

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO DE TANGERINA
SATSUMA (*Citrus unshiu*) E LARANJA DOCE HAMLIN
(*Citrus sinensis*) INFECTADAS COM *Xanthomonas citri*
subsp. *citri*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO**

Mayara Mari Murata

Engenheira Agrônoma

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO DE TANGERINA
SATSUMA (*Citrus unshiu*) E LARANJA DOCE HAMLIN
(*Citrus sinensis*) INFECTADAS COM *Xanthomonas citri*
subsp. *citri*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO**

Mayara Mari Murata

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Dr. Rui Pereira Leite Júnior

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

2013

Murata, Mayara Mari
M972t Transcriptoma da interação de tangerina Satsuma (*Citrus unshiu*) e laranja doce Hamlin (*Citrus sinensis*) infectadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico / Mayara Mari Murata. -- Jaboticabal, 2013
x, 182 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Coorientador: Rui Pereira Leite Júnior
Banca examinadora: Alessandro de Mello Varani, José Belasque Júnior
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. RNA-Seq. 3. Interação Planta-Patógeno. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.23:634.322

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Mayara Mari Murata – Nascida em Londrina (PR) no dia 13 de agosto de 1988. Concluiu a graduação em Agronomia em 2011 no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina - UEL. No ano de 2009, a aluna participou do programa de mobilidade acadêmica BRAFAGRI/CAPES e desenvolveu parte dos estudos no “Institut de Régions Chaudes” em Montpellier, França, por um período de sete meses. Em 2011, a aluna ingressou no Mestrado do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. O mestrado foi desenvolvido com bolsa da CAPES por 12 meses e com bolsa da FAPESP por outros 12 meses. O trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, do Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP, e coorientação do Dr. Rui Pereira Leite Júnior, do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR.

Dedico mais esta etapa vencida...

*Aos meus pais, Emília e Nilton por
tudo que representam em minha vida,
por sempre acreditarem em mim e pelo
amor incondicional.*

Dedico com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos e me dar forças para concluir mais esta etapa de minha vida com êxito;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela orientação e por sempre exigir o melhor. Obrigada por todos os ensinamentos científicos compartilhados e, principalmente, pelos ensinamentos de vida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Dr. Rui Pereira Leite Júnior pela confiança, pelo incentivo e pela colaboração em todas as etapas de minha vida acadêmica;

Ao Dr. José Belasque Júnior por ser um grande incentivador deste projeto e por contribuir significativamente com seus conhecimentos. Agradeço seu espírito otimista e agradeço também por todo apoio durante estes anos;

À Profa. Dra. Maria Inês por administrar o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) e por sempre prezar pelo bom andamento dos experimentos e pela qualidade dos trabalhos desenvolvidos;

Aos bioinformatas Dr. Roberto Herai e Dr. Adriano Ferrasa pelas análises de bioinformática e pelo suporte. Um agradecimento especial ao Dr. Roberto Herai pela disponibilidade e paciência nos esclarecimentos das dúvidas. A distância física não impediu fazer de você um dos pesquisadores mais presentes deste projeto;

Às funcionárias do Centro de Recursos Biológicos e Genômicos (CREBIO), Agda, Mariza, Fátima, Lúcia e Renata pelo acolhimento e pelo bom convívio durante as análises dos resultados. Em especial, agradeço a bioinformata Msc. Renata Tezza pela grande ajuda e por todo suporte técnico durante esta etapa crucial do trabalho;

Ao Prof. Dr. Alessandro Varani pela contribuição durante a anotação gênica e a categorização dos genes. Agradeço também aos direcionamentos científicos que contribuíram para o bom andamento do trabalho;

À funcionária Camila Fernandes, pelo trabalho técnico da construção das bibliotecas de cDNA e pelo sequenciamento das amostras;

Aos membros do trio RNA-Seq e queridas amigas, Juliana Cavallini e Teresa Cofre por estes dois anos e meio de convívio diário. Aprendi com vocês o verdadeiro significado do trabalho em equipe; aprendi a aceitar as diferenças e, o mais importante, aprendi amá-las. E como eu disse uma vez, mesmo com tantos motivos para tristezas, nossos momentos foram quase todos de alegrias. Este trabalho também é de vocês;

Aos estagiários, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos do LBM, Aline, Ana, Lúcia, Juliana Vantini, Karina, Larissa, Miguel, Gustavo (Vurto), Raquel, Flávia Carvalho, Juan, Sônia, Rafael, Mariane, Gustavo e Nayara pela colaboração direta e indireta no andamento deste trabalho e pelo agradável convívio durante estes anos, e em especial, às amigas Agda, Claudênia, Elaine, Flávia Campos e Lucília pela amizade e pelos momentos de descontração;

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Tecnologia que contribuíram durante o desenvolvimento do trabalho com o empréstimo de material e equipamentos. Em especial, agradeço ao laboratório do Prof. João Pizauro e da Profa. Eliana Lemos;

À minha amada mãe Emília, que mesmo distante, conseguiu ser tão presente na minha vida. Você, com toda certeza, é a minha maior incentivadora e sem a ajuda não conseguiria chegar até aqui. Você é meu exemplo de vida e obrigada por me ensinar tudo o que sou;

Ao meu pai Nilton por não ter poupado esforços pela minha educação. Obrigada por compartilhar comigo com alegria cada conquista alcançada;

À minha querida irmã Maisa pela amizade e pelo amor que compartilhamos com tanta cumplicidade;

À minha família de Jaboticabal, Ana Carolina, Vanja, Natália e Anaiane por dividir comigo o melhor lar que eu poderia ter fora de Londrina. Obrigada por toda ajuda, companheirismo e amizade;

Aos colegas, amigos, funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela contribuição em minha formação pessoal e profissional durante o mestrado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Aspectos gerais da citricultura brasileira	14
3.2 Cancro cítrico	15
3.2.1 Histórico da doença	16
3.2.2 Agente etiológico	17
3.2.3 Características gerais da doença	20
3.3 Interação Planta-Patógeno.....	23
3.4 Transcriptoma	26
3.5 RNA-Seq.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material vegetal e estirpe bacteriana.....	39
4.2 Curva de crescimento e avaliação dos sintomas	39
4.3 Extração de RNA total de citros	40
4.4 Extração de RNA total de Xac.....	43
4.5 Montagem das bibliotecas de cDNA, clusterização e sequenciamento	45
4.6 Análise dos resultados	47
4.6.1 Construção de um banco de dados de transcriptoma de citros.....	48
4.6.2 Clusterização	50
4.6.3 Análise dos dados de sequenciamento de citros.....	50
4.6.4 Construção de um banco de dados de transcriptoma de Xac	52
4.6.5 Análise dos dados de sequenciamento de Xac	53
4.6.6 Categorização, anotação de sequências e localização de domínios proteicos.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Comparação da curva de crescimento de Xac e avaliação dos sintomas de cancro cítrico em tangerina Satsuma e laranja doce Hamlin	55
5.2 Verificação da concentração e integridade do RNA Total extraído	58
5.3 Análises do RNA-Seq das bibliotecas de cDNA de planta	64
5.4 Clusterização	66
5.5 Expressão gênica global e temporal em Hamlin e Satsuma após a inoculação com Xac.....	69

5.5.1	Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos nas espécies Satsuma e Hamlin nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação	83
5.5.2	Genes diferencialmente expressos na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 24 horas após a inoculação	91
5.5.3	Genes diferencialmente expressos na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 48 horas após a inoculação	99
5.5.4	Genes diferencialmente expressos na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 72 horas após a inoculação	107
5.6	Análises do RNA-Seq das bibliotecas de cDNA de Xac	117
5.7	Expressão gênica global e temporal de Xac	118
5.8	Perspectivas	125
5.8.1	Validação dos resultados	125
5.8.2	Transcriptoma de novo	125
6	CONCLUSÕES	126
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
	APÊNDICES	145

TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO DE TANGERINA SATSUMA (*Citrus unshiu*) E LARANJA DOCE HAMLIN (*Citrus sinensis*) INFECTADAS COM *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO

Resumo – O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma das principais doenças que acometem a citricultura mundial e ataca uma ampla gama de espécies comerciais de citros, causando perdas significativas nos países produtores. A espécie de laranja doce Hamlin (*Citrus sinensis*) é suscetível ao cancro cítrico, enquanto a espécie de tangerina Satsuma (*Citrus unshiu*) é resistente. Para compreender os mecanismos moleculares relacionados aos sistemas de defesa ativados pela planta é importante identificar as alterações transcricionais de cada espécie vegetal sob estresse fitopatogênico, a fim de desvendar os elementos moleculares que são específicos de cada espécie. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma análise comparativa temporal do transcriptoma de duas espécies cítricas contrastantes em resposta à Xac, pela técnica do RNA-Seq (Illumina). Um total de 5.673 e 6.231 transcritos diferencialmente expressos foi induzido nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac em Satsuma e Hamlin, respectivamente, enquanto 3.982 e 7.944 transcritos foram reprimidos. Deste total, 52 transcritos foram induzidos em comum, nas duas espécies, em todos os tempos de inoculação. Estes genes estão relacionados com a defesa basal da planta contra o ataque de Xac, pois apresentam genes que participam na percepção e reconhecimento do patógeno, genes que codificam fatores de transcrição e genes que participam na defesa da planta, como glucanases e proteinases. Entre os genes induzidos exclusivamente na espécie resistente Satsuma destacou-se uma proteinase aspártica. Esta proteína apresentou a maior expressão gênica no tempo 24 horas e pode estar envolvida na resistência desta espécie, visto que na espécie suscetível Hamlin, a expressão desta proteína foi menos expressiva e tardia, no tempo 48 horas. Outra resposta oposta entre as espécies foi na expressão de genes relacionados à parede celular. A espécie Satsuma induziu a expressão destes genes em resposta à inoculação de Xac, enquanto que a espécie Hamlin, reprimiu. Em relação aos genes relacionados à defesa da planta, ambas as espécies induziram proteínas relacionadas à patogênese, principalmente no tempo 72 horas. No entanto, a expressão destes genes não evitou o aparecimento de sintomas na espécie Hamlin. Adicionalmente, esta espécie apresentou um elevado número de genes reprimidos relacionados à fotossíntese. Este estudo revelou diferentes respostas moleculares ao cancro cítrico em genótipos cítricos com resistência contrastante, o que proporcionou levantar hipóteses sobre a resposta da planta à doença e forneceu informações valiosas quanto à identificação de genes para a obtenção de plantas cítricas com resistência ao cancro cítrico.

Palavras-chave: expressão gênica, interação planta-patógeno, RNA-Seq, cancro cítrico

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF SATSUMA MANDARIN (*Citrus unshiu*) AND HAMLIN SWEET ORANGE (*Citrus sinensis*) INTERACTION WITH *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, THE CITRUS CANKER PATHOGEN

Abstract – Citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), is a one of the most important disease affecting citrus production worldwide and attacks a wide range of commercial species of citrus trees, causing significant losses in producing countries. Hamlin sweet orange (*Citrus sinensis*) is canker-sensitive, while Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) is canker-resistant. To understand the molecular mechanisms underlying the differences in responses to Xac, transcriptional profiles of these two genotypes following Xac attack were compared by RNA-Seq (Illumina). The purpose of this study was to examine simultaneous changes in gene expression profile during the early stages (24, 48 and 72 hpi) of citrus canker infection in Satsuma and Hamlin. A total of 5673 and 6231 up-regulated transcripts were identified at 24, 48 and 72 hpi in Satsuma and Hamlin, respectively, while 3982 and 7944 were down-regulated. Of these, 52 transcripts were up-regulated in common between both genotypes. These genes in common are related to basic defense against Xac, because there are genes involved in pathogen perception and recognition, transcription factors and genes related to plant defense, such as glucanases and proteinases. Among up-regulated genes expressed only in Satsuma, aspartic proteinase was highlighted. This protein presented the highest gene expression 24 hpi and it can be involved in Satsuma resistance, since the expression of this protein was less pronounced and delayed in Hamlin. Another opposite response between these two genotypes was the expression of genes related to cell wall. Such genes were pectate lyase, extensin, cellulose synthase, and xiloglucanase endotransglycosylase. The genes were up-regulated in Satsuma, while in Hamlin, they were down-regulated. For genes related to plant defense, both genotypes up-regulated pathogenesis-related proteins, especially 72 hpi. However, the expression of these genes did not prevent the symptoms in Hamlin. In addition, in Hamlin, abundant photosynthesis-related genes were significantly down-regulated, which may be in order to ensure the basic defense. This study revealed different molecular responses to citrus canker in Satsuma and Hamlin, affording insight into the response to canker and providing valuable information for identification of potential genes for future engineered canker tolerance in citrus plants.

Keywords: gene expression, citrus canker, plant-pathogen interaction, RNA-Seq

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Nível de resistência de espécies do gênero <i>Citrus</i> em relação ao cancro cítrico.....	22
Tabela 2. Amostras de RNA total de planta e sua respectiva legenda.....	42
Tabela 3. Amostras de RNA total de Xac e sua respectiva legenda.....	44
Tabela 4. Concentração e relação 260/280 e 260/230 das amostras de RNA total extraídas de folhas de Satsuma e Hamlin e RNA total extraídos de células bactérias de Xac.....	59
Tabela 5. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-Seq (Illumina) das bibliotecas de cDNA produzidas a partir de tecido foliar de Satsuma e Hamlin infectado e não infectado com Xac nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção.....	66
Tabela 6. Genes induzidos em comum na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin em todos os tempos de infecção (24, 48 e 72 horas).....	74
Tabela 7. Transcritos induzidos apenas no tecido infectado da espécie resistente Satsuma nos três tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac.....	79
Tabela 8. Transcrito transcript6080433 reprimido em todos os tempos (24, 48 e 72 horas), após a infecção com Xac, em Satsuma.....	81
Tabela 9. Genes reprimidos em todos os tempos (24, 48 e 72 horas), após a infecção com Xac, relacionados à resposta ao estresse e à fotossíntese, na espécie suscetível Hamlin.....	82
Tabela 10. Genes induzidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac.....	92
Tabela 11. Valores de expressão (Fold-change e P-valor) dos transcritos diferencialmente expressos da enzima proteinase aspártica 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac em folhas da espécie resistente Satsuma e em folhas da espécie suscetível Hamlin.....	94

Tabela 12. Genes reprimidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac.....	98
Tabela 13. Genes induzidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação com Xac.....	103
Tabela 14. Genes reprimidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação com Xac.....	106
Tabela 15. Genes induzidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação com Xac.....	107
Tabela 16. Genes reprimidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação com Xac.....	111
Tabela 17. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-Seq (Illumina) como número de sequências geradas e porcentagem de sequências com alta qualidade, identificados nas bibliotecas de cDNA de Xac cultivados em meio de cultura AN e XAM1 e em Xac inoculada e exsudada dos tecidos de Satsuma e Hamlin.....	118
Tabela 18. Lista dos genes induzidos em Xac em todas as bibliotecas analisadas.....	120
Tabela 19. Lista dos genes reprimidos em Xac em todas as bibliotecas analisadas.....	121
Tabela 20. Transcritos com variação de expressão com alta significância estatística, entre as amostras controle e infectadas de Xac. Os quatro transcritos, XLOC_003056, XLOC_003394, XLOC_003659, XLOC_003671, aparecem com expressão significativa aparecem distribuídos em sete comparações distintas.....	122
Tabela 21. Expressão comparativa entre as amostras controle e as amostras infectantes do transcrito XLOC_003659.....	124

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da infecção da superfície abaxial das folhas de <i>Citrus paradisi</i> por Xac. Bactérias presentes na abertura de um estômato (A) e bactéria presente na matriz de polissacarídeos extracelular encontrada na superfície da lesão (B).....	18
Figura 2. Lesões de cancro cítrico. Folhas com lesões circundadas por anel amarelado (A) e lesões em frutos (B).....	21
Figura 3. Esquema geral de um experimento de expressão gênica pela técnica RNA-Seq na plataforma Illumina/Solexa.....	32
Figura 4. Etapa da clusterização na plataforma Illumina/Solexa.....	34
Figura 5. Sequenciamento dos “clusters” na plataforma Illumina. Incorporação de nucleotídeos modificados, chamados de dideoxynucleotídeos (ddNTPs).....	35
Figura 6. Captura da imagem do sequenciamento na plataforma Illumina/Solexa.....	36
Figura 7. Pipeline para construção de um banco de dados não redundante de transcriptoma de plantas da espécie <i>Citrus sp.</i> para estudos de genotipagem.....	49
Figura 8. Pipeline para análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento.....	51
Figura 9. Comparação dos sintomas de cancro cítrico na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 11 e 25 dias após inoculação com Xac.....	56
Figura 10. Curva de crescimento de Xac nas espécies Hamlin e Satsuma até o 18º dia após a inoculação. Pontos acompanhados de letras minúsculas iguais não se diferem estatisticamente dentro de cada tempo e pontos acompanhados de letras maiúsculas iguais não se diferem estatisticamente entre os tempos no teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	57

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes do RNA extraído por Trizol de folhas de Hamlin coletadas 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após a inoculação com suspensão de Xac 10^8 UFC/mL e do RNA extraído pelo kit Illustra RNAspin Mini Isolation de células bacterianas de Xac exsudadas de folhas de Hamlin após 24 (D), 48 (E) e 72 (F) horas de inoculação.....	60
Figura 12. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de tecido vegetal da espécie Satsuma.....	61
Figura 13. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de tecido vegetal da espécie Hamlin.....	62
Figura 14. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de células da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 24 horas após inoculação em folhas da espécie Hamlin e Satsuma.....	63
Figura 15. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de células da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	64
Figura 16. Matriz de expressão (“Heatmap”) de seis bibliotecas de cDNA da espécie resistente Satsuma (Controle e Infectada) 24, 48 e 72 horas após a inoculação com água ou Xac. A escala de cores varia da cor branca, que indica bibliotecas sem nenhum transcrito em comum até a cor vermelha que indica bibliotecas idênticas.....	67
Figura 17. Matriz de expressão (“Heatmap”) de seis bibliotecas de cDNA da espécie suscetível Hamlin (Controle e Infectada) 24, 48 e 72 horas após a inoculação com água ou Xac. A escala de cores varia da cor branca, que indica bibliotecas sem nenhum transcrito em comum até a cor vermelha que indica bibliotecas idênticas.....	68
Figura 18. Número de genes diferencialmente expressos (GDEs) nas espécies Satsuma e Hamlin, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac. As barras em azul indicam os genes induzidos e as barras vermelhas indicam os genes reprimidos.....	70
Figura 19. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac. Diagramas mostram o número de genes induzidos em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou são exclusivos de cada tempo.....	71

Figura 20. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac. Diagramas mostram o número de genes reprimidos em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou são exclusivos de cada tempo.....	72
Figura 21. Diagrama de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos em comum nas espécies Satsuma e Hamlin nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac.....	72
Figura 22. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Satsuma no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	85
Figura 23. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Satsuma no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	86
Figura 24. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Satsuma no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	87
Figura 25. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Hamlin no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	88
Figura 26. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Hamlin no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	89
Figura 27. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Hamlin no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).....	90
Figura 28. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma e Hamlin 24 após a inoculação com Xac.....	91
Figura 29. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma e Hamlin 24 após a inoculação com Xac.....	97
Figura 30. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma e Hamlin 48 após a inoculação com Xac.....	100
Figura 31. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma e Hamlin 48 após a inoculação com Xac.....	104

Figura 32. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma e Hamlin 72 após a inoculação com Xac.....	107
Figura 33. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma e Hamlin 72 após a inoculação com Xac.....	110
Figura 34. Esquema simplificado da fotossíntese retirada do banco de dados KEGG (2013).....	113
Figura 35. Esquema hipotético da resposta molecular da espécie Satsuma à inoculação artificial de Xac baseado no transcriptoma revelado pela técnica de RNA-Seq.....	115
Figura 36. Esquema hipotético da resposta molecular da espécie Hamlin à inoculação artificial de Xac baseado no transcriptoma revelado pela técnica de RNA-Seq.....	116
Figura 37. Número de genes diferencialmente expressos (GDEs) de Xac cultivada em meio XXAM1 por 24 horas e Xac inoculadas e exsudadas da espécie Satsuma e Hamlin, 48 e 72 horas após a inoculação, quando comparado ao controle.....	119
Figura 38. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos em Xac infectando as espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) 48 e 72 horas após a inoculação.....	119
Figura 39. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram reprimidos em Xac infectando as espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) 48 e 72 horas após a inoculação.....	120

1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é uma doença que ataca uma ampla gama de variedades comerciais de citros e tem causado perdas significativas nos países produtores (DAS, 2003).

Atualmente, a estratégia de controle do cancro cítrico depende de um sistema integrado que engloba práticas culturais compatíveis às medidas fitossanitárias, como a erradicação de fontes de inóculo e aplicação de bactericidas a base de cobre. No entanto, a erradicação de plantas cítricas sintomáticas representa um custo elevado para o produtor. Adicionalmente, a aplicação de produtos cúpricos, além de aumentar os custos na produção, também levanta preocupações sobre a contaminação do meio ambiente e a segurança alimentar (FU et al., 2012), pois o cobre é um metal pesado. Adicionalmente, o uso constante de produtos cúpricos pode levar ao aparecimento de bactérias resistentes como resultado da adaptação do patógeno ao metal.

Devido a estas limitações, o desenvolvimento de variedades de citros agronomicamente aceitáveis e com adequado nível de resistência ao cancro cítrico é a forma mais eficiente, econômica e ambientalmente segura para controlar (FAGOAGA et al., 2001) e manejar a doença a longo prazo (ZHANG et al., 2010). Consequentemente, a resistência genética é, atualmente, a estratégia mais desejável no manejo do cancro cítrico.

No entanto, a hibridação sexual convencional entre espécies e aparentados do gênero *Citrus* é considerada difícil (FRANCIS et al., 2009), além de ser um processo longo, no qual são necessários anos de pesquisa para se obter uma nova variedade (MACHADO, 2006). Até o momento, apesar dos esforços de vários grupos em diferentes países, nenhuma variedade comercial de laranja doce resistente a Xac foi produzida. Por outro lado, a técnica de transformação genética pode rapidamente incorporar genes de resistência em plantas cítricas sem interferir na expressão das características agrônômicas ótimas da variedade transformada. A laranja geneticamente modificada para resistência a doenças é, potencialmente, a alternativa mais viável hoje para garantir a longevidade dos pomares. No entanto,

um dos requisitos primordiais para alcançar o sucesso nestas pesquisas está na compreensão dos mecanismos moleculares da interação planta-patógeno e na identificação de genes-alvo que possam ser utilizados para conferir resistência às variedades de laranja que são utilizadas no plantio comercial (ZHANG et al., 2010; AN; MOU, 2012).

Para isso, é importante identificar alterações transcricionais em cada espécie vegetal sob estresse biótico, a fim de desvendar os elementos moleculares que são específicos para cada planta (FU et al., 2012). A identificação dos genes relacionados com os mecanismos de defesa e resistência da planta que são ativados pela presença do patógeno e dos genes de patogenicidade do microrganismo pode ser feita através do estudo da expressão gênica temporal da interação planta-patógeno. Entender a expressão gênica ou transcriptoma do patossistema é essencial para compreender como o patógeno consegue ou não vencer as defesas da planta e assim causar ou não a doença.

Com o recente advento das novas tecnologias de sequenciamento, surgiu a possibilidade de se extrair o material genético completo de um organismo vivo para a identificação e quantificação de transcriptomas, criando a possibilidade de gerar um potencial enorme e revolucionário de novas informações no campo da genômica. Esta abordagem permite alcançar níveis sem precedentes de precisão e especificidade na quantificação de genes diferencialmente expressos e identificar novas regiões transcritas (KIM et al., 2011). Ainda não há informação disponível sobre uma análise comparativa de transcriptoma entre os genótipos de *Citrus* com diferentes níveis de resistência ao cancro cítrico pela técnica de RNA-Seq. A comparação do transcriptoma de variedades com níveis diferentes de resistência ao cancro cítrico pode auxiliar numa identificação mais precisa dos genes relacionados com as vias de defesa da planta cítrica e a compreender porque uma planta é mais resistente do que a outra.

Este estudo buscou investigar a expressão gênica temporal e diferencial de espécies cítricas contrastantes em relação à resistência ao cancro cítrico e investigar a expressão gênica temporal de Xac por meio da nova tecnologia de sequenciamento RNA-Seq (Illumina).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar, através da tecnologia de RNA-Seq, a expressão temporal de genes de Xac e de espécies do gênero *Citrus* resistente e suscetível ao cancro cítrico durante o processo de infecção em um período de 24 a 72 horas. Esta abordagem tem o potencial de identificar genes da bactéria e da planta envolvidos na interação patógeno-hospedeiro nas duas situações.

2.1 Objetivos específicos

Identificar os genes de tangerina Satsuma (*Citrus unshiu*), resistente ao cancro cítrico, e de laranja doce Hamlin (*Citrus sinensis*), suscetível ao cancro cítrico, que são expressos quando as mesmas são infectadas com Xac. Isso permitirá a identificação dos mecanismos de defesa que são ativados nas duas plantas sob o ataque da mesma bactéria.

Identificar os genes de Xac que são expressos quando a bactéria infecta tangerina Satsuma, resistente ao cancro cítrico, e laranja doce Hamlin suscetível ao cancro cítrico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da citricultura brasileira

As plantas do gênero *Citrus* pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae. Estas plantas são nativas da região sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e do Leste da Índia a Nova Guiné. Da Ásia, foram levadas para o Norte da África, em seguida, para o Sul da Europa até serem trazidas para a América (SWINGLE; REECE, 1967; HASSE, 1987; SOOST, CAMERON, 1975; CARDOSO, 2008).

Atualmente, são cultivadas em diferentes regiões do mundo, sendo que a exploração comercial concentra-se, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais entre as latitudes de 20° e 40° dos dois hemisférios, onde os regimes térmicos e hídricos são mais satisfatórios (SENTELHAS, 2005).

Entre os principais grupos de frutas no mundo, os citros ocupam o primeiro lugar em volume de produção com aproximadamente 69 milhões de toneladas em 2011. No mesmo ano, o Brasil produziu aproximadamente 19 milhões de toneladas de laranja e mantém a posição de maior produtor mundial de laranja e maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado (FAO, 2013). Portanto, a citricultura brasileira pode ser caracterizada como uma das mais importantes atividades agro-industriais, apoiada em demanda de produtos *in natura* e produtos processados.

A importância da citricultura brasileira tem como base uma história secular, deste o descobrimento do país. Nos tempos da colonização, houve registros de transplantes de mudas de laranjeiras de origem asiática, trazidas da Europa, que mostraram excelente adaptação ao solo e clima locais. Mas foi só na segunda metade do século XIX, que a laranja ganhou um peso mercadológico relativo. Já em 1939, chegou a ser um dos dez principais produtos de exportação (OKUMURA, 2007).

Os citros são produzidos na maioria dos estados brasileiros. No entanto, o Estado de São Paulo destaca-se com a maior produção de laranja, responsável por 77,20 % da produção nacional. Em 2011, a produção paulista de laranja foi estimada em torno de 15 milhões de toneladas. Dentre os demais Estados produtores destacam-se Bahia, Minas Gerais, Sergipe e Paraná (IBGE, 2011).

As variedades copa de citros cultivadas em plantios comerciais são, basicamente, representadas pelas laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos. As laranjas (*Citrus sinensis*) predominam na maioria dos países citrícolas com, aproximadamente, dois terços dos plantios. No Brasil, dentre as laranjas comerciais destacam-se Pêra, Natal, Valência e Hamlin. As três primeiras variedades perfazem mais de 80% da citricultura paulista (PIO et al., 2005).

A citricultura nacional tem se mostrado bastante vulnerável aos diversos problemas fitossanitários que têm surgido ao longo de seu estabelecimento no país e que são responsáveis por grandes perdas para a cultura. Existem cerca de 300 pragas e doenças afetando a citricultura brasileira. Entre as doenças bacterianas que representam as maiores preocupações por parte do setor estão o huanglongbing (HLB), a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico. No caso do cancro cítrico, além dos prejuízos causados pela queda de produção e pelas perdas de plantas, existe ainda a limitação da exportação de frutos *in natura* em consequência da presença desta doença no Brasil. Desta forma, a busca de variedades de citros resistentes ao cancro cítrico é de grande importância para o mercado citrícola brasileiro.

3.2 Cancro cítrico

O cancro cítrico é uma das mais importantes doenças para a citricultura mundial, pois, além dos prejuízos que acarreta, é uma doença quarentenária, o que dificulta o comércio mundial de fruta *in natura*. A doença tem restrições quarentenárias para os mercados citrícolas da União Europeia (UE) e Estados Unidos da América (EUA) e para que a exportação para estes países seja possível, rigorosas orientações devem ser seguidas. Uma vez que a tolerância para a

presença de sintomas é zero, um eficiente trabalho de auditoria realizado no campo por fiscais, tanto na área de embalagens como nos portos de embarque, deve ser realizado (STEGMAYER et al., 2013). Desta forma, estudos referentes a esta doença são de extrema importância para o mercado citrícola mundial.

3.2.1 Histórico da doença

As primeiras indicações da existência do cancro cítrico datam do início do século XIX, na Índia (SCHUBERT et al., 2001). A partir do Sudoeste Asiático, a doença foi disseminada para diversas regiões citrícolas ao redor do mundo, principalmente via órgãos vegetais contaminados (LEITE JUNIOR, 1990; ROMEIRO, 1995; BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995; FEICHTENBERGER, 1998). No Brasil, o primeiro relato de cancro cítrico foi feito no ano de 1957 na região de Presidente Prudente, em São Paulo (ROSSETTI, 1977). No mesmo ano, foi identificado também no município de Lupionópolis, Estado do Paraná (LEITE JUNIOR, 1990).

Atualmente, a doença ocorre endemicamente em diversas regiões do Sudoeste Asiático e em vários países da América. Na América do Sul, a bactéria está presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai (LEITE JUNIOR, 1990) e Bolívia (BRAITHWAITE et al., 2003). Nos Estados Unidos, o agente causal da doença foi introduzido no Estado da Flórida em 1910 e a erradicação foi o método escolhido pelos americanos. A operação, ao final de 30 anos, foi bem sucedida com quase a eliminação completa da bactéria em solo norte-americano. No entanto, os custos para alcançar este resultado foram elevados, com a erradicação de mais de 250 mil árvores e três milhões de mudas (BERGAMIM FILHO; AMORIN; REZENDE, 2011).

Baseado nestes resultados, quando a doença foi introduzida no Brasil, os técnicos do Instituto Biológico optaram pela erradicação da bactéria. Com essa estratégia de controle, a doença manteve-se sob controle por cinco décadas em todo o Estado de São Paulo. Porém, em 1996, foi detectada, no Brasil, a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*). Este inseto provocou um dramático ressurgimento do cancro cítrico em São Paulo, pois as galerias abertas pela lagarta aumentam diretamente a eficiência de infecção da bactéria, além de aumentar a

severidade da doença. Como consequência, no final da década de 90, a campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo intensificou-se, com novas regras de erradicação (BERGAMIM FILHO; AMORIN; REZENDE, 2011).

A legislação determinava a erradicação completa dos talhões nos quais a incidência da doença fosse superior a 0,5% de árvores sintomáticas. Para incidências iguais ou inferiores a 0,5%, as plantas sintomáticas, e as demais plantas, ao redor de 30 metros, tinham que ser eliminadas (FEICHTENBERGER et al., 2005). Desta forma, a doença voltou a níveis pouco preocupantes. Contudo, esta regra de 0,5% foi revogada pelo governo do Estado de São Paulo em junho de 2009 e seu efeito em relação ao cancro cítrico foi evidente, pois entre 2009 e 2010, a incidência da doença aumentou de 0,14% para 0,44% de talhões com doença (BERGAMIM FILHO; AMORIN; REZENDE, 2011). A situação continua preocupante, pois segundo o levantamento amostral realizado pelo FUNDECITRUS (2012), a incidência de cancro cítrico saltou de 0,44% para 1,39% nos talhões do parque citrícola do Estado de São Paulo em 2012.

3.2.2 Agente etiológico

O cancro cítrico asiático ou cancrose A é a forma mais agressiva e propagada da doença. A doença é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), uma bactéria com células do tipo bastonete (Figura 1), gram-negativa, estritamente aeróbica, dotada de um único flagelo polar. No cultivo em meio de cultura sólido, a Xac apresenta colônias de formato côncavo de pigmentação amarela e aspecto bastante viscoso devido à produção de exopolissacarídeos (BEBENDO, 1995; BRUNINGS, GABRIEL, 2003), que ajudam na sua sobrevivência e dispersão (GOTO; HYODO, 1985). Essa bactéria cresce na maioria dos meios de culturas usados em microbiologia e é facilmente isolada de tecido cítrico infectado. Colônias da bactéria são visíveis em meio de cultura Ágar Nutriente após dois a três dias de incubação a 28°C (ROSSETTI; FEICHTENBERGER; SILVEIRA, 1981; CARDOSO, 2008).

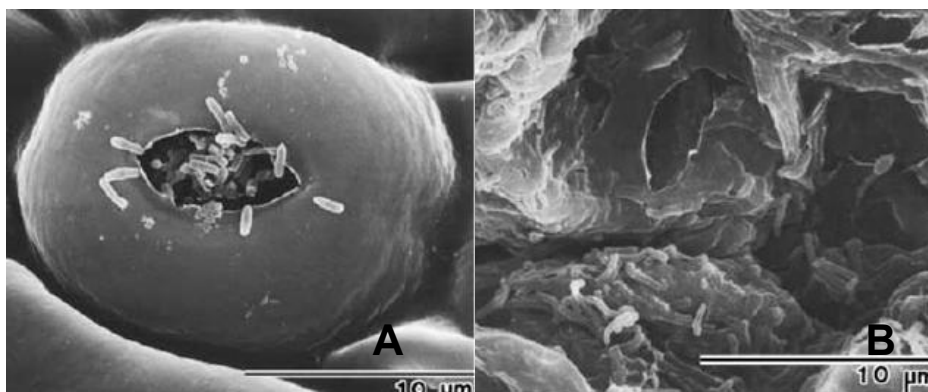


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da infecção da superfície abaxial das folhas de *Citrus paradisi* por Xac. Bactérias presentes na abertura de um estômato (A) e bactéria presente na matriz de polissacarídeos extracelular encontrada na superfície da lesão (B). Fonte: GRAHAM et al., 2004.

As condições ideais para o crescimento da bactéria são umidade elevada e temperatura entre 28° e 30° C. Em relação à sobrevivência no ambiente, a Xac sobrevive por poucos dias em materiais inertes e por até três meses em solo. No entanto, pode permanecer viável por vários anos em tecidos do hospedeiro, mesmo após a queda destes ou quando estes se encontram desidratados (FEICHTENBERGER et al., 2005). Além disso, a bactéria pode se estabelecer como epífita no fitoplano de plantas não hospedeiras (GOTO, 1972; CARVALHO et al., 1984).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pertence ao gênero *Xanthomonas* (do grego, xanthos = amarelo; monas = unidade). De todas as bactérias fitopatogênicas, os membros deste gênero formam o maior grupo disperso na natureza, com capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros que incluem, pelo menos, 68 famílias de plantas e mais de 240 gêneros (HAYWARD, 1993). Embora o gênero apresente uma gama de hospedeiro muito ampla, cada estirpe é limitada a um número muito estreito de hospedeiros, como um grupo de gênero dentro de uma família de plantas ou um grupo de espécies dentro de um gênero. Isto faz com que o gênero *Xanthomonas* seja ideal para o estudo da especificidade planta-patógeno (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

A bactéria foi identificada e isolada pela primeira vez por Hasse (1915) e após comprovar patogenicidade da Xac, classificou-a como *Pseudomonas citri*. Em 1939, Dowson reclassificou a bactéria como *Xanthomonas citri*. Após 45 anos, a bactéria foi novamente renomeada para *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et

al.,1995) e, mais recentemente, em 2006, o nome foi modificado para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006). Apesar da recente mudança de nomenclatura, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é ainda amplamente conhecida e encontrada na literatura pela denominação Xac, pois, em 2002, quando o sequenciamento completo do seu genoma foi finalizado (DA SILVA et al., 2002), o nome da bactéria ainda era *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac).

O sequenciamento completo do genoma da Xac isolado 306 possibilitou sua caracterização estrutural e identificação de três estruturas distintas: um cromossomo com 5.175.554 pares de base (pb), onde 4.374 ORFs foram identificadas e anotadas; um plasmídeo pXAC64 com 64.920 pb e um outro plasmídeo pXAC33 com 33.699 pb, onde 73 e 42 ORFs foram, respectivamente, identificadas e anotadas (DA SILVA et al., 2002). Algumas características particulares encontradas no genoma de Xac devem estar associadas com a capacidade de adaptação do fitopatógeno ao seu hospedeiro, como a presença de um grande número de genes codificadores de enzimas degradativas de parede celular e de transporte de açúcares; de genes putativos codificadores de proteínas efetoras de virulência que estão associadas ao sistema de secreção do tipo III (SSTT), genes da biossíntese da goma xantana e de um completo sistema flagelar e de quimiotaxia (MOREIRA et al., 2004; CARVALHO, 2006). Portanto, diversos genes envolvidos em patogenicidade e virulência foram descritos neste genoma. No entanto, a conhecimento completo do arsenal utilizado pela Xac na colonização e no desenvolvimento da doença está longe de ser totalmente alcançado, considerando que 37,4% das ORFs contidas no genoma correspondem a proteínas sem função definida, e que dentre esses, muitos podem codificar proteínas com funções importantes na patogenicidade, porém ainda desconhecidas (DA SILVA et al, 2002; TEZZA, 2008). Desta forma, estudos no campo da transcriptômica são ideais para a complementação das informações até hoje adquiridas em relação à patogenicidade de Xac.

