado a este fenótipo (MOREIRA et al., 2015; CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). Neste aspecto, uma possível explicação à perda de virulência nestas bactérias poderia estar relacionada com uma baixa expressão dos genes do T3SS, em resposta da alteração dos genes relacionados com o transporte de Pi. Um estudo mais amplo sobre o efeito

do Pi e seu mecanismo de ativação dos genes do T3SS na *Xac*, serão discutidos no capítulo 3 deste trabalho.

Nossos resultados também mostraram que além do Pi, fontes de nitrogênio orgânico podem ser sinais que são reconhecidos pela *Xac* para ativar o T3SS (Figura 6D). Estes dados sugerem que múltiplas vias de sinalização estariam envolvidas na expressão dos genes do T3SS em *Xac*, como já tem sido reportado na bactéria *Ralstonia solanacearum* (YOSHIMUCHI et al., 2009). Estudos realizados na bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria*, mostraram que genes do cluster *hrp* são induzidos principalmente em meios de cultura que possuam sacarose e aminoácidos com enxofre (SCHULTE; BONAS, 1992). Neste aspecto, é interessante observar que algumas das vias bioquímicas identificadas nos tempos 48 e 72 hai, estão relacionadas com o metabolismo de aminoácidos como enxofre (cisteína e metionina), o que sugere que este tipo de composto estaria presente no apoplasto de citros e poderiam estar relacionado com a expressão do T3SS em *Xac* (Tabela 4). Avaliou-se também o efeito de compostos como o ferro e o ácido cítrico na expressão dos genes do T3SS na *Xac*, porém diferenças significativas não foram observadas (Figura 6C e 6E). Assim, estes dados sugerem que a *Xac* reconhece sinais nutricionais específicas do ambiente, como as concentrações do Pi e o N, antes de ativar seu T3SS. A figura 7 apresenta um resumo das principais vias que foram induzidas pela *Xac* em condições infectantes, e que foram abordadas no decorrer desta discussão.

Muitos dos genes reprimidos identificados neste estudo estão relacionados com processo que envolvem transferência horizontal de genes (elementos genéticos móveis e conjugação) e recombinação do DNA (figura 2B). Neste sentido, é sabido que as bactérias são haplóides e se reproduzem por divisão clonal, assim, sua principal fonte de variação genética é a transferência horizontal de genes e elementos genéticos (plasmídeos, profagos, transposons e integrons) (LEVIN; BERGSTROM, 2000). De acordo com esses resultados dos perfis gênicos da *Xac* infectando as variedades de citros, sugerimos que o ambiente nutricional presente no apoplasto dos citros, não é favorável para gerar processos de variabilidade genética na bactéria, enquanto que, ambientes nutricionalmente mais ricos poderiam ser propícios para gerar

heterogeneidade, no entanto, estudos posteriores são necessários para demonstrar estas hipóteses.

A informação apresentada neste estudo permitiu uma melhor compreensão das características físicoquímicas do apoplasto de citros, e como elas são percebidas pela *Xac* para ativar os diferentes mecanismos de virulência que levam ao desenvolvimento da doença.

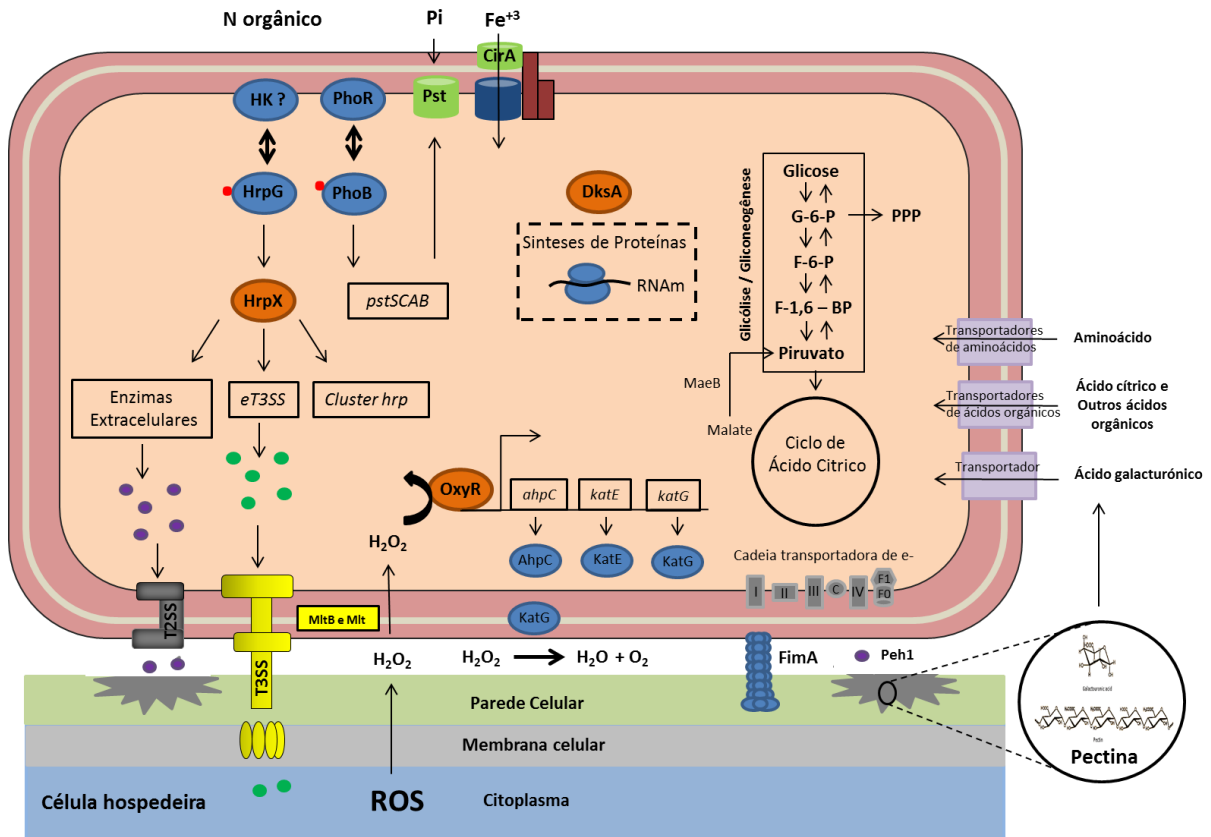


Figura 7. Principais vias bioquímicas induzidas no transcriptoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em condições infectantes. As baixas concentrações de Pi e nitrogênio orgânico presentes no apoplasto dos citros provavelmente induzem a expressão do T3SS e enzimas extracelulares, as quais são secretadas ao meio exterior pelo T2SS. As enzimas extracelulares degradam celulase, proteínas e pectina (Peh1). Outros elementos presentes em baixas concentrações no apoplasto como o íon férrico são transportados por receptores de membrana dependentes de TonB e proteínas auxiliares deste sistema. Fontes de carbono simples como ácidos orgânicos e aminoácidos são metabolizados através do ciclo do ácido cítrico e metabólitos intermediários como o piruvato são utilizados para os processos de sínteses de glicose (gliconeogênese). A alta atividade relacionada com a sínteses de proteína

provavelmente é regulada pelo fator transcricional DksA. Por outro lado, a planta se defende do ataque produzindo espécies reativas do oxigênio (ROS) e a bactéria tenta anular a ação desses produtos através da produção de catalases e peroxidases que são reguladas pelo regulador OxyR. As caixas representam genes e os ovais representam proteínas. As setas em duas direções representam processos de fosforilação ou desfosforilação e o ponto vermelho sobre as proteínas representa o grupo fosfato (regulador ativo). HK= Histidin quinase desconhecida, FimA=Adesina, MaeB= Enzima málica, Peh1= Poligalacturonases Mlt e MltB = Enzimas mureína transglicosilase atuando no peptidoglicano da bactéria.

5. CONCLUSÕES

O transcritoma global e temporal de *Xac* em condições infectantes sugerem um complexo processo adaptativo da bactéria ao ambiente presente no apoplasto. Este ambiente intracelular é caracterizado principalmente pelas diversas fontes de carbono, baixa disponibilidade de íons (especialmente P e Fe^{+3}) e a forte resposta da planta através de processos de defesa que envolve espécies reativas de oxigênio. É provável que as baixas concentrações de Pi e nitrogênio orgânico que a *Xac* percebe no apoplasto sejam interpretadas como sinais para a ativação do T3SS e enzimas extracelulares degradadoras de parede. É interessante também inferir que possíveis mecanismos de variabilidade genética em *Xac* estariam sendo favorecidos provavelmente em meios nutricionalmente ricos, o que é um aspecto importante do ponto de vista evolutivo desta bactéria.

6. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Tabela S1. Genes Induzidos que foram expressos em comum pela Xac para todas as variedades de citros estudadas nos tempos de 48 e 72 hai (Fold-change de >2 e FDS < 0,001).

Classificação Funcional	GeneID	Descrição	48 hai *	72 hai *
T3SS	XAC0286	AvrXacE1	X	X
	Xac0393	HpaF protein	X	X
	XAC0394	HrpF protein	X	X
	XAC0396	HpaB protein	X	X
	XAC0397	HrpE protein	X	X
	XAC0398	HrpD6 protein	X	X
	XAC0399	HrpD5 protein	X	X
	XAC0400	HpaA protein	X	X
	XAC0401	HrcS protein	X	
	XAC0402	HrcR protein	X	
	XAC0403	HrcQ protein	X	X
	XAC0404	HpaP protein	X	X
	XAC0405	HrcV protein	X	X
	XAC0406	HrcU protein	X	
	XAC0407	HrpB1 protein	X	X
	XAC0408	HrpB2 protein	X	X
	XAC0409	HrcJ protein	X	X
	XAC0415	HrcC protein	X	X
	XAC0416	Hpa1	X	X
	XAC0417	Hpa2	X	X
	XAC0543	XopX	X	X
	XAC1266	HrpX protein	X	X
	XAC2922	HrpW	X	X
	XAC3224	AvrXacE2 avirulence protein	X	X
	XACb0011	AvrXacE3, avirulence protein	X	X
	XAC0532	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	X	
	XAC0661	Endopolygalacturonase	X	X
	XAC0802	Sulfotransferase	X	X
	XAC1006	Malate dehydrogenase	X	X
	XAC2041	PpsA phosphoenolpyruvate synthase	X	

Processos Metabólicos	XAC2078	SdhB	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	X	
	XAC2112		Pseudouridine synthase (EC 5.4.99.-)	X	X
	XAC2288	GuaB	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	X	
	XAC2374	PglA	polygalacturonase	X	X
	XAC2376	CbbZ	phosphoglycolate phosphatase	X	
	XAC3225	MltB	transglycosylase		X
	XAC3235	SucD	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	X	
	XAC3236	SucC	succinyl-CoA synthetase beta subunit		X
	XAC3347	Pgk	phosphoglycerate kinase	X	
	XAC3352	GapA	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	X	
	XAC3470	MaeB	NADP-dependent malic enzyme	X	
	XAC3580	XanB	phosphomannose isomerase	X	
	XAC3659	lpdA	dihydrolipoamide dehydrogenase	X	
	XAC3661	PhdB	dihydrolipoamide acetyltransferase	X	
	XAC4326	UahA	urea amidolyase	X	
	XAC4174		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	X	X
	XAC4199		Polyvinylalcohol dehydrogenase	X	X
	XACb0007	Mlt	lytic murein transglycosylase	X	X
Transporte de ferro	XAC0009	ExbB	biopolymer transport ExbB protein	X	
	XAC0010	ExbD1	biopolymer transport ExbD1 protein	X	
	XAC0011	ExbD2	biopolymer transport ExbD2 protein	X	
	XAC0074	CirA		X	X
	XAC0999	CirA	colicin I receptor	X	
	XAC2829		Receptor TonB (sideroforo)	X	X
Transporte de fósforo	XAC1574	PstB	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	X	
	XAC1578	PhoX	phosphate binding protein	X	
	XAC1792	PhoX	alkaline phosphatase	X	
Resposta estresse oxidativo	XAC0282	Ohr	organic hydroperoxide resistance protein		X
	XAC0905	OxyR	oxidative stress transcriptional regulator		X
	XAC0906	AhpF	alkyl hydroperoxide reductase subunit F	X	X
	XAC0907	AhpC	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	X	X
	XAC1211	KatE	catalase	X	
	XAC1301	KatG	catalase	X	X
	XAC2369		General stress protein	X	

	XAC2386	SodM superoxidase dismutase	X	
	XAC4029	CatB catalase precursor	X	X
Enzimas extracelulares	XAC0612	EngXCA cellulase	X	
	XAC0661	Endopolygalacturonase	X	X
	XAC2831	Extracellular serine protease	X	X
	XAC2833	Extracellular serine protease	X	
	XAC2853	Cysteine protease	X	X
	XAC3507	Truncated cellulase S	X	
Tradução	XAC0488	RpsI 30S ribosomal protein S9	X	X
	XAC0951	RplY 50S ribosomal protein L25	X	
	XAC0967	RpsL 30S ribosomal protein S12	X	
	XAC0968	RpsG 30S ribosomal protein S7	X	
	XAC0970	TufA elongation factor Tu		X
	XAC0972	RplC 50S ribosomal protein L3	X	X
	XAC0973	RplD 50S ribosomal protein L4	X	
	XAC0974	RplW 50S ribosomal protein L23	X	
	XAC0975	RplB 50S ribosomal protein L2	X	X
	XAC0976	RpsS 30S ribosomal protein S19	X	
	XAC0977	RplV 50S ribosomal protein L22	X	
	XAC0978	30S ribosomal protein S3	X	X
	XAC0986	RpsH 30S ribosomal protein S8	X	
	XAC0987	RplF 50S ribosomal protein L6		X
	XAC0988	RplR 50S ribosomal protein L18		X
	XAC0989	RpsE 30S ribosomal protein S5	X	X
	XAC0991	RplO 50S ribosomal protein L15		X
	XAC1122	RpmF 50S ribosomal protein L32		X
	XAC1249	RpmA 50S ribosomal protein L27	X	
	XAC1251	RpsT 30S ribosomal protein S20	X	X
	XAC1292	RpsP 30S ribosomal protein S16		X
	XAC1620	RpsF 30S ribosomal protein S6		X
	XAC1622	50S ribosomal protein L9	X	X
Proteólises	XAC0249	Dcp peptidyl-dipeptidase	X	
	XAC0552	Proteinase	X	X
	XAC0628	Prolyl oligopeptidase	X	
	XAC2537	Peptidase	X	X

Reguladores transcrpcionais	XAC1455	Transcriptional regulator marR family	X	
	XAC2358	DnaK supresor	X	
	XAC2037	Manganese transport regulator MntR	X	X
Proteínas de membrana	XAC3664	OmpW outer membrane protein	X	
	XAC1347	Outer membrane protein	X	X
Elementos movies	XAC2372	IS1479 transposase	X	
Adesão	XAC3241	FimA fimbrillin	X	
Fosforilação oxidativa	XAC1258	CyoA cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II	X	
	XAC1259	CyoB cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I	X	
Sinalização	XAC1171	Serine/threonine kinase	X	
Não clasificada	XAC0435	VirK	X	X
	XAC0100	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC0277	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC0285	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC0340	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC0501	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC0682	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC0754	Hypothetical protein	X	X
	XAC1172	Uncharacterized protein	X	X
	XAC1208	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC1262	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC1364	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC2009	Uncharacterized protein	X	X
	XAC2370	Conserved hypothetical protein	X	X

Proteínas hipotéticas	XAC2653	Proteína hipotética	X	
	XAC2786	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC2832	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC3058	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC3085	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC3230	Hypothetical protein	X	
	XAC3314	Hypothetical protein	X	
	XAC3615	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC3657	Conserved hypothetical protein		X
	XAC3691	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC3754	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC3856	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC3970	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC3971	Conserved hypothetical protein	X	
	XAC4007	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC4333	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC4213	Hypothetical protein	X	
	XACb0006	Hypothetical protein	X	

*O “X” indica que o gene foi identificado no tempo estabelecido de acordo com os critérios de seleção utilizados neste estudo. No caso de genes induzidos os critérios utilizados para a seleção destes genes foram o Fold-change de >2 e um valor de FDS (*False Discovery Rate*) < 0,001.

Tabela S2. Genes reprimidos que foram expressos em comum pela *Xac* para todas as variedades de citros estudadas nos tempos de 48 e 72 horas após a inoculação (Fold-change de < 0,5 e FDS < 0,001).