3.2.3 Características gerais da doença

A partir do contato com os tecidos jovens de uma planta cítrica sadia, a *Xac* invade o tecido da planta por aberturas naturais, como estômatos, ou por escoriações e ferimentos provocados por espinhos, insetos ou partículas de solo carregadas pelo vento (LEITE JUNIOR, 1990; AMORIM, 1995; SCHUBERT; SUN, 1996). De acordo com Gottwald e Graham (1992), quase todas as infecções ocorrem em folhas com até 40 dias após o seu surgimento, quando apresenta de 50 a 80% de expansão. Frutos são altamente susceptíveis até 90 dias contados a partir da queda das pétalas (FEICHTENBERGER, 2005). A colonização do tecido é rápida. Em uma a duas semanas após o aparecimento da primeira lesão, geralmente comportando 10^6 bactérias, estarão formadas 10 lesões (com 10^7 bactérias) e, em outras duas semanas, podem existir em torno de 1.000 lesões, comportando cerca de 10^9 bactérias no total (FRANCO, 2001).

Na natureza, a disseminação da bactéria a curtas distâncias, dentro do próprio pomar ou propriedades vizinhas, se dá principalmente por chuvas e ventos (SCHUBERT; SUN, 1996; ROSSETTI, 2001), no entanto, o principal agente disseminador da doença é o próprio homem, que leva a bactéria de um lugar para outro, em material de colheita, veículos, máquinas e implementos, ou por meio do transporte de folhas, ramos e frutos doentes. Para longas distâncias, a disseminação ocorre normalmente por meio de material de propagação doente (GOTTWALD; TIMMER, 1995). As mudas são importantes formas de disseminação da doença, que neste caso podem atingir municípios, estados e países até então livres da doença.

Em relação aos sintomas, a planta cítrica pode apresentar lesões em todos os órgãos da parte aérea, as quais, geralmente, são acompanhadas por um halo clorótico em folhas e frutos (SCHUBERT et al., 2001; GOTTWALD et al., 2002a). Nas folhas, as lesões iniciais de 2 a 10 mm são circulares, com aspecto oleoso na superfície abaxial. Em seguida, tanto em folhas, como em ramos, espinhos e frutos, as lesões circulares evoluem para lesões eruptivas com pústulas de cor amarelada. Estas pústulas escurecem e se tornam mais rígidas formando cancrios de cor castanha com aspecto de rolha que são ásperos ao toque. Em folhas e frutos, lesões mais velhas podem ser acompanhadas por um halo clorótico amarelo

(BRUNINGS; GABRIEL, 2003) (Figura 2). As lesões reduzem drasticamente a produção devido à queda prematura de frutos e à severa desfolha. Com isso, além da produção menor, os poucos frutos produzidos acabam tendo um valor comercial bastante reduzido, quase sempre economicamente inviável (CIVEROLO, 1984; LEITE JUNIOR, 1990; VERNIÈRE et al., 2003).

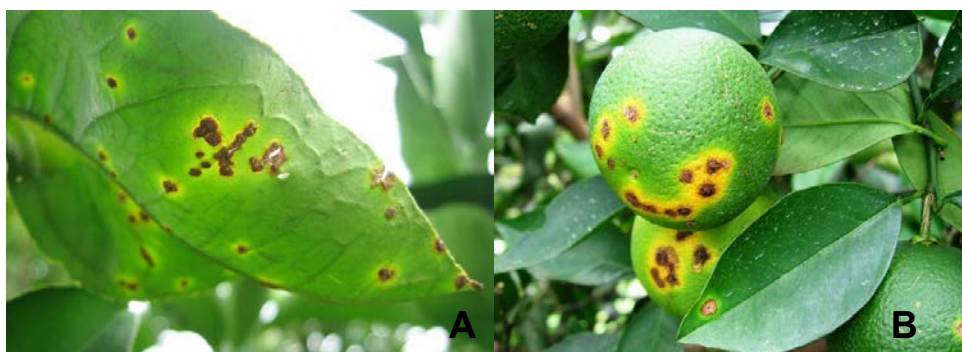


Figura 2. Lesões de cancro cítrico. Folhas com lesões circundadas por anel amarelado (A) e lesões em frutos (B). Fonte: Mayara Mari Murata.

A maneira mais eficaz de se prevenir a contaminação com a bactéria do cancro cítrico sempre foi evitar que o patógeno entre em contato com a planta cítrica. Além da erradicação, outras medidas de controle vêm sendo recomendadas, como: a) evitar a instalação de pomares em locais onde as condições ambientais são muito favoráveis ao desenvolvimento da doença, como áreas sujeitas a ventos fortes e constantes; b) implantar quebra-ventos arbóreos protetores, construídos com grevilha ou pinus, para barrar a entrada do patógeno no pomar; c) utilizar apenas mudas sadias na implantação dos pomares, proveniente de viveiros rigorosamente inspecionados; d) instalar viveiros somente em áreas comprovadamente livres de cancro cítrico por, pelo menos, um ano; e) promover a lavagem e a descontaminação de equipamentos de colheita, máquinas, veículos e implementos provenientes de áreas suspeitas da doença; f) restringir o acesso e fiscalizar a circulação de pessoas, veículos e implementos nas propriedades citrícolas; g) pulverizar preventivamente as plantas com produtos a base de cobre, protegendo as brotações novas; h) controlar adequadamente a larva minadora dos citros; i) inspecionar constantemente os pomares; e principalmente, j) plantar variedades resistentes ou moderadamente resistente à doença (GOTTWALD et al., 2002b; FEICHTENBERGER et al., 2005).

Até o momento, não existem cultivares de citros imunes ao cancro cítrico (OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, o gênero *Citrus* apresenta uma ampla variação nos níveis de resistência ao cancro cítrico. Pomelos, lima ácida Galego e limões são altamente suscetíveis. Laranja azeda e laranja doce são moderadamente suscetíveis. Enquanto que tangerinas são consideradas resistentes (GOTTWALD et al., 2002a) (Tabela 1).

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

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

É importante destacar que a literatura descreve a resistência observada no campo e que em algumas espécies, esta resistência não parece estar relacionada com a resistência fisiológica da planta. A resistência observada em situações de campo foi correlacionada com o tamanho e número de estômatos abertos que permite a entrada da bactéria na planta por meio de chuvas e vento (GOTO, 1969). Adicionalmente, a resistência de campo também está relacionada com o hábito de crescimento de algumas espécies, como a frequência de brotamento (GOTTWALD

et al., 1993). Folhas e ramos de brotamentos novos são mais suscetíveis ao cancro cítrico do que galhos e folhas maduras (STALL et al., 1982). Desta forma, a toranja, por exemplo, considerada uma das espécies mais suscetíveis, apresenta um brotamento vigoroso e seus ramos e folhas se mantem jovens durante várias semanas comparadas com o hábito de brotamento de tangerinas, que apresentam uma maior resistência ao cancro cítrico, porém um menor brotamento e ramos com um amadurecimento mais rápido (GOTTWALD et al., 1993).

Desta forma, fica evidente a necessidade de um estudo mais criterioso e a nível molecular para avaliar os mecanismos fisiológicos e os mecanismos mecânicos de resistência da planta cítrica em relação ao cancro cítrico. Técnicas avançadas de expressão gênica e avaliação de sintomas da doença em diferentes espécies auxiliam no estudo da busca de variedades resistentes ao cancro cítrico.

3.3 Interação Planta-Patógeno

O estudo das interações planta-patógeno é muito importante para compreender melhor os mecanismos utilizados pela planta para se defender do patógeno e os mecanismos utilizados pelo patógeno para atacar a planta. Cada espécie vegetal interage de uma maneira específica com um determinado fitopatógeno. Desta forma, destaca-se a importância de estudar cada patossistema para buscar medidas de controle eficientes para cada doença e, principalmente, elucidar os mecanismos de defesa da planta para que, no futuro, seja possível o desenvolvimento de plantas resistentes a uma série de doenças.

Em geral, nas interações planta-patógeno, para que ocorra a ativação do sistema de defesa da planta é necessário o reconhecimento de proteínas específicas do patógeno pelos receptores da planta (MAC DOWELL; DANGL, 2000). No entanto, de um grande número de fitopatógenos existentes na natureza, apenas uma fração muito pequena é capaz de causar doença em uma dada espécie vegetal. A razão para isto é que as plantas possuem resistência à maioria dos microrganismos. Em fitopatologia, este termo é referido como imunidade e os mecanismos que garantem esta condição são denominados de mecanismos de resistência não hospedeira. Mecanismos de resistência não hospedeira são

conservados do ponto de vista evolutivo e incluem mecanismos estruturais, como espessura da cutícula e controle do movimento dos estômatos, que servem como barreiras físicas aos microrganismos e mecanismos bioquímicos, como a produção de compostos tóxicos aos microrganismos (CAMARGO, 2011).

Entretanto, um pequeno número de microrganismos desenvolveu mecanismos de ataque que permitem quebrar a resistência não hospedeira e assim se tornarem fitopatógenos. É vantajoso para um microrganismo se tornar um fitopatógeno, pois a planta pode lhe oferecer uma gama de nutrientes e abrigo contra as intempéries da natureza e contra outros microrganismos. Uma vez que uma espécie de microrganismo consegue vencer as barreiras de resistência da planta não hospedeira, ela se torna um patógeno de uma determinada espécie vegetal, denominada agora como hospedeira (CAMARGO, 2011).

Os mecanismos ativados pela planta e pelo patógeno que desencadearão a doença dependem do tipo da interação planta-patógeno. As interações entre a planta e seus patógenos envolvem duas diferentes maneiras de comunicação. Não é somente a planta que deve ser capaz de reconhecer e se defender contra um agente patogênico que se acopla na sua superfície, mas o patógeno também deve ser capaz de manipular a biologia da planta e criar um ambiente adequado para seu crescimento e reprodução. Tanto as plantas como os fitopatógenos evoluíram um conjunto de genes que permitem essa comunicação (BOYD et al., 2013).

As plantas desenvolveram dois mecanismos de defesa para resistir à invasão de patógenos e estes mecanismos envolvem diferentes estratégias na detecção do patógeno (KIM et al., 2011). O primeiro mecanismo de defesa ativado pela planta ocorre na face externa da célula hospedeira (DODDS; RATHJEN, 2010). Moléculas do patógeno, denominado de PAMPs ou MAMPs (“pathogen (or microbe) – associated molecular patterns”) são reconhecidos por proteínas receptoras da planta, chamados de receptores de reconhecimento padrão PRR (“pattern recognition receptors”). As PAMPs são, normalmente, componentes essenciais dos patógenos, como a proteína flagelina de bactéria ou a proteína quitina dos fungos. As PAMPs podem ser também toxinas do patógeno usadas para atacar a planta. Este reconhecimento desencadeia respostas gerais de defesa das plantas denominado como imunidade desencadeada por PAMP - PTI (“PAMP-triggered

immunity”). Embora a resposta de defesa basal da planta seja ativada, o agente patogênico é capaz de suprimir os diferentes componentes da PTI por meio de proteínas efetoras do patógeno distribuídas pela planta, como por exemplo, as proteínas efetoras bacterianas secretadas pelo sistema de secreção tipo III (LAHAYE; BONAS, 2001; KIM et al., 2011).

A segunda forma de defesa da planta envolve o reconhecimento destas proteínas efetoras específicas, as proteínas de avirulência (avr) do patógeno, por receptores intracelulares, as proteínas de resistência (genes R) da planta, desencadeando uma resposta de resistência chamada de imunidade desencadeada por efetores – ETI (“effector-triggered immunity”) (BOYD et al., 2013). Neste modo de reconhecimento, há uma co-evolução dinâmica entre a planta e o patógeno, o que difere do mecanismo PTI, pois, no mecanismo ETI, há uma grande diversificação nos receptores e nas proteínas efetoras do patógeno, tanto dentro como entre as espécies, ao passo que os receptores PRR são conservados entre as famílias (DOODS; RATHJEN, 2010). Este reconhecimento de genes R/avr tem sido comparado à resistência gene a gene (FELIX et al., 1999; BOYD et al., 2013).

O reconhecimento do ataque do patógeno pelas PRRs e pelos genes R conduz a ativação de respostas de defesa. Em geral, os mecanismos PTI e ETI dão origem a respostas de defesa similares, embora o mecanismo ETI seja qualitativamente mais forte e rápido e sempre causa a morte celular programada, chamada de reação de hipersensibilidade (HR) (LAM et al., 2001, KIM et al., 2011). O mecanismo PTI é geralmente eficiente contra patógenos não específicos num fenômeno chamado de resistência não hospedeira, enquanto o mecanismo ETI é ativado contra patógenos específicos (DOODS; RATHJEN, 2010). É importante salientar que no patossistema cancro cítrico, ambas as espécies avaliadas no presente trabalho, tangerina Satsuma e laranja doce Hamlin, são plantas hospedeiras de Xac. Desta forma, a diferença entre as respostas de defesa de cada espécie depende dos mecanismos ativados em cada uma, após o reconhecimento do patógeno.

Ambos os mecanismos são semelhantes ao modelo chave-fechadura, onde a molécula do patógeno (chave) se encaixa no receptor da planta (fechadura), e havendo o encaixe, o sistema de defesa é acionado. Neste modelo, há quatro

formas de interações patógeno-planta. Na primeira interação, o encaixe das proteínas ou moléculas do patógeno com o receptor da planta hospedeira resulta na ativação do sistema de defesa e o resultado é uma interação incompatível. No outros casos, o reconhecimento não ocorre seja porque o patógeno não produz MAMP, PAMP ou proteínas avr ou o patógenos produz MAMP, PAMP ou proteínas avr, porém a planta não possui o gene R correspondente (CAMARGO, 2011). Resumindo, quando um patógeno em potencial consegue ultrapassar as barreiras estruturais do hospedeiro e é reconhecido pelas células da planta com um invasor, uma rápida e coordenada resposta de defesa é induzida pela planta resistente prevenindo a colonização e desenvolvimento do patógeno, conhecida com interação incompatível. No entanto, se a planta é incapaz de reconhecer o patógeno ou não consegue ativar rapidamente as vias de defesa, como é o caso das plantas suscetíveis, a doença ocorre e esta interação é conhecida como interação compatível (GREWAL et al., 2012).

Desta forma, a fisiologia do parasitismo procura gerar conhecimento básico para o entendimento das interações planta-patógeno a nível fisiológico e bioquímico, bem como contribuir para o uso efetivo desse conhecimento no desenvolvimento de novos métodos para o controle das doenças (BRENT, 1983; WOOD, 1987; PASCHOLATI, 2011).

3.4 Transcriptoma

Na década de 90, os projetos genomas revolucionaram as pesquisas no campo biológico (COLLINS et al., 1998), devido à grande quantidade de informações disponíveis sobre as sequências de DNA de muitos organismos. Esta abundância de dados sobre as sequências dos genomas completos permitiu um grande avanço na compreensão dos fenômenos que ocorrem nos organismos vivos e abriu a possibilidade de uma nova estratégia para a genética, chamada de genômica funcional, baseada na interpretação da função das sequências de DNA numa escala genômica. Entretanto, o conhecimento da sequência e da estrutura de um gene não permite que se alcance o objetivo máximo desta pesquisa, que é a

determinação da função de cada gene na célula (PASSOS; JORDAN, 2000; MARQUES; SILVA, 2004).

Dos milhares de genes presentes no genoma de um determinado organismo, somente uma fração é expressa em uma célula em um dado momento. Para que a mensagem contida no DNA possa ser convertida em uma função celular, é necessário que os genes sejam transcritos em outro tipo de molécula, um RNA, que posteriormente será traduzido em proteínas. Por analogia com o termo genoma, que representa o conjunto completo dos genes (DNA) de um organismo, criou-se o termo transcriptoma, que representa o conjunto completo dos transcritos (RNA). Portanto, a soma de todas as moléculas de RNA produzidas em uma célula em um conjunto determinado de condições é chamada de transcriptoma celular (NELSON; COX, 2011).

A transcrição do DNA em RNA é um dos principais pontos de regulação da expressão gênica. Assim, a presença do transcrito na célula é um forte indicativo de que o gene em questão está sendo expresso e não há dúvida de que a análise do transcriptoma de diferentes tipos de células, tecido ou organismo fornece informações valiosas sobre o padrão de expressão gênica em situações fisiológicas ou patológicas (MARQUES; SILVA, 2004).

O transcriptoma representa uma pequena percentagem do código genético, que é transcrita em moléculas de RNA. Cada gene pode produzir mais do que uma variante de mRNA devido ao “splicing” alternativo, edição de RNA ou devido a transcrição alternativa de sítios de iniciação e terminação. Portanto, o transcriptoma captura um nível de complexidade que uma simples sequência de genoma não é capaz (ADAMS, 2008).

A compreensão da dinâmica do transcriptoma é essencial para revelar os elementos funcionais do genoma e interpretar as variações fenotípicas produzidas por combinações de fatores genotípicos e ambientais (ZHANG et al., 2012). O estudo do transcriptoma tem como objetivo determinar quando e onde os genes são ligados ou desligados em vários tipos de células e tecidos. O número de transcritos pode ser quantificado e revelar a expressão de determinados genes em uma célula. Além disso, com a análise do transcriptoma é possível gerar uma imagem completa

de genes que são ativados em vários estágios de desenvolvimento de um organismo (ADAMS, 2008).

Estudos no campo da transcriptômica têm sido amplamente utilizados no estudo da interação planta-patógeno. Diversos grupos de pesquisas tem se dedicado para esclarecer os mecanismos utilizados pela planta para se defender do patógeno e os mecanismos do patógeno para atacar o hospedeiro. Vários trabalhos neste assunto foram desenvolvidos com *Arabidopsis thaliana* (CARTIEAUX et al., 2003; ZHU et al., 2013), tabaco (LU et al., 2012), arroz (BAGNARESI et al., 2012) trigo (LYSØE et al., 2011), soja (SÁ et al., 2012), laranja (FU et al., 2012), castanha (BARAKAT et al., 2012), amendoim (WANG et al., 2013) e pimenta (GÓNGORA-CASTILLHO et al., 2012).

Convencionalmente, análises do padrão da expressão de genes eram realizadas por meio de técnicas, como “Northern blotting” e transcrição reversa acoplada à reação de polimerase em cadeia (RT-PCR), sendo esta última empregada em larga escala atualmente devido a implementação da técnica de RT-PCR quantitativa ou em tempo real. Contudo, apenas um pequeno número de genes pode ser investigado através destas metodologias (MARQUES; SILVA, 2004).

A partir de então, várias tecnologias foram aprimoradas para a aplicação em grande escala e na última década, houve um enorme avanço no desenvolvimento de métodos de dedução e quantificação dos níveis de expressão gênica ao nível do transcriptoma completo, tornando possível a análise simultânea da expressão de milhares de genes (WANG et al., 2009). Entre os vários métodos de estudo de perfil transcricional, a técnica de RNA-Seq e a técnica de microarranjo destacam-se como os dois métodos mais amplamente utilizados na quantificação da expressão de genes em larga escala (KOGENARU et al., 2012).

A tecnologia de microarranjo tem sido essencial para análise global dos transcriptomas estudados até hoje. O microarranjo foi utilizado em inúmeros trabalhos de resposta da planta a infecção por patógeno, como vírus, bactérias e fungos. No entanto, esta tecnologia apresenta algumas limitações, como o número limitado de transcritos, já que a técnica pode revelar apenas a expressão daqueles transcritos presentes no “chip”. Por outro lado, a tecnologia RNA-Seq pode revelar transcritos raros e até mesmo transcritos desconhecidos, oferecendo um quadro de

transcriptoma mais preciso e acurado (GIBLY et al., 2004; PANTHEE et al., 2007; MARTINELLI et al., 2012).

Desta forma, atualmente, a tecnologia de RNA-Seq se tornou o método preferido e vem substituindo rapidamente as abordagens baseadas em microarranjos no estudo de expressão gênica, isoformas e novas regiões transcritas (WANG et al., 2009; FU et al., 2009; VAN VELLETT et al., 2010).

3.5 RNA-Seq

Recentemente, o advento das novas tecnologias de sequenciamento de DNA de larga escala (“high-throughput”), chamadas de tecnologias de sequenciamento de última geração, possibilitou o uso de um novo método, denominado RNA-Seq, para o mapeamento e quantificação de transcriptomas, por meio do sequenciamento direto de DNA complementar (cDNA), criando a possibilidade de gerar um potencial enorme e revolucionário no campo da transcriptômica. Esta abordagem permite alcançar níveis sem precedentes de precisão e especificidade na quantificação de genes diferencialmente expressos e identificar novas regiões transcritas (KIM et al., 2011).

A tecnologia do RNA-Seq é uma poderosa ferramenta para o estudo de expressão gênica e apresenta claras vantagens em relação aos métodos existentes: a) é uma técnica de medição absoluta de expressão gênica que proporciona um maior conhecimento quantitativo e qualitativo e uma maior precisão comparado com o microarranjo (GONZALEZ et al., 2010; OZSOLAK et al., 2011; JAIN, 2011); b) não depende do conhecimento prévio de um transcriptoma de referência (RAZ et al., 2011; KOGENARU et al., 2012); c) permite construir o transcriptoma completo de um organismo por meio de uma montagem “de novo” (MARTIN; WANG, 2011; GARBER et al., 2011; JAIN, 2011); d) requer uma quantidade relativamente pequena de RNA total para quantificação em relação ao microarranjo, pois a etapa de clonagem é eliminada no processamento das amostras (WANG et al., 2009; KOGENARU et al., 2012; STRICKLER, et al., 2012); e) produz uma enorme quantidade de dados por um custo menor (METZKER, 2010). A tecnologia do RNA-Seq combinada com as

ferramentas apropriadas de bioinformática proporciona uma melhor abordagem para estudo dinâmico da expressão gênica em uma escala global em diferentes contextos celulares e biológicos.

Em geral, um experimento de RNA-Seq inclui a conversão de uma população de mRNA em uma biblioteca fragmentada ao acaso de cDNA com adaptadores ligados a uma ou em ambas as extremidades. Em seguida, pode ocorrer ou não uma amplificação por PCR a partir de uma extremidade (“single-read”) ou de ambas as extremidades (“paired-end”). O comprimento da sequência pode variar de 30 a 400 pb, dependendo da tecnologia de sequenciamento utilizada. Existem várias tecnologias de sequenciamento de nova geração disponíveis no mercado atualmente. No entanto, as três principais são: o pirosequenciamento da Roche/454, sequenciamento por síntese da Illumina/Solexa e sequenciamento por ligação da Life Technologies/SOLiD (JAIN, 2011).

As tecnologias de sequenciamento são constituídas por etapas que incluem geralmente a preparação da amostra, o sequenciamento, a captura da imagem e a análise dos dados. São as combinações específicas de protocolos que distingue uma tecnologia da outra e determina o tipo de dados gerados a partir de cada plataforma. Estas diferenças na saída dos dados apresentam desafios na comparação das plataformas em relação à qualidade das sequências e ao custo benefício. Embora cada fabricante forneça seus índices de qualidade e estimativas de precisão, não existe um consenso de que a qualidade por base seja equivalente de uma plataforma para a outra (METZKER, 2010).

Todas as três tecnologias de RNA-Seq têm seus prós e contras. A Roche/454 oferece a vantagem de apresentar fragmentos de sequências maiores, na média de 400 bp, o que propicia o mapeamento único desta sequência quando comparados aos fragmentos de tamanho de curto gerados pelas tecnologias Illumina/Solexa e Life Technologies/SOLiD, na qual sequências curtas podem gerar redundâncias nos dados. No entanto, o número de sequências gerado por sequenciamento é muito menor quando comparado com as outras duas tecnologias. Devido ao maior número de sequências geradas, as tecnologias Illumina e SOLiD são consideradas mais eficazes e proporcionam uma maior detecção de transcritos com maior acurácia na expressão gênica. Além disso, estudos demonstraram que uma alta

cobertura de sequenciamento é necessária para detectar transcritos raros ou isoformas, o que só é possível em plataformas de sequenciamento de fragmentos curtos (NAGALAKSHMI et al., 2008; JAIN, 2011). Adicionalmente, avanços recentes nas tecnologias Illumina/Solexa e Life Technologies/SOLiD fornecem sequências suficientemente grandes de até 150 pb, superando a desvantagem de sequências de tamanho curto. Embora as plataformas Illumina/Solexa e Life Technologies/SOLiD ofereçam vantagens e desvantagens semelhantes, o uso da plataforma Illumina/Solexa tem se destacado (NAGALAKSHMI et al., 2008; MARIONI et al., 2008; JAIN, 2011) e será descrita em detalhes neste tópico.

O sequenciamento na plataforma Illumina/Solexa, assim como o sequenciamento de Sanger, é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A inovação dessa plataforma consiste na clonagem “in vitro” dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (TURCATTI et al., 2008; CARVALHO, SILVA, 2010).

O processo é dividido em quatro etapas: 1) preparo das bibliotecas de cDNA; 2) clusterização; 3) sequenciamento e captura de imagem e 4) análise dos resultados (Figura 3). O estudo do transcriptoma, em geral, inicia-se com a extração de RNA total de boa qualidade do tecido e organismo de interesse. O RNA ribossomal (rRNA) representa a grande maioria do RNA total celular. Para maximizar a diversidade de sequências é aconselhável reduzir a quantidade de rRNA presente nas amostras (WILHELM *et al*, 2010). Desta forma, para organismos eucariotos, o RNA mensageiro (mRNA) é isolado por meio de colunas de oligo dT e o restante do RNA, como o rRNA, é eliminado. No caso de organismos procariotos, é feita a remoção do rRNA da amostra com esferas magnéticas que contêm sondas que capturam este rRNA. Posteriormente, a molécula de mRNA é convertida na primeira fita de DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa. Em seguida, a fita simples é convertida em uma molécula de cDNA de fita dupla pela enzima DNA polimerase. As moléculas de cDNA são fragmentadas aleatoriamente em fragmentos de tamanhos curtos pela ação da enzima DNase I. As extremidades destes fragmentos de cDNA são convertidas para extremidades cegas ou abruptas pela enzima T4 DNA polimerase. A ação exonuclease 3'-5' desta enzima remove as

bases em excesso da extremidade 3" e a ação polimerase preenche a extremidade 5". Em seguida, as extremidades são adeniladas para facilitar a ligação dos adaptadores. Posteriormente, os adaptadores são adicionados. Por fim, os fragmentos de cDNA são amplificados por uma reação de PCR seletiva, na qual apenas os fragmentos que contém adaptadores em ambas as extremidades são amplificados. Após esta etapa, as bibliotecas de cDNA estão prontas para o processo de clusterização.

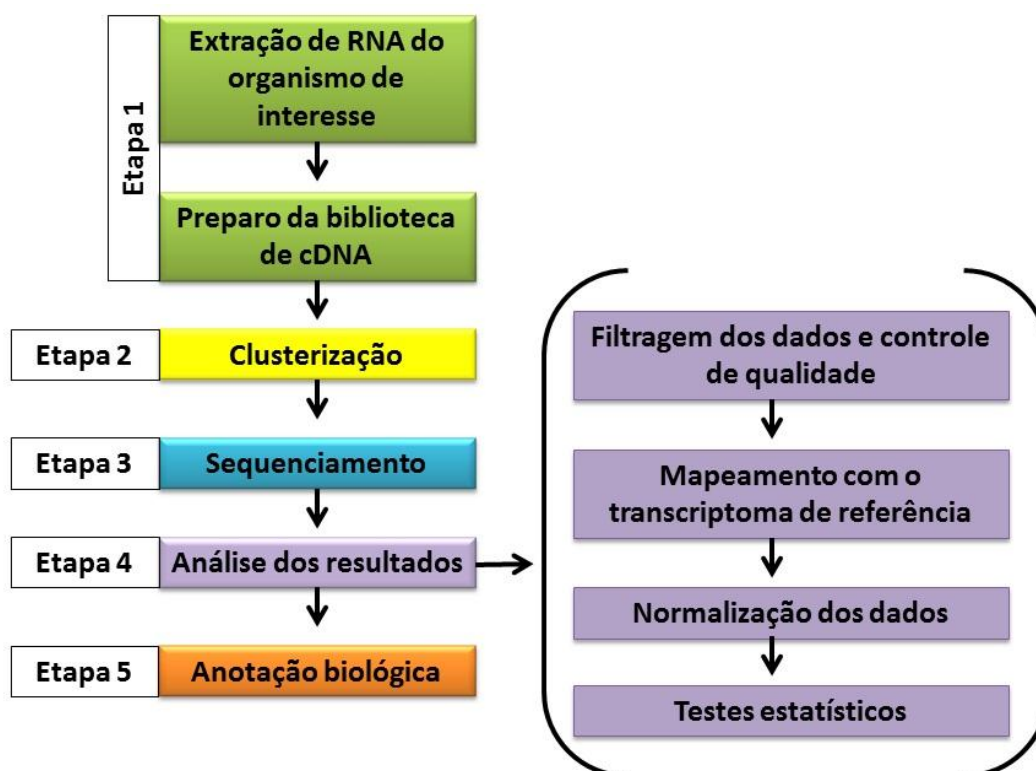


Figura 3. Esquema geral de um experimento de expressão gênica pela técnica RNA-Seq na plataforma Illumina/Solexa. A etapa 1 engloba a preparação da amostra a partir do RNA extraído do organismo de estudo e sua conversão em uma biblioteca de cDNA. A etapa 2 é a clonagem *in vitro* para a amplificação da amostra, chamada de clusterização. A etapa 3 é o sequenciamento dos "clusters" formados de cada amostra. A etapa 4 compreende a análise dos resultados, com a filtragem dos dados, mapeamento das sequências contra um transcriptoma de referência, normalização dos dados e teste estatístico para aferir significância na diferença de expressão gênica de um determinado transcrito. A etapa 5 é o estudo biológico dos genes diferencialmente expressos, por meio da anotação gênica, categorização funcional dos genes e análises de vias metabólicas. Adaptado de JAIN, 2011.

Na etapa da clusterização, conhecida também como etapa de clonagem, os fragmentos de cDNA são imobilizados em uma superfície sólida, uma lâmina de vidro chamada de “flow-cell” (Figura 4). Uma alta densidade de adaptadores são covalentemente ligados à “flow-cell” e estes são complementares aos adaptadores ligados aos fragmentos de cDNA. Estes adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização. No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos. O fragmento é imobilizado a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em ponte na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em ponte (Figura 4). No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos até 150 vezes e assim, milhares de cópias geradas de cada fragmento de cDNA permanecem próximas umas das outras, formando um “cluster” de sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010). Esta reação de clonagem em fase sólida dos fragmentos de cDNA ocorre em um equipamento chamado CBot (Illumina) e pode produzir de 100 a 200 milhões de “clusters” separados espacialmente na “flow-cell”, proporcionando extremidades livres para que um oligonucleotídeo de sequenciamento universal se hibridize para iniciar a reação de sequenciamento (METZKER, 2010).

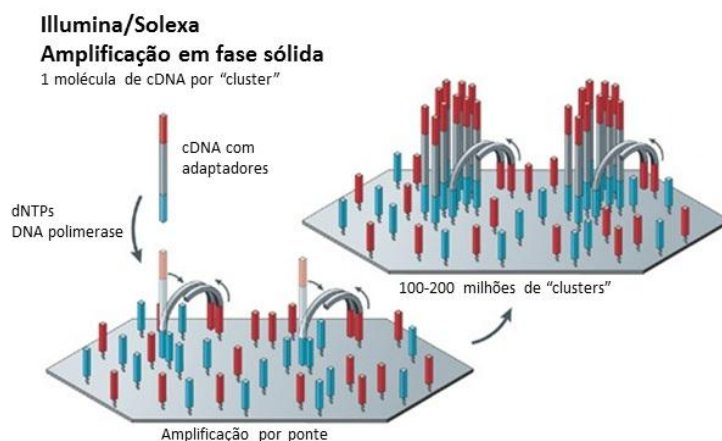


Figura 4. Etapa da clusterização na plataforma Illumina/Solexa. Os fragmentos de cDNA são imobilizados em uma superfície sólida repleta de adaptadores complementares, chamada de “flow-cell”. Nesta superfície sólida, milhares de cópias geradas de cada fragmento de cDNA permanecem próximas umas das outras, formando um “cluster” de sequenciamento. Esta etapa é conhecida também como etapa de clonagem *in vitro*. Fonte: METZKER, 2010.

A terceira etapa é realizada em uma plataforma de sequenciamento. O sequenciamento e a captura de imagem utiliza terminadores reversíveis em um método cíclico que compreende a incorporação de nucleotídeos, imagens de fluorescência e clivagem (METZKER, 2005; METZKER, 2010). Para cada ciclo do sequenciamento, os quatro nucleotídeos acoplados a quatro diferentes fluoróforos são adicionados ao mesmo tempo na “flow-cell” (WILHELM et al., 2010). Uma DNA polimerase se liga aos fragmentos de cDNA de cada “cluster” presente na “flow-cell” e incorpora apenas um nucleotídeo fluorescente que apresenta complementariedade com a fita molde do fragmento. As terminações destes nucleotídeos são reversíveis, ou seja, elas podem apresentar uma extremidade 3' bloqueada, para impedir a incorporação de mais de uma base por ciclo, e uma extremidade 3' desbloqueada, para dar continuidade ao sequenciamento. Isto é possível por meio do uso de nucleotídeos modificados, chamados de dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Após a incorporação de um único nucleotídeo, é realizada a lavagem dos nucleotídeos não adicionados (Figura 5). A captura da imagem é então realizada para identificar o nucleotídeo incorporado. A alta densidade de “clusters” de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata (CARVALHO; SILVA, 2010). As quatro cores são detectadas pela

captura de imagem por reflexão de fluorescência interna total (TIRF) com o uso de dois “lasers” (Figura 6). Este passo é seguido por uma clivagem. As terminações 3' bloqueadas necessitam da quebra de duas ligações químicas para remover o fluoróforo e restaurar o grupo 3'-OH. Uma lavagem adicional é realizada antes de iniciar o próximo passo de incorporação.

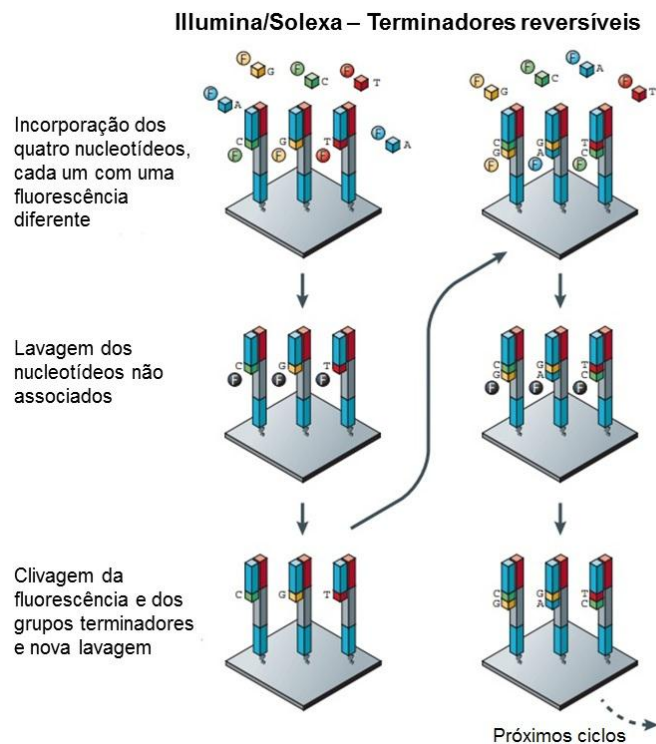


Figura 5. Sequenciamento dos “clusters” na plataforma Illumina. Incorporação de nucleotídeos modificados, chamados de dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Fonte: METZKER, 2010.

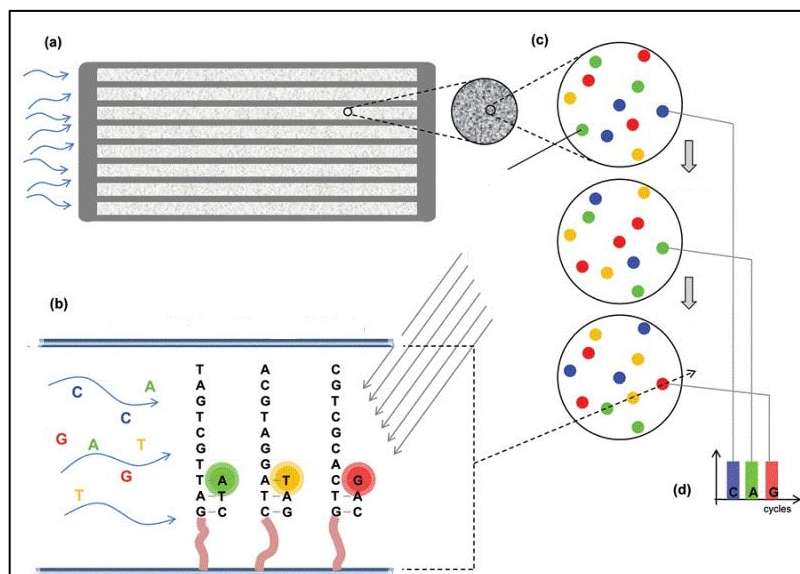


Figura 6. Captura da imagem do sequenciamento na plataforma Illumina/Solexa. A alta densidade de “clusters” de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. As quatro cores são detectadas pela captura de imagem por reflexão de fluorescência interna total (TIRF) com o uso de “lasers”. Fonte: GILCHRIST, 2013.

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

A última etapa é a análise dos dados. Esta etapa é considerada crítica, porque a enorme quantidade de dados produzidos em cada sequenciamento requer uma infraestrutura adequada para as análises computacionais e locais para armazenamento dos dados. Além disso, devido ao grande número de sequências, esta etapa é considerada também a mais demorada da tecnologia RNA-Seq (WILHELM et al., 2010).

Um experimento típico de análise de expressão gênica pelo RNA-seq envolve quatro etapas na análise dos dados. O primeiro passo é o controle de qualidade dos dados, chamado também de etapa de filtragem, que permite a remoção das sequências de baixa qualidade (WILHELM et al., 2010). A segunda etapa é o mapeamento das sequências com o genoma ou transcriptoma de referência e é considerado o passo mais importante (TRAPNELL; SALZBERG, 2009). Este passo é computacionalmente intensivo e depende do tipo de dados de sequências disponíveis, como o comprimento das sequências, quantidade de dados e o formato dos dados. Diversos algoritmos de mapeamento e alinhamento projetados para processar milhões de sequências curtas deram origem aos programas como Eland, SOAP, MAQ, RMAP, SSAHA2, SHRiMP, Stampy, TopHat, RNA-MATE e Bowtie (CLOONAN et al., 2009; RUMBLE et al., 2009; TRAPNELL et al., 2009; GARBER et al., 2011; JAIN, 2011) que já estão disponíveis para o processo de mapeamento das sequências.

Na terceira etapa, uma normalização dos dados é atribuída a cada gene ou transcrito, que representa a sua verdadeira quantidade na amostra. Em geral, o número total de sequências mapeadas para um dado gene é aproximadamente proporcional ao número de sequências produzidas e comprimento dos transcritos. Esta etapa é aplicada para minimizar os efeitos não relacionados à diferença entre as condições experimentais. A quantidade de sequências é expressa na unidade RPKM ("Reads per kilobase per million of mapped reads") e é utilizada como uma medida quantitativa normalizada para comparar os diferentes genes dentro da mesma amostra ou a expressão diferencial de genes em diferentes amostras biológicas (MORTAZAVI et al., 2008).

A última etapa é a aplicação de um teste estatístico para identificar os transcritos que exibem expressão gênica diferencial. Muitos métodos estatísticos, incluindo o teste de razão de verossimilhança, teste Z, o teste exato de Fisher e método bayesiano empírico baseado em Poisson ou em modelos de distribuição binomial têm sido propostos para analisar a significância da expressão diferencial (BLOOM et al., 2008; MARIONI et al., 2008; JIANG; WONG, 2009; HARDCASTLE; KELLY, 2010). Nos últimos anos, várias ferramentas foram desenvolvidas para analisar a expressão gênica diferencial com base em diferentes algoritmos

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

Portanto, a tecnologia do RNA-Seq tem sido aplicada em vários organismos para revelar suas atividades transcricionais. Dados de sequenciamento que, no passado, levariam anos para serem gerados, podem agora ser produzidas numa questão de dias ou mesmo horas. A enorme quantidade de dados gerados nesta tecnologia permitiu a criação de perspectivas empolgantes em várias áreas científicas, que mudou a forma como os problemas são abordados em muitas áreas da biologia molecular. Em particular, o estudo dos transcriptomas apresentou um grande avanço após o advento desta tecnologia (STRICKLER, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e estirpe bacteriana

Os experimentos foram conduzidos com plantas com mais de dois anos de idade de tangerina Satsuma e de laranja doce Hamlin enxertadas em limão Cravo, alocadas em vasos de 5 litros. As mudas foram fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) e cultivadas em ambiente protegido. Foram selecionadas as plantas que apresentaram tamanho uniforme e emissão de folhas jovens. Para isto, as plantas foram podadas na mesma época do ano e após dois meses, quando as folhas atingiram aproximadamente 75% de expansão foliar, iniciaram-se os experimentos.

Neste estudo foi utilizado o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), do estoque do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FCAV/UNESP, mantido em frascos contendo tampão fosfato estéril, à temperatura ambiente. Este é o mesmo isolado utilizado no projeto de sequenciamento do fitopatógeno (DA SILVA et al., 2002).

4.2 Curva de crescimento e avaliação dos sintomas

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

para uma concentração de 10^4 UFC/ml por meio de diluição seriada de 10 vezes variando de 10^{-1} a 10^{-7} .

As folhas jovens foram inoculadas pelo método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa sem agulha. As inoculações foram feitas em quatro pontos por folha. Foram utilizadas três plantas por espécie com a inoculação das 20 folhas mais homogêneas por planta. As folhas inoculadas foram coletadas a 0, 1, 5, 18 e 25 dias após a inoculação.

Para cada tempo de coleta, três discos foliares com 1 cm de diâmetro foram recuperados do ponto de inoculação de cada espécie. Os discos foliares foram esterilizados em álcool 70% por um minuto e enxaguados em água destilada estéril por um minuto. Em seguida, cada disco foi macerado em 1 mL de tampão Fosfato Salino PBS 1X estéril, seguido por uma diluição seriada de 10 vezes. Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi plaqueada em meio AN em duplicata. As placas foram mantidas a 28 °C por 72 horas até a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados foram analisados pelo teste de Tukey a 5% (Assistat 7.6 Beta). Os pontos inoculados foram fotografados para a caracterização dos sintomas.

Durante todo o experimento as plantas foram mantidas em um laboratório de segurança construído especialmente para a manipulação e inoculação de Xac em plantas cítricas, sob condições ótimas de temperatura (28 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuridão). Este local, pertencente ao Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBM) da FCAV/UNESP, possui um sistema de filtragem absoluta de ar (filtros EPA), além de possuir antecâmara e pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente.

4.3 Extração de RNA total de citros

Para o preparo do inóculo, a bactéria Xac 306 foi cultivada em meio de cultura sólido AN, e mantida a 28 °C. Após 72 horas, a massa de células foi coletada e diluída em água bi-destilada estéril em tubo estéril de 50 mL. A suspensão foi

ajustada para uma densidade ótica a 600nm (DO600nm) igual a 0,3, equivalente a 10^8 UFC/mL.

As folhas jovens foram inoculadas, em todo o limbo, com a suspensão bacteriana pelo método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa hipodérmica sem agulha. As folhas controle foram inoculadas com água destilada autoclavada. Em cada planta, 3 folhas inoculadas com Xac e 3 folhas inoculadas com água permaneceram em observação por 10 dias para avaliação da virulência e patogenicidade do isolado de Xac, com fotodocumentação dos sintomas para assegurar de que o isolado ainda apresenta a mesma patogenicidade e virulência inicial.

As folhas foram coletadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação e foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até o momento da extração do RNA. As amostras de RNAs totais foram purificadas segundo o método descrito por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987), baseado na extração utilizando uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol – Invitrogen).

A extração de RNA exige cuidados para evitar a contaminação da amostra com RNases. Desta forma, todo material de plástico foi tratado com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N e os utensílios de vidro foram submetidos a um aquecimento de 180 °C por seis horas. Todas as soluções usadas para extração foram feitas com água ultra pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

Para cada tempo de infecção e para cada controle, 1 g de tecido foliar de cada uma das três plantas foi macerado em nitrogênio líquido até a pulverização do material vegetal. As amostras maceradas foram rapidamente transferidas para tubos de vidro especial para centrifuga tipo Corex de 30 mL contendo 10 mL de Trizol. As amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex por 30 segundos e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado na amostra 4 mL de clorofórmio (Merck) e novamente a solução foi submetida a uma agitação em vórtex e incubação a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos tipo Corex de 15 mL e em seguida, foi adicionado clorofórmio equivalente ao volume coletado (0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol). As amostras foram

homogeneizadas em agitador vórtex por 30 segundos e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. Nesta etapa, o sobrenadante foi transferido para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL (1 mL de sobrenadante por tubo). Ao sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de isopropanol absoluto para cada 1 mL da fase aquosa para precipitação do RNA total. A solução foi homogeneizada por inversão vagarosa dos tubos e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada novamente a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugado 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o precipitado de RNA foi seco em bomba a vácuo durante 3 a 5 minutos e ressuspensão em 100 µL de água ultra pura livre de RNase (Invitrogen) pré-aquecida a 60 °C e incubado em banho-maria a 60 °C por 10 minutos.

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

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

Amostras	Legenda
SC24	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Satsuma 24 horas após a inoculação
SC48	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Satsuma 48 horas após a inoculação
SC72	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Satsuma 72 horas após a inoculação
SI24	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Satsuma 24 horas após a inoculação
SI48	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Satsuma 48 horas após a inoculação
SI72	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Satsuma 72 horas após a inoculação
HC24	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Hamlin 24 horas após a inoculação
HC48	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Hamlin 48 horas após a inoculação
HC72	RNA total extraído de folhas inoculadas com água da espécie Hamlin 72 horas após a inoculação
HI24	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Hamlin 24 horas após a inoculação
HI48	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Hamlin 48 horas após a inoculação
HI72	RNA total extraído de folhas inoculadas com Xac da espécie Hamlin 72 horas após a inoculação

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

4.4 Extração de RNA total de Xac

Para o preparo do inóculo, a bactéria Xac 306 foi cultivada em meio de cultura sólido AN, e mantida a 28 °C. Após 72 horas, a massa de células foi coletada e diluída em água bi-destilada estéril em tubo estéril de 50 mL. A suspensão foi ajustada para uma densidade ótica a 600nm (DO600nm) igual a 0,3 equivalente a 10^8 UFC/ml.

Para os tempos de 48 e 72 horas, 60 folhas jovens de cada espécie foram inoculadas, em todo o limbo, com a suspensão bacteriana pelo método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa hipodérmica sem agulha. A recuperação das células bacterianas de Xac foi feita por exsudação por meio de cortes finos com estilete estéril das 60 folhas inoculadas. As tiras das folhas foram imersas em água bi-destilada gelada e autoclavada, seguido por uma agitação suave por 20 minutos. Neste momento, a bactéria inoculada nas folhas foi exsudada para a água. Os restos foliares foram separados por filtração com o uso de gaze e as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 5000 xg por 5 minutos a 4 °C. A partir do sedimento obtido, a extração de RNA de Xac foi feita com o kit Illustra RNAspin Mini Isolation (GE Healthcare Life Sciences) conforme as recomendações do fabricante. Para o controle, a extração do RNA total é feita com o mesmo kit a partir da bactéria Xac 306 cultivada em meio de cultura sólido AN e mantida a 28 °C por 72 horas.

Para o tempo de 24 horas, a bactéria foi cultivada em um meio de cultura XAM1 (7,4 mM de sulfato de amônio, 16 mM de fosfato de potássio monobásico, 30 mM de fosfato de potássio dibásico, 1,6 mM citrato de sódio, 10 mM de frutose, 10

mM de sacarose, 1 mg/mL BSA (soro albumina bovina) em pH 5,4), que leva à indução de genes de patogenicidade e virulência de Xac (CARVALHO, 2006). A bactéria foi mantida a 28 °C por 24 horas sob agitação contínua de 200 rpm. O meio XAM1 é derivado do meio sintético XVM2, no qual Wengelnik e colaboradores (1996) relataram que o mesmo reflete as condições nos espaços apoplásticos da planta hospedeira de Xcv, sendo capaz de induzir a expressão dos genes de patogenicidade.

Neste presente trabalho, foi feita a extração de RNA de Xac recuperada de meio de cultura indutor XAM1 incubada por 24 horas e Xac recuperada após 48 e 72 horas da inoculação nas espécies Satsuma e Hamlin. O controle utilizado foi o mesmo para todas as amostras (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras de RNA total de Xac e sua respectiva legenda.

Amostra	Legenda
XC	RNA total de Xac cultivada em meio de cultura NA
XXAM1-24	RNA total de Xac cultivada em meio de cultura indutor XAM1 por 24 horas
XS48	RNA total de Xac exsudada de folhas da espécie Satsuma 48 horas após a inoculação
XS72	RNA total de Xac exsudada de folhas da espécie Satsuma 72 horas após a inoculação
XH48	RNA total de Xac exsudada de folhas da espécie Hamlin 48 horas após a inoculação
XH72	RNA total de Xac exsudada de folhas da espécie Hamlin 72 horas após a inoculação

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

Para as amostras de RNA total de Xac, foi necessário remover os RNA ribossomais presentes para que estes não interferissem no sequenciamento. Para esta etapa foi utilizado o kit Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit (Gram-negative bacteria) (Episcentre) e o procedimento realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Após a remoção de rRNA das amostras, foi realizada uma nova

quantificação da concentração de RNA com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit Qubit® RNA HS Assay.

4.5 Montagem das bibliotecas de cDNA, clusterização e sequenciamento

As análises de expressão gênica foram conduzidas pela tecnologia de sequenciamento RNA-Seq (Illumina). O RNA mensageiro foi isolado e purificado usando o kit de preparação de amostras TruSeq RNA Sample Preparation v2 (Illumina). O RNA mensageiro foi fragmentado e a primeira e segunda fita de cDNA foram sintetizadas, seguido pela reparação das extremidades das sequências e ligação dos adaptadores.

Nas amostras de RNA de planta, o processo de purificação de mRNA isolou as moléculas de mRNA que continham cauda poli-A utilizando um oligo poli-T ligado à esferas magnéticas. Nas amostras de RNA de bactéria, esta etapa não é realizada. O mRNA purificado foi fragmentado em sequências de 200 pb por enzimas presentes no kit. Após a fragmentação do mRNA iniciou-se a síntese da primeira fita de cDNA por meio da enzima transcriptase reversa e oligonucleotídeos randômicos. O mRNA molde é removido e a segunda fita do cDNA é sintetizado. A partir desta etapa, o kit Ampure XP beads foi utilizado nas etapas de limpeza da amostra. As esferas magnéticas deste kit separaram o cDNA dupla fita do restante dos reagentes. Em seguida, os fragmentos de cDNA fita dupla com extremidades coesivas resultantes da etapa de fragmentação foram convertidas em extremidades cegas pelo End Repair Mix. A atividade da exonuclease 3'-5' deste "mix" remove os nucleotídeos da extremidade 3' e a ação da polimerase adiciona nucleotídeos na extremidade 5'. Após o reparo das pontas, foi adicionado uma base adenina em cada extremidade 3' dos fragmentos de cDNA para evitar que estes fragmentos se liguem uns aos outros durante a próxima etapa, a ligação de adaptadores. Esta adenilação facilita a ligação dos adaptadores que possuem uma base timina. Os adaptadores responsáveis por identificar as amostras foram ligados às extremidades dos fragmentos de cDNA.

Os fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores foram submetidos a uma reação de PCR seletiva que tem como objetivo amplificar a quantidade de DNA da biblioteca. A reação de PCR utiliza um conjunto de oligonucleotídeos que anelam nas extremidades dos adaptadores. Desta forma, a reação de PCR não amplifica fragmentos com apenas um adaptador ou com nenhum adaptador nas suas extremidades. Após esta etapa, para o controle da qualidade das bibliotecas de cDNA, 1 uL de cada biblioteca foi analisada pelo Agilent Technologies Bioanalyser 2100 utilizando o chip específico para DNA (Agilent DNA-1000). As bibliotecas de cDNA devem apresentar um tamanho de 260 pb. A quantificação das bibliotecas de cDNA foi feita pelo fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit Qubit® dsDNA BR Assay.

Após a etapa de validação, as bibliotecas de cDNA de boa qualidade foram normalizadas. Neste processo, todas as bibliotecas foram diluídas para uma concentração de 10nM com o objetivo de manter todas as bibliotecas na mesma concentração. A concentração foi confirmada utilizando o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) e os reagentes do Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies). As bibliotecas de cDNA foram diluídas novamente para a concentração de 1,5 nM.

Na etapa de clusterização foi utilizado o Kit TruSeq™ SR Cluster Kit v3 (Illumina) e o aparelho cBot (Illumina). O sistema cBot utiliza amplificações em ponte para criar centenas de milhões de cópias de uma única molécula molde de DNA simultaneamente em menos de cinco horas. É nesta etapa que as bibliotecas de cDNA se ligam na “flow cell” e formam os “clusters” que posteriormente serão sequenciados. As bibliotecas de cDNA foram desnaturadas com NaOH e em seguida, juntamente com os reagentes do kit e a “flow cell”, alocadas no cBot. As etapas seguintes procederam-se de acordo com as especificações do fabricante.

Após o processo de clusterização, os “clusters” presentes na “flow cell” foram sequenciadas na Facility de sequenciamento da FCAV/UNESP utilizando a plataforma HiScanSQ System (Illumina), seguindo as instruções do fabricante para o RNA-Seq. Os equipamentos da Facility de sequenciamento da FCAV/UNESP foram obtidos no último Programa Equipamentos Multiusuários (EMU) da FAPESP (Proc. No. 2009/53984-20).

4.6 Análise dos resultados

Os dados sequenciados foram preparados e analisados para calcular o perfil de expressão gênica de cada amostra estudada, além da variação de expressão existente entre elas. A análise de expressão foi baseada em um método de alinhamento dos fragmentos (“reads”) contra um transcriptoma de referência devido à alta qualidade e quantidade de dados genéticos de diferentes espécies de *Citrus* disponíveis em bases de dados públicos. No caso da bactéria Xac, o método de alinhamento dos fragmentos foi feito contra o genoma completo de Xac sequenciado e contra seu transcriptoma previamente anotado. As metodologias de análise foram subdivididas em dois pipelines. O primeiro envolveu a construção de um banco de dados de sequências de *Citrus* spp. e Xac. O segundo a aplicação de um pipeline para análise de expressão gênica das bibliotecas sequenciadas, descritos nas seções seguintes.

Os pipelines desenvolvidos para a construção dos bancos de dados não redundantes de transcriptoma de plantas da espécie *Citrus* spp. (Figura 7) e de análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento (Figura 8), foram desenvolvidos por Roberto Herai (School of Medicine, UCSD – University of Califórnia San Diego, San Diego, Califórnia, USA e Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, São Paulo, Brasil) e Adriano Ferrasa (Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil). Outros dois bioinformatas estão envolvidos no projeto: Alessandro Varani (Departamento de Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Jaboticabal-SP) e Renata Izabel Dozzi Tezza (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, UNESP – Univ Estadual Paulista, Jaboticabal-SP). Os recursos computacionais utilizados foram os do Laboratório Multiusuário de Bioinformática da Embrapa Informática Agropecuária, em Campinas-SP, e os do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, em Jaboticabal-SP.

4.6.1 Construção de um banco de dados de transcriptoma de citros

A construção do banco de dados de transcriptoma de citros foi feito com base no pipeline simplificado da Figura 7. Neste pipeline foi feito um levantamento de bancos de dados públicos de transcriptomas de espécies do gênero *Citrus*, e foram identificadas seis bases de dados de transcriptomas, formadas por sequências reais e preditas, geradas por grupos de pesquisa independentes: AFFYM, NCBI, UNIGENE, USDA, CITRUSGDB e PHYTOZOME.

O banco de dados AFFYM da Affimetrix (GeneChip Citrus Genome Array) possui uma base de dados com 33.879 transcritos que foram utilizados como referência para construção de um “chip” de microarranjo para genotipagem de 11 espécies do gênero *Citrus*, incluindo *Citrus sinensis*, *Citrus unshui*, *Citrus aurantium*, *Citrus medica*, *Citrus reticulata*, *Citrus reshni*, *Citrus jambhiri*, *Citrus macrophylla*, *Citrus paradisi*, *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* e *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*. Por se tratar, atualmente, do melhor método disponível para genotipagem em larga escala de plantas da espécie *Citrus* spp., este “chip” foi utilizado pelo trabalho desenvolvido recentemente por Fu et al. (2012) para estudar a doença cancro cítrico.

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

O banco de dados UNIGENE, contendo 101.686 transcritos, utiliza uma base de dados genéticos de *C. clementina* armazenada no portal UNIGENE do NCBI, que foi gerado por grupos de pesquisa independentes. O banco de dados USDA, contendo 31.863 transcritos, utiliza uma base de dados de *Citrus* spp. gerada pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos. Este banco de dados possui dados de transcriptoma das espécies *Citrus sinensis* e *Poncirus trifoliata*.

O banco de dados CITRUSGDB, contendo 46.147 transcritos, produziu uma base de dados a partir de uma pesquisa em *C. sinensis* coordenada por diversos grupos de pesquisa internacionais. E por fim, o banco de dados PHYTOZOME, contendo 33.929 transcritos, gerou uma base de dados a partir de um consórcio

internacional chamado “International Citrus Genome Consortium” (GMITTER et al., 2012), para produzir informações genéticas do genoma e do transcriptoma das espécies de *C. sinensis* e *C. clementina*.

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

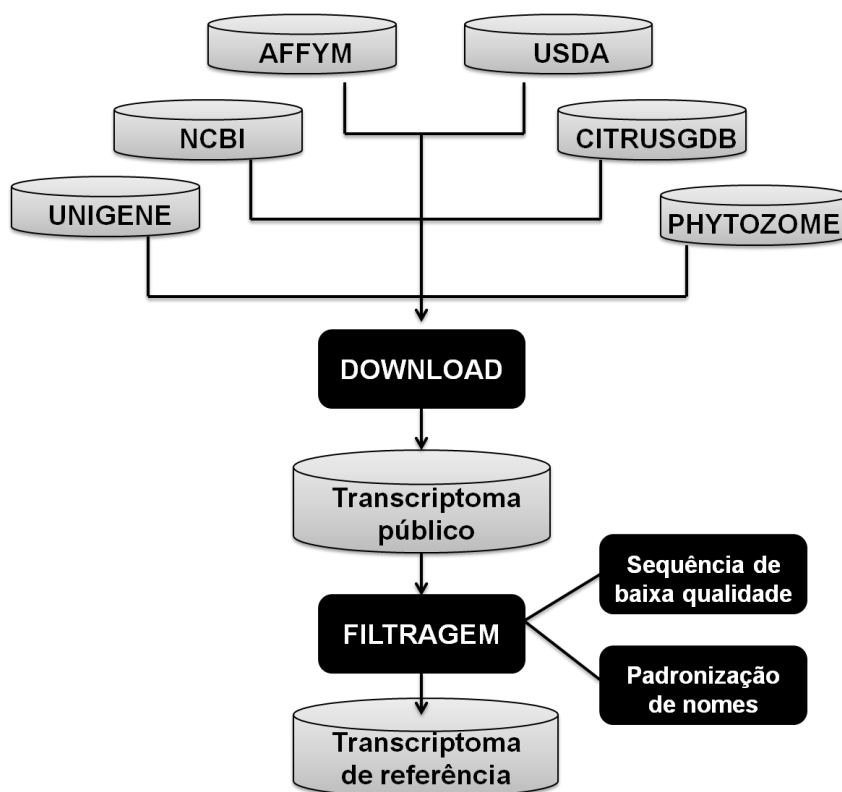


Figura 7. Pipeline para construção de um banco de dados não redundante de transcriptoma de plantas da espécie *Citrus* spp. para estudos de genotipagem. Fonte: Roberto Herai e Adriano Ferrasa.

4.6.2 Clusterização

As bibliotecas de sequenciamento filtradas e alinhadas contra o transcriptoma de referência foram clusterizadas para criação de um dendrograma e um “Heatmap” para cada espécie. Para isto, os valores de expressão gênica normalizados para cada transcrito de uma determinada biblioteca são comparados com todas as outras bibliotecas dentro da mesma espécie, gerando uma matriz de distâncias euclidianas.

Para a criação do dendrograma, a matriz de distâncias é analisada e as bibliotecas com perfil de expressão mais similares são agrupadas de acordo com um método conhecido como vizinho mais próximo (“single linkage method”). Neste método, a matriz de distâncias euclidianas é analisada, e o par de bibliotecas com a menor distância é agrupada. Esse processo é repetido até que todas as bibliotecas façam parte de um grupo. Além do dendrograma, é criado também um gráfico do tipo “Heatmap”, que transforma em cores os valores normalizados da matriz de distâncias. As cores podem variar de branco (maior diferença entre as bibliotecas) para vermelho (bibliotecas idênticas).

4.6.3 Análise dos dados de sequenciamento de citros

O pipeline desenvolvido para análise de expressão gênica é ilustrado na Figura 8. Inicialmente, os dados brutos são filtrados com base na qualidade dos fragmentos sequenciados, cuja nota média no padrão PHRED foi de no mínimo 20 para o fragmento inteiro. Esta análise foi realizada com a ferramenta NGS QC Toolkit (PATEL; JAIN, 2012). As sequências repetitivas não foram removidas pela impossibilidade em se estimar a origem das mesmas, pois não é possível definir se estas sequências representam artefatos oriundos da amplificação das amostras sequenciadas ou se correspondem a fragmentos repetidos reais dentro da amostra biológica.

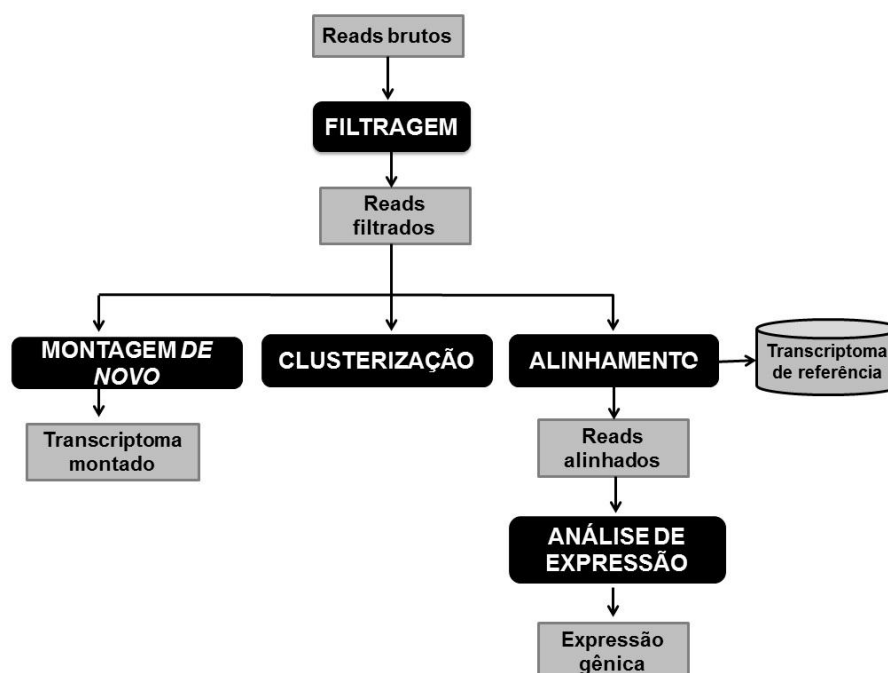


Figura 8. Pipeline para análise de expressão das bibliotecas de sequenciamento. Fonte: Roberto Herai e Adriano Ferrasa.

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

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

Os alinhamentos foram analisados e, para cada transcrito da base do transcriptoma de referência, foi feita a contagem da quantidade absoluta de fragmentos que alinharam em cada transcrito, para cada uma das amostras consideradas. O pacote de ferramentas DESeq (ANDERS; HUBER, 2010), disponível para o ambiente R – Bioconductor, foi usado para realizar o cálculo da variação da expressão gênica diferencial entre pares de amostras, por meio de uma

metodologia de análise de expressão gênica baseada em contagem de fragmentos. O cálculo da expressão normaliza as amostras com base no tamanho de cada uma para permitir a comparação da expressão de um mesmo transcrito entre bibliotecas de diferentes tamanhos. A partir dos dados normalizados, foi feito o cálculo do “Fold-Change”, Log base 2 do “Fold-Change” e a significância estatística (P-valor). O “Fold-Change” indica a variação de expressão normalizada de fragmentos por transcrito entre duas amostras (controle e tratamento), ou seja, é feita a divisão do valor de expressão de um determinado transcrito na amostra infectada pelo valor de expressão do mesmo transcrito na amostra controle. Desta forma, quando um transcrito é mais expresso no tecido infectado, o “Fold-change” será obrigatoriamente maior que um ou se o transcrito for expresso apenas na amostra infectada, o “Fold-change” será infinito (INF), já que qualquer número dividido por zero é infinito. Por outro lado, se um transcrito for mais expresso na amostra controle, o “Fold-change” será obrigatoriamente menor que um ou igual à zero, caso este transcrito seja expresso apenas na amostra controle. Estes valores são controlados por erros estatísticos do tipo 1 (probabilidade de falso positivos), calculados pelo método conhecido por False Discovery Rate (FDR) e ajustados com o uso de testes múltiplos desenvolvido por Benjamin-Hochberg (1995). Neste trabalho, as variações em que o P-valor foi inferior a 0,05 foram consideradas com significância estatística e, portanto, o transcrito é diferencialmente expresso.

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

4.6.4 Construção de um banco de dados de transcriptoma de Xac

O banco de dados de transcriptoma de Xac utilizou como referência o genoma completo da bactéria e seu transcriptoma previamente anotado e disponível no NCBI. Este genoma público de Xac forneceu um modelo de genes com transcritos reais e transcritos preditos. Entretanto, atualmente, estão disponíveis técnicas mais robustas para a predição de genes em genomas de bactérias e o uso destas metodologias tornou possível aumentar a quantidade de genes preditos no

modelo de genes de Xac. Essa etapa foi feita com o uso da ferramenta Glimmer (DELCHER et al., 1999), utilizando parâmetros previamente definidos pelo software, adequados para a bactéria Xac.

4.6.5 Análise dos dados de sequenciamento de Xac

Os dados de transcriptoma da bactéria Xac foram analisados com base na qualidade média dos nucleotídeos que compõem cada fragmento sequenciado. Esta análise de qualidade foi realizada com a ferramenta NGS Toolkit (PATEL; JAIN, 2012), considerando qualidade média mínima de 20 (padrão PHRED).

A análise de expressão genica diferencial do transcriptoma de Xac foi feita com o uso do genoma de referência da bactéria Xac e de seu respectivo modelo de genes. Os fragmentos sequenciados e filtrados foram alinhados contra o genoma com o uso da ferramenta Bowtie2 (LANGMEAD et al., 2009), configurada para exibir todos os alinhamentos válidos para cada fragmento. Após o alinhamento foi utilizada a ferramenta Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010) que faz uso do modelo de genes atualizado para identificar as regiões do genoma da bactéria que possuem fragmentos associados. Para cada região do genoma, foi verificado se a mesma possui um gene correspondente no modelo de genes, caso contrário foi atribuído um nome fictício que corresponde a um novo transcrito, seja uma isoforma ou um novo cluster. Após a identificação de todos os transcritos sequenciados, foi calculada a expressão gênica diferencial de cada transcrito entre as diferentes amostras consideradas. O cálculo da expressão gênica diferencial já foi descrito em itens anteriores.

4.6.6 Categorização, anotação de sequências e localização de domínios proteicos

Para obter uma descrição funcional de cada transcrito diferencialmente expresso entre as amostras, foi feito o uso da ferramenta Blast2GO (CONESA et al., 2005), um programa que integra os sistemas Blastx do NCBI com os sistemas de categorização funcional do Gene Ontology Consortium e GO Slim Viewer. A anotação de ontologias gênicas baseia-se em mineração de dados oriundos de sequências públicas com anotação disponível, com homologia mínima de 60% entre as sequências. Ao final, as moléculas diferencialmente expressas são classificadas em 3 domínios: a) processo biológico, que indica as operações ou os conjuntos de eventos moleculares com início e fim definidos em que o produto do gene estudado participa e que são fundamentais para o funcionamento de uma célula, tecido, órgãos ou organismo; b) função molecular, que indica as atividades elementares do produto do gene a nível molecular; e c) componente celular, que indica a parte da célula ou o ambiente extracelular em que o produto do gene desempenha sua função.

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

Após o uso destes programas e no auxílio destes para determinação prévia das funções de cada sequência, a anotação gênica das sequências apresentadas neste presente trabalho foi feita manualmente, baseada na literatura científica disponível até o momento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação da curva de crescimento de Xac e avaliação dos sintomas de cancro cítrico em tangerina Satsuma e laranja doce Hamlin

Para confirmar os níveis de resistência ao cancro cítrico das espécies selecionadas neste trabalho, foi realizada a observação dos sintomas de cancro cítrico em folhas inoculadas com Xac. Discos foliares foram coletados em diferentes dias após a inoculação para determinar a curva de crescimento de Xac em planta. Os sintomas, em ambas as espécies, se iniciaram a partir do décimo dia após a inoculação, com aparecimento de minúsculas lesões no local da inoculação na parte abaxial da folha. No décimo primeiro dia, foi possível observar sintomas semelhantes na espécie resistente e também na espécie suscetível (Figura 9). No entanto, a partir do vigésimo dia, os sintomas na espécie Hamlin evoluíram para lesões eruptivas e salientes que se desenvolveram por todo o limbo foliar. Por outro lado, na espécie Satsuma, não houve o progresso das lesões, apenas o surgimento de necrose do tecido foliar no local da inoculação. Esta morte do tecido na espécie resistente é comumente caracterizada com uma reação de hipersensibilidade (RH).

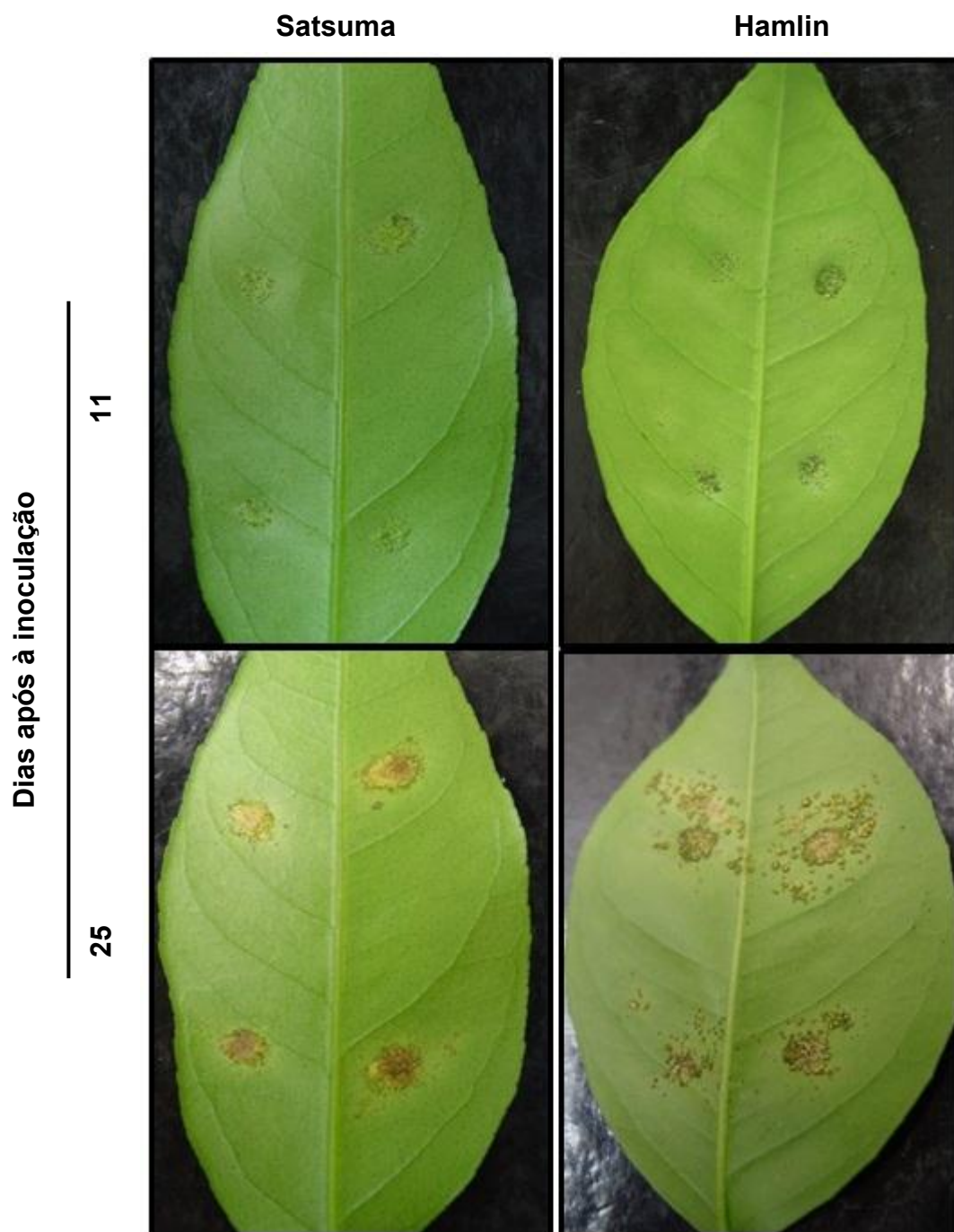


Figura 9. Comparação dos sintomas de cancro cítrico na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 11 e 25 dias após inoculação com Xac.