Classificação Funcional	GeneID	Descrição	48 hai *	72 hai *
Processos Metabólicos	XAC0452	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	X	X
	XAC0900	Pms peptide methionine sulfoxide reductase		X
	XAC2717	TrpB tryptophan synthase beta chain	X	X
Transporte de ferro	XAC0144	IroN TonB-dependent receptor	X	
	XAC2742	BtuB TonB-dependent receptor	X	
Resposta ao stress	XAC2454	Stringent starvation protein A (sspA)		X
Tradução	XAC3893	SSU 23S ribosomal RNA		X
	XAC3896	SSU 16S ribosomal RNA		X
	XAC4288	SSU 23S ribosomal RNA		X
	XAC4291	SSU 16S ribosomal RNA		X
Proteína de membrana	XAC3354	OmpW outer membrane protein W		X
Elementos móveis	XAC0093	ISxac1 transposase		X
	XAC0148	ISxac1 transposase		X
	XAC0502	ISxac1 transposase		X
	XAC1916	ISxac1 transposase		X
	XAC192	ISxac1 transposase	X	X
	XAC4137	ISxac1 transposase		X
	XAC4325	ISxac1 transposase		X
	XAC4328	ISxac1 transposase		
Conjugação	XAC1507	MobL plasmid mobilization protein	X	

Recombinação DNA	XAC2418	Rci shufflon-specific recombinase	X	X
Fosforilação oxidativa	XAC2336	CydA cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	X	X
	XAC2337	CydB cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	X	X
	XAC3736	CioB cyanide insensitive terminal oxidase	X	X
Proteínas hipotéticas	XAC1062	Hypothetical protein		X
	XAC1492	Conserved hypothetical protein		X
	XAC2120	Hypothetical protein	X	X
	XAC2216	Hypothetical protein	X	
	XAC2252	Hypothetical protein		X
	XAC2419	Hypothetical protein	X	
	XAC2420	Hypothetical protein	X	X
	XAC2483	Conserved hypothetical protein	X	X
	XAC3353	Conserved hypothetical protein		X
	XAC3804	Conserved hypothetical protein	X	X

*O "X" indica que o gene foi identificado no tempo estabelecido de acordo aos critérios de seleção utilizados neste estudo. No caso de genes reprimidos os critérios utilizados para a seleção destes genes foram o Fold-change de < 0,5 e um valor de FDS (*False Discovery Rate*) < 0,001.

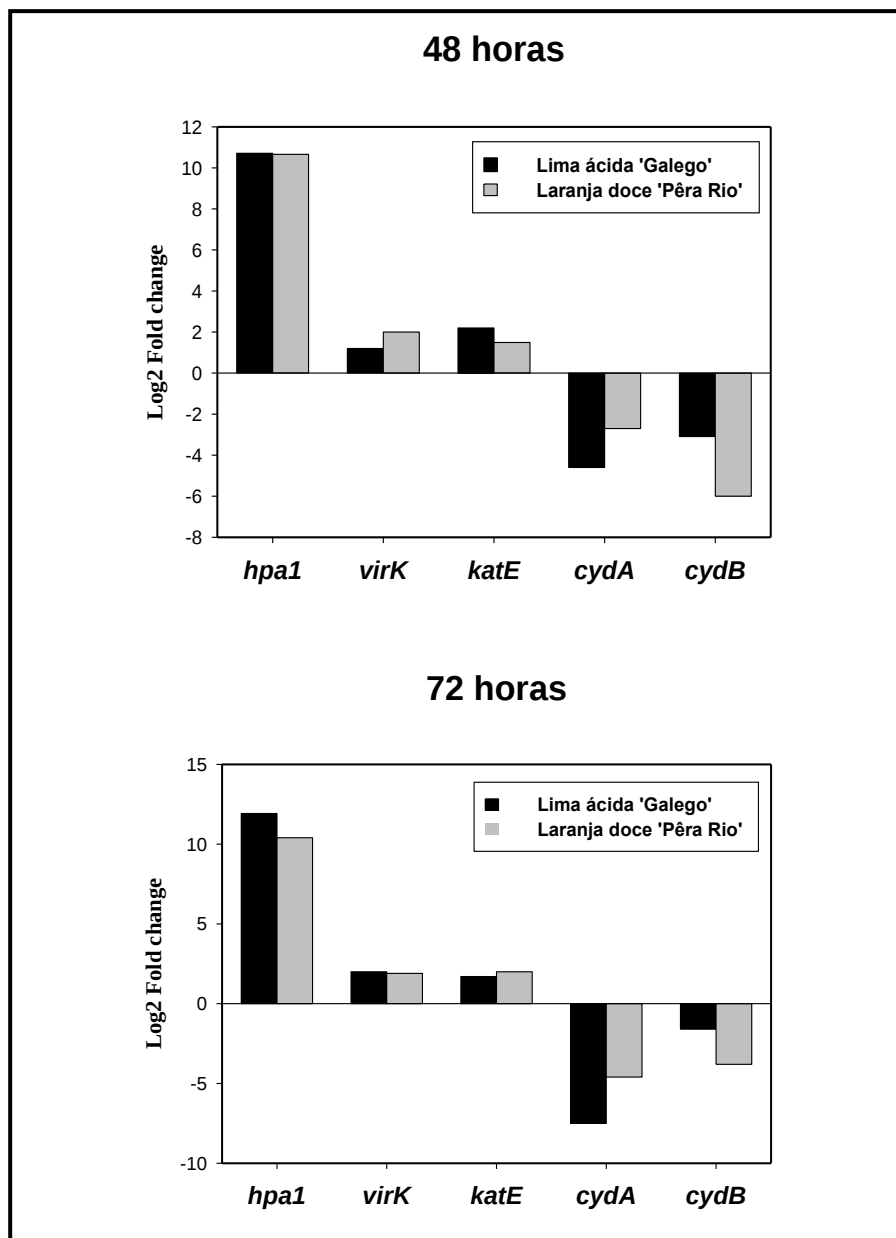


Figura S1. Validação do transcriptoma de *Xac* *in vivo* por qRT-PCR. Foram selecionados 3 genes induzidos (*hpa1*, *virK* e *katE*) e 2 genes reprimidos (*cydA* e *cydB*) no transcriptoma para fazer a validação por qRT-PCR nas variedades lima ácida “galego” e laranja doce pera rio.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, M. V.; CARCOUET, E.; PAILLY, O.; GAMBOTTI, C.; LURO, F.; BERTI, L. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8335–8339, 2006.
- ALTERI, C. J.; SMITH, S. N.; MOBLEY, H. L. T. Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000448, 2009.
- ALVA, A. K. Copper Contamination of Sandy Soils and Effects on Young Hamlin Orange Trees. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 857–864, 1993.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, n. 3, p. 300–305, mar. 2010.
- BOCH, J.; JOARDAR, V.; GAO, L.; ROBERTSON, T. L.; LIM, M.; KUNKEL, B. N. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 73–88, 2002.
- BROWN, D. G.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: An inside view of bacterial wilt. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 1641–1660, 2004.
- CHAKRABORTY, S.; SIVARAMAN, J.; LEUNG, K. Y.; MOK, Y. K. Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control virulence genes in type III and VI secretion systems of *Edwardsiella tarda*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 39417–39430, 2011.
- CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; STEVEN, L. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2016.
- CHEKABAB, S. M.; HAREL, J.; DOZOIS, C. M. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. **Virulence**, v. 5, p. 786–93, 2014.
- CHEKABAB, S. M.; JUBELIN, G.; DOZOIS, C. M.; HAREL, J. PhoB activates *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

COOKSEY, D. A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 381–386, 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00112.x>>.

CRÉPIN, S.; CHEKABAB, S. M.; LE BIHAN, G.; BERTRAND, N.; DOZOIS, C. M.; HAREL, J. **The Pho regulon and the pathogenesis of Escherichia coli** *Veterinary Microbiology*, 2011.

DA SILVA, a C. R.; FERRO, J. a; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. a; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, a M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. a; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, a J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, a; KATSUYAMA, a M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. a; MADEIRA, a M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. a; ROSSI, a; SENA, J. a D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. a F.; TAKITA, M. a; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–63, 23 maio 2002.

DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 20, p. 5495–5503, 2012.

FACINCANI, A. P.; MOREIRA, L. M.; SOARES, M. R.; FERREIRA, C. B.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. a; GOZZO, F. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F. 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**, v. 14, n. 1, p. 205–17, 2014.

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

FRANZA, T.; EXPERT, D. Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: An a la carte” menu. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 429–438, 2013.

GOTTWALD, T. R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J. H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, v. 91, n. 1, p. 30–4, 2001.

GOTTWALD, T. R.; PIERCE, F.; GRAHAM, J. H. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress. **Plant Management Network**, v. 1993, n. August, 2002.

GRAHAM, J. H.; R., G. T.; CUBERO, J.; DIANN S., A. *Xanthomonas axonopodis* pv . citri : factors affecting successful. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

GUO, M.; BLOCK, A.; BRYAN, C. D.; BECKER, D. F.; ALFANO, J. R. *Pseudomonas syringae* catalases are collectively required for plant pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 5054–5064, 2012.

GUO, Y.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX Play Global Roles in Coordinating Different Virulence Traits of *Xanthomonas axonopodis* pv . citri. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649–661, 2011.

HSIEH, Y.; WANNER, B. Global regulation by the seven-component P i signaling system. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 2, p. 198–203, 2010.

HU, X. M.; SHI, C. Y.; LIU, X.; JIN, L. F.; LIU, Y. Z.; PENG, S. A. Genome-wide identification of citrus ATP-citrate lyase genes and their transcript analysis in fruits reveals their possible role in citrate utilization. **Molecular genetics and genomics: MGG**, v. 290, p. 29–38, 2015.

JACOB, T. R.; LAIA, M. L. De; MOREIRA, L. M.; GONÇALVES, J. F.; MARIA, F.; CARVALHO, D. S.; INÊS, M.; FERRO, T.; FERRO, J. A. Type IV Secretion System Is Not Involved in Infection Process in Citrus. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

JACOBS, J. M.; BABUJEE, L.; MENG, F.; MILLING, A.; ALLEN, C. The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. **mBio**, v. 3, n. 4, p. e00114–12, 2012.

JACOBSEN, S. M.; LANE, M. C.; HARRO, J. M.; SHIRTLIFF, M. E.; MOBLEY, H. L. T. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 180–193, 2008.

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp . citri provide insights into

mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

JUDE, F.; KIHLE, T.; BRANNY, P.; PERRON, K.; MAYER, M. P.; COMTE, R.; VAN DELDEN, C. Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 3558–3566, 2003.

KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 37–43, 2009.

KIM, S.; CHO, Y.-J.; SONG, E.-S.; LEE, S. H.; KIM, J.-G.; KANG, L.-W. Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **BMC Genomics**, v. 17, p. 345, 2016.

KIM, S.; PARK, J.; LEE, J.; SHIN, D.; PARK, D. S.; LIM, J. S.; CHOI, I. Y.; SEO, Y. S. Understanding pathogenic *Burkholderia glumae* metabolic and signaling pathways within rice tissues through in vivo transcriptome analyses. **Gene**, v. 547, n. 1, p. 77–85, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.029>>.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I. T.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. F. and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC microbiology**, v. 17, p. 1–17, 2009.

LAMARCHE, M. G.; WANNER, B. L.; CRÉPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 461–473, 2008.

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

LEMKE, J. J.; SANCHEZ-VAZQUEZ, P.; BURGOS, H. L.; HEDBERG, G.; ROSS, W.; GOURSE, R. L. Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 5712, 2011.

LEVIN, B. R.; BERGSTROM, C. T. Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 6981–5, 2000.

LIU, H.; ZHANG, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P.; PATHOLOGY, P. in *Ralstonia solanacearum* Shows That Secreted Proteins in Addition to Plant Cell-Wall-Degrading Enzymes Contribute to Virulence. **Society**, v. 18, p. 1296–1305, 2005.

LIU, W.; YU, Y. H.; CAO, S. Y.; NIU, X. N.; JIANG, W.; LIU, G. F.; JIANG, B. Le; TANG, D. J.; LU, G. T.; HE, Y. Q.; TANG, J. L. Transcriptome profiling of *xanthomonas campestris* pv *campestris* grown in minimal medium MMX and rich medium NYG. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 466–479, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, p. 550, 2014.

MAGOC, T.; WOOD, D.; SALZBERG, S. L. EDGE-pro: Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 9, p. 127–36, 2013.

MARCO, M. L.; LEGAC, J.; LINDOW, S. E. *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1379–1391, 2005.

MOREIRA, L. M.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, C. B.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; GOZZO, F. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; SOARES, M. R. Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. **Functional and Integrative Genomics**, v. 15, p. 197–210, 2015.

OSBOURN, a E.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. **The EMBO journal**, v. 6, n. 1, p. 23–8, 1987.

PAUL, B. J.; BARKER, M. M.; ROSS, W.; SCHNEIDER, D. A.; WEBB, C.; FOSTER, J. W.; GOURSE, R. L. DksA: A critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. **Cell**, v. 118, p. 311–322, 2004.

PAUL, B. J.; BERKMEN, M. B.; GOURSE, R. L. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 7823–7828, 2005.

PITINO, M.; ARMSTRONG, C. M.; DUAN, Y. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. **Horticulture research**, v. 2, p. 15042, 2015.

PRIEFER, U. B.; WIGGERICH, H. Unusual Structure of the tonB-exb DNA Region of Are Essential for Ferric Iron Uptake , but exbD2 Is Not. v. 179, n. 22, p. 7103–7110, 1997.

RASKO, D. a.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. February, p. 117–128, 2010.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M.-A.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium-plant interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344–55, 2011.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, p. 863–864, 2011.

SCHULTE, R.; BONAS, U. A Xanthomonas Pathogenicity Locus Is Induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. **The Plant cell**, v. 4, n. January, p. 79–86, 1992.

SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G.; SCARPECI, T. E.; VALLE, E. M.; CORTADI, A.; ORELLANO, E. G.; GOTTIG, N.; OTTADO, J. Contribution of a harpin protein from Xanthomonas axonopodis pv . citri to pathogen virulence. v. 13, p. 1047–1059, 2012.

SKVORTSOV, T. a.; AZHIKINA, T. L. A Review of the Transcriptome Analysis of Bacterial Pathogens in vivo: Problems and Solutions. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 36, p. 550–559, 2010.

SOTO-SUÁREZ, M.; BERNAL, D.; GONZÁLEZ, C.; SZUREK, B.; GUYOT, R.; TOHME, J.; VERDIER, V. In planta gene expression analysis of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae, African strain MA11. **BMC microbiology**, v. 10, p. 170, 2010.

SRIVATSAN, A.; WANG, J. D. **Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp** *Current Opinion in Microbiology*, 2008. .

TAMIR-ARIEL, D.; NAVON, N.; BURDMAN, S. Identification of genes in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria induced during its interaction with tomato. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 17, p. 6359–6371, 2007.

TANG, D.; HE, Y.; FENG, J.; HE, B.; JIANG, B.; LU, G.; CHEN, B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Possesses a Single Gluconeogenic Pathway That Is Required for Virulence. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 6231–6237, 2005.

TARTAGLIA, L. A.; STORZ, G.; AMES, B. N. Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. **Journal of Molecular Biology**, v. 210, p. 709–719, 1989.

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

WHITE, F. F.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; KOEBNIK, R.; WHITE, F. F. The type III effectors of *Xanthomonas*. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 6, p. 749–766, 2009.

WIGGERICH, H.; PU, A. The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). p. 1053–1060, 2000.

XIA, T.; LI, Y.; SUN, D.; ZHUO, T.; FAN, X.; ZOU, H. Identification of an Extracellular Endoglucanase That Is Required for Full Virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **PloS one**, v. 11, p. e0151017, 2016.

XIE, C.; MAO, X.; HUANG, J.; DING, Y.; WU, J.; DONG, S.; KONG, L.; GAO, G.; LI, C. Y.; WEI, L. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 316–322, 2011.

XUE, X.-B.; ZOU, L.-F.; MA, W.-X.; LIU, Z.-Y.; CHEN, G.-Y. Identification of 17 HrpX-Regulated Proteins Including Two Novel Type III Effectors, XOC_3956 and XOC_1550, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e93205, 2014.

YAN, Q.; WANG, N. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 1590–1599, 2011.

YAN, Q.; WANG, N. High-Throughput Screening and Analysis of Genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Involved in Citrus Canker Symptom Development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 69–84, 2012.

YOSHIMUCHI, T.; ZHANG, Y.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; OHNISHI, K. Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 196–204, 2009.

YU, X.; LUND, S. P.; SCOTT, R. a; GREENWALD, J. W.; RECORDS, A. H.; NETTLETON, D.; LINDOW, S. E.; GROSS, D. C.; BEATTIE, G. a. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. E425–E434, 2013.

YWASSAKI, L. A. .; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. . Ascorbic acid and pectin in different sizes and parts of citric fruits [Ácido ascórbico e pectina em diferentes partes de frutas cítricas de vários tamanhos]. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 319–326, 2011.

ZHANG, Y.; CALLAWAY, E. M.; JONES, J. B.; WILSON, M. Visualisation of hrp gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 379–390, 2009.

ZHAO, Y.; BLUMER, S. E.; SUNDIN, G. W. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 23, p. 8088–8103, 2005.

CAPITULO 3 – O sistema de dois componentes PhoR/phoB regula a expressão dos genes do sistema de secreção tipo III (T3SS) em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO - Estudos demonstram que um dos principais fatores de virulência utilizados pela *Xac* para infectar e colonizar seus hospedeiros é o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS). Embora o papel do T3SS na patogênese de *Xac* esteja bem estabelecido, o mecanismo pelo qual este é ativado na planta ainda é pouco compreendido. Neste estudo, utilizando análises de RNA-Seq da *Xac* *in vivo* e *in vitro*, foi possível demonstrar que altas concentrações de fósforo inorgânico (Pi) suprimem significativamente, a expressão do T3SS na bactéria. Em *Xac* o mecanismo utilizado para detectar e transportar o Pi extracelular é controlado pelo sistema de dois componentes (TCS) PhoR / PhoB , por a sua vez , regula o sistema de alta afinidade Pst (Phosphate-Specific Transport). Para relacionar o efeito do Pi com a regulação do T3SS, foram caracterizados os mutantes *phoR* (Histidina-quinase sensora) e *pstB* (ATPase), genes do TCS e Pst, respectivamente. Os mutantes apresentaram perda de virulência, redução do crescimento bacteriano *in vivo*, limitada formação de biofilme e agregação em condições *in vitro*. As análises feitas através de qRT-PCR nos mutantes *phoR* e *pstB* demonstraram que a perda de virulência foi devida principalmente à alteração na expressão dos genes do T3SS. Análises efetuadas por meio de modelagem molecular sugeriram que PhoR pode estar fosforilando o HrpG e modulando a expressão de *hrpX*. Os resultados obtidos, indicam um possível mecanismo de regulação entre o Sistema de Dois Componentes PhoR-PhoB e os genes do T3SS via expressão e ativação de HrpG. Sendo assim, é proposto que o Pi pode ser um dos principais sinais ambientais captados pela *Xac* para dar início ao processo infeccioso.

Palavras-chave: Cancro cítrico, *Xac*, Mutantes PhoR e PstB, RNA-Seq, qRT-PCR, fósforo inorgânico (Pi).

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico asiático ou tipo A é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que afeta todas as variedades de citros de importância econômica (GRAHAM et al., 2004). A doença é caracterizada por hiperplasia e hipertrofia de tecidos, lesões circulares e corticosas em folhas, ramos e frutos (GOTTWALD; PIERCE; GRAHAM, 2002). Como outras bactérias fitopatogênicas, a Xac se multiplica inicialmente de forma epífita sobre a superfície das plantas e posteriormente entra no hospedeiro através dos estômatos e/ou de ferimentos chegando ao apoplasto (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Xac inicia o processo de colonização e multiplicação através da expressão coordenada de diferentes fatores de virulência que são regulados e controlados principalmente pelos sistemas de dois componentes (TCS = two-component system) (QIAN; HAN; HE, 2008). Estes sistemas são formados por uma histidina-quinase sensora de sinal (HK) e um regulador de resposta (RR). Em resposta aos estímulos ambientais, a HK se autofosforila e posteriormente transfere o grupo fosfato para um RR, que em seguida, permite a expressão de genes específicos (LAUB; GOULIAN, 2007; QIAN; HAN; HE, 2008; PODGORNIAIA; LAUB, 2013). Assim, os TCS são importantes nos processos de adaptação pelos quais a bactéria tem que passar durante o processo infeccioso.

Em *Xanthomonas spp* o principal fator de virulência é o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS = Type III secretion system) (BÜTTNER; HE, 2009; BÜTTNER; BONAS, 2010). O T3SS permite a translocação de proteínas efetoras (eT3SS) ao interior da célula hospedeira alterando principalmente sua resposta de defesa (BOCH; BONAS, 2010). Em *Xanthomonas*, o T3SS é codificado pelo cluster *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) que é regulado principalmente pelas proteínas HrpG e HrpX (WENGELNIK; ACKERVEKEN; BONAS, 1996; NOEL et al., 2001; GÜRLEBECK; THIEME; BONAS, 2006). Estudos de microarranjos feitos em Xac demonstraram que mutantes de *hrpG* e *hrpX* regulam respectivamente, 232 e 181 genes, relacionados com múltiplas atividades celulares como a virulência, biossíntese de aminoácidos, fosforilação oxidativa, via das pentoses fosfato e transporte de açúcar e

íons (GUO et al., 2011). O gene *hrpG* codifica uma proteína RR que pertence à família OmpR, que uma vez ativada (fosforilada), leva à expressão de *hrpX* (WENGELNIK; ACKERVEKEN; BONAS, 1996; NOEL et al., 2001; GÜRLEBECK; THIEME; BONAS, 2006). Recentemente foi reportado em *Xanthomonas campestris* uma HK putativa denominada HpaS que fosforila a HrpG (LI et al., 2014). Alegria et al, (2004) demonstraram que outras HK estabelecem interações proteína-proteína com HrpG, sugerindo que múltiplas vias de sinalização poderiam ativar esta proteína, como já observado na bactéria *Ralstonia solanacearum* (YOSHIMUCHI et al., 2009). Por outro lado, HrpX é um tipo de ativador transcricional da família AraC, que regula a expressão dos seis operons presentes no cluster *hrp* (*hrpA* até *hrpF*), além dos genes efetores do T3SS (eT3SS) (WENGELNIK; ACKERVEKEN; BONAS, 1996). Muitos dos genes regulados por HrpX apresentam um PIP-box (TTCGC-N15-TTCGC -plant-inducible promoter box) em sua região promotora (FENSELAU; BONAS, 1995). Tem sido demonstrado que os genes do cluster *hrp* são induzidos via HrpG e HrpX em meios mínimos e no apoplasto das células hospedeiras, o que sugere uma ativação destes genes por limitação de nutrientes (SCHULTE; BONAS, 1992; TSUGE et al., 2006).

O fósforo inorgânico (Pi) é um nutriente fundamental no desenvolvimento e crescimento bacteriano. Nas bactérias, o mecanismo utilizado para detectar e transportar o Pi extracelular é controlado pelo TCS PhoR / PhoB (LAMARCHE et al., 2008; HSIEH; WANNER, 2010). Quando as bactérias se multiplicam em condições limitadas de Pi, a proteína PhoR fosforila a PhoB e ativa a expressão dos genes do regulon Pho (LAMARCHE et al., 2008). O sistema de alta afinidade Pst (Phosphate-Specific Transport) é um dos principais grupos de genes do regulon Pho. Este regulon é formado por quatro proteínas denominadas PstS, PstC, PstA e PstB; estas proteínas constituem um típico sistema de transporte ABC (ATP -binding cassette) (WANNER, 1992; LAMARCHE et al., 2008). Outra proteína do regulon Pho é a PhoU, a qual atua como uma chaperona mediando a interação entre PhoR e PhoB para inibir a ativação de PhoB (desfosforilação) quando o Pi está em excesso (WANNER, 1998). Tem sido descrito que, além da homeostase do fósforo, o regulon Pho está relacionado com a

virulência em muitas bactérias (JACOBSEN et al., 2008; LAMARCHE et al., 2008; CRÉPIN et al., 2011; CHEKABAB; HAREL; DOZOIS, 2014). Recentes estudos de RNA-seq com *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) demonstraram que um dos principais grupos de genes expressos *in vivo* por esta bactéria estava relacionado com o regulon Pho (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). Estes autores demonstraram que além da alta expressão dos genes do regulon Pho, mutações feitas no operon *pstSCAB-phoU* causaram a perda de virulência. Resultados similares foram obtidos com o mutante *pstB* de *Xac* (MOREIRA et al., 2015), embora em nenhum destes estudos foi estabelecido o possível mecanismo de virulência associada ao regulon Pho. Neste aspecto, poucos estudos realizados com mutantes do sistema Pst nas bactérias *Edwardsiella tarda* e *Escherichia coli* demonstraram que o Pi está relacionado com a expressão e secreção de proteínas do T3SS, o que sugere um possível estímulo deste composto na indução da virulência (SRINIVASA RAO et al., 2004; CHAKRABORTY et al., 2011; CHEKABAB; HAREL; DOZOIS, 2014). No caso de *Xanthomonas* (e a maioria das bactérias fitopatógenas), ainda não tem sido descrita a relação entre o Pi e regulação e expressão dos genes do T3SS.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação do fósforo inorgânico (Pi) na ativação e expressão do T3SS em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e propor o possível mecanismo envolvido neste processo.

2. METODOLOGIA

2.1 Estirpes bacterianas e meios de cultura

Todas as estirpes bacterianas utilizadas neste estudo estão listadas na tabela S1. O mutante $\Delta phoR$ de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), isolado 306, foi gerado neste estudo como descrito posteriormente, e o mutante $\Delta ptsB$ foi gerado e confirmado segundo estudos prévios (MOREIRA et al., 2015). As estirpes selvagens e mutantes foram cultivadas em **caldo nutriente** (Difco™ NB—5 g/L peptone and 3 g/L meat extract), **água nutriente** (Difco™ NA—5 g/L peptone and 3 g/L meat extract), **XVM2** (20 mM NaCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0.16 mM KH_2PO_4 , 0.32 mM K_2HPO_4 , 0.01 mM $FeSO_4$, 10 mM fructose, 10 mM sucrose, 0.03% Casamino Acids pH 6.7) , **XAM1** (7.4 mM $(NH_4)_2SO_4$, 32 mM KH_2PO_4 , 64 mM, K_2HPO_4 , 1.6 mM sodium citrate, 10 mM fructose, 10 mM sucrose, 0.03% Casamino Acids , 1 mg/mL BSA, pH 5.4) e **PSY** (6 mM K_2HPO_4 ; 5 mM $MgSO_4$; 1,5 mM $MgSO_4$; 3% de sacarose; 1g/L extrato de levedura). As estirpes de Xac (selvagem e mutante) foram cultivadas nos meios de cultura NB, XVM2 e XAM1 a 28°C, 200 rpm até atingirem $DO_{600} = 0,4$ (aproximadamente 16 horas). Quando necessário foi adicionado fósforo no meio XVM2 nas concentrações de 4,8mM, 24 mM, 48 mM e 96 mM. As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani a 37°C. O antibiótico canamicina foi utilizado numa concentração de 50 µg/mL.

2.1.2 Inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas de citros e exsudação

Xac foi inoculada pelo método de infiltração por pressão, com o uso de uma seringa hipodérmica sem agulha em folhas jovens de laranja doce Pêra Rio e Lima Ácida 'Galego' numa concentração de 10^8 UFC/mL ($OD_{600} = 0.3$). Três plantas de cada variedade foram inoculadas e mantidas em casa de vegetação em condições de

temperatura (28°C) e fotoperíodo controladas (períodos de luz / escuridão de 12 horas). As folhas foram coletadas nos tempos de 48 e 72 horas após a inoculação (hai) e foi realizado um pool de cada tempo a partir das réplicas biológicas. A recuperação das células bacterianas de *Xac* do tecido folhar foi feita por exsudação. Para isso, as folhas foram cortadas em pedaços pequenos com bisturi estéreis e imersas em água gelada (4°C), seguido de agitação por 30 minutos. Os restos foliares foram separados por filtração com gaze e as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 10.000 x *g* por 10 min. O RNA total foi extraído imediatamente, como descrito abaixo.

2.1.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total de pellets bacterianos exsudados de folhas de citros e das bactérias cultivadas nos meios de cultura XAM1, XVM2 e NB foi extraído utilizando o “kit *RNeasy Protect Bacteria Mini*” (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando o fluorômetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen) e o kit *Qubit® RNA BR Assay* (Invitrogen) e, a ausência de DNA nas amostras foi verificada através do kit *Qubit® DNA HS Assay* (Invitrogen). A integridade do RNA total nas amostras foi avaliada através do Bioanalyzer 2100 (*Agilent*) e o kit *RNA 6000 Nano LabChip*. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando 1 µg de RNA total e o kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific) segundo instruções do fabricante.

2.1.4 RNA seq de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

As bibliotecas para o sequenciamento dos mRNAs de *Xac* selvagem em condições *in vivo* (48 e 72 hai) e *in vitro* (≈0,4 DO₆₀₀) foram obtidas com o kit *TruSeq RNA Sample Preparation v2* (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O mRNA foi fragmentado, seguido da síntese da

primeira e segunda fita de cDNA, reparo das extremidades e ligação dos adaptadores. Em seguida foi realizada a etapa de clusterização utilizando o Kit *TruSeq™ SR Cluster Kit v3* (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) e o aparelho cBot (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA). Após o processo de clusterização, os “clusters” presentes na “flow cell” foram sequenciados na Facility de sequenciamento da FCAV/UNESP utilizando a plataforma HiScanSQ System Illumina, seguindo as instruções do fabricante para sequenciamento de fragmentos do tipo *single end* de 50 pb em cada extremidade. No caso da *Xac* cultivada em meio de cultura XVM2 (indutor de genes de patogenicidade) os dados de sequenciamento foram obtidos na base de dados de Gene Expression Omnibus do NCBI (numero de acesso GSE41519) (JALAN et al., 2013).

2.1.5 Análise da expressão de genes

Após o sequenciamento (single-end) de cada amostra (*in vivo* e *in vitro*) as leituras foram submetidas a uma etapa de pré-processamento, onde as seqüências remanescentes de moléculas adaptadoras foram removidas, e as bases das leituras que foram reconhecidas com baixa qualidade foram descartadas. Os programas Scythe v.0.991 ([https:// github.com/ucdavis-bioinformatics/scythe](https://github.com/ucdavis-bioinformatics/scythe)) e CutAdapt v.1.4.1 (cutadapt-1.4.1-goof-1.4.10-Python-2.7.5.eb) foram aplicados na identificação e remoção de resquícios de moléculas adaptadoras (mínimo de 5pb de correspondência com até 1% de erro) e o programa PrinSeq v.0.20.3 (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) foi aplicado na identificação e remoção de bases de baixa qualidade (< Q25). Por fim, as leituras sem o tamanho mínimo de 15pb ou com mais de 80% de bases não reconhecidas (Ns) são filtradas com o programa PrinSeq. As leituras de alta qualidade foram mapeadas sobre o genoma de *Xac* utilizando Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) por meio da ferramenta EDGE-Pro v.1.3.1 (MAGOC; WOOD; SALZBERG, 2013) sem alteração nos parâmetros originais. O programa EDGE-Pro fornece as contagens normalizadas em RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) para cada gene. Os cálculos de variação

da expressão gênica nas diferentes condições experimentais foram realizados com o pacote R DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

2.1.6 qRT-PCR

A validação de RNA-seq e a expressão relativa dos genes nas diferentes condições (*in vivo* e *in vitro*) foram realizadas por real-time quantitative PCR (qRT-PCR) usando o kit Master Mix SYBR green (Applied Biosystems) e seguindo as especificações do fabricante. As reações foram feitas no aparelho 7500 Software V.2.0.6. (Applied Biosystems) e os dados obtidos foram analisados pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram analisadas três réplicas biológicas para as condições *in vitro* e um pool (três réplicas biológicas) para condição *in vivo*. Os genes *atpD*, *gyrB* e *rpoB* foram utilizados como endógenos (JACOB et al., 2014). Todos os primers usados estão listados na tabela S2.

2.1.7 Geração do mutante $\Delta phoR$

Para a obtenção do mutante $\Delta phoR$ foi utilizada a estratégia de mutagênese sítio dirigida por PCR (LEE et al., 2004). Para isso, o cosmídeo IGF07 da biblioteca de Xac 306 (DA SILVA et al., 2002) do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO-Brasil) foi utilizado como molde. A primeira etapa para a construção do mutante envolveu duas reações de PCR independentes utilizando os pares de iniciadores denominados A/B e C/D, sendo que os iniciadores B e C possuem uma cauda complementar entre si (ver tabela S2). Os produtos AB e CD foram utilizados como molde em uma segunda reação de PCR utilizando os iniciadores A e D, que resulta em um único fragmento (AD) que corresponde à fusão dos fragmentos AB e CD através da cauda complementar dos iniciadores B e C (Figura S1). Isso resulta na deleção total do ORF XAC1041 (Figura S1). Posteriormente, o fragmento AD e o vetor

suicida pNPTS138 foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição (EcoRI e BamHI) e ligados. O vetor resultante pNPTS138- Δ phoR foi inserido através de transformação em bactérias *Xac* eletrocompetentes para a deleção do gene *phoR* por recombinação homóloga. A confirmação do mutante Δ phoR foi realizada através de PCR e sequenciamento.