A curva de crescimento de Xac é semelhante em ambas às espécies até o quinto dia após a inoculação (Figura 10). No entanto, os ensaios de crescimento bacteriano demonstraram que as populações de Xac em folhas de Satsuma foram significativamente menores comparado com o crescimento em Hamlin no décimo primeiro. No décimo oitavo dia, não houve diferença estatística, mas o número de

bactérias foi inferior na espécie resistente Satsuma. Estes resultados indicam que a espécie Hamlin é mais suscetível à infecção por Xac quando comparada com a espécie Satsuma.

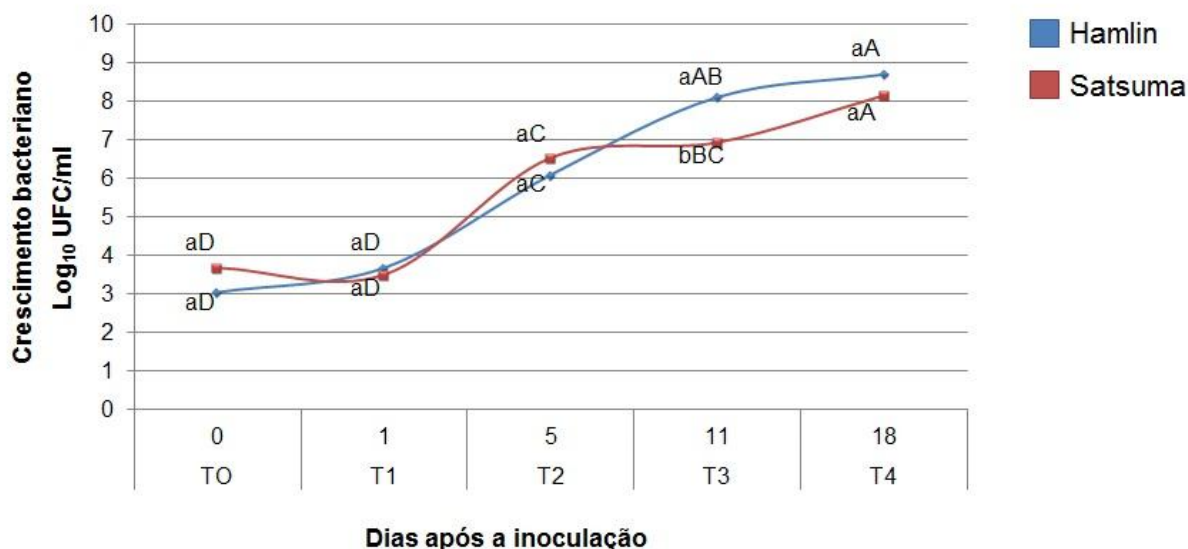


Figura 10. Curva de crescimento de Xac nas espécies Hamlin e Satsuma até o 18º dia após a inoculação. Pontos acompanhados de letras minúsculas iguais não se diferem entre si estatisticamente em cada tempo e pontos acompanhados de letras maiúsculas iguais não se diferem estatisticamente entre os tempos no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos comparativos são estratégias eficientes e importantes para uma análise crítica de genótipos com resistência a estresses contrastantes. Estudos anteriores descrevem que a espécie de tangerina Satsuma é resistente ao cancro cítrico, enquanto as espécies de laranja doce, como a Hamlin, são suscetíveis (LEITE JUNIOR, 1990; FEICHTENBERGER et al., 2005; TAZIMA et al., 2008). Este comportamento foi confirmado pelos ensaios biológicos do presente trabalho através da observação fenotípica dos sintomas e a avaliação da curva de crescimento bacteriano após a inoculação com Xac em ambas as espécies.

5.2 Verificação da concentração e integridade do RNA Total extraído

Uma das maneiras de avaliar a pureza de uma amostra de RNA é obter o espectro de absorbância da amostra utilizando um espectrofotômetro. Uma amostra de RNA de boa qualidade deve exibir uma curva em formato de sino, com um único pico em 260 nm. Contaminantes, como proteínas, apresentam um pico de absorbância a 280 nm e outros contaminantes, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos (fenol) apresentam pico de absorbância em torno de 230 nm. Por isso, a razão da absorbância 260/280 nm é frequentemente utilizada para avaliar a contaminação da amostra de RNA por proteínas, sendo o valor de referência, ou seja, uma amostra livre de proteínas, igual a 2,0. Todas as amostras de RNA extraídas de planta e Xac apresentaram resultados satisfatórios em relação à absorbância da solução de RNA a 260/280nm pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Tabela 4). A razão da absorbância 260/230 nm também é utilizada para avaliar a contaminação por outros compostos, apresentando um valor de referência em torno de 2,0. Algumas amostras apresentaram um valor abaixo de 2,0, no entanto, esta característica não interferiu na qualidade e integridade destas amostras.

Tabela 4. Concentração e relação 260/280 e 260/230 das amostras de RNA total extraídas de folhas de Satsuma e Hamlin e RNA total extraídos de células bacterianas de Xac cultivadas em meio de cultura (XC e XXAM1-24) e exsudadas de folhas de Satsuma e Hamlin.

Espécie	Amostras de RNA total	Concentração (ng/μl)	Relação 260/280	Relação 260/230
Satsuma	SC24	57,68	2,00	0,26
	SC48	199,60	2,03	1,90
	SC72	210,00	1,90	1,60
	SI24	206,19	1,92	1,63
	SI48	103,60	1,93	0,26
	SI72	100,87	2,06	0,25
Hamlin	HC24	106,09	2,06	1,32
	HC48	41,40	2,20	1,22
	HC72	564,00	2,08	2,34
	HI24	420,00	2,01	1,92
	HI48	177,00	2,10	1,95
	HI72	437,00	2,08	2,34
Xac	XC	1021,00	2,17	2,06
	XXAM1-24	2568,71	2,13	2,25
	XS48	241,54	2,15	0,95
	XS72	851,00	2,20	2,03
	XH48	1287,00	2,15	1,54
	XH72	550,00	2,10	2,33

As concentrações (ng/μl), para tecido vegetal, variaram de 41,40 a 564,00 ng/μL, enquanto que para as células bacterianas, foram de 241,54 a 2.568,71 ng/μL de RNA total. A montagem da biblioteca de cDNA necessita de, no mínimo, 1 μg de RNA total, segundo o protocolo TruSeq RNA Sample Preparation v2 (Illumina), utilizado neste experimento. Portanto, todas as amostras de RNA extraídas apresentaram concentração de RNA suficientes para o prosseguimento do experimento (Tabela 4).

Para avaliar a integridade do RNA é possível utilizar, principalmente, duas abordagens. A primeira é submeter o RNA a uma eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes e a segunda é analisar o RNA por meio de um sistema de eletroforese capilar, em um equipamento conhecido com Bioanalyser.

O gel de agarose desnaturante permite verificar a integridade do RNA total extraído por meio da visualização das bandas de RNA ribossomal (rRNA). A presença de rastro abaixo das bandas de rRNA indicam degradação e, acima delas, pode indicar contaminação por DNA genômico. Portanto, um RNA de boa qualidade

deve apresentar bandas bem definidas e sem rastros. Além disso, a banda referente ao rRNA 28S deve apresentar o dobro da intensidade da banda do rRNA 18S, no caso de organismos eucariotos. Para organismos procariotos, a banda referente ao rRNA 23S deve apresentar o dobro de intensidade da banda do rRNA 16S. Este parâmetro foi utilizado no início do projeto (Figura 11). No entanto, esta técnica exige uma quantidade considerável de RNA (mínimo de 1 µg), o que foi limitante para algumas amostras, e, além disso, não é uma técnica muito precisa, pois é capaz de detectar somente um grau considerável de degradação.

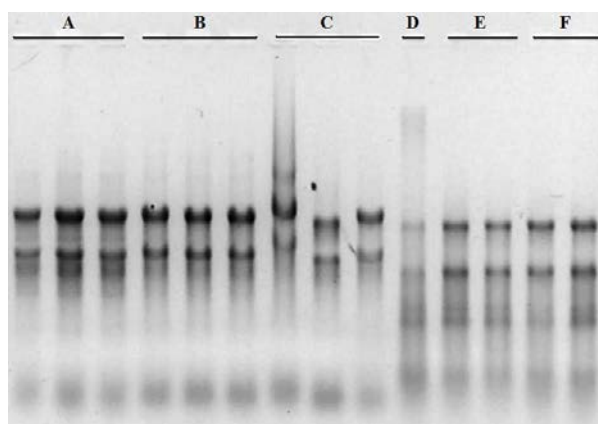


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes do RNA extraído por Trizol de folhas de Hamlin coletadas 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas após a inoculação com suspensão de Xac 10^8 UFC/mL e do RNA extraído pelo kit Illustra RNAspin Mini Isolation de células bacterianas de Xac exsudadas de folhas de Hamlin após 24 (D), 48 (E) e 72 (F) horas de inoculação. A concentração do gel foi de 1%, a corrida foi feita a 80 v e a quantidade de amostra aplicada em cada poço foi de 1 µg.

Por outro lado, o equipamento Bioanalyzer é considerado, atualmente, a melhor opção para avaliar a integridade do RNA. Esta técnica exige uma pequena quantidade de RNA e utiliza um corante fluorescente que permite avaliar tanto a integridade quanto a concentração de RNA na amostra. O princípio é o mesmo de uma eletroforese em gel de agarose, mas a corrida é feita em um capilar contendo o polímero e é gerado um eletroferograma, o qual é analisado automaticamente pelo aparelho e permite a detecção de qualquer traço de degradação. O resultado é exibido na forma de um gráfico, que calcula a razão 28S/18S ou 23S/16S com maior precisão a partir dos respectivos picos. Além disso, o equipamento possui um programa que utiliza um algoritmo para analisar os resultados obtidos e atribuir à

amostra uma pontuação (“RNA Integrity Number” - RIN) que varia de 1 a 10. A técnica de RNA-Seq exige um RNA de alta qualidade. Uma amostra satisfatória e sem degradação deve apresentar um RIN de 8 ou mais. A integridade do RNA total extraído do tecido vegetal apresentou uma média de RIN de 8,4 (mínimo 8,0 e máximo 8,8) (Figuras 12 e 13).

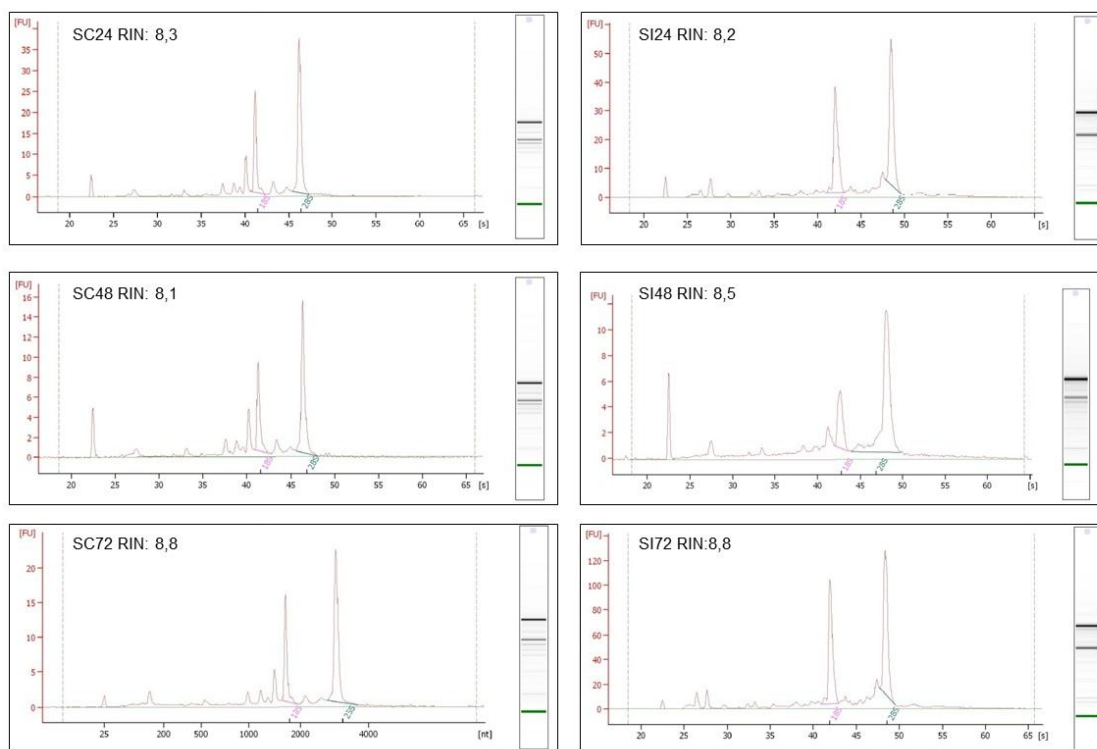


Figura 12. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de tecido vegetal da espécie Satsuma.

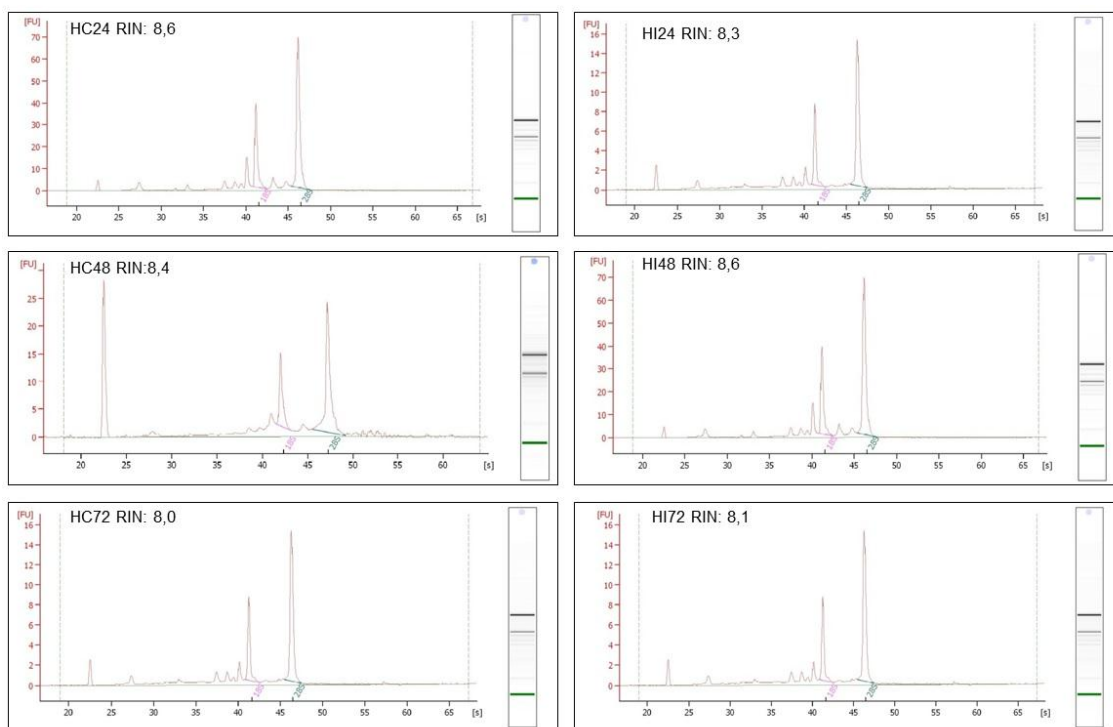


Figura 13. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de tecido vegetal da espécie Hamlin.

No entanto, a integridade do RNA total de Xac de algumas amostras não atingiu o valor de RIN necessário. O problema encontrado foi no processo de exsudação da bactéria, principalmente no primeiro tempo de coleta 24 horas. A hipótese é que a bactéria não consegue se multiplicar muito neste intervalo de tempo e a quantidade de bactéria recuperada não é suficiente para iniciar a extração de RNA. Além disso, no momento do corte das folhas cítricas, vários compostos fenólicos da planta contribuem para o processo de degradação do RNA da bactéria. Devido a estes problemas, é importante salientar que a extração de RNA de Xac é um processo difícil e várias tentativas foram realizadas para se obter um RNA de boa qualidade. No tempo 24 horas não foi possível extrair um RNA de Xac de boa qualidade (Figura 14), pois estas amostras apresentaram valores de RIN entre 4,7 a 5,8, mesmo após diversas tentativas de extração de RNA. Desta forma, foi inviável o uso destas amostras para a montagem de bibliotecas de cDNA e sequenciamento. Devido a este problema, foi realizada a extração de RNA de Xac cultivado em meio de cultura indutor XAM1 por 24 horas, no intuito de substituir a amostra 24 horas de Xac inoculada em planta.

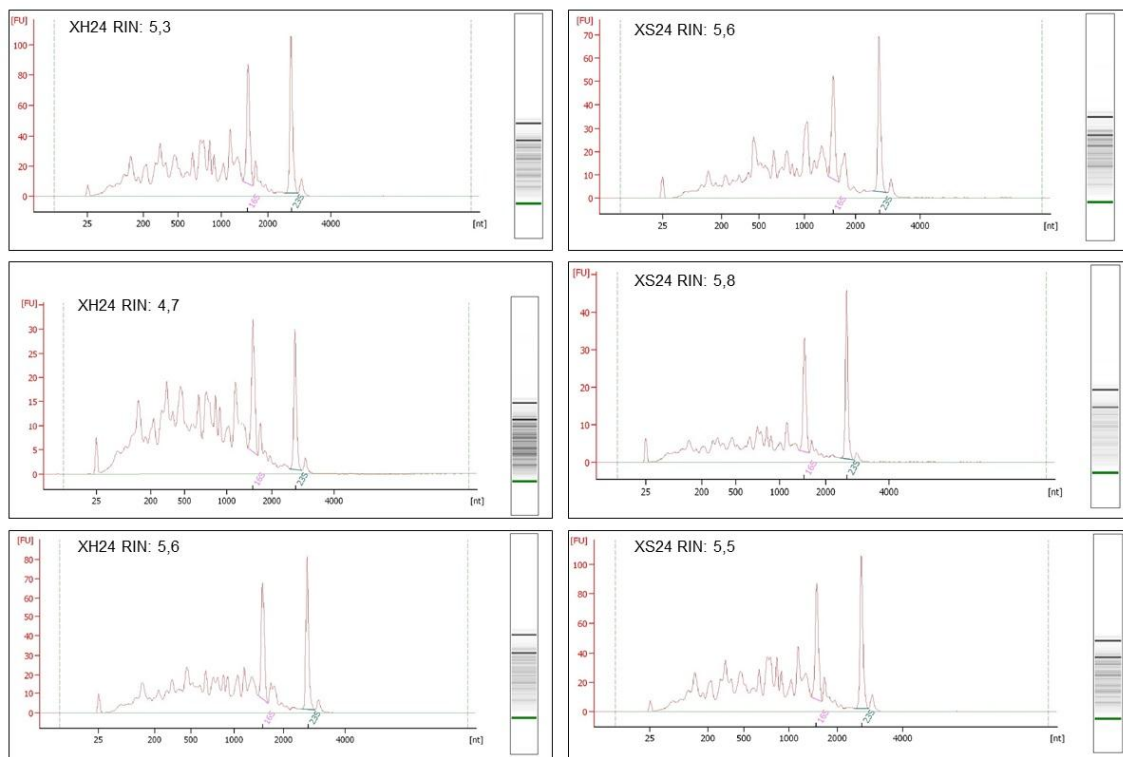


Figura 14. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de células da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 24 horas após inoculação em folhas da espécie Hamlin e Satsuma.

Para as amostras de Xac nos tempos 48 e 72 horas após a inoculação na espécie Satsuma e Hamlin, para o tempo 24 horas cultivado em meio XAM1 e para o controle, a integridade do RNA de Xac apresentou valores satisfatórios, com o valor de RIN em torno de 8,2 (Figura 15). Portanto, todas as amostras de RNA utilizadas no presente trabalho para a obtenção do transcriptoma por RNA-Seq, seja de planta ou de bactéria, possuíam a qualidade necessária para tal análise.

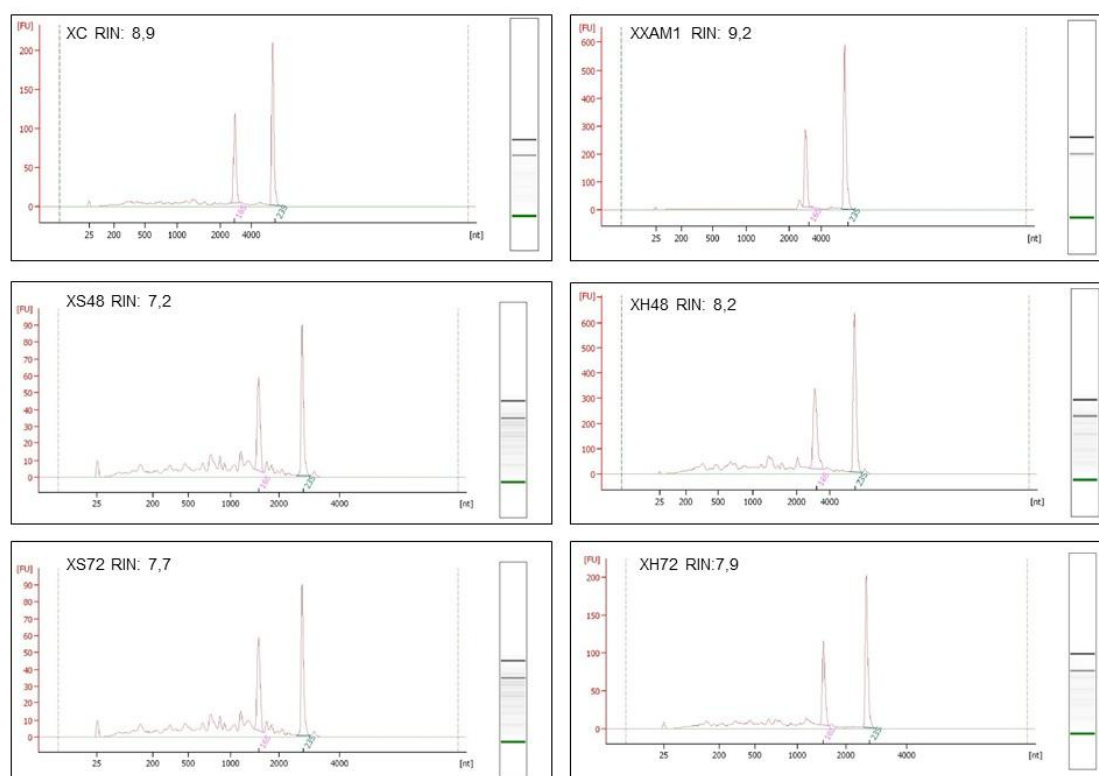


Figura 15. Eletroferograma e RIN obtidos das amostras de RNA total extraídas de células da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

5.3 Análises do RNA-Seq das bibliotecas de cDNA de planta

Este estudo buscou investigar a expressão gênica diferencial e temporal de espécies cítricas contrastantes em relação à resistência ao cancro cítrico por meio da nova tecnologia de sequenciamento RNA-Seq (Illumina). Um total de 184.088.483 sequências foram geradas a partir de fragmentos de 50 pares de bases provenientes de 12 bibliotecas de cDNA (Tabela 5), as quais foram construídas a partir de RNA extraído de folhas de Satsuma coletadas após 24, 48 e 72 horas após a inoculação com água (Satsuma Controle – SC24, SC48, SC72), de folhas de Satsuma coletadas 24, 48, 72 horas após a inoculação com Xac (Satsuma infectada – SI24, SI48, SI72), de folhas de Hamlin coletadas após 24, 48 e 72 horas após a inoculação com água (Hamlin controle – HC24, HC48, HC72) e de folhas de Hamlin coletadas 24, 48, 72 horas após a inoculação com Xac (Hamlin infectada – HI24, HI48, HI72). Deste número total de sequências geradas pelas 12 bibliotecas, 79,14%

(145.736.078 sequências) foram consideradas de alta qualidade para a análise dos resultados. A partir das sequências de alta qualidade, 96,02% foram alinhados com sucesso contra o transcriptoma de referência (Tabela 5). Estes resultados indicam que os dados do sequenciamento são consistentes e adequados para uma análise de transcriptoma de alta qualidade.

O sequenciamento das amostras baseou-se no uso da técnica de “barcoding” para tornar possível a multiplexação de 6 amostras por canaleta (“lane”) em uma lâmina de vidro (“flow cell”) do sequenciador Illumina. A quantidade mínima de fragmentos do sequenciamento que foi considerada válida para a análise de expressão gênica foi de 5 milhões de sequências (“reads”) de 50 pares de base (pb), totalizando 250 milhões de pb. Esta quantidade de fragmentos baseou-se no tamanho do genoma e na quantidade de genes da planta Satsuma, 380 Mb e 46.147 transcritos respectivamente, que é relativamente menor se comparado a outros organismos, como humanos, ratos e algumas aves (WANG et al., 2011). Apesar de não ser suficiente para detectar e quantificar a presença de transcritos de baixa expressão, a cobertura é válida para aqueles transcritos com variação significativa de expressão entre uma condição e outra (WANG et al., 2011).

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

Tabela 5. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-Seq (Illumina) das bibliotecas de cDNA produzidas a partir de tecido foliar de Satsuma e Hamlin infectado e não infectado com Xac nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Espécie	Biblioteca de cDNA	Número de sequências	Número de sequências com alta qualidade	Sequências alinhadas(%)
Satsuma	SC24	5.046.325	3.383.330	95,11
	SC48	22.802.242	20.124.753	95,92
	SC72	20.778.371	18.173.486	96,60
	SI24	19.555.111	15.414.539	95,10
	SI48	13.795.754	7.880.905	96,05
	SI72	14.193.700	8.156.295	95,80
	Total em Satsuma	96.171.503	73.133.308	
Hamlin	HC24	26.004.642	22.354.232	95,75
	HC48	13.071.339	7.541.330	95,71
	HC72	13.977.301	13.016.788	96,77
	HI24	10.754.499	9.167.729	96,36
	HI48	8.452.941	7.211.617	96,60
	HI72	15.636.258	13.311.074	96,50
	Total em Hamlin	87.916.980	72.602.770	
TOTAL		184.088.483	145.736.078	

5.4 Clusterização

A clusterização permitiu agrupar as bibliotecas que apresentaram o maior número de transcritos em comum em grupos distintos. Na espécie resistente Satsuma, as bibliotecas infectadas SI48 e SI72 foram agrupadas no mesmo grupo. Ambas as bibliotecas também apresentam similaridade com a biblioteca SI24, mostrando que as bibliotecas infectadas apresentaram uma expressão gênica mais homogênea. Por outro lado, as bibliotecas SC24 e SC48 foram agrupadas em outro grupo mais distante, mostrando um perfil de expressão gênica diferente comparado às bibliotecas infectadas com Xac (Figura 16).

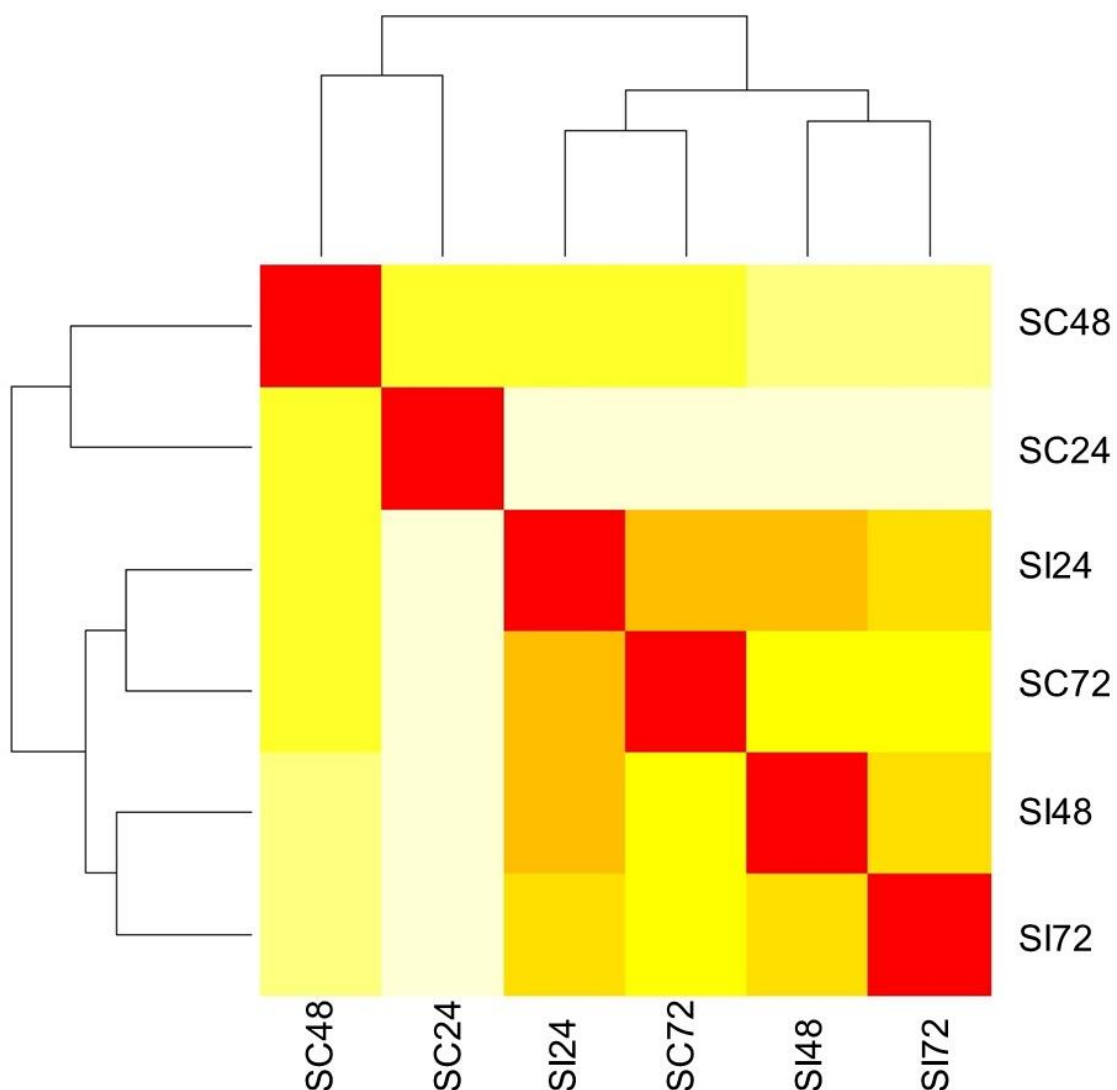


Figura 16. Matriz de expressão (“Heatmap”) de seis bibliotecas de cDNA da espécie resistente Satsuma (Controle e Infectada) 24, 48 e 72 horas após a inoculação com água ou Xac. A escala de cores varia da cor branca, que indica bibliotecas sem nenhum transcrito em comum até a cor vermelha que indica bibliotecas idênticas.

Para as bibliotecas da espécie suscetível Hamlin, é possível observar claramente os agrupamentos entre as bibliotecas controles e as bibliotecas infectadas, formando dois grupos principais, Controle (HC24, HC48 e HC72) e Infectado (HI24, HI48, HI72). Dentro de cada grupo é possível observar que a variação de expressão gênica entre as bibliotecas é muito pequena (Figura 17).

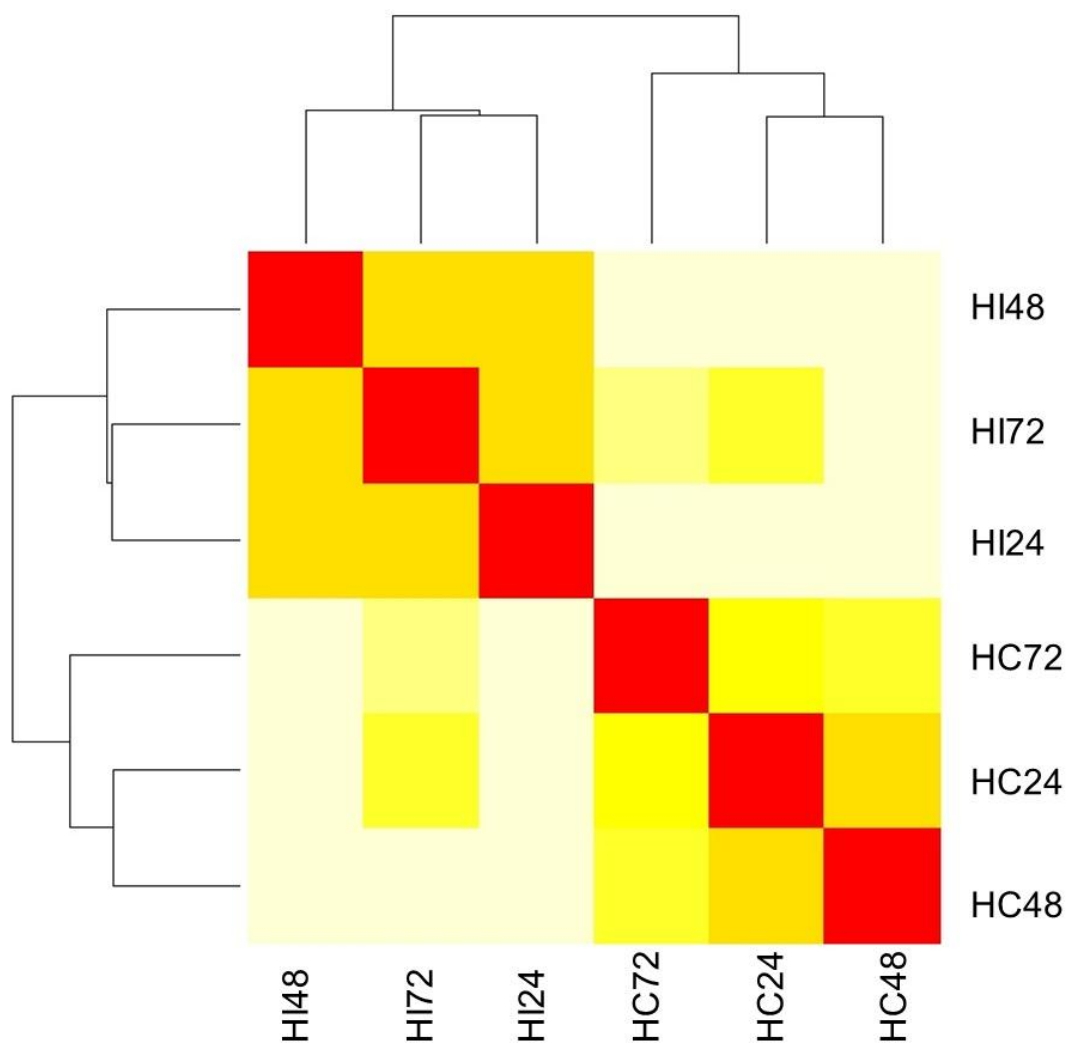


Figura 17. Matriz de expressão (“Heatmap”) de seis bibliotecas de cDNA da espécie suscetível Hamlin (Controle e Infectada) 24, 48 e 72 horas após a inoculação com água ou Xac. A escala de cores varia da cor branca, que indica bibliotecas sem nenhum transcrito em comum até a cor vermelha que indica bibliotecas idênticas.

5.5 Expressão gênica global e temporal em Hamlin e Satsuma após a inoculação com Xac

Neste estudo, foi considerado o valor de “Fold-change” de duas vezes, ou seja, valores >2 ou $<0,5$ e um P-valor menor que 0,05 como critério biológico para seleção de genes diferencialmente expressos (GDEs). Após análises estatísticas, foram identificados 1.301, 6.415 e 3.095 GDEs em folhas da espécie resistente Satsuma 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac, respectivamente, quando comparados com seus controles, dando um total de 10.811 GDEs. Na espécie suscetível Hamlin foram identificados 5.141, 5.082 e 7.290 GDEs após 24, 48 e 72 horas da inoculação com Xac, respectivamente, totalizando de 17.513 GDEs. Os transcritos que apresentaram uma expressão maior no tecido infectado, com valor de “Fold-change” maior ou igual dois, foram considerados, neste trabalho, como genes induzidos. Já, os transcritos que apresentaram uma expressão maior no tecido controle, com valor de “Fold-change” menor ou igual a 0,5, foram considerados como genes reprimidos.

Em Satsuma, no tempo 24 horas, 649 genes foram induzidos, enquanto 652 genes foram reprimidos. No tempo 48 horas, foram identificados 3.799 genes induzidos e 2.616 genes reprimidos e, no tempo 72 horas, 2.018 genes induzidos e 1.077 genes reprimidos (Figura 18). Por outro lado, na espécie Hamlin, 2.294 genes foram induzidos e 2.848 genes foram reprimidos no tempo 24 horas. No tempo 48 horas, foram identificados 2.555 genes induzidos e 2.527 genes reprimidos e no tempo 72 horas, 3.315 genes induzidos e 3.975 genes reprimidos (Figura 18). Estes dados mostram que as espécies Satsuma e Hamlin apresentam uma diferença notável em resposta ao ataque de Xac a nível transcricional.