2.1.8 Curva de crescimento *in vivo*

Suspensões bacterianas de *Xac* selvagem e mutante (10^6 UFC/mL) foram inoculadas através de infiltração por pressão, com o uso de uma seringa hipodérmica sem agulha. As inoculações foram feitas em quatro pontos por folha. Foram utilizadas três plantas de laranja doce Pêra Rio (repetição biológica) e inoculadas 20 folhas por planta. As folhas inoculadas foram coletadas aos 0, 1, 6, 10, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI). Quatro discos foliares com 1 cm^2 foram recuperados do ponto de inoculação de cada espécie para cada tempo de coleta. Posteriormente, o tecido vegetal foi macerado em 1 mL de tampão fosfato estéril (0,1 M, pH 7,0) e diluições seriadas foram feitas. Alíquotas de 50 μL de cada diluição foram plaqueadas em meio NA e as colônias bacterianas foram contadas depois de 72 horas de incubação a 28°C .

2.1.9 Curva de crescimento *in vitro*

A preparação dos inóculos foi realizada através do cultivo das bactérias (selvagem e mutantes) em meio de cultura sólido NA a 29°C por 48 horas. Após este período, três colônias isoladas (replica biológica) foram transferidas para 5 mL de meio de cultura líquido NB e a amostra foi mantida a 29°C , por 16 horas, a 180 rpm. Em seguida, as amostras foram ajustadas para uma concentração de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} igual a 0,3) através da adição de meio de cultura líquido NB fresco. Após diluição, 500 μL da suspensão bacteriana foram então inoculados em 50 mL de meio de cultura líquido NB, sendo os frascos mantidos a 29°C , a 180 rpm, durante os

tempos de coleta que foram de 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 horas após a inoculação (hai). Posteriormente, foi medida a DO_{600} em cada uma das amostras coletadas.

2.3 Formação de Biofilme e teste de Autoagregação

A formação de biofilme nas estirpes selvagens (*Xac*) e mutantes (Δ phoR e Δ pstB) foi determinada usando a metodologia descrita por Zimaro *et al.* (2014), com algumas modificações. As bactérias foram cultivadas em meio NA e mantidas a 28°C por 48 horas. Posteriormente, 5 colônias isoladas (replica biológica) foram transferidas separadamente para 5 ml de meio de cultura XVM2 e mantidas sob agitação até atingir uma DO_{600} de 0.3 (10^8 UFC/mL). Após esse período, os inóculos foram diluídos para uma concentração de 10^6 UFC/mL, e 1 mL destas suspensões foram transferidas para tubos de ensaio de borosilicato estéreis de 10 mL e mantidos sem agitação por 48 horas a 28°C. O biofilme formado nos tubos foi visualizado por coloração com 0,1% de cristal violeta por 10 minutos, seguido de duas lavagens com 1 mL de água estéril. As células fixadas com o corante foram dissolvidas em 1 mL de etanol a 95% e quantificadas por espectrofotometria a 590nm (DO_{590nm}).

Para avaliar a autoagregação das bactérias, isolados de *Xac* (selvagem e mutantes) foram cultivadas 16 horas a 28° C em de meio de cultura PSY. Posteriormente, a DO foi ajustada para 2 e as amostras foram transferidas para tubos de borosilicato estéreis de 20 mL. Para avaliar a autoagregação, alíquotas do sobrenadante (200 µL) foram recuperadas a cada 12 horas para determinar a densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}), por um período de 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado bacteriano.

2.3.1 Modelagem molecular

As estruturas tridimensionais das proteínas PhoR, PhoB e HrpG foram geradas no servidor on-line Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>). Na proteína PhoR, foi modelada a porção citoplasmática (201-447) e no caso das proteínas PhoB (3-122) e HrpG (8-122) a região “receptora”. Estas regiões são as que estabelecem interações proteína-proteína durante o processo de fosforilação no TCS. As estruturas tridimensionais do PDB (Protein Data Bank) utilizadas como molde para modelar a PhoR, PhoB e HrpG foram respectivamente 4JAS, ZIYN.1A e 3FFW1. Estas proteínas foram selecionadas de acordo com o ranking estabelecido por Swiss-model baseado na porcentagem de similaridade com as proteínas PhoR (33, 48%), PhoB (56,87%) e HrpG (21, 05 %).

A qualidade estéreo-química dos modelos gerados foi avaliada pelas análises dos gráficos de Ramachadran usando o servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). As interações proteína-proteína foram determinadas por sobreposição tridimensional das proteínas (PhoR, PhoB e HrpG) com a estrutura cristalina do TCS de *Thermotoga maritima* Hk853- RR468 (código PDB: 4JAS). Esta estrutura (4JAS) apresenta três substituições (mutações) dentro da HK853 e quatro no RR468, que são específicos para as interações do TCS PhoR/PhoB de *E. coli* (PODGORNAIA; LAUB, 2013). O programa utilizado para a visualização gráfica de todas as estruturas tridimensionais foi PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

3. RESULTADOS

3.1 Análise de RNA-Seq revela a relação entre a expressão dos genes do T3SS e o regulon Pho em *Xac* em condições *in vivo* e *in vitro*

Em bactérias fitopatogênicas o mecanismo pelo qual o Pi ativa a expressão do T3SS ainda não tem sido muito explorado. Análises globais prévias do transcriptoma de *Xac*, sugerem a hipótese de que o Pi pode ter um papel importante na regulação e expressão de genes do T3SS e servir como uma sinal externo indutor de virulência nesta bactéria (Ver capítulo 2). Para testar essa hipótese, um conjunto de 45 genes do T3SS e 17 do regulon Pho foram avaliados com relação a sua expressão a partir dos dados de RNA-seq de *Xac* em condições *in vitro* e *in vivo*. Para as condições *in vivo* foram utilizadas as variedades Lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) e Laranja doce ‘Pera Rio’ (*Citrus sinensis*), e no caso das condições *in vitro* os meios XAM1 (93 mM de Pi) e XVM2 (0,48 mM de Pi). Uma repressão dos genes do T3SS e do regulon Pho foi observada na *Xac* quando inoculada no meio XAM1, o que contrasta, com a indução apresentada por esses genes no meio XVM2 e nas folhas das plantas citricas (Figura 1). Estes mesmos resultados foram observados nas validações feitas por qRT-PCR (Figura 2S).

Na figura 1, verificou-se que os resultados das análises transcricionais se relacionam muito bem com os estudos de proteômica realizados na *Xac* em condições similares (FACINCANI et al., 2014; MOREIRA et al., 2015). Esses estudos detectaram um baixo número de proteínas relacionadas com o T3SS e o regulon Pho na *Xac* inoculada no meio de cultura XAM1, quando comparada com as condições *in vivo* (Figura 1). Esse conjunto de dados sugere que o alto conteúdo de Pi presente no meio XAM1 (93 mM de Pi) tem um efeito negativo na transcrição dos genes do T3SS e do regulon Pho na *Xac*.

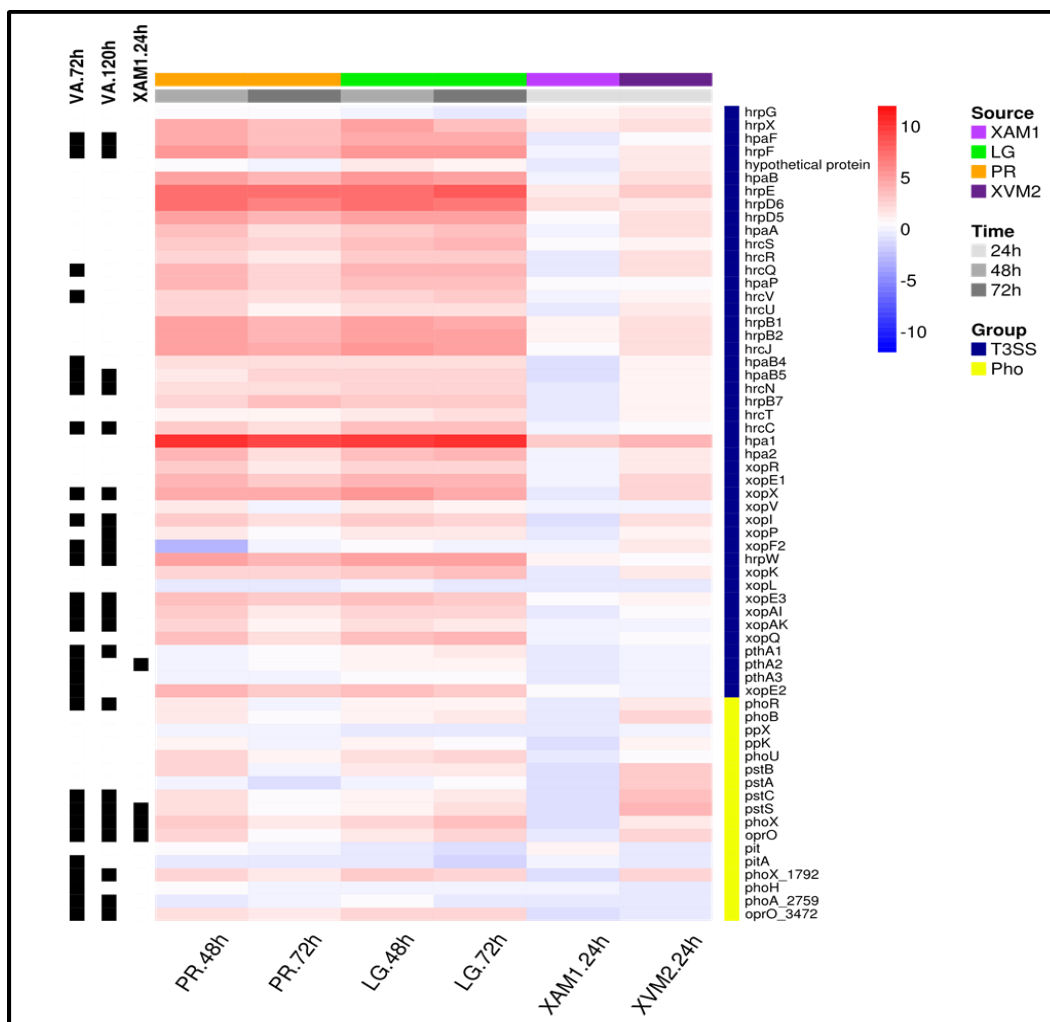


Figura. 1 Padrões de expressão diferencial dos genes e proteínas do T3SS e do regulon Pho em *Xac* em condições *in vivo* e *in vitro*. No mapa de calor cada linha horizontal representa um único gene e a cor indica o nível de expressão relativa em cada condição avaliada (colunas). Altos níveis de expressão são representados em vermelho e baixos níveis de expressão são representados em azul. A escala de cor dos níveis de expressão genética está representada como o log2 Foldchange. Os genes do T3SS e do regulon Pho estão agrupados por blocos e representados por cor azul escuro e amarelo respectivamente. No painel da esquerda estão indicadas em cor preta as proteínas do T3SS e do regulon Pho que têm sido detectadas em *Xac* através de estudos de proteômica *in vivo* (*Citrus sinensis*) e *in vitro* (meio XAM1). As proteínas do T3SS e do regulon Pho foram obtidas dos trabalhos de Facincani *et al.* (2014) e Moreira *et al.* (2015), respectivamente. LG= Lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*), PR= Laranja doce 'Pera Rio' (*Citrus sinensis*), VA= Laranja doce 'Valencia' (*Citrus sinensis* L. OSBECK).

3.2 A repressão do T3SS está relacionada com as concentrações de Pi extracelular

O Pi não é o único componente que diferencia os meios XAM1(93 mM de Pi) e XVM2 (0,48 mM de Pi) e, por esta razão, decidiu-se testar o efeito deste composto no meio XVM2. Este experimento foi realizado para garantir que as diferenças observadas nas análises de RNA-Seq são devido às concentrações de Pi e não a outros componentes. Para isso, foram avaliadas quatro concentrações diferentes de Pi no meio XVM2: 4,8 mM, 24 mM, 48 mM e 96 mM para determinar sua relação com a expressão dos genes T3SS. Como apresentado na Figura 2, o Pi teve um efeito significativo ($p < 0,01$) na repressão dos genes do T3SS e do regulon Pho na *Xac*. Este mesmo efeito foi observado na *Xac* cultivada em meio XAM1 e é consistente com os observados a partir das análises de RNA-seq (Figura1). É interessante ver como o Pi afeta a expressão do gene *hrpG*, o qual é considerado o regulador máster do T3SS (Figura 2). Neste aspecto, foram realizadas análises de bioinformática com o objetivo de estabelecer possíveis sítios de ligação do regulador PhoB (principal regulador do regulon Pho) sobre a região promotora do gene *hrpG*, entretanto os resultados obtidos não foram conclusivos (dados não mostrados). Também é possível observar nestes resultados como as concentrações de Pi de 4,8 mM, 24 mM, 48mM e 96 mM possuem um efeito similar com relação à expressão dos genes do T3SS e do regulon Pho na *Xac*, o que sugere uma possível saturação por Pi em concentrações $\geq 4,8$ mM. Estes resultados mostram de forma geral que concentrações saturantes de Pi ($\approx \geq 4,8$ mM) têm um efeito significativo na repressão dos genes do T3SS e do regulon Pho em *Xac*, além de sugerir que o Pi pode ser um dos possíveis sinais captados pela bactéria para iniciar o processo infeccioso.

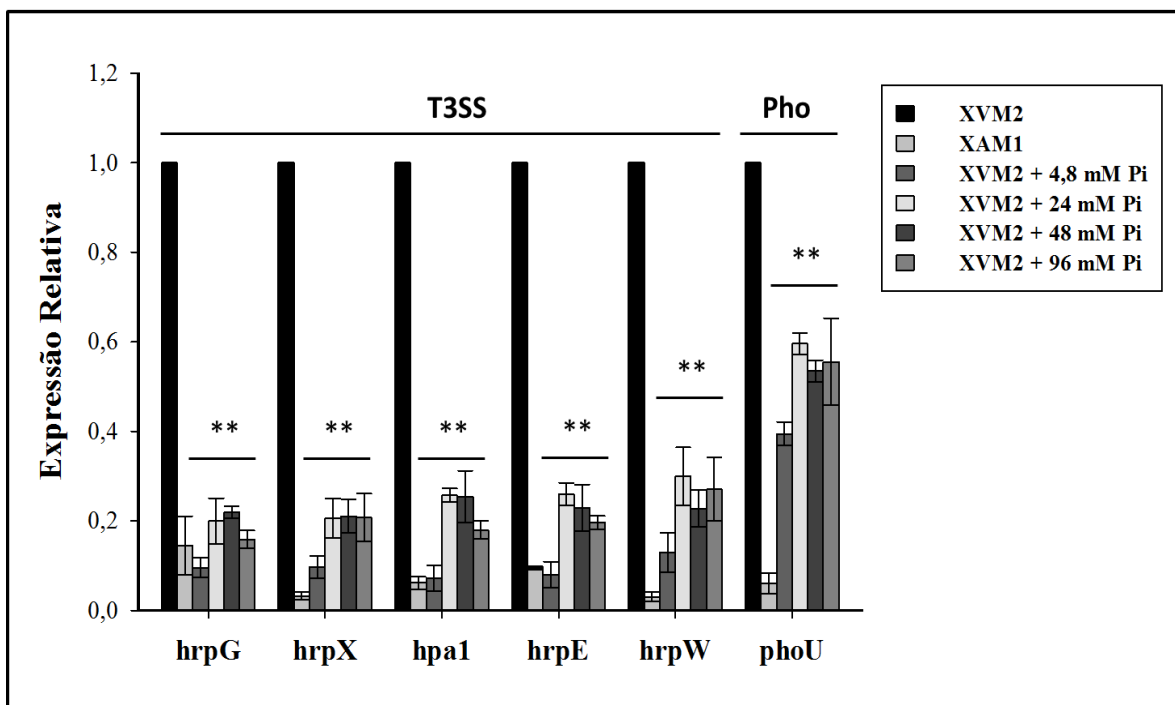


Figura. 2 Efeito da concentração do Pi sobre a expressão de genes do T3SS em *Xac*. O efeito da concentração do Pi foi determinado em *Xac* inoculada em meio XVM2 suplementado com Pi nas concentrações indicadas, e no meio XAM1 (93 mM de Pi). Os asteriscos representam uma significância estatística de $p < 0,01$ em relação ao controle (*Xac* inoculada em meio XVM2) segundo o teste de Tukey. Os valores representam o desvio padrão de três réplicas biológicas.

3.3 O regulon Pho tem um importante papel na virulência de *Xac*

Para avaliar o efeito do regulon Pho sobre a virulência de *Xac* foram utilizados os mutantes *phoR* (HK sensora de Pi) e *pstB* (ATPase do sistema pst). O $\Delta phoR$ foi obtido pela estratégia de mutagênese sítio dirigida por PCR (Figura S1) (LEE et al., 2004) e o $\Delta pstB$ por mutagênese randômica utilizando o transposon EZ-Tn5 (MOREIRA et al., 2015). Estes mutantes apresentaram uma significativa redução nos sintomas da doença, tanto em plantas tolerantes (*C. sinensis*) quanto em plantas suscetíveis (*C. aurantifolia*) (Figura 3A).

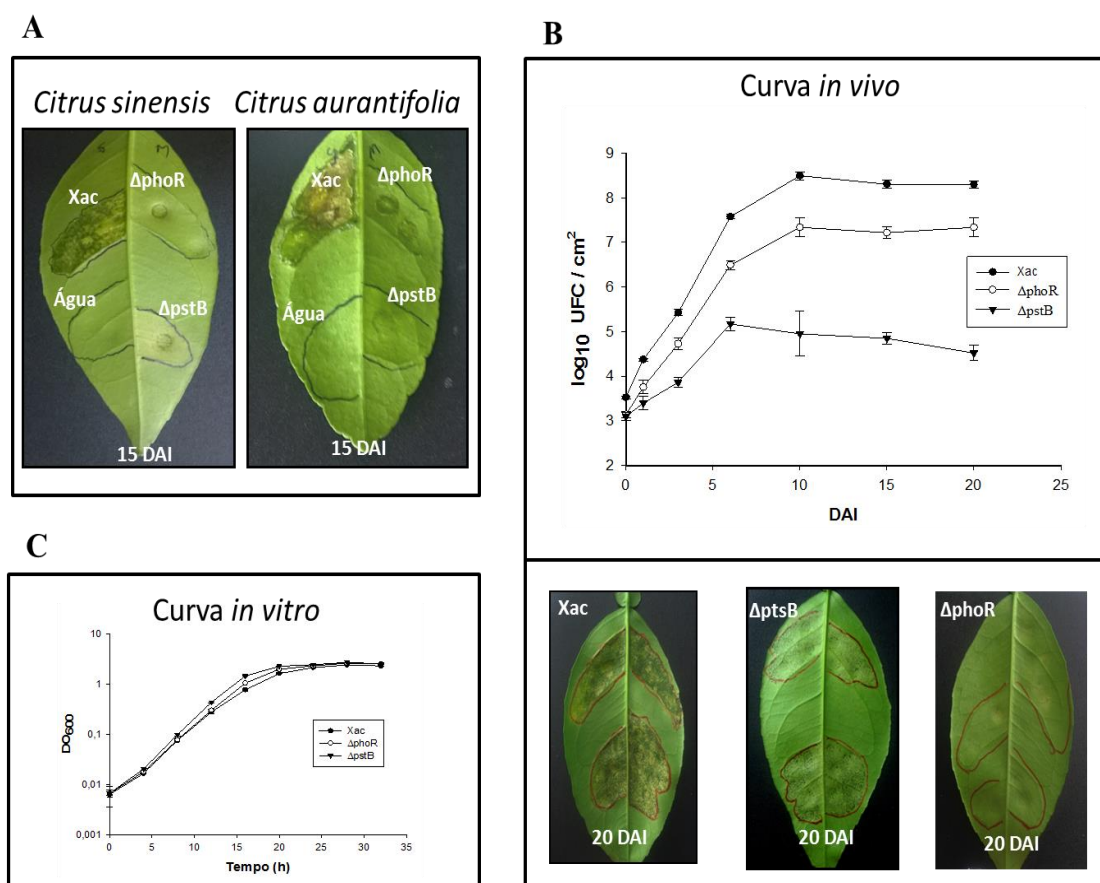


Figura 3. Efeito do regulon Pho na virulência de Xac. (A) Teste de patogenicidade. Xac selvagem e mutantes foram inoculadas em folhas de laranja doce ‘Pera Rio’ (*Citrus sinensis*) (tolerante) e Lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) (suscetível) numa concentração de 10^8 UFC/ ml. (B) Curva de crescimento *in vivo*. No painel acima mostra-se a curva de crescimento da Xac selvagem e dos mutantes em folhas de laranja doce Pera Rio’ (*Citrus sinensis*) (tolerante). No painel inferior mostra-se uma fotografia representativa dos sintomas presentes em folhas de laranja doce ‘Pera Rio’ inoculadas com Xac, $\Delta phoB$ e $\Delta phoR$ no dia 20 da curva de crescimento. (C) curva de crescimento *in vitro* de Xac selvagem e mutantes em meio NB. Os valores em B e C representam o desvio padrão de três réplicas biológicas.

A análise das curvas de crescimento *in vivo* da Xac selvagem e mutante ($\Delta phoR$ e $\Delta pstB$) indicam claramente o efeito dessas mutações na virulência da bactéria (Figura 3B). Estes resultados também mostram que as mutações nos genes *phoR* e *pstB* não alteram o crescimento de Xac em meio de cultura NB (Figura 3C), sugerindo que essas mutações não são auxotróficas. Curvas de crescimento dos mutantes *phoR* e *pstB*,

também foram realizadas no meio de cultura XVM2 com resultados similares (dados não mostrados). Estes resultados mostram que o regulon Pho além de estar envolvido na captação do Pi extracelular, tem uma relação direta com a virulência da *Xac*.

3.4 O regulon Pho afeta a formação de biofilme e a autoagregação

A formação de biofilme e a autoagregação são características importantes relacionadas com a virulência nas bactérias, e desempenham um papel fundamental no estabelecimento das interações patógeno-hospedeiro (DANHORN; FUQUA, 2007; GAO et al., 2015). Devido a sua importância, essas características foram avaliadas nos mutantes *phoR* e *pstB* de *Xac*. No caso da formação de biofilme, a *Xac* selvagem e os mutantes foram cultivados em meio XVM2, e o biofilme formado após 48 horas foi visualizado com cristal violeta e quantificado por espectrofotometria a 590nm (DO590nm). Na figura 4A pode-se observar uma redução significativa na formação de biofilme nos mutantes *phoR* ($p < 0,05$) e *pstB* ($p < 0,01$) quando comparados com o selvagem. Quanto às análises de autoagregação, estas foram realizadas em meio PSY e medições da turbidez das bactérias (selvagem e mutantes) foram feitas a cada 12 horas após terem atingido $DO_{600} = 2$. Na figura 4B pode-se observar uma lenta associação entre os mutantes ($DO_{\text{mutantes}} > DO_{\text{selvagem}}$) com relação à *Xac* selvagem nos tempos de 12 e 24 horas com uma significância estatística de $p < 0,01$. A aparência turva dos tubos com os mutantes revela que as células ainda permanecem dispersas (Figura 4B). Esses resultados sugerem que a redução na formação de biofilme e na autoagregação dos mutantes pode estar relacionada com a perda de virulência em *Xac*.

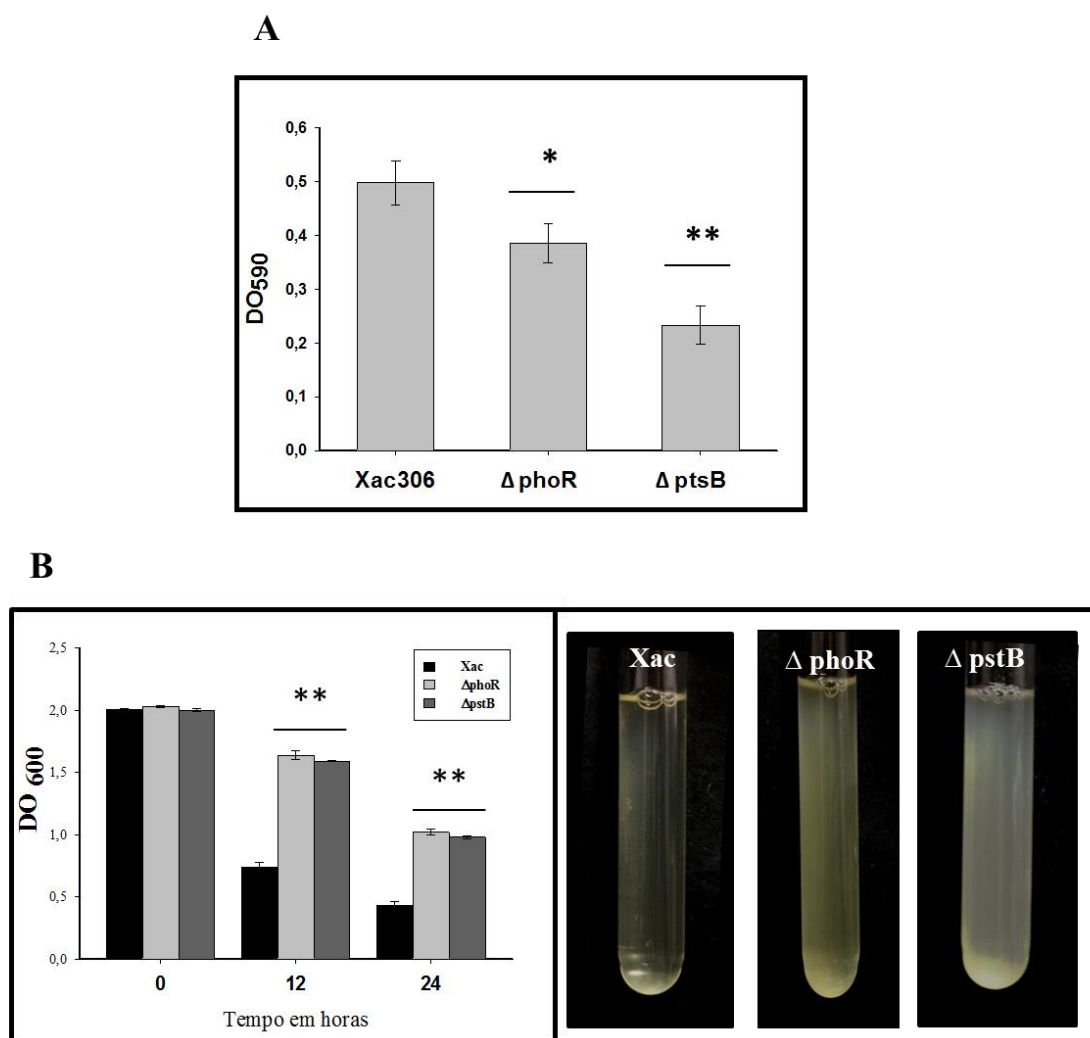


Figura. 4 Formação de biofilme e auto-agregação em Xac selvagem e mutantes. (A) Formação e quantificação de biofilme em tubos de borossilicato. (B) No painel da esquerda apresenta-se a quantificação da auto-agregação medida por espectrofotometria (DO₆₀₀) durante os tempos de 12 e 24 horas. No painel da direita apresenta-se a visualização da turbidez das bactérias selvagens e mutantes após 24 horas. Um asterisco (*) representa significância estatística de $p < 0,05$ e dois asteriscos (**), significância de $p < 0,01$ segundo o teste de Tukey. Os valores representam o desvio padrão das réplicas biológicas.

3.5 O regulon Pho afeta a virulência da *Xac* principalmente através da regulação do T3SS

Poucos estudos reportados na literatura com bactérias patógenas de animais têm demonstrado que o Pi regula a expressão dos genes do T3SS (SRINIVASA RAO et al., 2004; CHAKRABORTY et al., 2011; CHEKABAB et al., 2014). No caso de *Xac* (e bactérias fitopatogênicas em geral) a relação entre o Pi e o T3SS ainda é pouco explorada. Neste sentido, análises de qRT-PCR foram realizadas para avaliar a relação entre a perda de virulência dos mutantes *phoR* e *pstB* e a expressão dos genes do T3SS. Inicialmente avaliou-se a expressão dos principais reguladores do T3SS (*hrpG* e *hrpX*) com o intuito de verificar se as mutações de *phoR* e *pstB* estariam atuando no início da cascata reguladora como foi observado pelo efeito do Pi (Figura 2). As análises de expressão gênica dos mutantes foram realizadas em meio XVM2 e XVM2 + 4,8 mM de Pi. Os resultados experimentais reforçam nossa hipótese ao confirmar que o nível de expressão de *hrpX* foi significativamente reprimido ($p < 0,01$) nos mutantes *phoR* e *pstB* quando comparado com o selvagem, tanto na ausência de Pi como na sua presença (Figura 5A). Entretanto, o gene *hrpG* não apresentou mudanças significativas ($p < 0,01$) para nenhum dos mutantes avaliados nas duas condições de Pi testadas (Figura 5A). Estes resultados contrastam com os observados na *Xac* selvagem, onde o gene *hrpG* foi significativamente reprimido ($p < 0,01$) na presença de Pi (Figura 5A). Os genes *hpa1* e *hrpW*, que são regulados via *hrpX*, também apresentaram uma repressão significativa nos mutantes quando comparados com a bactéria selvagem, tanto em presença como na ausência do Pi (Figura 5B). Corrobora-se como um efeito na regulação de *hrpX* pode afetar a cascata de eventos que acontecem na ativação dos genes do T3SS, como já tem sido demonstrado em mutantes desse gene em *Xac* (GUO et al., 2011). Interessantemente, o gene *phoU* apresentou uma super-expressão nos mutantes *phoR* e *pstB* no meio XVM2 (Figura 5C) com um perfil de expressão similar ao do gene *hrpG* (Figura 5A).