É importante destacar que o genótipo suscetível Hamlin apresentou um número de GDEs responsivos à infecção por Xac (17.513 GDEs) 62% a mais do que o apresentado pelo genótipo resistente Satsuma (10.811 GDEs). Estes resultados estão de acordo com trabalhos relacionados ao estresse salino, no qual as variedades tolerantes de tomate e arroz expressaram menos GDEs do que as variedades suscetíveis (TAJI et al., 2004; WALIA et al., 2005; SUN et al., 2010). Estes dados também foram muito similares ao trabalho de Fu e colaboradores

(2012), em que a espécie resistente kumquat Meiwa (*Fortunella crassifolia*) apresentou um menor número de GDEs do que a espécie suscetível de laranja doce Newhall (*C. sinensis*) após a inoculação com Xac. Uma das explicações para esta resposta diferente entre genótipos resistentes e sensíveis pode estar relacionada ao fato que os genótipos resistentes apresentam uma resposta molecular limitada ao nível transcricional porque sofrem menos injúrias e apresentam um nível de estresse menos elevado comparado com os genótipos suscetíveis.

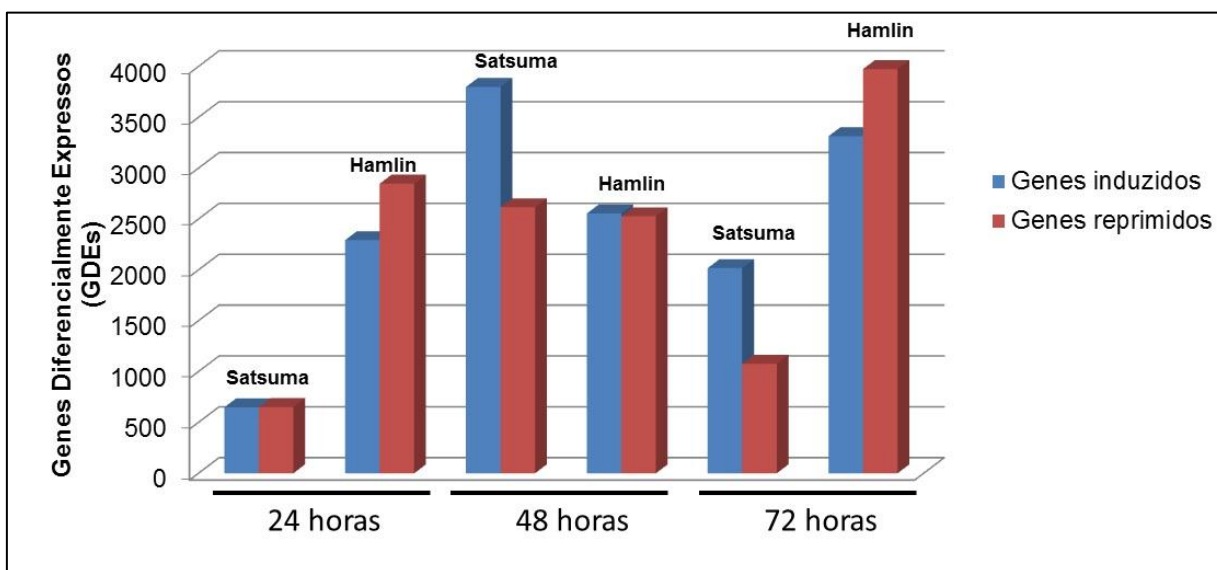


Figura 18. Número de genes diferencialmente expressos (GDEs) nas espécies Satsuma e Hamlin, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac. As barras em azul indicam os genes induzidos e as barras vermelhas indicam os genes reprimidos.

Outro aspecto relevante são os genes induzidos e reprimidos nas duas espécies. Na espécie resistente Satsuma, o número de genes com expressão induzida foi aproximadamente igual ou superior ao número de genes reprimidos. Por outro lado, na espécie suscetível Hamlin, o número de genes induzidos foi igual ou inferior ao número de genes reprimidos (Figura 18). Estes dados estão de acordo com os resultados de Fu e colaboradores (2012). Estes autores sugerem que as variedades resistentes implantam principalmente uma regulação positiva na resposta ao cancro cítrico, enquanto as variedades suscetíveis apresentam predominantemente uma regulação negativa. Uma explicação é que a espécie suscetível necessite de um maior investimento para a sua defesa por meio do deslocamento de energia da via da fotossíntese para os mecanismos de defesa

(BILGIN et al., 2010; PAUL; FOYER, 2001; FU et al., 2012). Estes dados são suportados pelo alto número de genes reprimidos relacionados à fotossíntese na espécie suscetível Hamlin (Tabela 7 e 14). Estes resultados serão discutidos mais adiante.

Foi possível identificar diferença na expressão gênica temporal. Na espécie Satsuma foi identificado um maior número de GDEs 48 horas após a inoculação com Xac, enquanto na espécie Hamlin, o maior número de GDEs foi encontrado 72 horas após a inoculação (Figura 18).

Na análise da expressão gênica temporal, há genes que foram induzidos em todos os tempos de infecção em cada uma das duas espécies (Figura 19), sendo que na espécie Satsuma foram encontrados 70 e na espécie Hamlin foram encontrados 576. Em relação aos genes reprimidos, na espécie Satsuma foi encontrado apenas um gene reprimido em comum em todos os tempos de infecção, enquanto que na espécie Hamlin 106 transcritos foram reprimidos em todos os tempos de infecção (Figura 20).

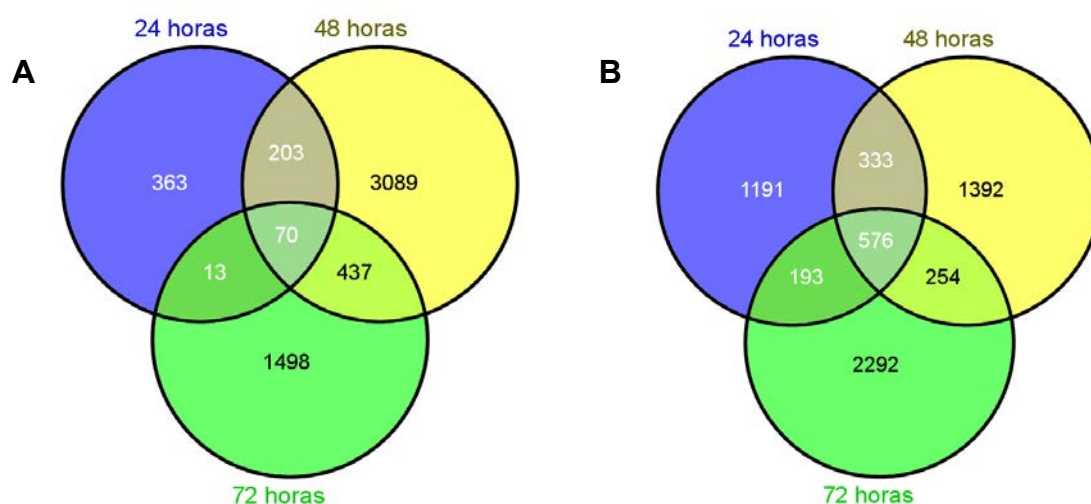


Figura 19. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac. Diagramas mostram o número de genes induzidos em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou são exclusivos de cada tempo.

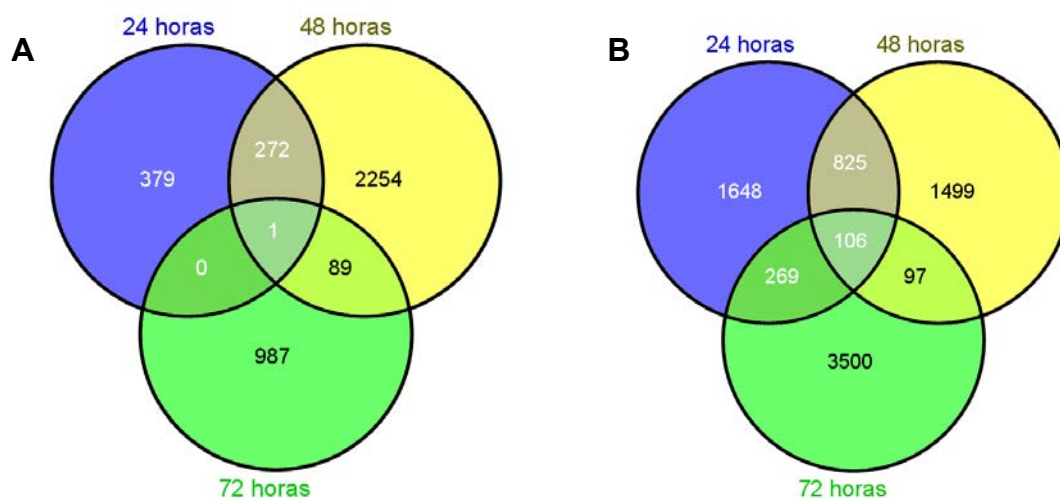


Figura 20. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac. Diagramas mostram o número de genes reprimidos em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou são exclusivos de cada tempo.

Apesar das espécies Hamlin e Satsuma apresentarem um perfil transcricional diferente sob a condição de infecção, elas expressam alguns genes em comum em resposta à infecção com Xac. Foram identificados 52 genes induzidos em comum entre estas duas espécies em todos os tempos de infecção (Figura 21).

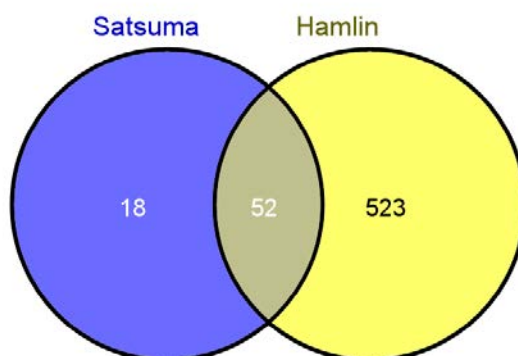


Figura 21. Diagrama de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos em comum nas espécies Satsuma e Hamlin nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação de Xac.

Estes genes podem estar relacionados com a resposta basal ao estresse biótico e podem representar os mecanismos básicos de defesa da planta contra a Xac. Estes genes estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Genes induzidos em comum na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin em todos os tempo de infecção (24, 48 e 72 horas).

Categorização funcional	Transcrito	Fold-change em Satsuma			Fold-change em Hamlin			Produto
		24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
Estresse	transcript2251821	29,57	32,96	20,18	30,33	42,89	33,05	Glicosídeo hidrolase
	transcript59166	29,82	23,02	18,24	16,32	28,40	50,52	Glicosídeo hidrolase
	transcript4790973	87,04	422,93	381,92	INF	73,26	80,10	Endo-beta-glucanase
	transcript10185949	72,44	1087,23	198,14	INF	INF	338,85	Endo-beta-glucanase
Sinalização celular	transcript10686051	INF	8,47	43,79	28,56	INF	22,41	Proteína de ligação de cálcio
	transcript10336349	23,98	16,94	75,37	15,55	14,89	13,76	Proteína serina/treonina quinase
	transcript2228269	19,51	45,96	55,46	27,95	37,88	36,60	Receptor com repetições ricas em leucina (LRR) proteína serina/treonina quinase
	transcript10277972	9,09	8,02	24,37	10,83	12,31	20,49	Proteína LRR
	transcript10793977	7,39	8,76	25,50	12,37	5,73	15,23	Proteína LRR
Defesa	transcript2248565	18,84	106,32	136,51	17,60	56,75	80,94	Proteína cisteína proteinase
	transcript9182509	17,99	71,61	126,88	17,84	43,31	60,91	Proteína cisteína proteinase
	transcript4556827	17,60	61,16	157,22	19,33	58,39	130,18	Proteína cisteína proteinase
	transcript294614	15,31	75,00	122,18	15,39	49,56	74,23	Proteína cisteína proteinase
	transcript821132	19,65	89,31	73,22	31,06	57,75	79,37	Proteína cisteína proteinase
	transcript2708642	11,07	12,33	6,64	9,66	19,12	15,60	Fator de transcrição ER responsivo ao etileno
Fator de transcrição	transcript2770277	12,27	15,76	15,76	8,37	7,17	5,32	Fator de transcrição NAC
	transcript11170783	INF	123,85	162,60	24,26	28,91	INF	Fator de transcrição AP2
Metabolismo	transcript2823521	31,38	27,00	17,11	14,47	6,61	15,99	Enzima Reticulina oxidase
	transcript2843633	17,18	16,81	42,36	24,49	28,14	25,29	Enzima Glicerofosforil diester fosfodiesterase
	transcript2339927	97,71	34,37	8,34	INF	INF	6,52	Enzima Glutamina amidotransferase
	transcript2873437	44,60	9,23	9,67	INF	24,52	12,64	Piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorreductase
Transporte	transcript10415705	8,35	9,45	21,94	6,73	6,78	5,51	Proteína transportadora (ABC)
	transcript2278240	7,27	9,23	21,21	9,10	8,41	7,57	Proteína transportadora (ABC)
	transcript396108	14,14	10,13	30,54	15,90	6,71	8,28	Proteína transportadora (ABC)
	transcript2150976	10,44	8,41	8,75	11,48	19,99	20,69	Enzima Ent-caurene oxidase
	transcript11062541	22,27	33,62	165,12	88,02	95,94	146,18	Proteína de transporte de lipídios em plantas
	transcript2402259	12,93	10,99	8,91	15,04	126,60	6,97	Proteína zinco-permease
Diversos	transcript2199673	INF	88,17	94,22	93,50	INF	INF	Proteína F-box
	transcript424855	369,15	115,44	43,97	INF	INF	INF	Proteína F-box
	transcript6111846	372,89	40,91	54,38	INF	INF	INF	Proteína F-box
	transcript9653593	INF	INF	58,69	21,11	80,74	108,65	Proteína LOB
	transcript10748165	16,66	200,63	85,35	40,29	39,37	224,67	Proteína LOB
	transcript4919307	11,51	179,33	78,87	29,68	94,69	38,05	Proteína LOB
	transcript6056150	58,40	145,71	44,68	INF	46,85	40,51	Proteína LOB
	transcript10301673	INF	14,57	35,18	22,83	57,81	19,80	Proteínas domínio blue copper
	transcript10301699	23,81	11,95	29,07	INF	INF	13,35	Proteínas domínio blue copper
	transcript2478435	25,45	72,85	18,84	52,04	114,38	17,32	Enzima Fosfatase
	transcript5769917	82,66	INF	19,12	INF	188,39	30,01	Enzima Fosfatase
	transcript2841062	8,38	77,41	34,39	12,27	59,28	27,98	Enzima Pectato liase
	transcript6099458	12,41	130,86	30,00	26,29	98,68	25,78	Enzima Pectato liase
	transcript54735	16,39	68,33	31,42	9,45	83,53	24,93	Enzima Pectato liase
Desconhecido	transcript2489999	87,23	12,62	73,65	INF	16,05	29,99	Proteína hipotética
	transcript2715144	6,89	8,21	9,83	10,14	26,11	10,52	Proteína hipotética
	transcript2490074	77,35	17,93	96,48	14,04	20,48	29,15	Proteína hipotética
	transcript3270030	23,74	INF	23,21	INF	INF	31,15	Proteína hipotética
	transcript2178078	316,73	INF	226,13	INF	INF	22,32	Proteína predita família UPF0114
	transcript6223418	23,36	349,70	22,01	INF	55,82	57,54	Proteína predita PAR1
	transcript10601622	20,96	170,81	28,26	29,05	105,66	49,85	Proteína predita PAR1
	transcript2823087	10,92	30,93	47,91	22,79	10,38	29,72	Proteína hipotética conservada
	transcript2257953	28,38	8,63	32,38	13,92	45,85	13,19	Proteína hipotética conservada
	transcript2257639	97,71	8,21	157,22	INF	99,68	58,01	Proteína hipotética conservada
	transcript6537082	70,98	15,44	23,00	8,73	23,67	27,25	Proteína hipotética conservada

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado

Os genes induzidos relacionados com a resposta basal ao cancro cítrico incluem genes relacionados ao reconhecimento do patógeno, sinalização celular, genes ligados à transdução de sinal, fatores de transcrição, além dos genes que codificam proteínas que são traduzidas em resposta ao ataque do patógeno, como, por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteinases e glucanases.

Em ambas as espécies, foram expressos transcritos que apresentam o domínio com repetições ricas em leucina (LRR) e domínio serina/treonina quinase. A maioria dos genes R, responsáveis pelo reconhecimento do patógeno em plantas, codifica para uma proteína que apresenta um domínio central de ligação a nucleotídeos (NB), outro domínio com regiões repetidas ricas em leucina (LRR), o qual medeia o reconhecimento de diversos efetores de todas as classes de patógenos de plantas, e um terceiro domínio que pode ser representado pelo domínio quinase (RODRIGUES, 2011; DANNA et al., 2011). O domínio LRR ocorre em várias proteínas para fornecer um quadro estrutural para interações proteína-proteína e, quando associado com um domínio quinase, possui função de receptor (GREWAL et al., 2012). Uma vez que Hamlin é suscetível à Xac, estas proteínas devem fazer parte de um sistema de reconhecimento/sinalização que dispara mecanismos basais em resposta ao patógeno, mas que não são suficientes para a sua contenção no local de infecção.

Após o reconhecimento do patógeno, se inicia a sinalização celular. Um importante transcrito que faz parte desta sinalização é o transcrito0686051 que codifica para uma proteína de ligação de cálcio (Ca^{2+}). O Ca^{2+} é uma molécula de sinalização importante na planta, convertendo estímulos ambientais em respostas fisiológicas apropriadas, por meio da fosforilação de proteínas e alteração dos padrões de expressão gênica (SANDERS et al., 2002; LECOURIEUX, 2011). Outros transcritos envolvidos na sinalização celular são as proteínas F-box. Três transcritos codificaram para proteínas contendo este domínio. As proteínas F-box constituem uma das maiores superfamílias em plantas, com mais de 600 membros, e têm demonstrado serem essenciais no processo de sinalização da auxina (DHARMASIRI et al, 2005; TAN et al, 2007), metil jasmonato (CHINI et al, 2007; THINES et al, 2007), giberelina (STRADER et al, 2004) e do etileno (GUO; ECKER, 2003;

POTUSCHAK et al, 2003). Alguns trabalhos em tabaco também sugerem que proteínas F-box participam no processo de defesa da planta (LIU et al., 2002, 2004).

As MAP quinases (MAPKs) também participam das vias de sinalização celular e são organizadas hierarquicamente em três módulos: as MAPKs que são fosforiladas e ativadas pelas MAP quinase quinases (MAPKKs) que, por sua vez são fosforiladas e ativadas pelas MAP quinase quinase quinases (MAPKKKs). As MAPKKKs são ativadas pela interação das subunidades menores de GTPases ou por outras proteínas quinases como receptores na superfície celular. Adicionalmente, no citoplasma, as MAPKs fosforilam os fatores de transcrição. (RUDRABHATLA et al, 2006; TEIXEIRA et al., 2013). Recentemente, trabalhos realizados com plantas transgênicas de laranja doce mostraram que a superexpressão do gene MAPK refletiu na redução dos sintomas de cancro cítrico e na redução do crescimento bacteriano. Além disso, a superexpressão deste gene causou a indução de genes relacionados com a defesa da planta e o acúmulo significativo de peróxido de hidrogênio em resposta a inoculação com Xac (OLIVEIRA et al., 2013). Os transcritos referentes a essas proteínas não estão representadas na Tabela 6, pois nenhum transcrito igual foi expresso nos três tempos em Satsuma e Hamlin. No entanto, todos os tempos nas duas espécies, apresentam transcritos diferentes que codificam para MAPKs.

Após a sinalização, é necessário que ocorra a transcrição de genes relacionados à defesa da planta. Foram expressos três transcritos (transcript2708642, transcript2770277 e transcript11170783) (Tabela 6) que codificam fatores de transcrição que são os responsáveis pela regulação dos padrões de expressão temporal e espacial de genes específicos em resposta ao estresse das plantas (RUSHTON; SOMSSICH, 1998; SINGH; FOLEY; ONATE-SANCHEZ, 2002). Entre eles, destaca-se a proteína ERF que pertence à subfamília da APETALA2 (AP2) e à família dos fatores de transcrição EREBP (“ethylene-responsive-element-binding protein”), ambas exclusivas em plantas. As proteínas ERF partilham um domínio que pode se ligar ao GCC box, um elemento cis encontrado em vários genes promotores de proteínas relacionadas à patogênese (PR) que confere a capacidade de resposta ao etileno, hormônio envolvido na

sinalização de estresse após o ataque patogênico (SINGH; FOLEY; ONATE-SANCHEZ, 2002).

Outro fator de transcrição encontrado em todos os tempos nas duas espécies foi o fator de transcrição WRKY. Embora suas funções regulatórias ainda não estejam bem definidas, inúmeros estudos realizados ao longo dos últimos anos têm reunido evidências de seu envolvimento nas respostas ao estresse biótico. Respostas ao ataque de patógenos requerem uma ampla reprogramação transcricional na célula vegetal, na qual os fatores de transcrição WRKY parecem desempenhar um papel crucial no ajuste desta expressão gênica (BERRI et al., 2009; PANDEY; SOMSSICH, 2009).

Entre as enzimas hidrolíticas produzidas em resposta ao ataque de Xac, destaca os transcritos que codificam para a enzima cisteína proteinase e para a enzima endo-beta-glucanase. As cisteína proteinases são enzimas que têm uma participação essencial na proteólise em plantas. Elas estão envolvidas na degradação e reconstrução de proteínas em resposta a diferentes estímulos externos e também desempenham a função de remover proteínas deformadas. Desta forma, a proteólise por cisteína proteinases é um processo altamente regulado. Em resposta a fatores bióticos, as proteínas celulares podem ser reconstruídas. Proteínas danificadas são eliminadas por degradação e substituídas por proteínas recém-formadas, como, por exemplo, as proteínas PR relacionadas com a patogênese (GRUDKOWSKA; ZAGDAŃSKA, 2004; TREMACOLDI, 2008). Os transcritos de cisteína proteinase apresentaram uma expressão crescente nos tempos de inoculação, sendo que a maior expressão destes transcritos foi maior 72 horas após a inoculação de Xac em ambas as espécies (Tabela 6).

Já as enzimas endo-beta-glucanases são expressas em resposta a ataque patogênico e podem conferir resistência contra agentes patogênicos específicos (LEUBNER-METZGER; MEINS, 1999, BISHOP et al., 2005). Evidências sugerem que estas enzimas podem degradar componentes celulares do patógeno e os fragmentos gerados são reconhecidos e ativam os mecanismos de defesa da planta (COTÉ et al, 1998; BISHOP et al., 2005).

E, por último, é importante ressaltar a expressão dos transcritos transcript2278240, transcript396108 e transcript10415705 (Tabela 6) que codificam

para uma proteína transportadora ABC. Há evidências que estas proteínas estão envolvidas na secreção de metabólitos secundários antimicrobianos da planta que representam a primeira linha de defesa da planta em resposta ao ataque de um patógeno (KANG et al., 2011). Estas hipóteses são suportadas por trabalhos desenvolvidos por Bradi e colaboradores (2008 e 2009), em que proteínas transportadoras ABC são induzidas pela via do ácido jasmônico e do ácido salicílico em *A. thaliana*. Foi observado também que os níveis de transcrição de mais de 50% dos transportadores ABC são induzidos após o ataque por microrganismos.

Grande parte das proteínas expressas em todos os tempos de inoculação com Xac na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin também foram encontradas em outros trabalhos de expressão gênica com plantas infectadas com bactérias fitopatogênicas. Trabalhos com microarranjo de DNA, desenvolvidos por Cernadas e colaboradores (2008), Khalaf e colaboradores (2011) e Fu e colaboradores (2012), em variedades de laranja doce Newhall, Pêra, Cristal e em variedades de kumquat Meiwa e Nagami em folhas inoculadas com Xac identificaram proteínas que também foram identificadas no presente trabalho, pela técnica de RNA-Seq, como a proteína com domínio de repetições ricas em leucina (LRR), a proteína de ligação de cálcio, a proteína com domínio quinase, a enzima cisteína proteinase, o fator de transcrição AP2 e a enzima endo-beta-glucanase. Um estudo de expressão gênica realizado no patossistema Huanglongbing (HLB)-citros, utilizando RNA-seq, mostrou que foram induzidos genes que codificam para fatores de transcrição AP2/ERF e para proteínas transportadoras ABC (MARTINELLI et al., 2012). Estes genes provavelmente estão relacionados com a defesa basal de plantas do gênero *Citrus* spp.

A expressão de genes em comum entre Satsuma e Hamlin era esperada, visto que estas plantas cítricas pertencem ao mesmo gênero. Por outro lado, 18 genes foram expressos nos três tempos apenas na espécie resistente Satsuma (Figura 21 e Tabela 7), enquanto que 523 genes foram expressos nos três tempos apenas na espécie suscetível Hamlin (Figura 21). Os GDEs presentes, de modo exclusivo, na espécie resistente Satsuma são mais importantes do que os genes regulados em comum, já que estes genes exclusivos podem fornecer informações valiosas sobre a base molecular da maior resistência ao cancro cítrico deste

genótipo. Os 18 transcritos que foram expressos exclusivamente nos três tempos da espécie resistente Satsuma estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Transcritos induzidos apenas no tecido infectado da espécie resistente Satsuma nos três tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Fold-change			Produto
	24 horas	48 horas	72 horas	
transcript2620046	INF	19,27875	7,12377	Proteína ribossomal S24e
transcript10649080	25,23496	6,83723	12,56325	Proteína com repetições ankyrin
transcript2852717	22,9023	25,55555	9,45755	Proteína UspA
transcript2261904	INF	14,41102	9,69165	Proteína de ligação de cálcio
transcript5271546	INF	27,64782	6,61493	Proteína de ligação de cálcio
transcript2465819	8,48234	6,13522	8,84555	Proteína hipotética conservada
transcript2616659	INF	100,87718	INF	Expansina
transcript2771559	INF	41,47173	5,85364	Expansina
transcript2254995	20,35762	92,65756	32,30551	Proteína F-box
transcript6438809	INF	48,19687	107,68504	Proteína F-box
transcript2617004	INF	165,88692	14,93232	Fator de transcrição NAC
transcript9745025	INF	17,37329	13,99905	Fator de transcrição NAC
transcript4987954	18,02497	24,16070	22,97280	Enzima alantoinase
transcript2518647	10,44388	16,98984	5,48982	Receptor com repetições ricas em leucina (LRR) proteína serina/treonina quinase
transcript5009774	INF	7,39766	23,69070	Glutathione-S-transferase
transcript10035378	7,63410	71,17445	6,05728	Proteína predita
transcript2249639	26,50732	7,84600	7,17900	Receptor quinase
transcript2448934	11,23910	13,77053	9,35513	Receptor quinase

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado

Vários transcritos codificaram para genes que já foram descritos anteriormente, como as proteínas F-box, as proteínas de ligação de cálcio e proteínas com domínio quinase. O fator de transcrição NAC apresentou um transcrito (transcript2770277) (Tabela 6) que foi induzido em todos os tempos tanto em Satsuma como em Hamlin. No entanto, na Tabela 7, é possível observar que a espécie resistente Satsuma expressou de maneira exclusiva mais dois transcritos para o fator de transcrição NAC (transcript2617004 e transcript9745025). Genes da família de fatores de transcrição NAC são específicos de plantas e atuam em processos diversos como no desenvolvimento e no reconhecimento de estímulos ambientais (OLSEN et al., 2005). A superexpressão de genes NAC também indicou seu envolvimento na resistência a diferentes patógenos em plantas de batata, cana-de-açúcar e arroz (COLLINGE; BOLLER, 2001; NOGUEIRA et al., 2005, LIN et al., 2007).

Por outro lado, a espécie resistente Satsuma apresentou alguns transcritos nos três tempos de inoculação que não foram identificadas na espécie Hamlin. Estas proteínas foram a proteína ribossomal S24e, a proteína UspA (“universal stress protein”) e a proteína expansina.

Segundo Barakat e colaboradores (2001), as proteínas ribossomais representam uma parte essencial da maquinaria da célula, responsáveis pela síntese de proteínas, e como tal, desempenham um papel importante no controle do crescimento celular, divisão e desenvolvimento. A proteína expansina também está envolvida no crescimento celular de órgãos vegetativos e reprodutivos da planta. Estudos implicam a participação de expansinas em uma variedade de resposta ao crescimento e desenvolvimento, desde a germinação e maturação dos frutos até a polinização e respostas adaptativas de crescimento (COSGROVE et al., 2002; SHIN et al., 2005). Em trabalho de expressão gênica em arroz, por meio de RT-qPCR, mostrou que o gene EXPA5, que representa uma expansina, pode estar envolvido na defesa da planta contra patógenos, visto que os níveis de transcrição deste gene aumentam em resposta ao ácido salicílico e ao ácido jasmônico (SHIN et al., 2005).

Em relação aos genes reprimidos, foi possível verificar que a espécie suscetível Hamlin apresentou um maior número de genes em comum em todos os tempos de infecção, mostrando uma maior homogeneidade nos transcritos reprimidos pela Xac (Figura 20B). Por outro lado, a espécie resistente Satsuma apresentou apenas um gene reprimido em comum nos diferentes tempos após a inoculação com Xac (Figura 20A). As duas espécies não apresentaram genes reprimidos em comum nos três tempos de inoculação.

O único gene reprimido em comum nos três tempos após a inoculação em Satsuma é o transcrito transcript6080433 (Tabela 8) que codifica uma proteína rica em glicina. A sequência deste gene quando comparado ao banco de dados de nucleotídeos (blastn) tem 83% de identidade com outro gene (AB007818.1) que codifica para uma proteína rica em glicina também encontrado em Satsuma. Já, quando comparado com o banco de dados de EST, o transcript6080433 apresenta uma identidade superior a 90% com várias sequências de ESTs provenientes de folhas saudáveis, folhas inoculadas com *Xylella fastidiosa*, frutos e flores de laranja doce (*C. sinensis*). Esta proteína está envolvida em uma série de funções dentro da

planta, como alongação celular, atividade antimicrobiana, transdução de sinal, deposição de calose, resposta a estresse, florescimento e atividade de ligação de RNA (MANGEON et al., 2010).

Tabela 8. Transcrito transcript6080433 reprimido em todos os tempos (24, 48 e 72 horas), após a infecção com Xac, em Satsuma.

Transcrito	Fold-change			Produto
	24 horas	48 horas	72 horas	
transcript6080433	0,0591	0,0882	0,1468	Proteína rica em glicina

Na Tabela 9, estão apresentados os genes reprimidos em comum em todos os tempos de infecção na espécie Hamlin que estão relacionados à fotossíntese e à resposta ao estresse. A repressão de genes relacionados à resposta ao estresse pode comprometer o mecanismo de defesa da planta. As peroxidases presente nas plantas estão envolvidas no metabolismo da auxina, na síntese de lignina e suberina, na conformação da parede celular, na síntese de fitoalexina, no metabolismo das espécies reativas ao oxigênio (ERO) e no metabolismo das espécies reativas ao nitrogênio (RNS) (ALMAGRO et al., 2009). As peroxidases são uma classe bem conhecida de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e pertencem à família PR-9 (VAN LOON et al., 2006).

Outros genes reprimidos que podem interferir na defesa da espécie suscetível Hamlin são aqueles que codificam para a enzima xiloglucano endotransglicosilase (XET) e para a enzima celulose sintase. Estas enzimas estão relacionadas com alongamento e reestruturação da parede celular (COSGROVE, 2005). Albert e colaboradores (2004) mostraram que a interação incompatível entre tomate e o parasita *Cuscuta reflexa* acumulou a enzima XET nos tecidos foliares seis horas após a fixação do parasita, fornecendo evidências que esta enzima participa nas reações de defesa da planta. Esta enzima também foi induzida na espécie de kumquat *Fortunella margarita* resistente ao cancro cítrico, 24 horas após a inoculação com Xac (KHALAF et al., 2011). Por outro lado, trabalho de expressão gênica realizado com batata, mostrou que a variedade suscetível Beauregard apresentou a repressão da enzima XET após infecção com o vírus SPFMV e SPCSV (McGREGOR et al., 2009), o que foi similar ao resultado encontrado no

presente trabalho, visto que a laranja doce Hamlin é uma espécie suscetível ao cancro cítrico.

A repressão de genes relacionados com a fotossíntese na espécie suscetível Hamlin será discutida mais adiante no tópico 5.4.3.

Tabela 9. Genes reprimidos em todos os tempos (24, 48 e 72 horas), após a infecção com Xac, relacionados à resposta ao estresse e à fotossíntese, na espécie suscetível Hamlin.

Categorização funcional	Transcrito	Fold-change			Produto
		24 horas	48 horas	72 horas	
Resposta ao estresse	transcript7522399	0,14128	0,08423	0,16305	Proteína trocador Ca^{2+}
	transcript6004885	0,10696	0,10223	0,04519	Enzima celulose sintase
	transcript5841691	0,03045	0,03871	0,14422	Enzima anidrase carbônica (cloroplasto)
	transcript9203598	0,11927	0,14240	0,05443	Enzima anidrase carbônica (cloroplasto)
	transcript10412899	0,13085	0,07438	0,02630	Peroxidase classe III
	transcript1007623	0	0,07974	0,11509	Proteína hipotética conservada
	transcript9913809	0,12888	0,05980	0,11719	Citocromo P450
	transcript5830229	0,11339	0,13432	0,11719	Proteína Heat shock
	transcript212052	0,08388	0,14411	0,12811	Proteína Heat shock
	transcript10108634	0,14039	0,16311	0,16126	Proteína Heat shock
	transcript4989910	0,13651	0,17211	0,10123	Peroxidase
	transcript113169	0,03319	0,03067	0,13428	Peroxidase
	transcript5105681	0,01841	0,03909	0,12010	Peroxidase
	transcript10893180	0,05663	0,07939	0,17264	Peroxidase
	transcript8908397	0,03940	0,09968	0,15067	Peroxidase
	transcript8907205	0,04238	0,09968	0,15346	Peroxidase
	transcript8910339	0	0	0,04003	Peroxidase
	transcript5776737	0,03682	0,04153	0,06350	Peroxidase
	transcript589554	0,09045	0,10604	0,14851	Peroxidase
	transcript8907187	0,04084	0,04746	0,12638	Peroxidase
	transcript225869	0,06965	0,13593	0,07132	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript10537718	0,02078	0,02864	0,16955	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript8623315	0,01782	0,02027	0,18782	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript10537772	0,02355	0,01738	0,14675	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript8623138	0,01750	0,02476	0,12010	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript10537791	0,02984	0,01498	0,18643	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript10537682	0,03718	0,03157	0,17061	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript3174930	0,03397	0,01754	0,17539	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript8622789	0,03623	0,02990	0,13484	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript8623210	0,01701	0,02492	0,15904	Xiloglucano endotransglicosilase
	transcript5563505	0,04883	0,02120	0,08632	Xiloglucano endotransglicosilase
Fotossíntese	transcript5201768	0,06071	0,02120	0,11161	Proteína de ligação de clorofila A-B
	transcript1460062	0,10367	0,08306	0,09324	Proteína de ligação de clorofila A-B
	transcript5947698	0,07487	0	0,06350	Proteína de ligação de clorofila A-B
	transcript10388178	0,10799	0,13990	0,12940	Proteína de ligação de clorofila A-B
	transcript10716197	0,14650	0,14767	0,12923	Proteína de ligação de clorofila A-B
	transcript9856835	0,07246	0,10492	0,07175	Enzima Magnésio quelatase
	transcript5850130	0,04631	0,07974	0,08853	Enzima Magnésio quelatase
	transcript7755621	0,08168	0,05863	0,01938	Enzima Magnésio quelatase
	transcript5921772	0,10133	0,11590	0,08158	Enzima Magnésio quelatase

5.5.1 Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos nas espécies Satsuma e Hamlin nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação

A classificação funcional dos GDEs foi feito no programa Blast2GO em relação ao processo biológico, função molecular e componente celular para a espécie Satsuma e para espécie Hamlin. A distribuição baseada no Gene Ontology (GO) foi feita por nível (nível 2) afim de reduzir o nível de sobreposição na classificação, representado nas Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27. Baseado nesta categorização, é possível observar os principais processos e funções que são ativadas pela planta sob condição de ataque patogênico e em que local da célula, estas reações ocorrem.

Esta categorização foi uma análise preliminar, entretanto, é necessário ainda aplicar uma análise de categorização de GO que compare os transcritos diferencialmente expressos contra o transcriptoma das plantas controle. Este estudo comparativo permitirá identificar quais categorias possuem significância estatística, de maneira que as vias moleculares alteradas pela doença possam ser identificadas de forma mais precisa.

Na espécie resistente Satsuma e Hamlin, as principais categorias em todos os tempos foram as mesmas em todos os tempos. Para o processo biológico, foi encontrado um maior número de sequências no processo biológico, processo celular e resposta a estímulos. Para função molecular se destacaram a função de ligação e atividade catalítica. Para componente celular, os genes são encontrados em maior número na célula, em organelas e na membrana.

Esta primeira categorização gerou categorias gerais e não foi possível detectar diferenças em relação as espécies Satsuma e Hamlin. Uma segunda categorização foi realizada para identificar as subcategorias presentes em cada categoria do nível 2. Devido a grande quantidade de categorias, foi determinado um corte de no máximo 50 categorias para a apresentação dos resultados (APÊNDICES).