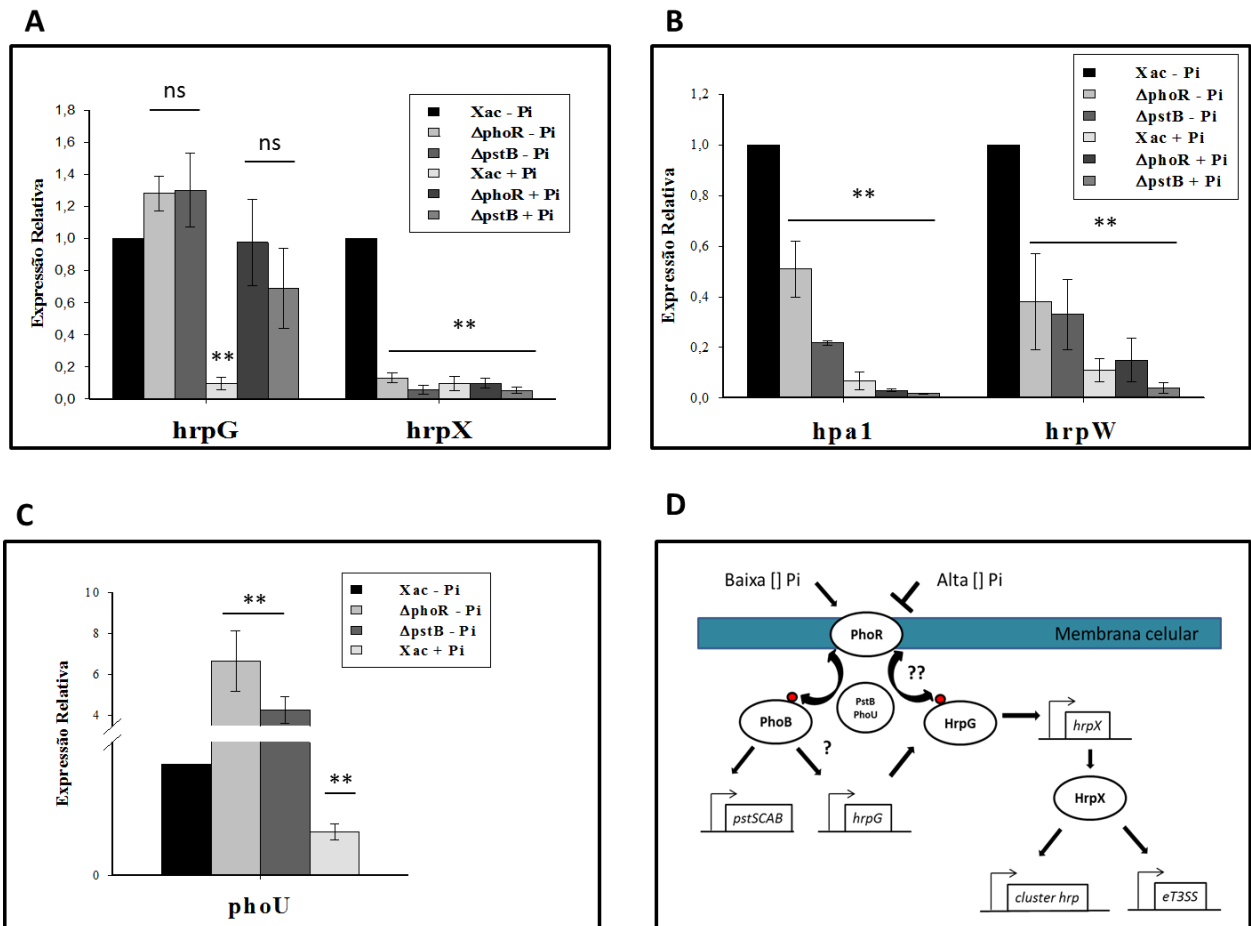


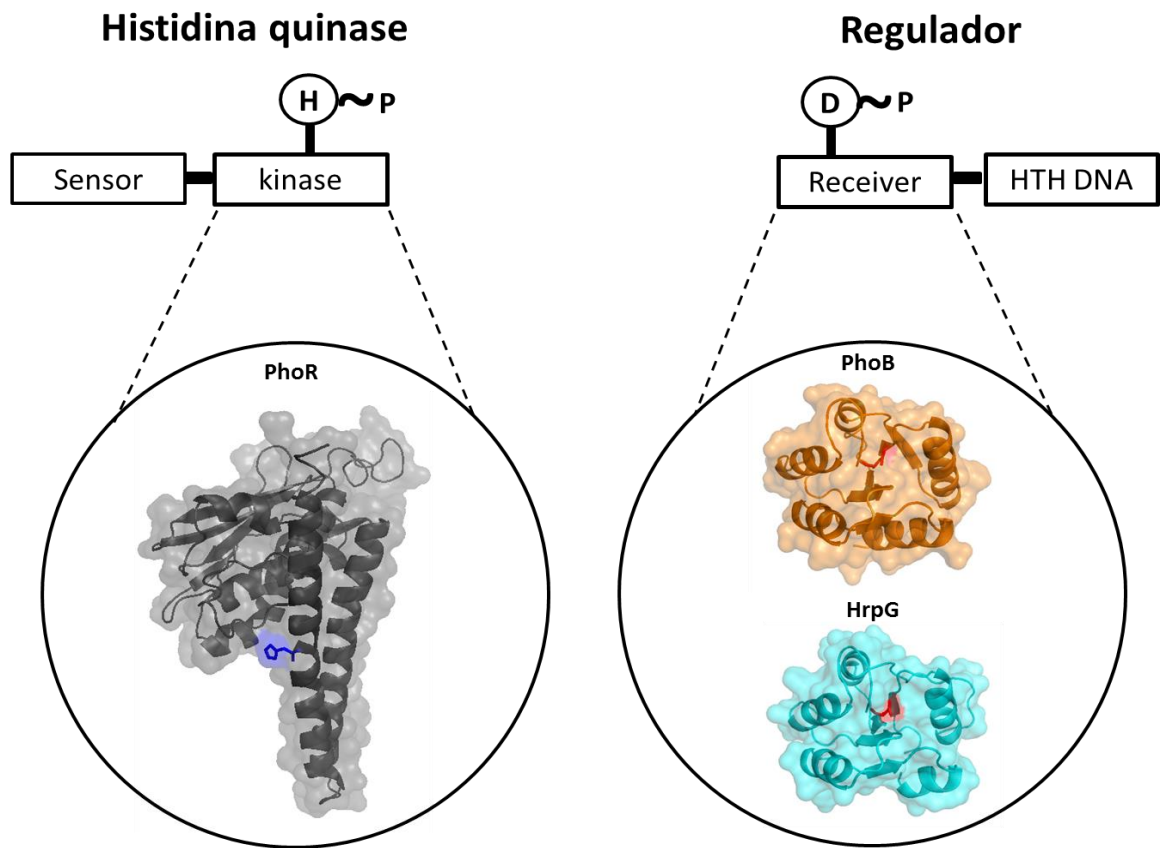
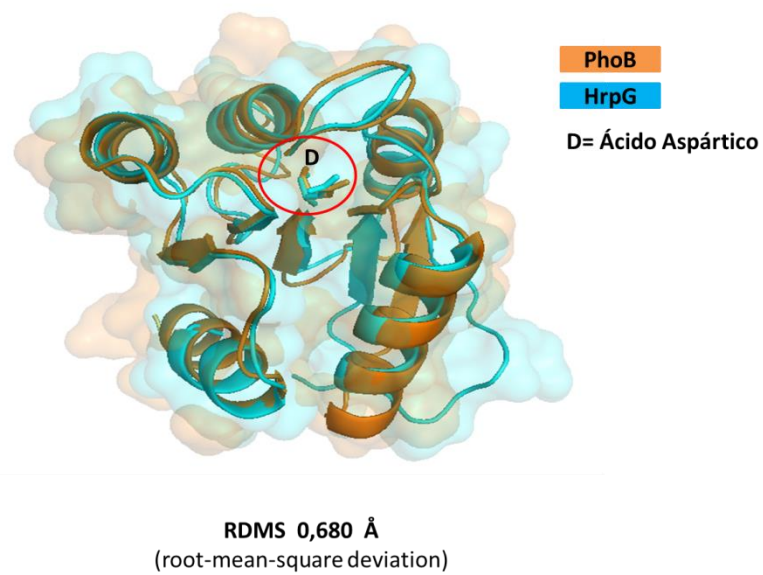
Figura 5. Efeito da concentração do Pi sobre a expressão de genes do T3SS e do regulon Pho nos mutantes *phoR* e *pstB*. (A) Expressão dos genes reguladores do T3SS *hrpG* e *hrpX*. (B) Expressão dos genes *hpa1* e *hrpW*. (C) Expressão do gene *phoU*. A Xac selvagem e mutantes foram cultivadas em meio XVM2 sem adição de Pi (-) com adição de 4,8 mM de Pi (+). Os asteriscos representam uma significância estatística de $p > 0,01$ em relação ao controle (Xac inoculada em meio XVM2) segundo o teste de Tukey. Os valores representam o desvio padrão de três réplicas biológicas. (D) Modelo ilustrativo que mostra a regulação do T3SS e o regulon Pho pelo TCS PhoR/PhoB. Em presença de baixas concentrações de Pi extracelular PhoR fosforila o PhoB ativando-o. PhoB fosforilado inicia a expressão do operon *pstSCAB-phoU* e *hrpG*, este último de forma direta ou indireta através de um mecanismo desconhecido (?). Uma vez que o gene *hrpG* é traduzido (HrpG) é provavelmente fosforilado (??) por PhoR, elevando a expressão de *hrpX* e dos genes do cluster *hrp* e dos efetores do T3SS (eT3SS). Em presença de altas concentrações de Pi extracelular, PhoR desfosforila o gene PhoB e o HrpG inativando-os, ficando reprimida a expressão do operon *pstSCAB-phoU* e dos genes do T3SS. Os dois processos (fosforilação e desfosforilação) no TCS PhoR/PhoB precisam da interação das proteínas PstB e PhoU (GARDNER et al., 2014, 2015).

No entanto, o gene *phoU* apresentou uma repressão significativa na *Xac* selvagem em presença de Pi (Figura 5C). Estes dados sugerem uma ativação constitutiva de PhoB nos mutantes *phoR* e *pstB*, como já tem sido observado em outros estudos de mutantes bacterianos do regulon Pho (BERTRAND et al., 2010). Neste sentido, a proteína PhoB ativa (fosforilada) nos mutantes *phoR* e *pstB* estaria envolvida na expressão do gene *hrpG* (direta ou indiretamente) o que levaria a sua expressão. No entanto, apesar da expressão de *hrpG*, não foi possível observar uma expressão de *hrpX* o que supõe que a proteína HrpG não está sendo fosforilada por sua HK “parceira”. Esses resultados sugerem que o TCS PhoR/PhoB poderia estar regulando o T3SS via expressão e fosforilação de HrpG, como se indica no modelo da figura 5D.

3.6 Modelagem molecular de PhoB e HrpG sugerem possível fosforilação por PhoR

A regulação cruzada entre diferentes TCS já tem sido reportada em bactérias (ZHOU et al., 2005; LAUB; GOULIAN, 2007). Nossos resultados sugerem que a regulação do T3SS envolve uma possível expressão e fosforilação do regulador HrpG mediada pelo TCS PhoR/PhoB em *Xac* (Figura 5D). Para avaliar nossa hipótese, foi realizada uma modelagem molecular das proteínas PhoR, PhoB e HrpG de *Xac* utilizando o servidor on-line Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>). O intuito dessa modelagem foi estabelecer possíveis sítios de interação proteína-proteína que pudessem esclarecer o processo de fosforilação entre PhoR /PhoB e PhoR /HrpG, assim como o possível grau de similaridade entre as proteínas PhoB e HrpG de *Xac*. Para isso, a região citosólica da proteína PhoR (201- 447) e a região “receptora” das proteínas PhoB (3-122) e HrpG (8-122) foram modeladas devido a essas regiões estarem envolvidas no processo de fosforilação. Na figura 6A encontram-se os modelos obtidos para cada uma das proteínas avaliadas.

A avaliação da qualidade estereoquímica desses modelos pelas análises de Ramachadran no servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), revelou 93,8 %, 94,9% e 92,1% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis para PhoR, PhoB e HrpG, respectivamente. Esses dados mostram que os modelos estabelecidos para as proteínas PhoR, PhoB e HrpG são de boa qualidade (> 90% de resíduos em regiões favoráveis). Na figura 6 B, verifica-se o alinhamento tridimensional dos modelos de PhoB e HrpG com um valor de 0,68Å de RMSD (*root-mean-square deviation*), indicando a semelhança estrutural que existe entre elas (quanto menor o valor RDMS, maior é a semelhança). Estes dados podem explicar o fato de uma possível fosforilação de HrpG (similar estruturalmente a PhoB) por PhoR. Posteriormente, foi utilizada como molde para simular as interações PhoR/PhoB e PhoR/HrpG a estrutura tridimensional do TCS de *Thermotoga maritima* Hk853-RR468 (código PDB: 4JAS) (PODGORNAIA; LAUB, 2013). Os resultados para as interações PhoR/PhoB e PhoR/HrpG estão ilustradas na Figura 6C. Nesses modelos, também é possível observar que os resíduos histidina (H) de PhoR e o resíduo de ácido aspártico (D) de PhoB e HrpG estão muito próximos. Esses resíduos estão envolvidos no processo de fosforilação. Estes resultados mostram, de forma geral, uma possível fosforilação de HrpG por PhoR.

A**B**

C

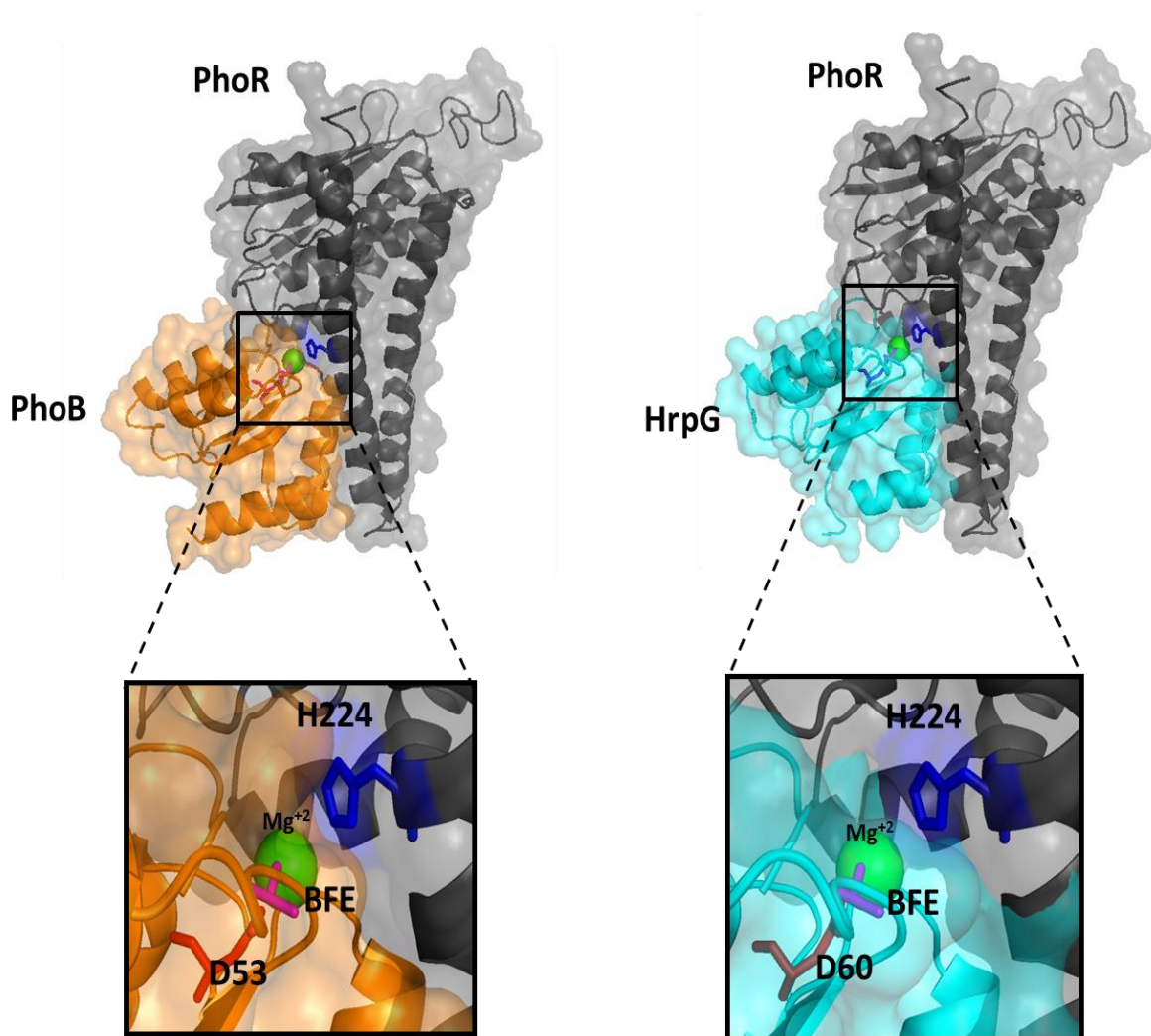


Figura. 6 Modelagem molecular das proteínas PhoR, PhoB e HrpG de Xac. (A) Regiões modeladas em PhoR, PhoB e HrpG que estão envolvidas no processo de fosforilação. (B) Alinhamento estrutural entre PhoB e HrpG. (C) Interações proteína-proteína entre PhoR/PhoB e PhoR/HrpG mostrando em forma ampliada os resíduos de histidina e ácido aspártico que participam do processo de fosforilação. H=histidina, D=ácido aspártico, Mg^{+2} = Íon magnésio e BFE= Íon Trifloreto de berílio.

4. DISCUSSÃO

O Sistema de dois componente PhoR/PhoB controla a expressão do regulon Pho nas bactérias em resposta às concentrações de Pi presentes no ambiente. A relação entre o regulon Pho e a virulência das bactérias tem sido identificada em muitos casos (LAMARCHE et al., 2008). No entanto, os poucos estudos realizados principalmente com patógenos de animais, relacionam o regulon Pho com a regulação dos genes do T3SS (SRINIVASA RAO et al., 2004; CHAKRABORTY et al., 2011; CHEKABAB et al., 2014). Neste estudo, foi possível demonstrar em *Xac* a relação existente entre o Pi e a expressão dos genes do T3SS via regulação PhoR/PhoB.

Neste estudo, a partir das análises de RNA-seq foi observada uma relação direta entre a expressão dos genes do regulon Pho e o T3SS em *Xac* (tanto na presença de Pi, quanto na sua ausência) (Figura 1). Análises de microarranjos realizados com estirpes selvagens e mutantes do gene *phoB* de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) mostraram também uma relação entre o Pi e a expressão dos genes da ilha de patogenicidade LEE (Locus of Enterocyte Effacement) portadora dos genes do T3SS (CHEKABAB et al., 2014). Também tem sido reportado na bactéria *Edwardsiella tarda*, que genes do regulon Pho (operon *pstSCAB-phoU* e TCS *phoR/phoB*), estão envolvidos na regulação de genes do T3SS (CHAKRABORTY et al., 2011). Estes autores também demonstraram por ensaios de Western Blot que as altas concentrações de Pi no meio de cultura (20 mM de Pi) diminuíem o conteúdo total de proteínas secretadas pelo T3SS. Neste sentido, estudos recentes do secretoma de *Xac* em meio de cultura XAM1, não apontaram a presença de proteínas do T3SS, isto ,devido provavelmente ao efeito das concentrações de Pi presentes no meio (FERREIRA et al., 2016). Todos estes resultados se relacionam muito bem com os obtidos em estudos de proteômica realizados em *Xac* em condições *in vivo* (*Citrus sinensis* variedade Valência) e *in vitro* (XAM1), onde se reporta um baixo número de proteínas do T3SS e do regulon Pho no meio de cultura XAM1 (Figura 1) (FACINCANI

et al., 2014; MOREIRA et al., 2015). Todos estes dados sugerem que o regulon Pho, além de estar envolvido no transporte do fósforo, tem um papel importante na virulência da bactéria *Xac*.

No presente trabalho, foi observado também o efeito das concentrações do Pi sobre a expressão dos genes do T3SS e do regulon Pho de *Xac* no meio XVM2 através de ensaios de qRT-PCR (Figura 2). Estes resultados sugeriram que concentrações de Pi $\geq 4,8$ mM têm um efeito significativo na repressão dos genes do T3SS e do regulon Pho em *Xac*. É interessante observar que estes resultados também mostram um efeito do Pi no início da cascata de sinalização do T3SS, ao regular a expressão do regulador máster *hrpG*. Neste aspecto, estudos feitos na bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens* demonstraram que o gene *virG* (ortólogo de *hrpG*) é regulado positivamente em concentrações limitantes de Pi (WINANS, 1990). O gene *virG* codifica uma proteína da família OmpR/PhoB que regula o regulon *vir* envolvido na virulência de *A. tumefaciens* (WINANS, 1990; MARTÍNEZ-HACKERT; STOCK, 1997). Outros estudos, realizados com o fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*, têm demonstrado que o gene *hrpG* é transcrito (expresso), traduzido (proteína HrpG) e ativado (HrpG fosforilada) por múltiplos sinais ambientais (YOSHIMUCHI et al., 2009). Neste sentido, tem sido demonstrado na bactéria *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo) que níveis baixos de Ca^{+2} e Mg^{+2} induzem a expressão do gene *hrpG* via TCS PhoQ/PhoP (LEE et al., 2008). Infere-se a partir destes dados que uma complexa rede regulatória pode estar envolvida na expressão e ativação de *hrpG*, integrando múltiplas vias e sinais ambientais.

O papel do regulon Pho na virulência de *Xac* foi demonstrado com os mutantes *phoR* e *pstB*. Estes mutantes levaram a uma redução na sintomatologia quando inoculados em planta cítricas (*Citrus sinensis* e *C. aurantifolia*), assim como, uma diminuição na população bacteriana no espaço intracelular das folhas de citros (Figura 3A, B). Resultados similares foram reportados recentemente na bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), agente causal da pústula bacteriana da soja, na qual mutações feitas no operon *pstSCAB-phoU* causaram a perda de virulência na bactéria (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; STEVEN, 2016). Entretanto, os autores não

descrevem o possível mecanismo envolvido na perda de virulência nestes mutantes (operon *pstSCAB-phoU*), e sugerem a realização de estudos futuros para determiná-lo. Uma possível explicação para estes resultados seria a redução na formação de biofilme, na auto agregação e, principalmente a repressão dos genes do T3SS, mecanismos que foram observados nos mutantes *phoR* e *pstB* de *Xac* em nosso trabalho (Figura 4 e 5). Alguns estudos já têm mostrado a relação entre o regulon Pho e a formação de biofilme. Por exemplo, no patógeno de plantas *A. tumefaciens* o TCS PhoR/PhoB está relacionado com a indução de grandes quantidade de biofilme em condições limitantes de Pi (DANHORN et al., 2004; XU et al., 2012). Mutantes dos genes do Pst em bactérias colonizadoras da rizosfera *Pseudomonas aerofaciens* e *Pseudomonas fluorescens*, também apresentaram redução na formação de biofilme (MONDS; SILBY; KHRIS MAHANTY, 2001). Além disso, na bactéria *E. coli*, o regulon Pho parece estar relacionado com o quórum sensing (REN et al., 2004), um mecanismo chave na regulação da formação de biofilme (PARSEK; GREENBERG, 2005). Ademais, é interessante observar como o regulon Pho, a formação de biofilme, a autoagregação e a expressão de genes do T3SS estão correlacionadas. Neste aspecto, estudos realizados na bactéria *E. tarda* mostraram como mutantes do operon *pstSCAB-phoU* apresentaram baixa formação de biofilme, autoagregação e secreção de efetores do T3SS (SRINIVASA RAO et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado na bactéria *E. tarda* que a formação de biofilme e o fenômeno de autoagregação eram devidos à proteína EseB, um componente do T3SS nesta bactéria (GAO et al., 2015). A contribuição do T3SS na formação do biofilme e autoagregação também tem sido reportada em *Xac* 306 (ZIMARO et al., 2014), *Erwinia chrysanthemi* (YAP et al., 2005), *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) (IDESES et al., 2005) e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (JENNINGS et al., 2012). Também tem sido mostrado a partir de estudos de transcriptoma em *Xac* que *hrpG* está relacionado com a formação de biofilme via repressão de *rpfG* (GUO et al., 2011). A proteína RpfG tem atividade c-di-GMP fosfodisterase, que diminui os níveis do segundo mensageiro di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP). Assim, quando ela está reprimida pela ação de HrpG se favorece o acúmulo de altos níveis de c-di-GMP promovendo a formação de biofilme

(GUO et al., 2011). Assim, todos estes resultados podem explicar porque as mutações realizadas nos genes *phoR* e *pstB* de *Xac* alteraram a expressão dos genes do T3SS (Figura 5A; B), a formação de biofilme e autoagregação (Figura 4A; B) levando a perda de virulência da bactéria (Figura 3A; B). Portanto, os resultados deste trabalho sugerem que, o TCS PhoR/PhoB regula o T3SS via expressão e fosforilação de HrpG (Figura 5D). Sendo HrpG um regulador de resposta órfã, é possível que sua atividade seja modulada por múltiplas vias de sinalização como foi mencionado acima. O fenômeno de regulação cruzada entre diferentes TCS já tem sido reportada em bactérias (ZHOU et al., 2005; LAUB; GOULIAN, 2007), o que explicaria a fosforilação de HrpG em condições limitantes de Pi por PhoR. Neste sentido, os resultados obtidos a partir da modelagem molecular sugeriram uma estrutura semelhante entre PhoB e HrpG, assim como, uma possível interação proteína-proteína entre PhoR e HrpG (figura 6B, C). Esses resultados reforçam a hipótese de que o T3SS estaria sendo regulado via PhoR/HrpG pelo Pi ambiental. No entanto, outras interações proteína-proteína podem ser necessárias para os processos de fosforilação e desfosforilação do complexo PhoR/HrpG como já tem sido mostrado em *E. coli* com o complexo PhoR/PhoB (GARDNER et al., 2014, 2015). Um modelo da regulação e expressão do T3SS via PhoR/PhoB de *Xac*, assim como, possíveis vias alternativas envolvidas nesse processo (biofilme e autoagregação) , está apresentado na Figura 7.

Em resumo, os dados apresentados neste estudo mostram o efeito do Pi na expressão do T3SS, e seu possível mecanismo de regulação via TCS PhoR/PhoB na bactéria *Xac*, fornecendo, desta forma, um maior entendimento das complexas vias de sinalização envolvidas na ativação dos mecanismos de virulência em *Xac*, assim como, os tipos de sinais captados pela bactéria para dar início ao processo infeccioso.

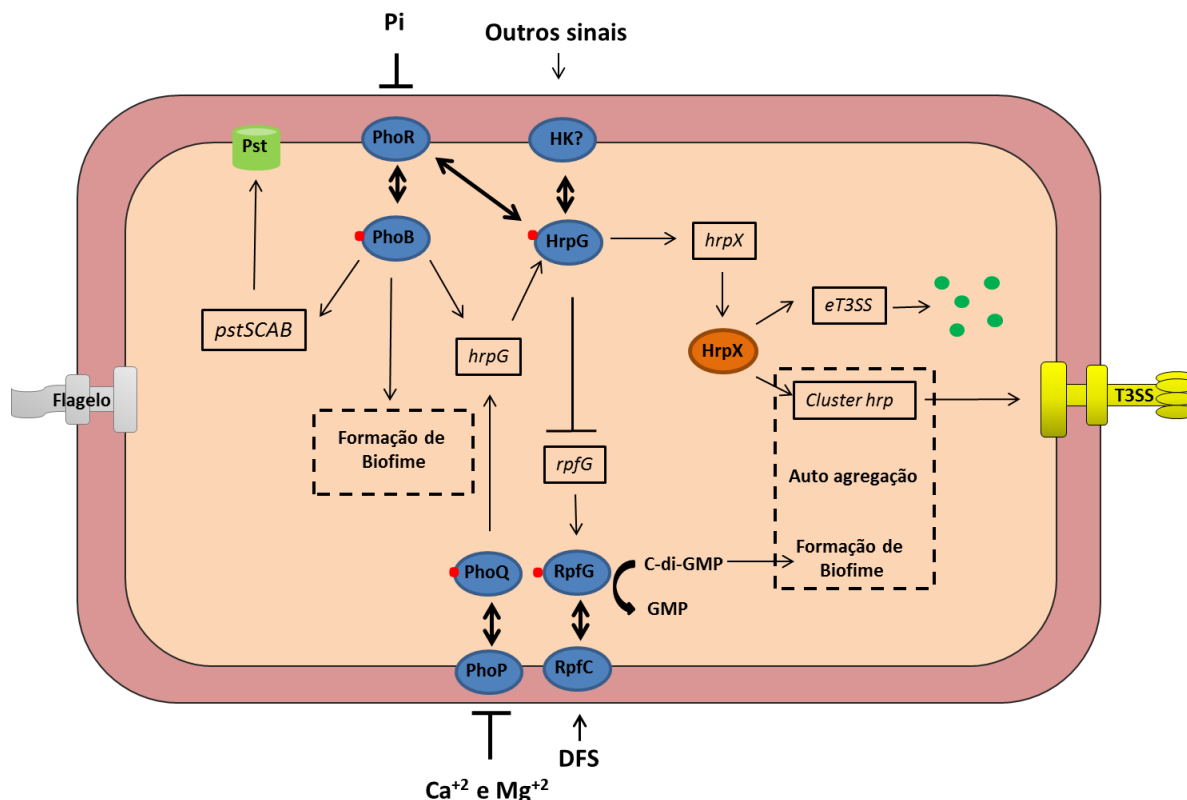


Figura 7. Representação esquemática que correlaciona as vias regulatórias do regulon Pho, T3SS, formação de biofilme e autoagregação em *Xac306*. As baixas concentrações de Pi , Mg^{+2} e Ca^{+2} ativam a expressão do gene *hrpG* via $PhoR/PhoB$ e $PhoP/PhoQ$. Posteriormente o gene *hrpG* é traduzido e ativado provavelmente pela fosforilação de $PhoR$ e outras Histidina Kinasas ($HK?$). $HrpG$ (ativada) leva a expressão do gene *hrpX* que uma vez traduzido expressa os genes do *cluster hrp* e dos *eT3SS*. $HrpG$ também pode regular negativamente a expressão do gene *rpfG*, favorecendo a presença de altos níveis de cyclic-di-GMP e promovendo a formação de biofilme. A formação de biofilme também poder ser regulada via $RpfC/RpfG$ na presença de DSF (Diffusible Signal Molecules) e através de $PhoR/PhoB$. A caixa com linha pontilhada representa a relação entre o T3SS, autoagregação e a formação de biofilme observado em *Xac 306* (Zimaro *et al.*, 2014). As caixas representam genes, os círculos azuis representam proteínas dos Sistemas de Dois Componentes (TCS) e o círculo laranja representa uma proteína reguladora da família AraC. As setas em duas direções representam processos de fosforilação ou desfosforilação e o ponto vermelho sobre os reguladores de resposta do TCS representa o grupo fosfato. c-di-GMP= di-guanosina monofosfato cíclico e GMP= guanosina monofosfato.

5. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste estudo demonstram, pela primeira vez, que a concentração de Pi regula a expressão do T3SS da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*). Esta regulação é dependente do sistema de dois componentes PhoR/PhoB, o qual poderia modular a expressão de *hrpX* via ativação de *hrpG*.

Mutação nos genes *phoR* e *pstB* diminui a formação de biofilme, a autoagregação e a virulência de *Xac*.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que o Pi pode ser um dos principais sinais ambientais captados pela *Xac* para dar início ao processo infeccioso no hospedeiro citros.

6. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Tabela S1. Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo

Estirpe e plasmídeos	Característica	Referência
Xac 306	<i>X. axonopodispv. citri</i> strain 306; wild type Rif ^r	(DA SILVA et al., 2002)
Xac 306 Δ phoR	Mutante phoR derivado da cepa Xac306	Este estudo
Xac 306 Δ ptsB	pstB EZ-Tn5 derivado da cepa Xac306	(MOREIRA et al., 2015)
<i>E.coli</i> DH10B	Δ (<i>mcrA</i> , <i>mcrBC</i> , <i>mrr</i> , A1 and <i>hsdRMS</i>), <i>pir</i> ⁺ , <i>lacZ</i> para screening	Invitrogen
Cosmídeo IGF07	Biblioteca de Xac 306 , Km ^r	(DA SILVA et al., 2002)
pNPTS138	Vector suicida, Km ^r	Addgene
pNPTS138- Δ phoR	pNPTS138 contendo a deleção phoR, Km ^r	Este estudo

Tabla S2 Lista de primers utilizados

Primer	Sequência 5' - 3'
Mutagênese	
A	GAC <u>GAATTC</u> GGACAACACCGACGACAGG
B	AAGCCACCC TATGTAGTC AGTGCGCGC
C	GACTACATA GGGTGGCTT TGCGGCACG
D	CGC <u>GGATCC</u> ATTGCCGGCTCTTCACGG
qRT-PCR	
atpD_F	CGGCGCACCGTCGTAT
atpD_R	CCGGTTTCCAGCAATTCG
gyrB_F	CGTCCCGGCATGTATTCG
gyrB_R	ACCACCTCGAACACATGTGA
rpoB_F	GGATTCCTATCGCGAATTCCT
rpoB_R	TGTAGCTGGAAATCGGGAACA
hrpG_F	CGGCAAGCCGATCGTATT
hrpG_R	GAAAAGAGCAGCCAGGCAAT
hrpX_F	GCCTACAGCTACATGATCACCAAT
hrpX_R	TGCGGCCACTTCGTTGA
hrpA1_F	GCAGCAGGCCGGTCAGT
hrpA1_R	TTCATCAGCATCTGGGTGTATTG
hrpE_F	ACGAGGCCCCAGAAGTCCAT
hrpE_R	CCACGTTGAAGTCCAGATCATTT
hrpW_F	GGCGGACACACCGACATC
hrpW_R	TGCCTTTCAGGGTGGAGTCTT
phoU_F	GCTGCTCACCTACATGATGGAA
phoU_R	TCCAGATTCTTTGCCATGAACA

No primer A, a região em negrito e sublinhada corresponde ao sítio de restrição de EcoRI e no primer D ao sítio de restrição BamHI. Nos primers B e C as regiões, grifadas em amarelo e verde são regiões complementares