Dentre a subcategorização é possível identificar diferenças entre as espécies avaliadas. Na espécie Satsuma, são induzidas as categorias de processo biológico de proteólise, fosforilação de proteína, reação de peroxidase e resposta de defesa a

bactéria no tempo 24 horas (APÊNDICE A – Figura 1) que continuam sendo induzidas até o tempo 72 horas. No tempo 72 horas tem ainda a adição da categoria morte celular, resposta ao estresse e resposta ao estresse biótico (APÊNDICE A- Figura 7). Em relação à função molecular, destacou as categorias atividade cisteína, atividade aspártica e atividade pectato liase (APÊNDICE A –Figura 3). A maioria das reações ocorreu na membrana plasmática, parede celular e citossol, segundo a categorização baseada em componente celular (APÊNDICE A – Figura 2). Em relação, aos genes reprimidos, destacaram-se as categorias de processo de biossíntese de asparagina e fotossíntese (APÊNDICE B- Figura 10, 13 e 16).

A espécie suscetível Hamlin, mesmo apresentando sintomas, apresentou categorias de resposta da defesa e estresse biótico nos genes induzidos (APÊNDICE C- Figura 19, 22 e 25). Por outro lado, esta espécie apresentou várias categorias relacionadas à fotossíntese como ligação de clorofila (APÊNDICE D – Figura 28 e 31), atividade da ribulose-bisfosfato sintase, Fotossistema 1, Fotossistema 2, fotossíntese (reação à luz), fotossíntese (coleta de luz), síntese de clorofila, processos de oxidação-redução, resposta ao estímulo luminoso, resposta à luz vermelha e azul nos genes reprimidos, principalmente 72 horas após a inoculação com Xac (APÊNDICE D – Figura 34).

Esta categorização baseada no GO foi o primeiro passo para o início da anotação gênica dos GDEs. Adicionalmente, é importante ressaltar que a categorização concordou com os resultados encontrados, que serão apresentados nos próximos tópicos.

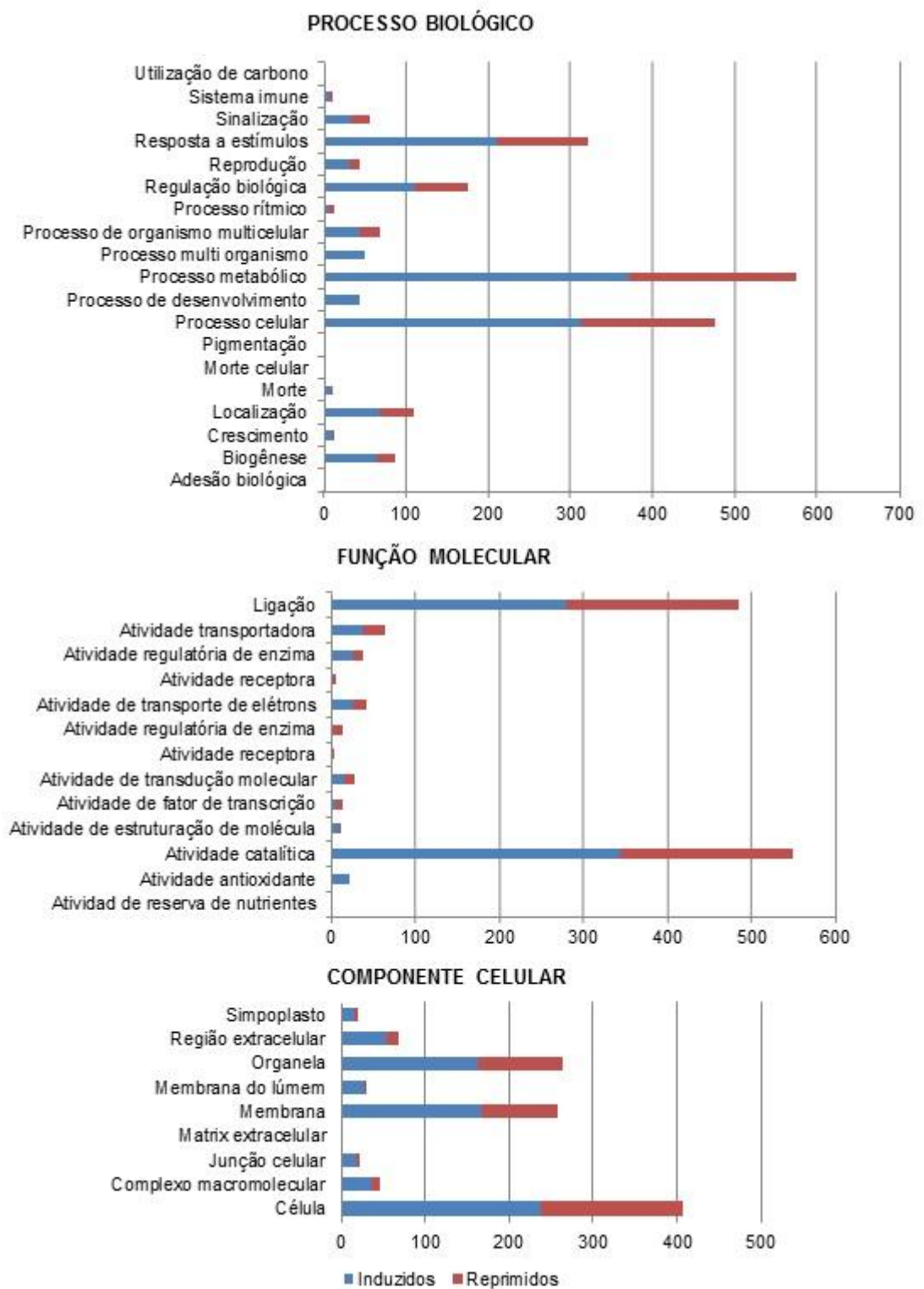


Figura 22. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Satsuma no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

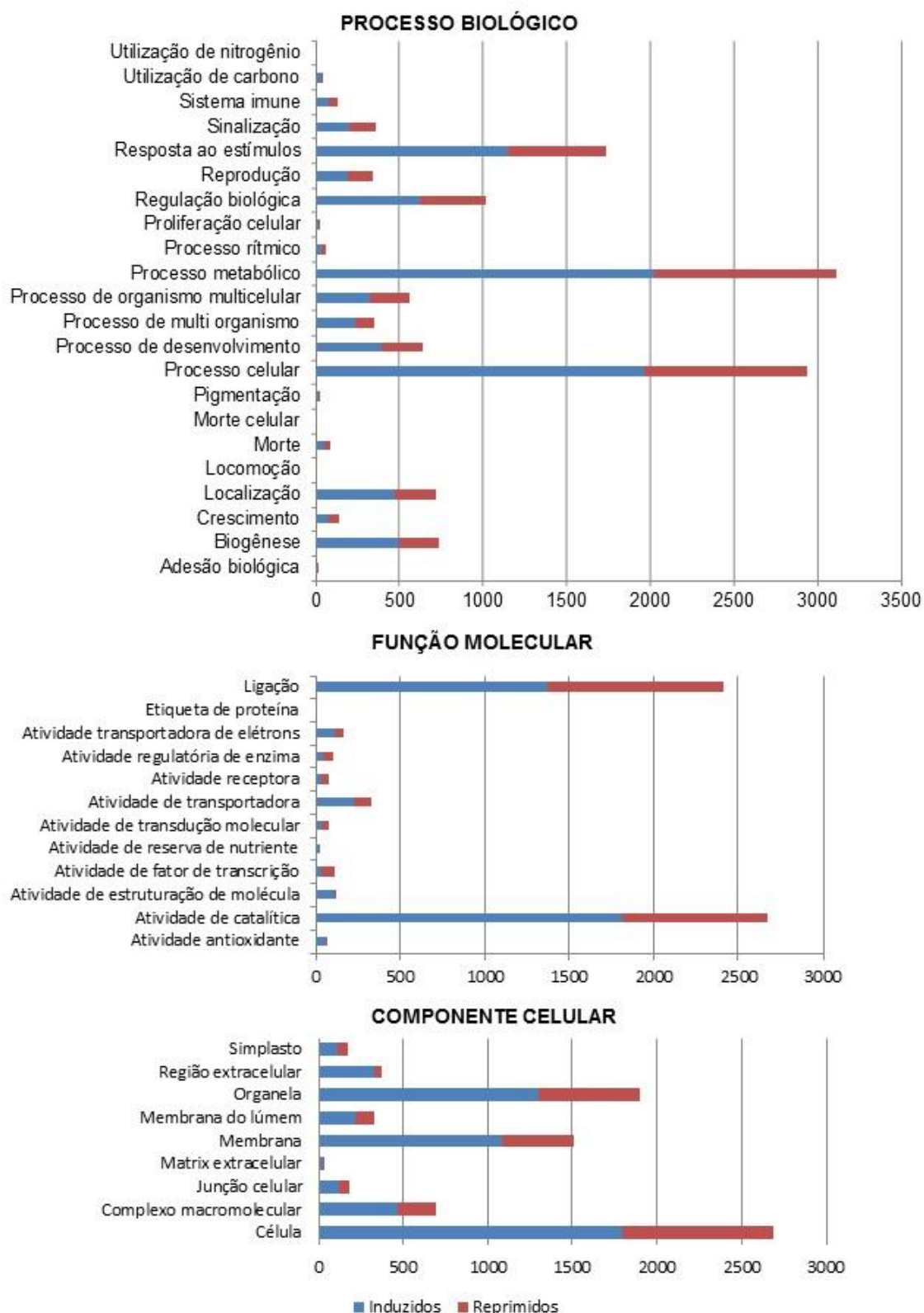


Figura 23. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Satsuma no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

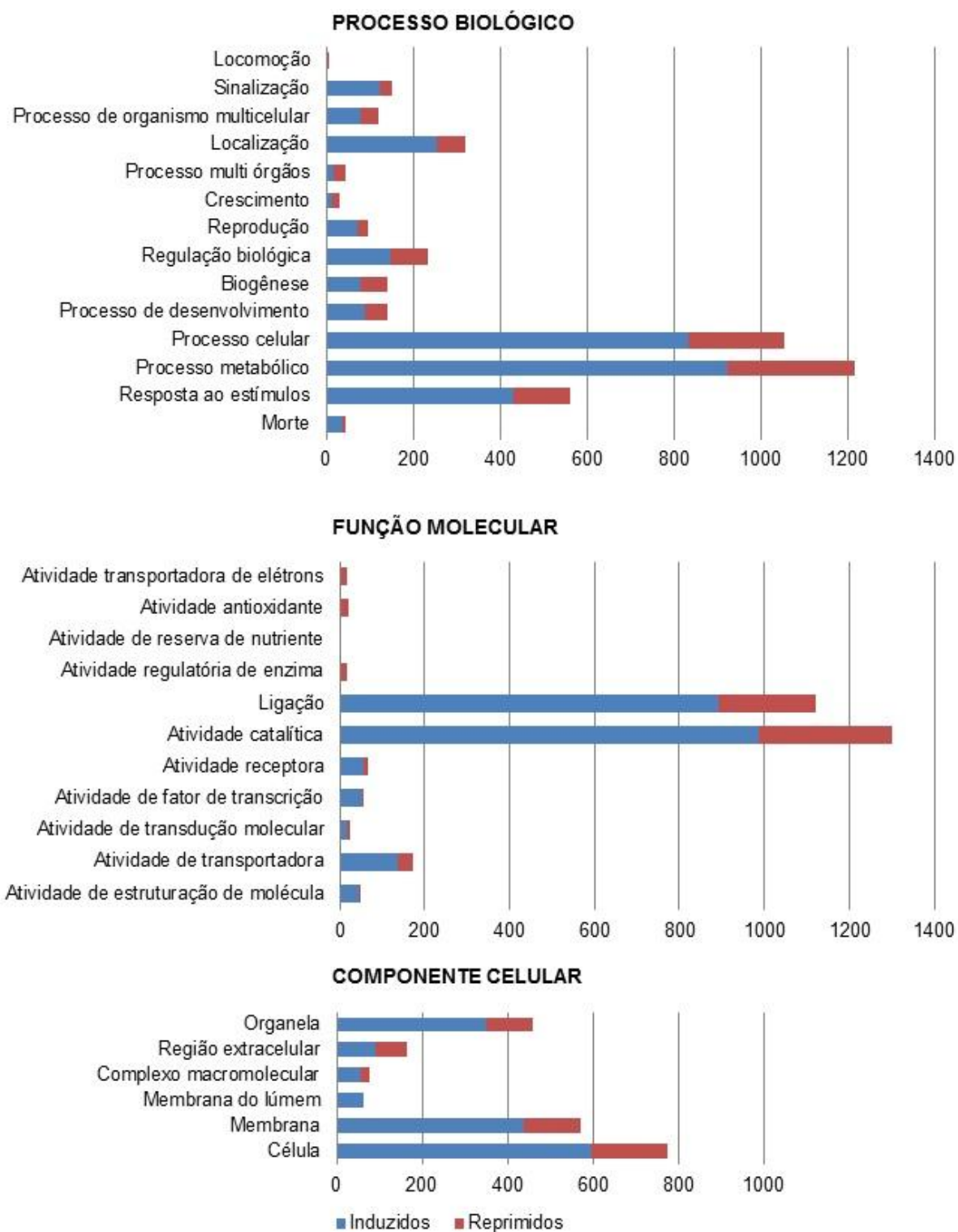


Figura 24. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Satsuma no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

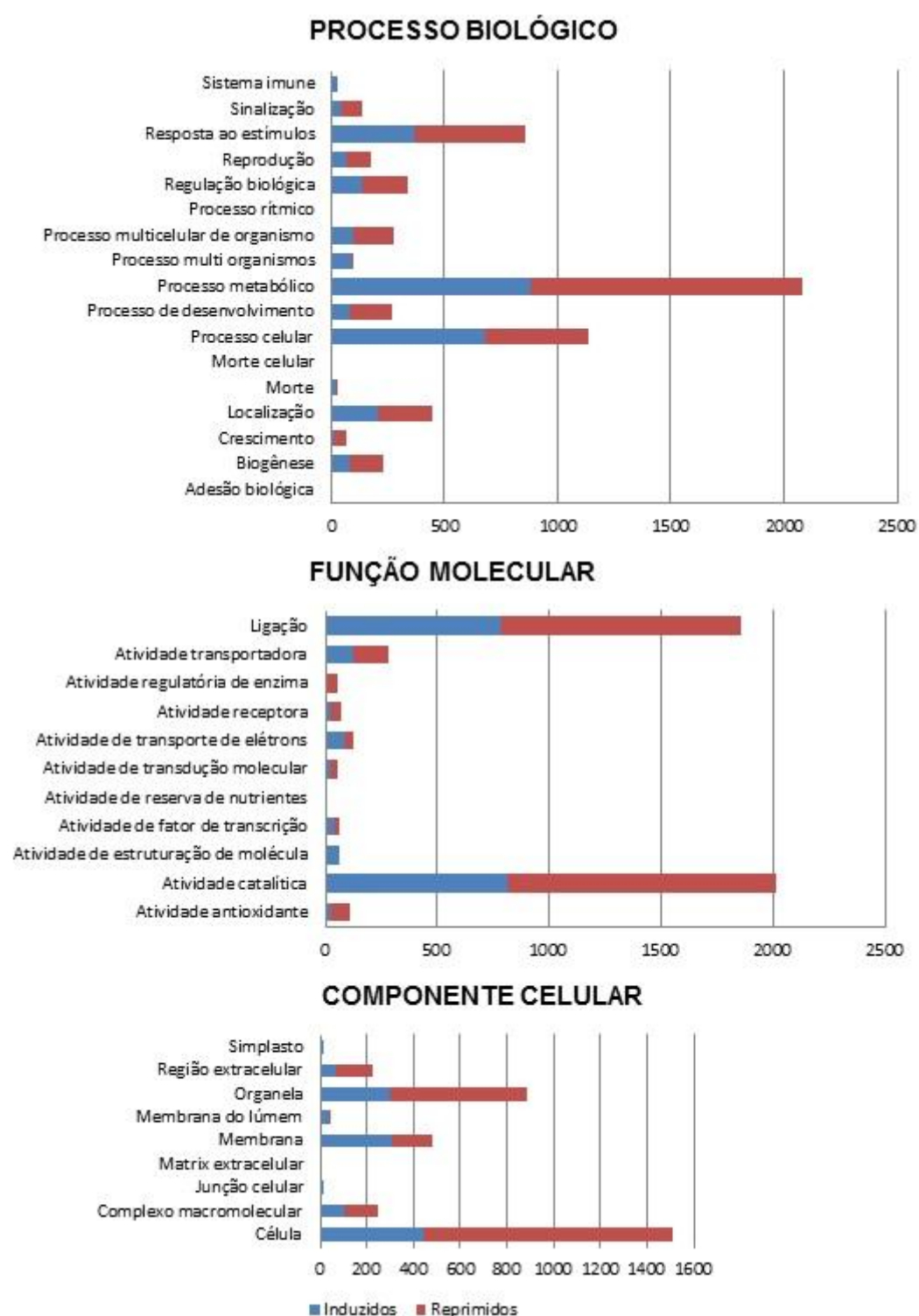


Figura 25. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Hamlin no tempo 24 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

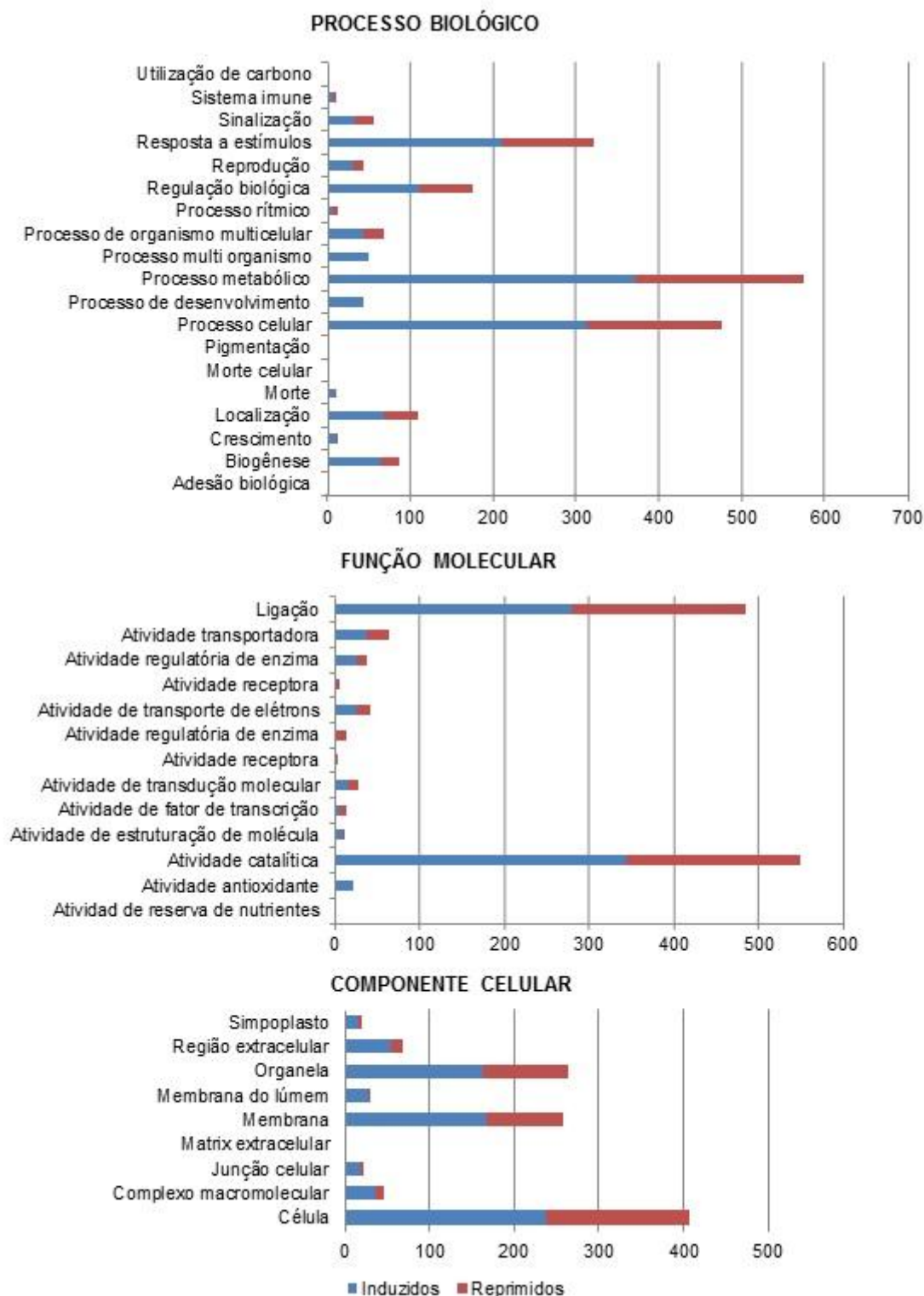


Figura 26. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Hamlin no tempo 48 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

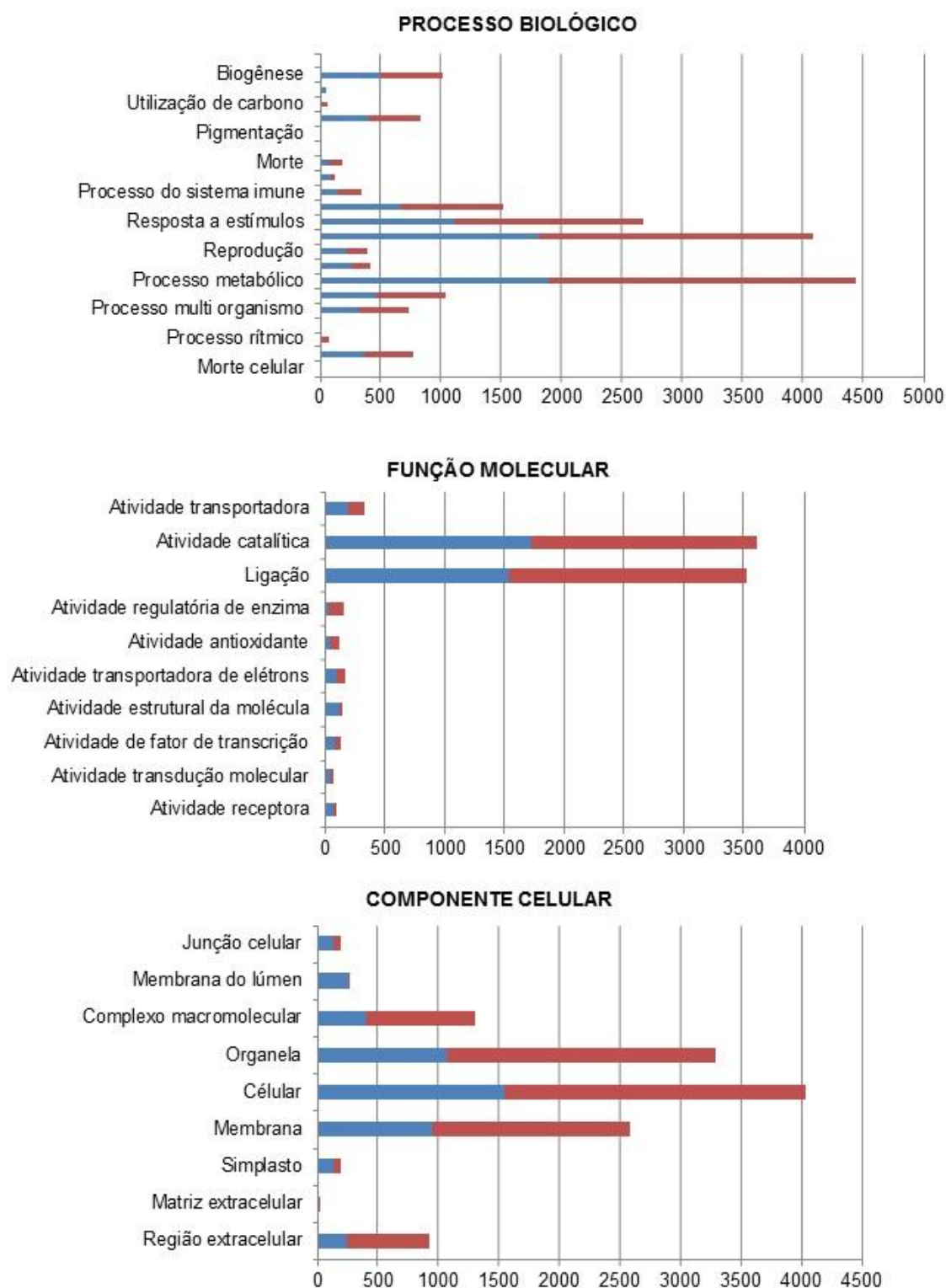


Figura 27. Processo biológico, função molecular e componente celular dos GDEs da espécie resistente Hamlin no tempo 72 horas após a inoculação com Xac (Categorização nível 2).

5.5.2 Genes diferencialmente expressos na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 24 horas após a inoculação

Além de analisar os genes que foram expressos em comum em todos os tempos de infecção avaliados, é importante estudar a expressão diferencial de genes dentro de cada tempo de infecção e fazer a comparação da expressão gênica destes transcritos entre a espécie suscetível e resistente.

O tempo 24 horas após a inoculação com Xac foi o primeiro tempo de infecção avaliado. Neste tempo foi possível identificar os primeiros genes que são ativados em resposta ao ataque bacteriano. Esta resposta inicial, nas primeiras horas após a inoculação, pode ser crucial para definir a suscetibilidade de uma espécie vegetal a um estresse biótico. A Figura 28 apresenta o número de GDEs induzidos na espécie Hamlin e na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac. As espécies apresentaram 99 genes induzidos em comum, enquanto a espécie Satsuma apresentou 550 genes induzidos de modo exclusivo e a espécie Hamlin apresentou 2.194 (Figura 28).

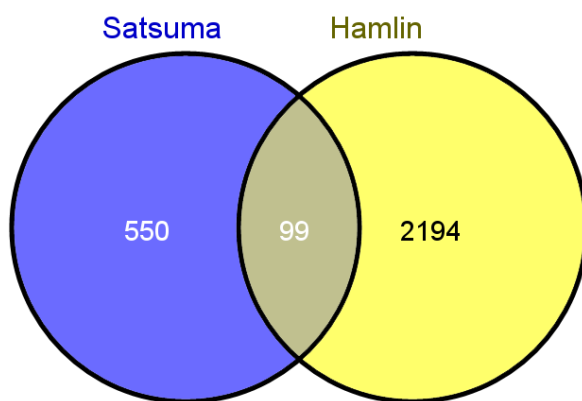


Figura 28. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma e Hamlin 24 após a inoculação com Xac.

Devido ao grande número de genes diferencialmente expressos, o presente estudo focou nos transcritos que apresentaram uma maior significância estatística, ou seja, aqueles transcritos com o menor valor de P-valor. A Tabela 10 apresenta os transcritos que codificam GDEs induzidos com os menores valores de P-valor exclusivos na espécie resistente Satsuma (N/A em Hamlin) e na espécie suscetível

Hamlin (N/A em Satsuma). Alguns transcritos foram expressos em ambos as espécies, mas com o valor de expressão mais significativo em uma das espécies.

Tabela 10. Genes induzidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Produto	Fold-change Satsuma	P-valor Satsuma	Fold-change Hamlin	P-valor Hamlin
transcript5482977	Proteína Proteinase Aspática	48,52607	0,000117	N/A	N/A
transcript424855	Proteína F-box	INF	0,00017	369,1512	5,80E-07
transcript11008926	Proteína Proteinase Aspática	95,00224	0,000235	N/A	N/A
transcript11008900	Proteína Proteinase Aspática	37,25162	0,000308	N/A	N/A
transcript2251821	Glicosídeo hidrolase	29,57253	0,000419	INF	0,000101
transcript11008845	Proteína Proteinase Aspática	27,27073	0,00061	N/A	N/A
transcript10708313	Enzima Nitrato Redutase	46,75891	0,000639	N/A	N/A
transcript2873437	Piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidoreductase	INF	0,000722	44,60621	0,000316
transcript5972527	Proteína Proteinase Aspática	INF	0,000792	N/A	N/A
transcript2206259	Proteína Gigantea	INF	0,000861	N/A	N/A
transcript821132	Proteína cisteína proteinase	31,06658	0,000878	19,65037	0,001552
transcript2199673	Proteína F-box	INF	0,000952	93,50457	2,38E-05
transcript10748165	Proteína LOB	40,29113	0,001022	56,4397	0,000127
transcript5809083	Lipoxigenase	40,71525	0,001059	N/A	N/A
transcript2234635	Citocromo P450	60,01257	0,001131	N/A	N/A
transcript5449857	Desconhecido	INF	0,001167	INF	0,000137
transcript2832990	Fator de transcrição AP2	INF	0,00119	22,08917	0,003657
transcript182354	Enzima corimato mutase	INF	0,001227	N/A	N/A
transcript11117316	Proteína pseudo reguladora de resposta	56,40758	0,001381	N/A	N/A
transcript1971022	Desconhecido	INF	0,001409	N/A	N/A
transcript5516934	Fator de transcrição LIM	INF	0,001734	N/A	N/A
transcript2248565	Proteína cisteína proteinase	18,84292	0,001763	17,6002	0,002099
transcript1081715	Desconhecido	INF	0,001803	32,7968	0,001159
transcript2489999	Desconhecido	INF	0,001913	87,23349	3,75E-05
transcript2817147	Enzima Fosfohexomutase	50,04582	0,002089	N/A	N/A
transcript2127176	Nitrato redutase	19,90321	0,002375	N/A	N/A
transcript9539719	Enzima Pectinesterase	INF	0,002558	N/A	N/A
transcript4822808	Terpeno sintase	22,7963	0,002631	N/A	N/A
transcript4715427	Proteína reguladora de resposta de dois componentes	INF	0,002966	N/A	N/A
transcript9182509	Proteína cisteína proteinase	17,84321	0,003315	22,32316	0,00105
transcript1188166	Proteína hipotética conservada	N/A	N/A	378,511	1,04E-06
transcript10797432	Serina carboxipeptidase	N/A	N/A	180,3503	2,49E-06
transcript214644	Serina carboxipeptidase	N/A	N/A	226,882	3,11E-06
transcript2476968	Cinamoil-CoA redutase	N/A	N/A	195,433	3,56E-06
transcript5025067	Beta expansina	N/A	N/A	361,6633	4,60E-06
transcript6111846	Proteína F-box	N/A	N/A	372,8951	5,66E-06
transcript2148823	Citocromo P450	N/A	N/A	190,1915	6,45E-06
transcript10797408	Serina carboxipeptidase	N/A	N/A	125,7959	6,59E-06
transcript10760253	Preniltransferase	N/A	N/A	343,6925	6,82E-06
transcript6438809	Proteína F-box	N/A	N/A	INF	7,91E-06
transcript2178078	Proteína predita	N/A	N/A	316,7362	9,27E-06
transcript10760226	Enzima homogentisato fitil transferase	N/A	N/A	305,5044	1,00E-05
transcript11049044	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	108,8235	1,19E-05
transcript10760202	preniltransferase	N/A	N/A	177,4621	1,61E-05
transcript283908	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	104,616	1,63E-05
transcript11062541	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	378,511	1,04E-06
transcript4760475	Cinamoil-CoA redutase	N/A	N/A	238,1137	2,54E-05
transcript11165295	Proteína predita	N/A	N/A	83,33981	2,78E-05
transcript2490074	Desconhecido	N/A	N/A	77,35889	2,79E-05
transcript2148223	Proteína predita	N/A	N/A	78,27687	2,94E-05
transcript11034760	UDP-glicosiltransferase	N/A	N/A	120,5544	3,05E-05
transcript364915	Glutamina amidotransferase	N/A	N/A	INF	3,52E-05
transcript7739684	Quitinase	N/A	N/A	103,3324	5,19E-05
transcript4790973	Endo-beta-glucanase	N/A	N/A	87,0463	5,33E-05

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado N/A: transcrito não detectado

Ambas as espécies induziram genes já descritos no presente trabalho como genes que participam na defesa basal da planta. Desta forma, nesta parte do trabalho, será dado um enfoque nos GDEs exclusivos de cada espécie.

A espécie resistente Satsuma expressou positivamente genes que codificam para uma proteinase aspártica. Foram identificados nove transcritos induzidos de proteinase aspártica no tecido infectado de Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac. Dentre estes transcritos, cinco (transcript5482977, transcript11008926, transcript11008900, transcript11008845 e transcript5972527) estão entre os 10 transcritos com maior valor de expressão (Tabela 10). O transcrito transcript11008926 apresentou um elevado valor de “Fold-change” e o menor valor de P-valor (Tabela 10), indicando que este gene foi altamente expresso na espécie resistente 24 horas após a inoculação com Xac. Esta proteína também foi expressa no tempo 48 e 72 horas. No tempo 48 horas após a inoculação de Xac, foram identificados 22 transcritos induzidos de proteinase aspártica e no tempo 72 horas, foram expressos seis transcritos de proteinase aspártica em resposta à Xac. Na espécie suscetível Hamlin, esta proteína foi detectada a partir do tempo 48 horas com a expressão de quatro transcritos, enquanto que 72 horas após a inoculação foram identificados 14 transcritos para proteinase aspártica. Todos os transcritos induzidos de proteinase aspártica nas espécies Satsuma e Hamlin estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de expressão (“Fold-change” e P-valor) dos transcritos induzidos da enzima proteinase aspártica 24, 48 e 72 horas após a inoculação com Xac em folhas da espécie resistente Satsuma e em folhas da espécie suscetível Hamlin.

Transcrito	Fold-change Hamlin	P-valor Hamlin	Fold-change Satsuma	P-valor Satsuma
24 horas				
transcript5513863	N/A	N/A	INF	0,0289
transcript11008926	N/A	N/A	95,0022	0,0002
transcript11008900	N/A	N/A	37,2516	0,0003
transcript11008845	N/A	N/A	27,2707	0,0006
transcript5972527	N/A	N/A	INF	0,0007
transcript11008873	N/A	N/A	17,0589	0,0033
transcript9820894	N/A	N/A	INF	0,0165
transcript4787292	N/A	N/A	23,7505	0,0220
transcript5913797	N/A	N/A	19,5093	0,0380
48 horas				
transcript5979838	N/A	N/A	INF	0,0174
transcript11008926	N/A	N/A	55,6692	6,10E-05
transcript11008845	N/A	N/A	37,6218	9,43E-05
transcript11008900	N/A	N/A	34,2982	0,0001
transcript11008873	N/A	N/A	30,4873	0,0002
transcript5972527	N/A	N/A	60,5263	0,0002
transcript5913797	N/A	N/A	73,9766	0,0007
transcript5513863	N/A	N/A	53,8011	0,0025
transcript4787292	N/A	N/A	22,4171	0,0031
transcript9820894	N/A	N/A	INF	0,0039
transcript6000139	N/A	N/A	INF	0,0058
transcript7938849	N/A	N/A	11,5288	0,0087
transcript2680952	N/A	N/A	INF	0,0217
transcript229634	N/A	N/A	6,9798	0,0241
transcript10377985	N/A	N/A	8,5592	0,0257
transcript8621181	N/A	N/A	6,5421	0,0284
transcript334181	N/A	N/A	INF	0,0335
transcript9820995	N/A	N/A	INF	0,0415
transcript8621718	N/A	N/A	6,4449	0,0430
transcript2315316	N/A	N/A	5,6281	0,0434
transcript6934125	N/A	N/A	6,3048	0,0491
transcript361031	14,1916	0,0028	10,1979	0,0065
transcript7938641	INF	0,0245	N/A	N/A
transcript7938757	INF	0,0182	N/A	N/A
72 Horas				
transcript10720309	N/A	N/A	10,7685	0,0137
transcript5427276	INF	0,0072	12,3837	0,0252
transcript312562	N/A	N/A	5,6885	0,0355
transcript6000139	N/A	N/A	7,9994	0,0474
transcript11008845	5,1914	0,0489	N/A	N/A
transcript11008900	5,1771	0,0499	N/A	N/A
transcript9820823	8,5502	0,0319	N/A	N/A
transcript10761002	INF	0,0259	N/A	N/A
transcript43463	INF	0,0448	N/A	N/A
transcript1475320	INF	0,0274	N/A	N/A
transcript2390857	5,9852	0,0444	N/A	N/A
transcript5251168	8,1030	0,0454	N/A	N/A
transcript11000082	9,7604	0,0233	N/A	N/A
transcript5643258	19,3368	0,0354	N/A	N/A
transcript6255282	INF	0,0065	N/A	N/A
transcript7556155	10,4357	0,0326	N/A	N/A

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado
N/A: transcrito não detectado

Na espécie resistente Satsuma, é possível notar que a expressão da proteína proteinase aspártica é alta para oito transcritos nas primeiras 24 horas após a inoculação com Xac. Esta expressão aumenta mais ainda no tempo 48 horas (22 transcritos) e decai 72 horas após a inoculação (4 transcritos). No entanto, outros transcritos que codificam para proteinase aspártica, que inicialmente não foram diferencialmente expressos no tempo 24 e 48 horas, foram reprimidos no tempo 72 horas (Tabela 14). Estes dados serão discutidos adiante.

Já na espécie suscetível Hamlin, não há nenhum transcrito para proteinase aspártica no tempo de 24 horas a inoculação com Xac (Tabela 11). Apenas três transcritos aparecem induzidos no tempo de 48 horas e 13 transcritos aparecem induzidos no tempo de 72 horas. Ou seja, o perfil de expressão de transcritos para esta proteína em Satsuma e Hamlin são completamente opostos. Enquanto a expressão em Satsuma ocorre nos estágios iniciais da infecção, a expressão na espécie suscetível Hamlin ocorre em um estágio mais tardio e em menor escala, o que pode estar relacionado com a não resistência deste genótipo à infecção por Xac.

Baseado na expressão significativa dos transcritos que codificam para proteinase aspártica, é sugerida a hipótese que esta proteína possui um papel importante na defesa da planta contra a Xac. As proteinases aspárticas de plantas têm sido associadas na transformação e degradação de proteínas em diferentes órgãos da planta, bem como na senescência, na resposta ao estresse e na morte celular programada (SIMÕES; FARO, 2004). Estas proteínas têm sido associadas também no processo de “turnover” das proteínas vegetais relacionadas com patogênese (PR), na degradação de proteínas intracelulares para fornecer aminoácidos para as proteínas relacionadas com a defesa das plantas e na defesa contra agentes patogênicos por meio da hidrólise das suas proteínas secretadas (SCHALLER; RYAN, 1996). Em trabalho realizado com batata, foi observada a indução de uma proteinase aspártica em folhas após a infecção com *Phytophthora infestans*. O teor de proteinase aspártica foi significativamente maior em folhas de cultivar resistente em comparação com a cultivar suscetível, o que concorda com os resultados do presente trabalho. Em outro estudo realizado desta vez com *A. thaliana* (XIA et al., 2004) foi identificado um gene CDR1 que codifica uma

proteínase aspártica que libera um peptídeo endógeno elicitor dependente de ácido salicílico induzindo a resposta de resistência da planta. A superexpressão do gene CDR1 refletiu no aumento de resistência da planta aos agentes patogênicos bacterianos.

Outro transcrito importante induzido apenas na espécie Satsuma foi o transcript5809083 que codifica para a proteína lipoxigenase (Tabela 10). As lipoxigenases (LOX) são isoenzimas envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como o ácido traumático e ácido jasmônico, no crescimento e na senescência, na germinação de sementes, na resposta a ferimento e resistência a insetos e patógenos (SIEDOW, 1991; SILVA et al.; 2001). Durante um processo de estresse, ocorrem danos físicos às células e, em razão disso, uma degradação sequencial de lipídeos pode ser iniciada pelas lipoxigenases. Esta degradação forma hidroperóxidos de ácidos graxos, que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos. Dentre esses, está o ácido jasmônico, um hormônio vegetal que induz a expressão de diversos genes relacionados à defesa contra estresses (SOARES; MACHADO, 2007). A espécie resistente Satsuma apresentou a indução das duas primeiras enzimas envolvidas na via do ácido jasmônico, a lipase e a lipoxigenase (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2005), indicando a ativação rápida da via de sinalização do ácido jasmônico, contribuindo para a resistência da espécie Satsuma ao ataque por Xac.

Em relação aos genes reprimidos, a Figura 29 apresenta o número de GDEs reprimidos na espécie Hamlin e na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac. Em relação a genes reprimidos de maneira exclusiva em cada espécie, Satsuma apresentou 557 genes e Hamlin apresentou 2.753 genes (Figura 29). Ambas as espécies apresentam 95 genes reprimidos em comum 24 horas após a inoculação (Figura 29).

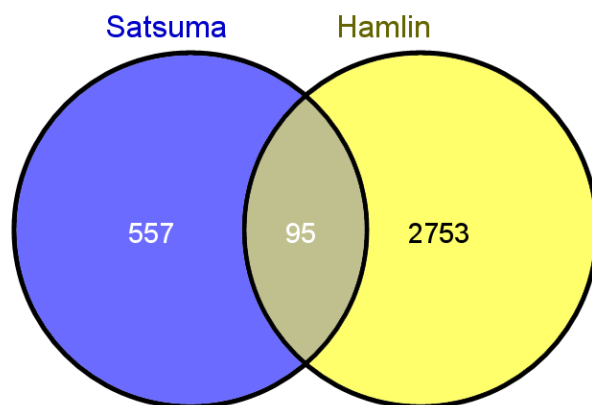


Figura 29. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma e Hamlin 24 após a inoculação com Xac.

Em relação aos genes reprimidos com maior significância estatística, ambas as espécies apresentaram sequências que não tem correspondência com nenhuma proteína presente no banco de dados de proteínas do NCBI quando se faz blastx, sendo então denominado de produto desconhecido (Tabela 12). Entretanto, estas sequências já foram encontradas em várias espécies de *Citrus*, incluindo *C. sinensis*, e se encontram depositadas no banco de EST (dBest) do NCBI. Houve também a repressão de várias proteínas preditas e hipotéticas (Tabela 12). Além destas proteínas sem função definida, ambas as espécies reprimiram transcritos que codificam para a enzima asparagina sintetase, 24 horas após a inoculação com Xac (Tabela 10).

A asparagina sintetase é a enzima que catalisa a biossíntese da asparagina, um dos principais aminoácidos envolvidos no transporte e no armazenamento de nitrogênio (N) em plantas superiores. O metabolismo do N é um processo essencial durante o desenvolvimento da planta em resposta aos sinais ambientais e sinais celulares e sua deficiência leva a uma profunda alteração no metabolismo de aminoácidos na planta (ANTUNES, 2007; GAUFICHON et al., 2010). A forte repressão desta enzima nas espécies Hamlin e Satsuma, indica que a bactéria Xac atua e altera esta via em plantas cítricas. Um estudo desenvolvido por Lima e Sodek (2003) mostra que as mudanças no transporte de N no xilema refletem as alterações no metabolismo sofridas pela planta em resposta ao estresse.

Tabela 12. Genes reprimidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Produto	Fold-change	P-valor	Fold-change	P-valor
		Satsuma	Satsuma	Hamlin	Hamlin
transcript2401885	Catecol O-metiltransferase	0,00241	5,79E-06	N/A	N/A
transcript2775741	Proteína predita	0,007213	1,17E-05	0,062716	0,004937
transcript4565895	Desconhecido	0,008539	1,98E-05	0,017414	0,002581
transcript2854916	Proteína predita	0,003787	2,36E-05	N/A	N/A
transcript78717	Proteína hipotética	0,006147	2,89E-05	0,013866	0,000878
transcript10121223	Proteína hipotética	0,00633	3,19E-05	0,03378	0,0039
transcript2687977	Proteína MSF	0,012605	3,51E-05	N/A	N/A
transcript2349717	Desconhecido	0,003927	4,26E-05	N/A	N/A
transcript2160388	Proteína hipotética	0,013254	0,000112	0,015492	0,001281
transcript10121387	Proteína hipotética	0,015303	0,000129	0,030632	0,001634
transcript491447	Proteína MSF	0,011781	0,000139	N/A	N/A
transcript10699133	Proteína MSF	0,01383	0,00014	N/A	N/A
transcript2345545	Proteína predita	0,005891	0,000142	0,036625	0,003007
transcript224415	Proteína predita	0,006426	0,000187	N/A	N/A
transcript10846801	Enzima asparigina sintetase	0,013905	0,000199	0,038446	0,001392
transcript2160363	Proteína hipotética	0,018103	0,00024	0,014682	0,001077
transcript2160415	Proteína hipotética	0,019061	0,000253	0,011288	0,000451
transcript10121283	Proteína predita	0,016567	0,000255	0,016045	0,001413
transcript2486141	Proteína hipotética	0,018326	0,00026	N/A	N/A
transcript10852066	Proteína predita	0,006841	0,000265	0,038074	0,00386
transcript10852122	Proteína hipotética conservada	0,011781	0,000362	0,057599	0,007512
transcript10846891	Enzima asparigina sintetase	0,017971	0,000372	0,02582	0,000524
transcript1169447	Glutarredoxina monotiol	0,011781	0,000388	N/A	N/A
transcript4592902	Enzima asparigina sintetase	0,020617	0,000417	0,009478	0,000265
transcript10846832	Enzima asparigina sintetase	0,022721	0,000462	0,01689	0,000241
transcript2747345	Enzima glicosil transferase	0,018934	0,000493	0,115621	0,037562
transcript3515707	Enzima asparigina sintetase	0,021513	0,00051	0,030772	0,011196
transcript10851919	Proteína predita	0,012852	0,000538	0,013137	0,000989
transcript10846770	Enzima asparigina sintetase	0,024587	0,000671	0,010328	8,70E-05
transcript2747660	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	0,00095	2,00E-08
transcript5422191	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	0,00109	1,38E-07
transcript110533	Inibidor de pectinesterase	N/A	N/A	0	1,71E-07
transcript5730239	Desconhecido	N/A	N/A	0	1,83E-07
transcript5917991	Desconhecido	N/A	N/A	0	3,35E-07
transcript381612	Extensina	N/A	N/A	0	3,99E-07
transcript9608765	Desconhecido	N/A	N/A	0,00293	5,52E-07
transcript5549762	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	0	5,85E-07
transcript9608566	Desconhecido	N/A	N/A	0,001762	7,51E-07
transcript9608530	Desconhecido	N/A	N/A	0	8,37E-07
transcript11043989	Extensina	N/A	N/A	0,001995	1,29E-06
transcript5891471	Desconhecido	N/A	N/A	0,00204	1,31E-06
transcript9658174	Desconhecido	N/A	N/A	0,002413	2,52E-06
transcript9608734	Desconhecido	N/A	N/A	0,002504	2,65E-06
transcript36807	Enzima lipase	N/A	N/A	0,002858	4,25E-06
transcript10196585	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0	5,22E-06
transcript10092152	Desconhecido	N/A	N/A	0	5,88E-06
transcript5463107	Proteína de função desconhecida DUF833	N/A	N/A	0	6,11E-06
transcript10892652	Enzima lipase	N/A	N/A	0,006814	1,11E-05
transcript10196558	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0,003893	1,32E-05
transcript2879467	Protease de subtilisina	N/A	N/A	0,00388	1,39E-05
transcript2580060	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0,004011	1,45E-05
transcript8181485	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0	1,46E-05
transcript5161777	Glicerol-3-fosfato-aciltransferase	N/A	N/A	0	1,53E-05
transcript8623102	Xiloglucano endotransglicosilase	N/A	N/A	0,004603	2,10E-05
transcript125639	Glicerol-3-fosfato-aciltransferase	N/A	N/A	0,011858	2,21E-05
transcript1993410	Extensina	N/A	N/A	0,004396	2,29E-05
transcript10196540	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0,004769	2,69E-05
transcript96079	Enzima pectato liase	N/A	N/A	0	3,38E-05

N/A: transcrito não detectado

Entre os genes reprimidos com maior significância estatística, é importante ressaltar os genes reprimidos exclusivamente na espécie suscetível Hamlin. Entre eles, os transcritos que codificam para a proteína extensina, pectato liase e xiloglucano endotransglicosilase. Estas três proteínas estão envolvidas na degradação e reestruturação da parede celular. As espécies reativas de oxigênio podem atuar de diferentes maneiras durante a resposta de resistência da planta, entre elas, participa no fortalecimento da parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais (STANGARLIN et al., 2011). Este mecanismo torna a parede celular mais resistente à penetração do patógeno e à degradação enzimática. Desta forma, a repressão de enzimas que atuam na reestruturação da parede celular pode afetar de maneira negativa em um dos processos de defesa da planta e estar envolvida na suscetibilidade ao cancro cítrico da espécie Hamlin.

5.5.3 Genes diferencialmente expressos na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 48 horas após a inoculação

O tempo 48 horas após a inoculação com Xac foi o segundo tempo de infecção avaliado no presente trabalho. A Figura 30 apresenta o número de GDEs induzidos na espécie Hamlin e na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação com Xac. As duas espécies apresentaram 516 genes induzidos em comum, enquanto a Satsuma apresentou 3.283 genes induzidos exclusivamente e Hamlin apresentou 2.039 (Figura 30).

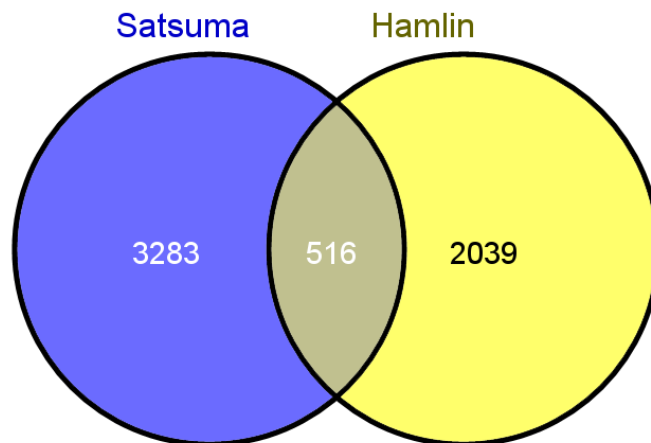


Figura 30. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma e Hamlin 48 após a inoculação com Xac.

Neste tempo, a espécie resistente Satsuma e Hamlin induziram genes relacionados à defesa da planta, como as proteínas já descritas como endo-beta-glucanase, cisteína proteinase, fator de transcrição NAC, expansina, fator de transcrição AP2 e proteína F-box (Tabela 13). No entanto, o valor de “Fold-change” destes transcritos foi superior em Satsuma. A proteína endo-beta-glucanase apresentou os transcritos com os maiores valores de “Fold-change” (transcript10185949 e transcript4790973) em Satsuma no tempo 48 horas. Outras proteínas também se mostraram altamente induzidas, como a proteína LOB, proteína PAR-1 e enzima pectato liase. Estas proteínas também foram mais induzidas na variedade resistente Satsuma. Apenas a proteína relacionada à patogênese PR-1 foi expressa com maior intensidade na variedade suscetível Hamlin.

No total de genes induzidos em Satsuma (Figura 30), 25 transcritos codificam para a enzima pectato liase, no qual 23 transcritos foram induzidos apenas em Satsuma. As pectinas são um dos principais componentes das paredes celulares primárias das plantas e contribuem para a resistência mecânica das paredes celulares primárias, mas também participam na adesão intercelular e podem atuar como moléculas sinalizadoras na defesa da planta contra patógenos (RIDLEY; O’NEILL; MOHNEN, 2001; SUN; NOCKER, 2010). Após um ataque biótico, a planta necessita de uma remodelação dinâmica da parede celular, que por sua vez requer modificações de vários componentes da parede celular, incluindo assim a

participação da enzima pectato liase para a quebra da pectina. Além disso, esta enzima em estudos realizados com *A. thaliana*, foi induzida em resposta a ferimento e infecção por patógeno (VOGEL; RAAB; SOMERVILLE; 2002; PALUSA et al., 2007), demonstrando assim, a participação desta enzima na defesa da planta contra patógenos.

Outra proteína altamente expressa foi o fator de transcrição LOB (“lateral organ binding”). Esta proteína pertence a uma nova família e ainda não possui funções bem definidas (SHUAI et al., 2002). Um trabalho desenvolvido por Bell e colaboradores (2012) buscou encontrar funções desta proteína por meio do aumento e diminuição da sua atividade. A superexpressão desta proteína mostrou que ela regula negativamente a acumulação do hormônio brassinosteróide (BR) em planta. Os brassinosteróides são hormônios importantes para o controle do desenvolvimento de plantas (FUJIOKA; YOKOTA, 2003) ocorrendo em maior concentração em tecidos jovens que em tecidos adultos (MANDAVA, 1988). Esses hormônios regulam os processos de alongamento celular, diferenciação do xilema, alongamento de raízes e caules, germinação de sementes, dominância apical e expansão foliar (BAJGUAZ; TRETYN, 2003). Algumas pesquisas apontam que existe interação entre brassinosteróides e auxinas, sendo assim, esses dois hormônios modulariam a expressão de genes envolvidos nos mesmos processos fisiológicos (NEMHAUSER et al., 2004). Já, mutantes que possui o gene LOB silenciado tem uma expansão ou crescimento excessivo das gemas que resulta em defeitos na separação destes órgãos (BELL et al., 2012).

Por outro lado, a proteína PAR1 (“photoassimilate-responding genes”), que também foi fortemente induzida em Satsuma, apresentou funções relacionadas à defesa da planta. Herbers e colaboradores (1995) avaliaram três clones de cDNA desta proteína em resposta ao vírus PVY (potato vírus Y) e concluíram que a proteína PAR1 apresenta características semelhantes às proteínas relacionadas com patogênese, pois esta foi fortemente induzida por ácido salicílico e acumulou em plantas de tabaco, após a infecção com o vírus PVY. Estes resultados foram suportados por Guo e colaboradores (2000), que utilizando a técnica de biblioteca de cDNA identificaram clones homólogos à proteína PAR-1 em resposta ao vírus TMV (“tabacco mosaic virus”) em tabaco. Recentemente, um trabalho com o objetivo de

encontrar genes de resistência em *Pinus pinea* a *Bursaphelenchus xylophilus* pela tecnologia RNA-Seq, mostrou a indução de proteínas PAR-1 em resposta de defesa desta planta. Esta expressão foi confirmada pela técnica de RT-qPCR (SANTOS et al., 2012).

Tabela 13. Genes induzidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Produto	Fold-change	P-valor	Fold-change	P-valor
		Satsuma	Satsuma	Hamlin	Hamlin
transcript10185949	Endo-beta-glucanase	1087,232	1,65E-08	INF	2,94E-06
transcript4790973	Endo-beta-glucanase	422,9369	5,90E-08	73,2665	5,07E-05
transcript3270030	Desconhecido	INF	1,19E-07	INF	3,57E-05
transcript5025067	Expansina	305,4337	1,40E-07	INF	9,56E-07
transcript10748165	Proteína LOB	200,6335	3,99E-07	39,37452	0,000421
transcript6099458	Enzima pectato liase	130,8601	9,56E-07	98,6855	1,78E-05
transcript10601622	Proteína PAR1	170,8187	1,06E-06	105,6633	4,03E-05
transcript2248565	Proteína cisteína proteinase	106,3161	1,34E-06	56,75018	3,19E-05
transcript9653593	Proteína LOB	INF	1,36E-06	80,74268	0,00044
transcript6223418	Proteína PAR1	349,7076	1,93E-06	55,8221	0,001382
transcript127382	Enzima pectato liase	200,6335	2,75E-06	8,116989	0,030778
transcript2617004	Fator de transcrição NAC	165,8869	2,83E-06	N/A	N/A
transcript821132	Proteína cisteína proteinase	89,31834	3,10E-06	57,75344	3,67E-05
transcript4921957	Endo-beta-glucanase	109,0034	3,24E-06	13,45711	0,006686
transcript168656	Endo-beta-glucanase	137,3051	3,53E-06	111,6442	0,000146
transcript392584	Endo-beta-glucanase	289,1813	3,89E-06	INF	0,000115
transcript4919307	Proteína LOB	179,3372	3,98E-06	94,6982	0,000262
transcript2841062	Enzima pectato liase	77,40711	4,56E-06	59,28166	3,31E-05
transcript242849	Desconhecido	175,9746	4,70E-06	15,20155	0,008371
transcript11170783	Fator de transcrição AP2	123,8548	4,95E-06	28,90787	0,001744
transcript294614	Proteína cisteína proteinase	75,00779	5,44E-06	49,5693	4,90E-05
transcript7744940	Enzima pectato liase	169,2495	5,52E-06	N/A	N/A
transcript488883	Endo-beta-glucanase	138,9863	5,76E-06	75,75856	0,000548
transcript424855	Proteína F-box	115,4483	6,37E-06	INF	1,59E-06
transcript2178078	Proteína predita	INF	6,58E-06	INF	7,84E-05
transcript111257	Expansina	255,5555	6,98E-06	N/A	N/A
transcript9182509	Proteína cisteína proteinase	71,61371	7,01E-06	43,3165	8,65E-05
transcript6299505	Proteína PAR1	255,5555	7,02E-06	81,7395	0,000414
transcript2577457	Enzima pectato liase	102,6706	7,49E-06	N/A	N/A
transcript5894414	Enzima pectato liase	242,1052	8,00E-06	N/A	N/A
transcript283908	Proteína rica em prolina	40,35087	0,001249	INF	1,01E-06
transcript10797432	Serina carboxipeptidase	10,50804	0,009829	219,7995	3,11E-06
transcript4715857	Geranilgeranil difosfato sintase	N/A	N/A	214,317	3,41E-06
transcript10024241	Proteína relacionada à patogênese PR1	31,94444	0,000381	177,9329	6,35E-06
transcript2199673	Proteína F-box	88,17413	2,99E-05	INF	7,30E-06
transcript10797408	Serina carboxipeptidase	12,22754	0,00743	116,6283	9,96E-06
transcript2776164	Proteína hipotética	28,59885	0,000195	77,30682	9,99E-06
transcript2478435	Pirofosfatase inorgânica	72,85575	0,000118	114,3855	1,08E-05
transcript452642	Isopenicilina N sintase	8,826754	0,01767	224,2852	1,20E-05
transcript11062541	Proteína hipotética	33,62573	0,000495	95,94423	1,94E-05
transcript60306	Proteína relacionada à patogênese PR1	31,6897	0,000187	78,12602	1,96E-05
transcript88863	Proteína cisteína proteinase	N/A	N/A	69,93098	2,12E-05
transcript79598	Proteína relacionada à patogênese PR1	23,77398	0,000374	61,69811	2,25E-05
transcript214644	Serina carboxipeptidase	N/A	N/A	124,1045	2,31E-05
transcript5769917	Fosfoetanolamina fosfocolina	INF	0,000314	188,3996	2,33E-05
transcript54735	Enzima pectato liase	68,33835	8,73E-06	83,53378	2,45E-05
transcript9526859	Pirofosfatase inorgânica	INF	0,000404	183,4155	2,53E-05
transcript2476968	Cinamoil-CoA redutase	11,33312	0,008009	120,1172	2,57E-05
transcript10760226	Homogentisate fitil transferase	24,65887	0,028267	INF	2,63E-05
transcript2847441	Isopenicilina N sintase	10,76023	0,007673	70,77445	3,07E-05
transcript11034760	UDP-glicosiltransferase	17,93372	0,005191	INF	3,30E-05
transcript10760253	Homogentisate fitil transferase	INF	0,00289	INF	3,39E-05
transcript2148223	Proteína hipotética	N/A	N/A	80,99188	3,52E-05

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado

N/A: transcrito não detectado

Entre os genes reprimidos, as espécies Satsuma e Hamlin apresentam 173 genes reprimidos em comum. A espécie resistente Satsuma apresentou repressão exclusiva de 2.443 genes, enquanto que na espécie suscetível Hamlin, o número de genes reprimidos de modo exclusivo foi de 2.354 (Figura 31).

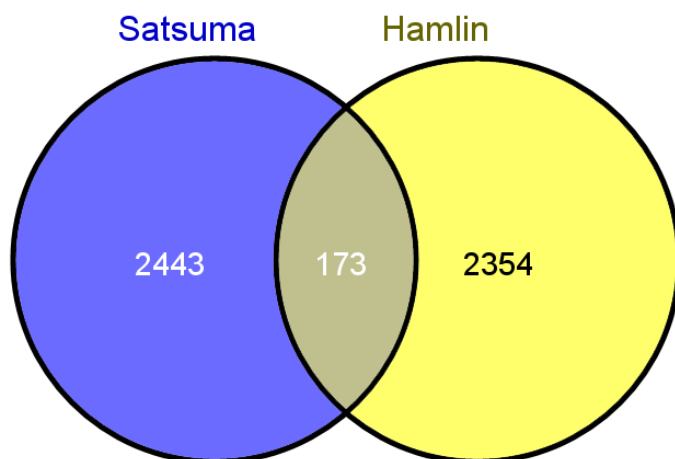


Figura 31. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma e Hamlin 48 após a inoculação com Xac.

A enzima asparagina sintetase continuou sendo altamente reprimida em ambas as espécies após 48 horas de infecção com Xac, sendo mais reprimida na Satsuma. A espécie resistente Satsuma apresentou a repressão de transcritos que codificam para diversos inibidores de proteinases, tais como o inibidor de proteinase tipo 1 (transcript279703), outros inibidores de proteinase (transcript7829925, transcript1143676, transcript7829789), um inibidor de tripsina (transcript2621089) e inibição de transcritos que codificam a proteína miraculina (transcript2612024, transcript1532095 e transcript1904237), um inibidor de protease da família Kunitz. Os inibidores de proteinases são proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo inibição da atividade dessas proteases. As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção. Isso leva a acreditar que os inibidores de proteases presentes nos tecidos das plantas devam atuar diretamente contra as proteases extracelulares, retardando a proteólise de paredes celulares e proteínas de membrana, reduzindo a desorganização celular (SIKES; MARCY, 1979, TREMACOLDI, 2008). Os inibidores de proteases fazem parte de uma

via de defesa associada e induzida por ácido jasmônico que se acumula em ferimentos, ataque de patógenos ou dano causado por inseto em folhas (ALBA et al., 2004).

No entanto, é importante adicionar que a proteína tipo miraculina apresentou outros 17 transcritos diferencialmente expressos que foram induzidos, porém, com o valor de P-valor menos expressivo, 24 horas após a inoculação com Xac no tecido da espécie resistente Satsuma (dados não apresentados). Khalaf e colaboradores (2012) também encontraram genes do tipo miraculina em infecções precoces com Xac em pesquisa sobre a análise transcricional da espécie resistente ao cancro cítrico kumquat realizado com a técnica de biblioteca subtrativa de cDNA. Isto sugere que os inibidores de proteinase encontrados neste trabalho possuem uma atuação rápida no início da infecção bacteriana e que logo em seguida, é fortemente reprimida pela planta resistente Satsuma, o que lhe permitiria continuar com seu arsenal de proteinases ativo e poder responder melhor ao ataque do patógeno.

Por outro lado, a espécie suscetível Hamlin continuou a reprimir a expressão de genes relacionados à formação da parede celular que codificam para celulose sintetase (transcript2282703, transcript10878336 e transcript10946023), xiloglucano endotransglicosilase (transcript8622958, transcript619795 e transcript10537791) e extensina (transcript5422191) (Tabela 14). Além disso, a espécie suscetível reprimiu a enzima lipase (transcript36807, transcript10196558 e transcript10892652) já citada anteriormente como participante da via do ácido jasmônico (Tabela 14). Estes transcritos reprimidos podem estar relacionados com o aparecimento dos sintomas em Hamlin.

Tabela 14. Genes reprimidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Produto	Fold-change	P-valor	Fold-change	P-valor
		Satsuma	Satsuma	Hamlin	Hamlin
transcript279703	Inibidor de proteinase tipo 1	0	1,19E-07	N/A	N/A
transcript2612024	Proteína tipo miraculina	0	7,56E-07	N/A	N/A
transcript513448	Proteína CEBiP	0	8,62E-07	0,012306	0,000488
transcript7829925	Inibidor de proteinase	0	1,07E-06	N/A	N/A
transcript2160388	Proteína hipotética	0,004332	1,12E-06	0,00987	0,000231
transcript2854916	Proteína hipotética	0,002927	1,33E-06	N/A	N/A
transcript10846770	Enzima asparagina sintetase	0	1,86E-06	0,005086	2,10E-05
transcript2160415	Proteína hipotética	0,006081	1,94E-06	0	1,49E-05
transcript78717	Proteína hipotética	0,005026	2,05E-06	0	2,67E-05
transcript2621089	Inibidor de tripsina	0	2,12E-06	N/A	N/A
transcript10121283	Proteína predita	0,005072	2,13E-06	0,019546	0,00056
transcript1143676	Inibidor de proteinase	0,003301	2,26E-06	N/A	N/A
transcript10846891	Enzima asparagina sintetase	0	2,48E-06	0,016078	0,000136
transcript2160363	Proteína hipotética	0,006814	3,05E-06	0,018808	0,000491
transcript10121223	Proteína hipotética	0,006912	3,28E-06	0	3,77E-05
transcript2553497	Beta-amilase	0,011746	3,67E-06	0,128576	0,016231
transcript224415	Proteína predita	0	3,85E-06	0	0,002597
transcript10121387	Proteína hipotética	0,00924	4,58E-06	0,019936	0,000302
transcript6132121	Beta-amilase	0,007866	5,61E-06	0,120827	0,016595
transcript2264460	Desconhecido	0	7,42E-06	N/A	N/A
transcript10327655	Proteína associada a microtúbulos	0,004729	8,04E-06	N/A	N/A
transcript1532095	Proteína tipo miraculina	0	8,06E-06	N/A	N/A
transcript10846832	Enzima asparagina sintetase	0,00477	8,54E-06		
transcript7829789	Inibidor de proteinase	0	9,29E-06	N/A	N/A
transcript10327747	Proteína associada a microtúbulos	0,005004	9,79E-06	N/A	N/A
transcript10846801	Enzima asparagina sintetase	0,004993	1,07E-05	0,010548	6,28E-05
transcript3515707	Enzima asparagina sintetase	0	1,19E-05	0,051119	0,012019
transcript4592902	Enzima asparagina sintetase	0,005189	1,21E-05	0,016476	0,000298
transcript10461571	Beta-galactosidase	0,013321	1,27E-05	0,143686	0,032143
transcript1904237	Proteína tipo miraculina	0	1,51E-05	N/A	N/A
transcript9608566	Desconhecido	N/A	N/A	0	1,40E-07
transcript5730239	Desconhecido	N/A	N/A	0	1,66E-07
transcript5917991	Desconhecido	N/A	N/A	0	2,12E-07
transcript9608765	Desconhecido	N/A	N/A	0,001424	2,23E-07
transcript2747660	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	0,003383	2,49E-07
transcript5422191	Extensina	N/A	N/A	0,00272	5,17E-07
transcript9608530	Desconhecido	N/A	N/A	0	6,80E-07
transcript2282703	Enzima celulose sintase	N/A	N/A	0,002026	8,48E-07
transcript9608734	Desconhecido	N/A	N/A	0	9,10E-07
transcript5891471	Desconhecido	N/A	N/A	0	1,13E-06
transcript10878336	Enzima celulose sintase	N/A	N/A	0	1,27E-06
transcript5325677	Desconhecido	N/A	N/A	0	4,03E-06
transcript10946023	Enzima celulose sintase	N/A	N/A	0	4,59E-06
transcript36807	Enzima lipase	N/A	N/A	0,00356	5,81E-06
transcript125639	Glicerol-3-fosfato-aciltransferase	N/A	N/A	0,008204	8,50E-06
transcript2580060	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0	1,02E-05
transcript2765362	Proteína hipotética	N/A	N/A	0	1,21E-05
transcript10196558	Enzima lipase	N/A	N/A	0	1,36E-05
transcript110533	Inibidor de pectinesterase	N/A	N/A	0	1,78E-05
transcript11128368	Proteína lacase	N/A	N/A	0	1,78E-05
transcript10196540	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0	1,85E-05
transcript9658174	Desconhecido	N/A	N/A	0	1,86E-05
transcript8622958	Xiloglucano endotransglicosilase	N/A	N/A	0,009173	1,88E-05
transcript10892652	Enzima lipase	N/A	N/A	0,005086	1,91E-05
transcript10196585	Proteína zinc finger	N/A	N/A	0	2,26E-05
transcript6197951	Xiloglucano endotransglicosilase	N/A	N/A	0	3,08E-05
transcript10537791	Xiloglucano endotransglicosilase	N/A	N/A	0,01499	3,46E-05

N/A: transcrito não detectado

5.5.4 Genes diferencialmente expressos na espécie resistente Satsuma e na espécie suscetível Hamlin 72 horas após a inoculação

O tempo 72 horas após a inoculação com Xac foi o último tempo de infecção avaliado. A Figura 32 apresenta o número de GDEs induzidos na espécie Hamlin e na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação com Xac. As duas espécies apresentaram 683 genes induzidos em comum, enquanto a espécie Satsuma apresentou 1.335 genes expressos de maneira exclusiva e na espécie Hamlin este número foi de 2.632.

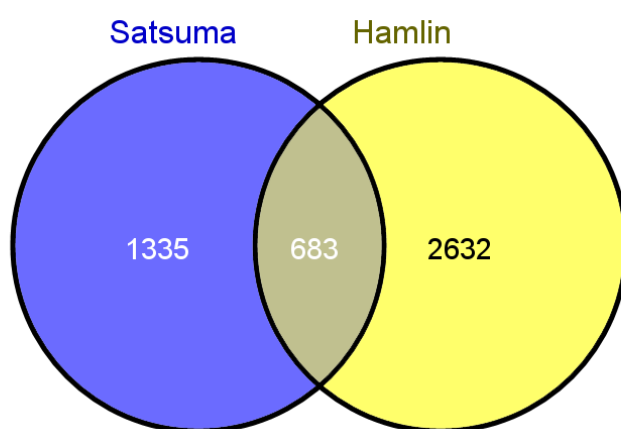


Figura 32. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram induzidos nas espécies Satsuma e Hamlin 72 após a inoculação com Xac.

Neste tempo, a espécie resistente Satsuma e a espécie suscetível Hamlin apresentaram muito mais genes induzidos em comum do que nos tempos de 24 e 48 horas, indicando que no tempo 72 horas a espécie Hamlin suscetível consegue ativar muito mais genes em comum com a espécie Satsuma resistente do que nos tempos iniciais de 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno. Isto fortalece a hipótese de que a rapidez e a intensidade da ativação dos genes das vias de resistência da planta é determinante no aparecimento da doença ou não. Entre os genes altamente expressos, em ambas as espécies, estão as proteínas relacionadas à patogênese da família PR-1 e da família PR-5. As proteínas da família PR-5 possuem 60% ou mais de identidade com a proteína taumatina (TLP). As proteínas desta família acumulam quando as plantas são atacadas por patógenos (FU et al., 2012). Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que TLPs exibem uma atividade

antifúngica direta, interagindo com a membrana plasmática de suas células (HEJGARD et al., 1991; PASCHOLATI et al., 2008). Resultados encontrados por Fu e colaboradores (2012) mostraram a indução de TLPs na espécie cítrica resistente ao cancro cítrico de kumquat Meiwa (*Fortunella crassifolia*), sugerindo que a expressão de genes TLPs pode fazer parte da maquinaria de defesa contra Xac nesta espécie. Os resultados do presente trabalho indicam que o mesmo pode ocorrer em relação às espécies Satsuma (*C. unshiu*) e Hamlin (*C. sinensis*).

Além das proteínas relacionadas à patogênese, houve a indução de genes já comentados tais como endo-beta-glucanase, cisteína proteinase, expansina, fator de transcrição AP2 e proteína LOB e proteínas relacionadas à defesa da planta como proteína antimicrobiana e proteína de defesa (Tabela 15).

Tabela 15. Genes induzidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Produto	Fold-change	P-valor	Fold-change	P-valor
		Satsuma	Satsuma	Hamlin	Hamlin
transcript60306	Proteína relacionada à patogênese PR-1	480,2753	3,44E-08	149,8141	1,84E-06
transcript4790973	Endo-beta-glucanase	381,923	8,20E-08	80,10956	2,99E-05
transcript79598	Proteína relacionada à patogênese PR-1	209,1397	1,09E-07	359,3996	6,62E-08
transcript2776164	Proteína hipotética	177,0746	2,01E-07	281,7053	1,24E-07
transcript5025067	Expansina	257,7262	3,93E-07	81,03036	2,87E-05
transcript10024241	Proteína relacionada a patogênese PR-1	495,3512	4,39E-07	210,1725	1,34E-06
transcript4556827	Proteína cisteína proteinase	157,2202	4,65E-07	130,1869	2,57E-06
transcript2248565	Proteína cisteína proteinase	136,508	4,96E-07	80,9364	8,65E-06
transcript10185949	Endo-beta-glucanase	198,1405	5,15E-07	338,8542	3,15E-06
transcript9182509	Proteína cisteína proteinase	126,8811	8,33E-07	60,91816	2,41E-05
transcript294614	Proteína cisteína proteinase	122,1866	8,70E-07	74,23947	1,14E-05
transcript11170783	Fator de transcrição AP2	162,6044	1,65E-06	INF	5,39E-05
transcript2847441	Dioxigenase dependente de oxoglutarato	148,0669	2,50E-06	109,345	1,21E-05
transcript392584	Endo-beta-glucanase	314,4403	2,67E-06	53,86678	0,000466
transcript11062541	Proteína de transporte de lipídios em plantas	165,1171	2,80E-06	146,1769	4,68E-06
transcript11170761	Fator de transcrição AP2/ERF	137,2984	3,24E-06	35,91118	0,001668
transcript10748165	Proteína LOB	85,35457	4,39E-06	224,6751	1,35E-05
transcript10715542	Proteína multi-extrusão antimicrobiana	91,17334	4,94E-06	20,48779	0,004187
transcript10747027	Proteína hipotética conservada	181,9877	5,30E-06	23,01999	0,008433
transcript2668772	Proteína de ligação	INF	5,31E-06	11,35653	0,025236
transcript11131405	teobromina sintase	80,54841	5,46E-06	12,61495	0,005019
transcript488883	Endo-beta-glucanase	166,9118	5,56E-06	INF	8,14E-05
transcript821132	Proteína cisteína proteinase	73,22583	5,78E-06	79,37292	1,03E-05
transcript168656	Endo-beta-glucanase	117,3767	5,96E-06	73,66397	0,000156
transcript20819	Proteína relacionada à patogênese PR-1	136,4011	6,00E-06	21,63879	0,00348
transcript10274748	Proteína de defesa	87,82313	6,61E-06	N/A	N/A
transcript2490074	Desconhecido	96,4858	9,03E-06	29,15865	0,00051
transcript2178078	Proteína predita	226,1386	1,05E-05	22,32939	0,002609
transcript2803769	S-linalol sintase	64,61103	1,09E-05	N/A	N/A
transcript10004251	Glutarredoxina	27,99811	0,021873	INF	0,03181
transcript2609896	Quitinase	33,1392	0,000138	198,8927	1,63E-06
transcript283908	Proteína rica em prolina	217,5238	1,49E-05	258,2843	1,86E-06
transcript214644	Serina carboxipeptidase	104,8134	2,01E-05	INF	3,23E-06
transcript10797432	Serina carboxipeptidase	70,5337	2,00E-05	201,6551	4,19E-06
transcript10797408	Serina carboxipeptidase	75,37953	1,79E-05	201,1947	4,21E-06
transcript11049044	Proteína rica em prolina	N/A	N/A	194,7491	4,87E-06
transcript10605405	Proteína hipotética	N/A	N/A	103,1296	1,23E-05
transcript2475640	2-oxoglutarato oxigenase	N/A	N/A	74,51394	1,83E-05
transcript2476968	Cinamoil-CoA redutase	N/A	N/A	197,9719	1,85E-05
transcript452642	Isopenicilina N sintase	55,99622	8,66E-05	189,6847	2,11E-05
transcript6639723	Desconhecido	N/A	N/A	101,9018	2,74E-05
transcript2988798	Proteína de defesa	40,30497	0,000184	95,14929	3,12E-05
transcript2412647	Proteína relacionadas à patogênese PR-5	41,3119	0,000119	73,5105	3,30E-05
transcript5384844	2-oxoglutarato oxigenase	15,07591	0,010757	75,68973	3,90E-05

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado

N/A: nenhum sinal de expressão detectado

Em relação aos genes reprimidos às 72 horas após a inoculação de Xac nas espécies Satsuma e Hamlin, apenas 104 transcritos foram reprimidos em comum, enquanto 973 genes foram reprimidos exclusivamente na espécie resistente e 3.868 genes na espécie suscetível (Figura 33). Quando se analisa os genes exclusivos mais reprimidos em cada espécie observa-se uma resposta contrastante entre as espécies resistente Satsuma e suscetível Hamlin (Tabela 16), ou seja, o set de genes que é mais reprimidos em Satsuma é diferente do set de genes que é mais reprimido em Hamlin.