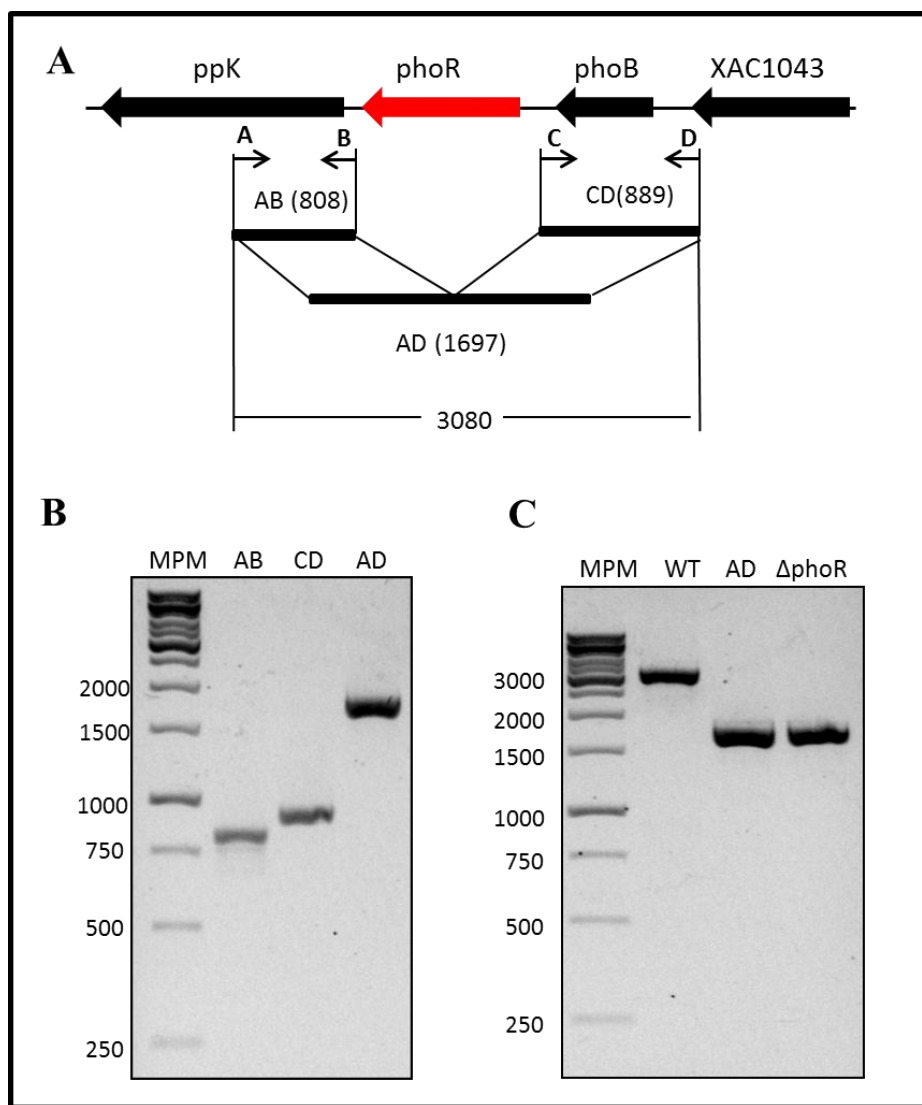


Figura S1 Representação da construção do mutante *phoR* por deleção. (A) Diagrama esquemático do gene *phoR* no genoma de *Xac* representado em cor vermelha. As setas com letras A, B, C e D representam os primers utilizados para a amplificação dos fragmentos AB e CD com tamanhos de 808 pb e 889 pb respectivamente. O fragmento AD selvagem apresenta um tamanho de 3080 pb e a versão AD deletada (sem o gene *phoR*) um tamanho de 1697 pb. (B) Géis de eletroforese em agarose (1%) com os fragmentos AB, CD e AD (deletado). O fragmento AD (deletado) foi clonado no vector suicida pNPTS138 e células electrocompetentes de *Xac* foram transformadas para realizar a mutação por recombinação homóloga. (C) Géis de eletroforese em agarose com os fragmentos AD (WT), AD (deletado) e o mutante *phoR*.

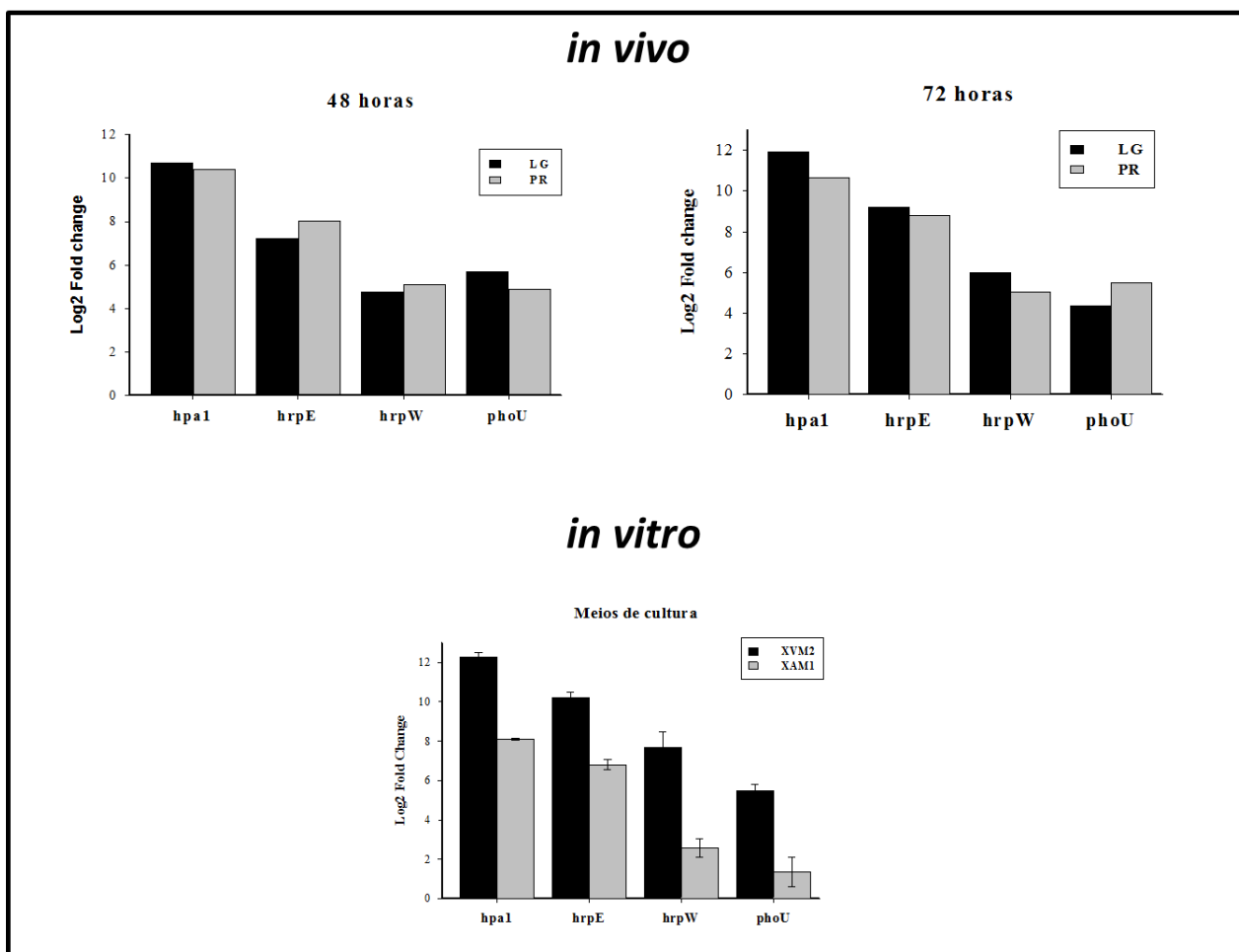


Figura S2 Validação dos genes do T3SS e do regulon Pho da Xac por qRT-PCR nas condições *in vivo* e *in vitro*. LG= Lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) , PR= Laranja doce ‘Pera Rio’ (*Citrus sinensis*).

6. REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, M. C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C. H. I.; SILVA, A. C. R.; FARAH, C. S. New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates of the Type III Secretion System of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6186–6197, 2004.
- BERTRAND, N.; HOULE, S.; LEBIHAN, G.; POIRIER, Éd.; DOZOIS, C. M.; HAREL, J. Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5324–5331, 2010.
- BOCH, J.; BONAS, U. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors : Discovery and Function. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 419–436, 2010.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 141–157, 2003.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 107–33, mar. 2010.
- BÜTTNER, D.; HE, S. Y. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant physiology**, v. 150, n. 4, p. 1656–64, ago. 2009.
- CHAKRABORTY, S.; SIVARAMAN, J.; LEUNG, K. Y.; MOK, Y. K. Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control virulence genes in type III and VI secretion systems of *Edwardsiella tarda*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 39417–39430, 2011.
- CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; STEVEN, L. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2016.
- CHEKABAB, S. M.; HAREL, J.; DOZOIS, C. M. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. **Virulence**, v. 5, n. April, p. 786–93, 2014.
- CHEKABAB, S. M.; JUBELIN, G.; DOZOIS, C. M.; HAREL, J. PhoB activates *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in response to inorganic phosphate limitation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

CRÉPIN, S.; CHEKABAB, S. M.; LE BIHAN, G.; BERTRAND, N.; DOZOIS, C. M.; HAREL, J. **The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*** *Veterinary Microbiology*, 2011.

DA SILVA, a C. R.; FERRO, J. a; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. a; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, a M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. a; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, a J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, a; KATSUYAMA, a M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. a; MADEIRA, a M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. a; ROSSI, a; SENA, J. a D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. a F.; TAKITA, M. a; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–63, 23 2002.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 401–422, 2007.

DANHORN, T.; HENTZER, M.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R.; FUQUA, C. Phosphorus Limitation Enhances Bio lm Formation of the Plant Pathogen. **Society**, v. 186, n. 14, p. 4492–4501, 2004.

FACINCANI, A. P.; MOREIRA, L. M.; SOARES, M. R.; FERREIRA, C. B.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. a; GOZZO, F. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F. 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**, v. 14, n. 1, p. 205–17, 2014.

FENSELAU, S.; BONAS, U. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 8, n. 6, p. 845–854, 1995.

FERREIRA, R. M.; MOREIRA, L. M.; FERRO, J. a; SOARES, M. R. R.; LAIA, M. L.; VARANI, A. M.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, M. I. T. Unravelling potential virulence factor candidates in *Xanthomonas citri* . subsp. *citri* by secretome analysis. **PeerJ**, v. 4, n. April, p. e1734, 2016.

GAO, Z. P.; NIE, P.; LU, J. F.; LIU, L. Y.; XIAO, T. Y.; LIU, W.; LIU, J. S.; XIE, H. X. Type III secretion system translocon component EseB forms filaments on and mediates autoaggregation of and biofilm formation by *Edwardsiella tarda*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 17, p. 6078–6087, 2015.

GARDNER, S. G.; JOHNS, K. D.; TANNER, R.; MCCLEARY, W. R. The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 9, p. 1741–1752, 2014.

GARDNER, S. G.; MILLER, J. B.; DEAN, T.; ROBINSON, T.; ERICKSON, M.; RIDGE, P. G.; MCCLEARY, W. R. Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in *Escherichia coli*. **BMC genetics**, v. 16 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S2, 2015.

GOTTWALD, T. R.; PIERCE, F.; GRAHAM, J. H. Citrus Canker : The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress. **Plant Management Network**, v. 1993, n. August, 2002.

GRAHAM, J. H.; R., G. T.; CUBERO, J.; DIANN S., A. *Xanthomonas axonopodis* pv . citri : factors affecting successful. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

GUO, Y.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX Play Global Roles in Coordinating Different Virulence Traits of *Xanthomonas axonopodis* pv . citri. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649–661, 2011.

GÜRLEBECK, D.; THIEME, F.; BONAS, U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 3, p. 233–55, 2006.

HSIEH, Y.; WANNER, B. Global regulation by the seven-component P i signaling system. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 2, p. 198–203, 2010.

IDESSES, D.; GOPHNA, U.; PAITAN, Y.; CHAUDHURI, R. R.; PALLAN, M. J.; RON, E. Z. A Degenerate Type III Secretion System from Septicemic *Escherichia coli* Contributes to Pathogenesis A Degenerate Type III Secretion System from Septicemic *Escherichia coli* Contributes to Pathogenesis. **Society**, v. 187, n. 23, p. 8164–8171, 2005.

JACOB, T. R.; LAIA, M. L. De; MOREIRA, L. M.; GONÇALVES, J. F.; MARIA, F.; CARVALHO, D. S.; INÊS, M.; FERRO, T.; FERRO, J. A. Type IV Secretion System Is Not Involved in Infection Process in Citrus. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

JACOBSEN, S. M.; LANE, M. C.; HARRO, J. M.; SHIRTLIFF, M. E.; MOBLEY, H. L. T. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 180–193, 2008.

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

JENNINGS, M. E.; QUICK, L. N.; UBOL, N.; SHROM, S.; DOLLAHON, N.; WILSON, J. W. Characterization of salmonella type III secretion hyper-activity which results in biofilm-like cell aggregation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

LAMARCHE, M. G.; WANNER, B. L.; CRÉPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 461–473, 2008.

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

LAUB, M. T.; GOULIAN, M. Specificity in two-component signal transduction pathways. **Annu Rev Genet**, v. 41, p. 121–145, 2007.

LEE, J.; LEE, H. J.; SHIN, M. K.; RYU, W. S. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **BioTechniques**, v. 36, n. 3, p. 398–400, 2004.

LEE, S. W.; JEONG, K. S.; HAN, S. W.; LEE, S. E.; PHEE, B. K.; HAHN, T. R.; RONALD, P. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 6, p. 2183–2197, 2008.

LI, R.-F.; LU, G.-T.; LI, L.; SU, H.-Z.; FENG, G.; CHEN, Y.; HE, Y.-Q.; JIANG, B.-L.; TANG, D.-J.; TANG, J.-L. Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the hrp genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2053–71, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, p. 550, 2014.

MAGOC, T.; WOOD, D.; SALZBERG, S. L. EDGE-pro: Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 9, p. 127–36, 2013. MARTÍNEZ-HACKERT, E.; STOCK, a M. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. **Journal of molecular biology**, v. 269, p. 301–312, 1997.

MONDS, R. D.; SILBY, M. W.; KHRIS MAHANTY, H. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 415–426, 2001.

MOREIRA, L. M.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, C. B.; FERREIRA, R. M.; FERRO, M. I. T.; GOZZO, F. C.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; SOARES, M. R. Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. **Functional and Integrative Genomics**, v. 15, p. 197–210, 2015.

NOEL, L.; THIEME, F.; NENNSTIEL, D.; BONAS, U. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 1271–1281, set. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2001.02567.x>>.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. **Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms** *Trends in Microbiology*, 2005.

PODGORNAIA, A. I.; LAUB, M. T. Determinants of specificity in two-component signal transduction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 156–162, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.004>>.

QIAN, W.; HAN, Z.-J.; HE, C. Two-Component Signal Transduction Systems of *Xanthomonas* spp.: A Lesson from genomics. **Molecular plant-microbe interaction**, v. 21, n. 2, p. 151–161, 2008.

REN, D.; BEDZYK, L. A.; YE, R. W.; THOMAS, S. M.; WOOD, T. K. Stationary-Phase Quorum-Sensing Signals Affect Autoinducer-2 and Gene Expression in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2038–2043, 2004.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, p. 863–864, 2011.

SCHULTE, R.; BONAS, U. A *Xanthomonas* Pathogenicity Locus Is Induced by Sucrose and Sulfur-Containing Amino Acids. **The Plant cell**, v. 4, n. January, p. 79–86, 1992.

SRINIVASA RAO, P. S.; YAMADA, Y.; YUEN, P. T.; KA, Y. L. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 573–586, 2004.

TSUGE, S.; NAKAYAMA, T.; TERASHIMA, S.; OCHIAI, H.; FURUTANI, A.; OKU, T.; TSUNO, K.; KUBO, Y.; KAKU, H. Gene involved in transcriptional activation of the hrp regulatory gene hrpG in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 4158–4162, 2006.

WANNER, B. L. Is Cross Regulation by Phosphorylation of Two-Component Response Regulator Proteins Important in Bacteria ? t Uptake pathways. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 7, p. 2053–2058, 1992.

WANNER, B. L. Phosphate Signaling and the Control of Gene Expression in *Escherichia coli*. In: **Metal Ions in Gene Regulation**. [s.l: s.n.]p. 104–128.

WENGELNIK, K.; ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. Hrp, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 9, n. 8, p. 704–712, 1996.

WINANS, S. C. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 5, p. 2433–2438, 1990.

XU, J.; KIM, J.; DANHORN, T.; MERRITT, P. M.; FUQUA, C. Phosphorus limitation increases attachment in *Agrobacterium tumefaciens* and reveals a conditional functional redundancy in adhesin biosynthesis. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 0, p. 674–684, 2012.

YAP, M.; YANG, C.; BARAK, J. D.; JAHN, E.; CHARKOWSKI, A. O.; JAHN, C. E. The *Erwinia chrysanthemi* Type III Secretion System Is Required for Multicellular Behavior The *Erwinia chrysanthemi* Type III Secretion System Is Required for Multicellular Behavior. **Journal Of Bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 639–648, 2005.

YOSHIMUCHI, T.; ZHANG, Y.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; OHNISHI, K. Expression of hrpG and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 196–204, 2009.

ZHOU, L.; GRÉGORI, G.; BLACKMAN, J. M.; ROBINSON, J. P.; WANNER, B. L. Stochastic activation of the response regulator PhoB by noncognate histidine kinases. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 2, p. 111–24, 2005.

ZIMARO, T.; THOMAS, L.; MARONDEDZE, C.; SGRO, G. G.; GAROFALO, C. G.; FICARRA, F. a; GEHRING, C.; OTTADO, J.; GOTTIG, N. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC microbiology**, v. 14, p. 96, 2014.