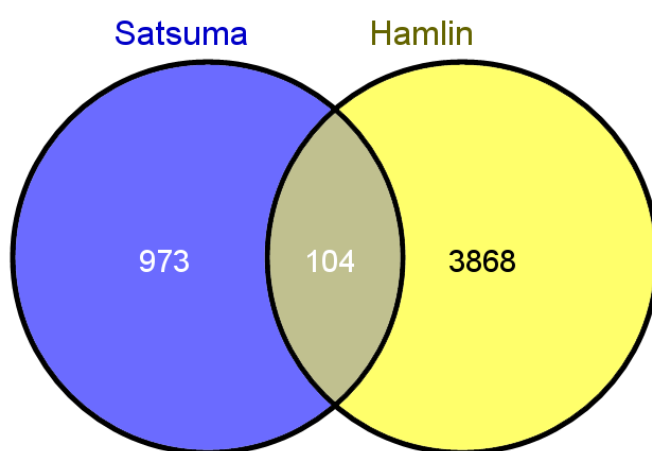


Figura 33. Diagrama de Venn ilustrando o número de genes que foram reprimidos nas espécies Satsuma e Hamlin 72 após a inoculação com Xac.

Entre os GDEs reprimidos na espécie Satsuma, os genes mais reprimidos (alto “Fold-change” e menor P-valor) foram aqueles que nos tempos anteriores foram fortemente induzidos. Por exemplo, a proteína proteinase aspártica apresentou transcritos induzidos com alta significância estatística no tempo 24 horas (Tabela 10). Já no tempo 72 horas, os transcritos transcript8254565, transcript2159754, transcript5565810, transcript1462950 e transcript1462950, que codificam para uma proteinase aspártica, foram reprimidos (Tabela 16).

A enzima pectato liase também foi induzida nos tempos 24 e 48 horas (Tabela 10 e 12); no entanto, no último tempo, 72 horas após a inoculação com Xac, esta enzima apresentou 14 transcritos reprimidos. Deste total, sete transcritos estão representados na Tabela 16.

Tabela 16. Genes reprimidos com os menores valores de P-valor (maior significância estatística) que foram expressos em comum ou exclusivamente na espécie Hamlin e/ou na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação com Xac.

Transcrito	Produto	Fold-change	P-valor	Fold-change	P-valor em
		Satsuma	Satsuma	Hamlin	Hamlin
transcript8254565	Proteína proteinase aspártica	0	2,87E-05	N/A	N/A
transcript10491081	Enzima pectato liase	0,00673	3,78E-05	N/A	N/A
transcript2684168	Enzima pectato liase	0,007061	4,58E-05	N/A	N/A
transcript2159754	Proteína proteinase aspártica	0,018728	5,99E-05	N/A	N/A
transcript2582930	Proteína zinc finger	0	7,83E-05	N/A	N/A
transcript5549762	Proteína rica em prolina	0,029081	0,000125	N/A	N/A
transcript5328565	Enzima pectato liase	0,009283	0,000132	N/A	N/A
transcript8001964	Enzima pectato liase	0	0,000179	N/A	N/A
transcript2582950	Enzima lipase	0,009925	0,000188	N/A	N/A
transcript8001946	Enzima pectato liase	0	0,000191	N/A	N/A
transcript10491058	Enzima pectato liase	0,019698	0,0002	N/A	N/A
transcript2263211	Proteína induzida por giberelina	0	0,000211	N/A	N/A
transcript5565810	Proteína proteinase aspártica	0	0,000215	N/A	N/A
transcript2416885	Desconhecido	0,011102	0,00028	N/A	N/A
transcript1462950	Proteína proteinase aspártica	0	0,000281	N/A	N/A
transcript6300557	Enzima lipase	0	0,000308	N/A	N/A
transcript2240648	Transferase	0,037294	0,000594	N/A	N/A
transcript87219	Desconhecido	0,013806	0,000644	N/A	N/A
transcript2376291	Proteína transportadora (ABC)	0	0,000722	N/A	N/A
transcript5544740	Proteína hipotética	0	0,000749	N/A	N/A
transcript9305896	Proteína induzida por giberelina	0	0,000784	N/A	N/A
transcript8254255	Proteína proteinase aspártica	0	0,000787	N/A	N/A
transcript2175242	Peroxidase	0	0,000902	N/A	N/A
transcript4901736	Enzima pectato liase	0,033652	0,000919	N/A	N/A
transcript10368709	Terpeno sintase	0	0,000973	N/A	N/A
transcript2827527	Citocromo P450	0,037391	0,001011	N/A	N/A
transcript5195041	Proteína miraculina	N/A	N/A	0	1,42E-05
transcript11104429	Proteína quinona oxidoreductase	N/A	N/A	0	2,29E-05
transcript824507	Peptidase	N/A	N/A	0	4,82E-05
transcript6273198	Amina oxidase	N/A	N/A	0,019884	7,66E-05
transcript9341315	Aminotransferase	N/A	N/A	0	9,43E-05
transcript10413113	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,02008	0,000128
transcript2850444	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,030018	0,000193
transcript2267647	Amina oxidase	N/A	N/A	0,032121	0,00025
transcript10666570	Amina oxidase	N/A	N/A	0	0,000301
transcript5958808	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,018665	0,000322
transcript5743226	Desconhecido	N/A	N/A	0,016154	0,000335
transcript10132366	Citocinina ribosídeo 5-monofosfato fosforibohidrolase	N/A	N/A	0,015476	0,000342
transcript6084323	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,03882	0,000386
transcript10421033	ferric reduction oxidase chloroplastic-like	N/A	N/A	0,042916	0,000523
transcript2127811	ferric reduction oxidase chloroplastic-like	N/A	N/A	0	0,000533
transcript1881991	Peroxidase	N/A	N/A	0,036164	0,000542
transcript7829925	Inibidor de protease	N/A	N/A	0,043457	0,000551
transcript10421147	ferric reduction oxidase chloroplastic-like	N/A	N/A	0,043781	0,000566
transcript10421083	ferric reduction oxidase chloroplastic-like	N/A	N/A	0,019385	0,000594
transcript7755621	Enzima magnésio quelatase	N/A	N/A	0,030026	0,000598
transcript9205206	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,035992	0,000602
transcript10412854	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,026309	0,000635
transcript5975362	Proteína de ligação de clorofila A-B	N/A	N/A	0,044982	0,000666
transcript5854201	ferric reduction oxidase chloroplastic-like	N/A	N/A	0,033397	0,000709
transcript8544230	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase	N/A	N/A	0,024446	0,000722
transcript5960507	Proteína de ligação de clorofila A-B	N/A	N/A	0,03157	0,000735
transcript1248213	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0,040159	0,000786
transcript10412962	Anidrase carbônica	N/A	N/A	0	0,000812
transcript2180461	Proteína de ligação de clorofila A-B	N/A	N/A	0,042916	0,000523

N/A: transcrito não detectado

Por outro lado, na espécie suscetível Hamlin, os genes reprimidos com maior significância estatística estão relacionados à fotossíntese. Além dos genes representados na Tabela 16, a espécie suscetível Hamlin apresentou aproximadamente 1.000 transcritos reprimidos relacionados à fotossíntese. A categorização dos genes reprimidos em Hamlin no tempo 72 horas, em relação ao processo biológico, apresentou várias categorias relacionadas à fotossíntese, como fotossíntese, fotossíntese (reação à luz), fotossíntese (coleta de luz), Fotossistema 1, Fotossistema 2, síntese de clorofila, processos de oxidação-redução, resposta ao estímulo luminoso, resposta à luz vermelha e azul, fotorrespiração, mostrando que todos os eventos ligados à fotossíntese foram reprimidos na espécie suscetível neste tempo de infecção (APÊNDICE D – Figura 23). A categorização em relação ao componente celular concordou com os dados anteriores, pois mostra que a maior parte dos genes reprimidos se encontra no cloroplasto (APÊNDICE D – Figura 24), local onde ocorre a fotossíntese. Estes transcritos relacionados à fotossíntese representam 52 genes distintos. Entre estes genes estão as proteínas PsaG, PsaK, PsaN e PsaE pertencem ao Fotossistema I (PSI) e as proteínas PsbA, PsbD, PsbP e PsbQ pertencem ao Fotossistema II (PSII) (Figura 34). O PSI é um complexo de proteínas de membrana integral que utiliza a energia da luz para mediar a transferência de elétrons de plastocianina a ferredoxina. Já o PSII é um complexo de subunidades múltiplas de pigmento contendo polipeptídeos tanto intrínsecos como extrínsecos na membrana fotossintética. Dentro do núcleo do complexo, a clorofila e os pigmentos β -caroteno estão principalmente ligados às proteínas antenas CP43 (PsbC) e CP47 (PsbB), que transfere a energia de excitação para as proteínas dos centros reacionais D1 (Qb, PsbA) e D2 (Qa, PsbD) que ligam todos os cofatores de atividade redox envolvidos no processo de conversão de energia. O complexo de oxigênio (OEC) do PSII oxida a água para fornecer prótons que serão utilizados pelo PSI. Este complexo é formado pelas proteínas OEE1 (PsbO), OEE2 (PsbP) e OEE3 (PsbQ) (Figura 34) (BARTSEVICH; PAKRASI, 1997; CHEN et al., 2006).

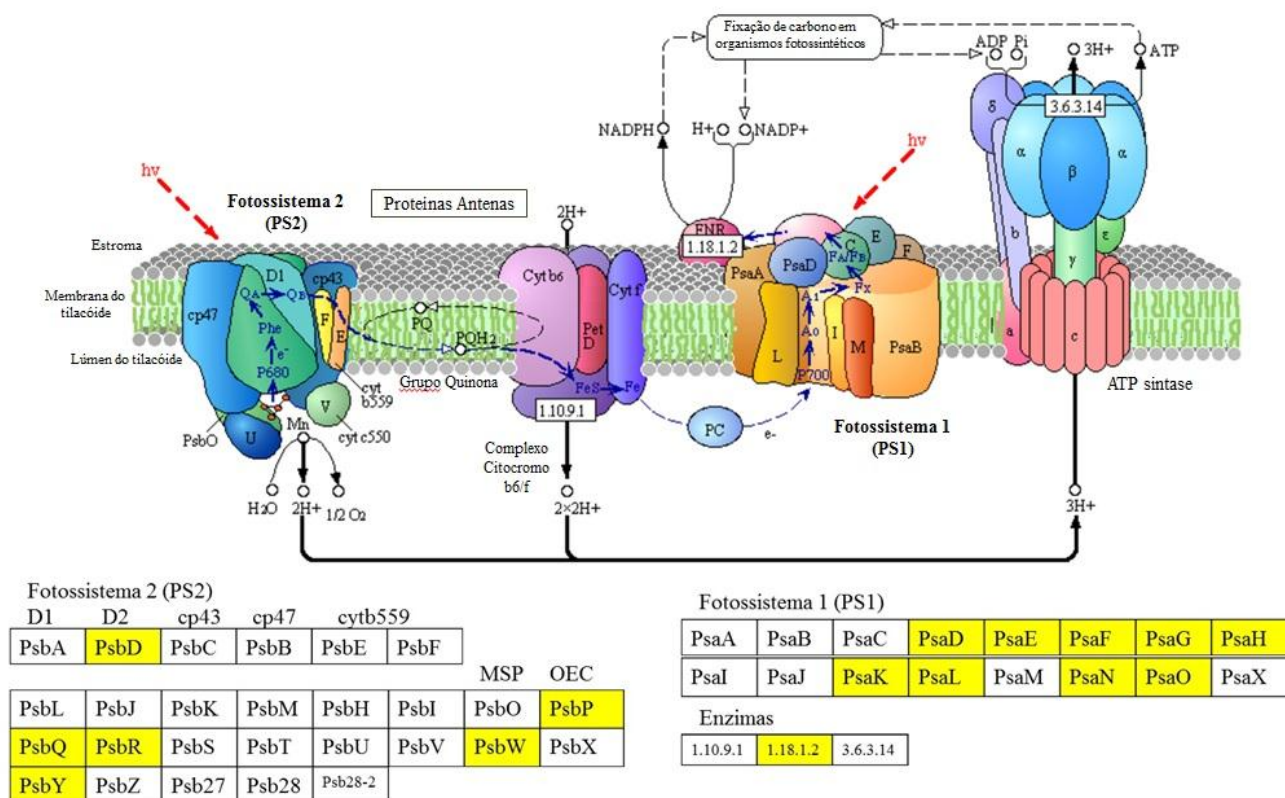


Figura 34. Esquema simplificado da fotossíntese retirada do banco de dados KEGG (2013). Os retângulos amarelos representam as proteínas e enzimas que foram reprimidas em folhas da espécie Hamlin 72 horas após a inoculação com Xac.

A espécie de laranja doce Newhall suscetível ao cancro cítrico também apresentou um grande número de genes reprimidos relacionados com a fotossíntese, incluindo aqueles que codificam proteínas envolvidas na fotossistema I e no fotossistema II (FU et al., 2012). Estes resultados sugerem que a função fotossintética da planta hospedeira é comprometida após o ataque por patógenos, pois resulta em mudanças morfológicas, como o surgimento de sintomas de cancro nas folhas cítricas. Neste contexto, o maior número de genes reprimidos no genótipo suscetível é consistente com os sintomas de cancro mais graves quando comparado com a gravidade dos sintomas do genótipo tolerante.

Em trabalho realizado com a espécie resistente ao cancro cítrico kumquat foi observado que a maior parte da maquinaria fotossintética da planta foi reprimida 6 horas após a inoculação com Xac. Os autores sugerem que a regulação de genes envolvidos na fotossíntese durante a interação Xac/Kumquat representa um custo para planta e desta forma, os recursos energéticos são redirecionados para resposta

de defesa (KHALAF et al., 2011). A regulação negativa da expressão de genes relacionados com a fotossíntese foi similar com os resultados obtidos em estudos anteriores, indicando que a expressão de muitos genes fotossintéticos foi reprimida após um ataque biótico em oito espécies de planta (ZOU et al., 2005; BILGIN et al., 2010). Porém, é importante ressaltar que, no presente estudo, a espécie resistente Satsuma apresentou apenas cinco transcritos reprimidos relacionados à fotossíntese, um número muito pequeno quando comparado com os 1.000 transcritos reprimidos na espécie suscetível Hamlin 72 horas após a infecção.

Para tentar compreender os mecanismos envolvidos na expressão gênica temporal nas espécies Satsuma e Hamlin submetidas ao ataque de Xac, dois esquemas são propostos (Figura 35 e 36). Como discutido anteriormente, a defesa basal da planta é a mesma em ambas as espécies. Tanto a planta Satsuma como a Hamlin apresenta uma via de sinalização MAPK com a ativação dos fatores de transcrição WRKY, AP2/ERF e NAC no núcleo. Como resposta, as plantas cítricas de ambas as espécies produzem proteínas em resposta ao ataque bacteriano com a produção de proteínas relacionadas à patogênese, endo-beta-glucanase, cisteína proteinase, proteínas LOB, proteínas PAR1 e proteínas antimicrobianas. Mas é importante ressaltar que com a exceção da proteína PR-1, o restante das proteínas foram mais induzidas (maior valor de “Fold-change”) na espécie resistente Satsuma, o que pode ter contribuído na resistência desta espécie.

Mesmo com a expressão de vários genes relacionados à defesa da planta, a espécie suscetível Hamlin não conseguiu conter a doença e os sintomas de cancro cítrico apareceram (Figura 9). A diferença notável de expressão desta espécie quando comparada a espécie resistente Satsuma foram a repressão de genes relacionados com a parede celular, como celulose sintase, expansina, extensina, pectato liase e proteína xiloglucano endotransglicosilase que em Satsuma foram altamente induzidos e genes relacionados à fotossíntese que foram fortemente reprimidos em Hamlin, principalmente 72 horas após a inoculação. Outro aspecto relevante foi à expressão tardia da proteína proteinase aspártica em Hamlin. Esta proteína apresentou uma expressão acentuada nas primeiras 24 horas após a inoculação com Xac em folhas de Satsuma, indicando algum envolvimento desta proteinase na defesa da espécie resistente.

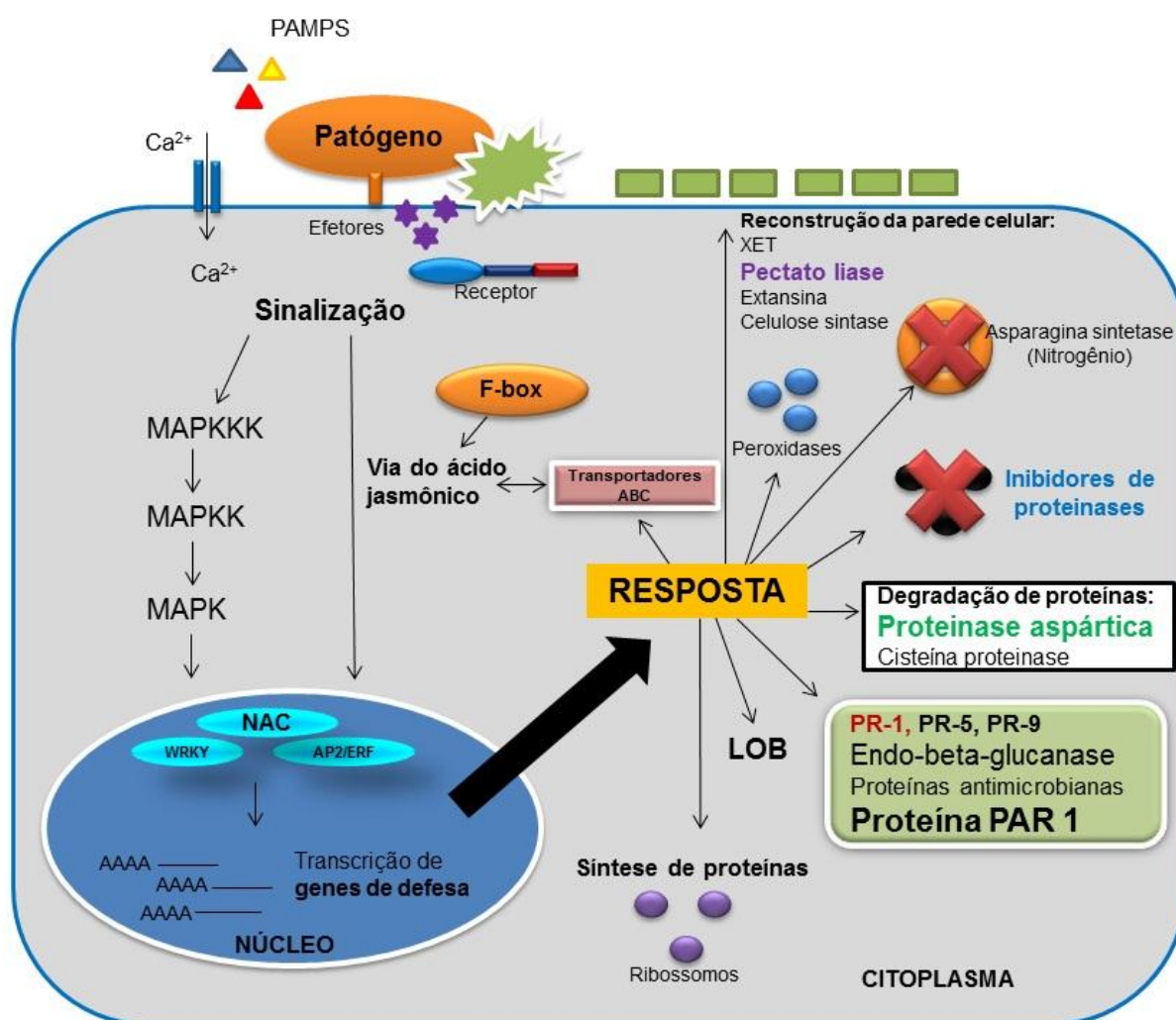


Figura 35. Esquema hipotético da resposta molecular da espécie Satsuma à inoculação artificial de Xac baseado no transcriptoma revelado pela técnica de RNA-Seq. Fonte em preto representam os genes expressos em todos os tempos, fonte em verde representam os genes expressos apenas no tempo 24 horas, fonte em azul representam os genes expressos apenas no tempo 48 horas, fonte em roxo representam os genes expressos no tempo 24 e 48 horas e fonte em vermelho representam genes expressos no tempo 48 e 72 horas. O sinal de multiplicar em vermelho representa os genes que foram reprimidos.

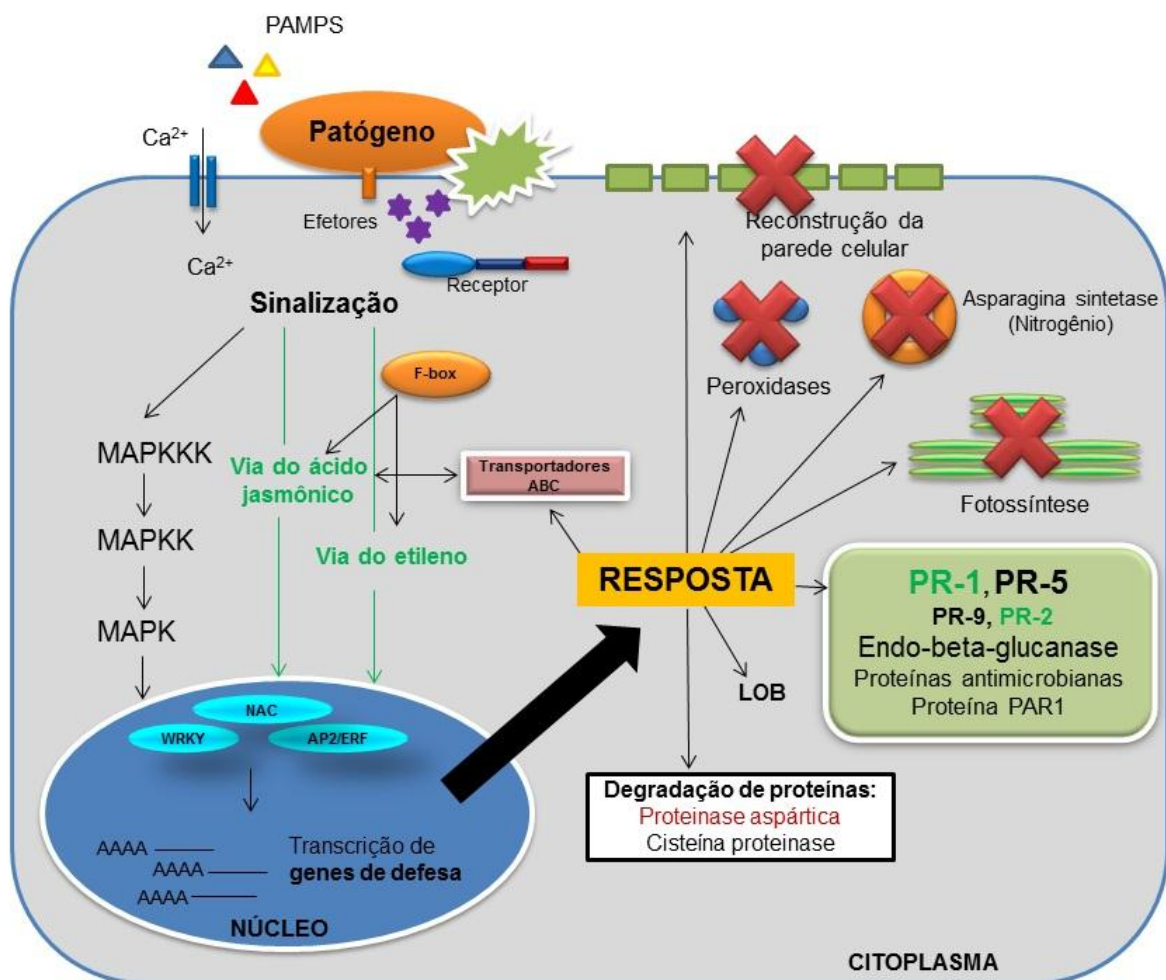


Figura 36. Esquema hipotético da resposta molecular da espécie Hamlin à inoculação artificial de Xac baseado no transcriptoma revelado pela técnica de RNA-Seq. Fonte em preto representam os genes expressos em todos os tempos, fonte em verde representam os genes expressos apenas no tempo 24 horas e fonte em vermelho representam genes expressos no tempo 48 e 72 horas. O sinal de multiplicar em vermelho representa os genes que foram reprimidos.

5.6 Análises do RNA-Seq das bibliotecas de cDNA de Xac

Este estudo buscou investigar a expressão gênica diferencial da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) inoculada em espécies de citros contrastantes em relação a sua resistência ao cancro cítrico, por meio da nova tecnologia de sequenciamento RNA-Seq (Illumina). Um total de 119 milhões de sequências foram geradas a partir de sequências de 50 pares de base sequenciadas de 6 bibliotecas de cDNA (Tabela 17) construídas a partir de: Xac cultivada em meio de cultura sólido AN (amostra controle – XC); Xac cultivada por 24 horas em meio indutor XAM1 (XXAM1-24); Xac inoculada e exsudada de folhas da espécie resistente Satsuma 48 e 72 horas após a inoculação (XS48 e XS72); Xac inoculada e exsudada de folhas da espécie suscetível Hamlin 48 e 72 horas após a inoculação (XH48 e XH72).

O uso da ferramenta Glimmer permitiu um pequeno aumento no número de genes de Xac em relação ao que foi descrito quando do sequenciamento de seu genoma (DA SILVA et al., 2002). Foram identificados 47 novos transcritos dentre isoformas e “clusters” novos, aumentando o número de genes de 4.491 para 4.538 genes. Estes 4.538 genes foram utilizados como anotação inicial para analisar os 6 transcriptomas de Xac oriundos das bibliotecas sequenciadas. A preparação dos dados removeu de 7% a 11% das amostras sequenciadas, mantendo uma grande cobertura de sequenciamento. O alinhamento contra o genoma de Xac, sem permitir gaps nos fragmentos, foi de 100% para todas as bibliotecas (Tabela 17), demonstrando que eventos raros em bactérias, como “splicing”, não foram detectados.

Tabela 17. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-Seq (Illumina) como número de sequências geradas e porcentagem de sequências com alta qualidade, identificados nas bibliotecas de cDNA de Xac cultivados em meio de cultura AN e XAM1 e em Xac inoculada e exsudada dos tecidos de Satsuma e Hamlin.

Biblioteca de cDNA	Número de sequências	Número de sequências com alta qualidade	Sequências alinhadas(%)
XC	17.804.274	15.941.464	100
XXAM1-24	12.672.758	11.116.057	100
XS48	22.191.675	20.456.663	100
XS72	15.483.439	14.295.233	100
XH48	18.849.442	17.425.972	100
XH72	20.022.830	17.819.326	100
TOTAL	107.024.418	97.054.715	

XC: Xac cultivada em meio de cultura sólido NA; XXAM1-24: Xac cultivada por 24 horas em meio indutor XAM1; XS48 e XS72: Xac inoculada e exsudada de folhas da espécie resistente Satsuma 48 e 72 horas após inoculação, respectivamente; XH48 e XH72: Xac inoculada e exsudada de folhas da espécie suscetível Hamlin 48 e 72 horas após inoculação, respectivamente.

Cinco comparações em pares foram realizadas entre as seis bibliotecas de cDNA para gerar o maior número de informações possíveis e comparar as diferenças transcricionais do patógeno em situação infectante e não infectante (Controle vs. Infectada).

5.7 Expressão gênica global e temporal de Xac

Para esta análise foi considerado o valor de alteração absoluta ("Fold-change") de duas vezes (>2 ou $<0,5$) e um P-valor menor que 0,05 como critério biológico para seleção de genes diferencialmente expressos (GDEs). A análise de expressão gênica entre as amostras foi feita comparando os dados de alinhamento das bibliotecas controles contra as bibliotecas infectadas.

Após análises estatísticas, foram identificados 15, 28, 34, 38 e 35 GDEs nas bibliotecas XXAM1-24, XH48, XH72, XS48 e XS72, respectivamente (Figura 37).

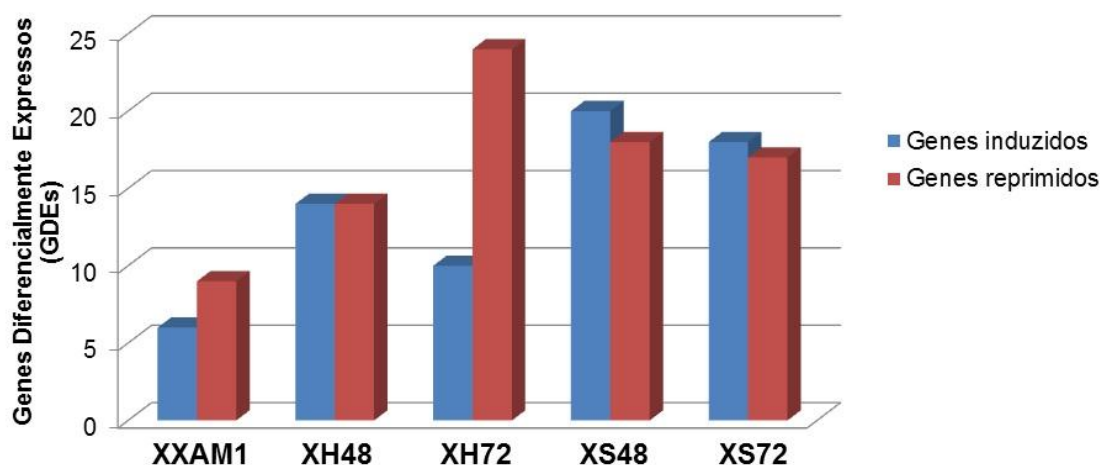


Figura 37. Número de genes diferencialmente expressos (GDEs) de *Xac* cultivada em meio XAM1 por 24 horas e *Xac* inoculadas e exsudadas da espécie Satsuma e Hamlin, 48 e 72 horas após a inoculação, quando comparado ao controle. As barras em azul indicam os genes induzidos e as barras vermelhas indicam os genes reprimidos.

Os GDEs foram representados em diagramas de Venn (Figura 38 e 39) para representar os genes induzidos e reprimidos em comum nos diferentes tempos de infecção de *Xac* e nas duas espécies. Os GDEs estão representados nas Tabelas 18 e 19.

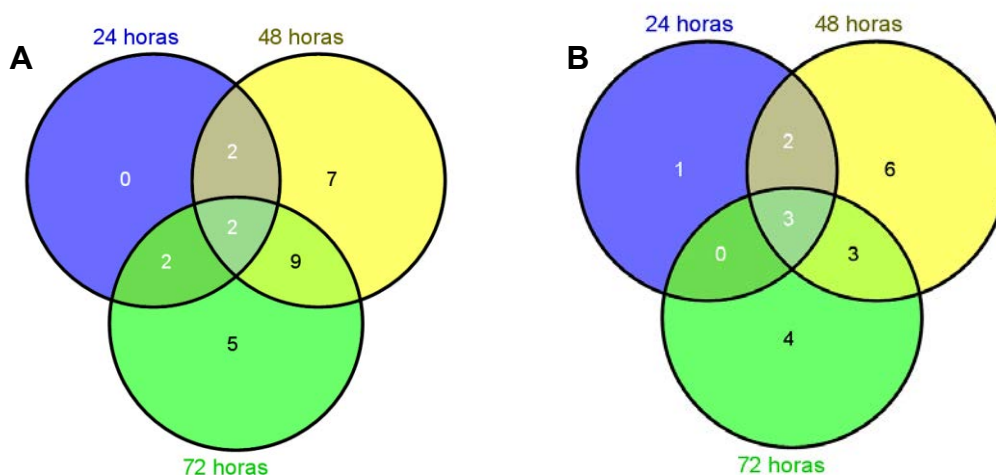


Figura 38. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram induzidos em *Xac* infectando as espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) 48 e 72 horas após a inoculação. O tempo 24 horas é representado por GDEs em *Xac* cultivada em meio indutor XAM1 por 24 horas. Diagramas mostram o número de genes induzidos que são expressos em comum ou são exclusivos de cada espécie.

Tabela 18. Lista dos genes induzidos em Xac em todas as bibliotecas analisadas.

Transcrito	Produto	Fold-change XXAM1-24	Fold-change XH48	Fold-change XH72	Fold-change XS48	Fold-change XS72
XLOC_002996	Proteína hipotética XCAW_00506	1,9306	1,9058	1,5252	N/A	N/A
XLOC_003116	Proteína tipo plasmídeo	INF	-	-	-	N/A
XLOC_003122	Proteína hipotética XAC2245	INF	N/A	N/A	N/A	INF
XLOC_003335	Proteína de membrana	1,0089	2,8981	1,6684	13,9031	N/A
XLOC_003377	Nucleotidiltransferase DNA polimerase	1,1792	N/A	1,4967	N/A	N/A
XLOC_003378	DNA polimerase error-prone	1,3205	N/A	1,3059	N/A	N/A
XLOC_003671	Transglicosilase lítica de mureína	3,1453	24,2707	14,5915	14,0658	13,0373
XLOC_003674	Proteína de divisão A	2,6613	N/A	N/A	N/A	N/A
XLOC_003681	Proteína hipotética XACb0033	6,3239	N/A	N/A	N/A	N/A
XLOC_002987	Proteína putativa não caracterizada	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003014	dihidroxi-ácido desidratase	N/A	5,0702	N/A	7,4446	4,6489
XLOC_003055	Protease extracelular	N/A	6,5281	5,3082	6,3546	7,1443
XLOC_003173	RNA polimerase fator sigma 54	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003176	Quinase p-loop	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003183	Proteína secretada	N/A	N/A	N/A	3,0872	N/A
XLOC_003188	Quinase shikimate	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003192	Proteína hipotética	N/A	3,9596	N/A	4,3332	1,9051
XLOC_003198	Proteína hipotética XAC3023	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003203	Proteína hipotética	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003208	Proteína de ligação de penicilina	N/A	N/A	N/A	3,98906	N/A
XLOC_003308	Proteína tipo ankyrin	N/A	N/A	N/A	INF	N/A
XLOC_003430	Regulador transcricional	N/A	N/A	N/A	2,3603	N/A
XLOC_003659	Proteína de avirulência	N/A	12,7313	4,8084	5,29469	4,5122
XLOC_003036	Regulador transcricional	N/A	N/A	1,3058	N/A	1,1944
XLOC_003041	Protease	N/A	N/A	N/A	N/A	1,6628
XLOC_003165	Proteína da membrana	N/A	N/A	N/A	N/A	INF
XLOC_003191	Proteína hipotética	N/A	INF	N/A	N/A	INF
XLOC_003204	I-serina desidratase	N/A	-	INF	N/A	-
XLOC_003319	Celulose degenerada	N/A	-	9,2073	N/A	-
XLOC_003323	Vanílico o-demetilase oxigenase	N/A	34,7694	38,9685	N/A	26,1967
XLOC_003327	Proteína reguladora	N/A	790,3688	329,580	151,9705	255,3509
XLOC_003394	Encinuclease abc subunidade b	N/A	3,4050	3,6008	N/A	3,4372
XLOC_003617	Proteína hipotética	N/A	N/A	N/A	N/A	INF
XLOC_002989	UDP-glucose epimerase	N/A	INF	N/A	N/A	N/A
XLOC_002995	Proteína da membrana	N/A	1,3782	N/A	N/A	N/A
XLOC_003190	Proteína hipotética	N/A	1,0870	N/A	N/A	N/A
XLOC_003194	Proteína hipotética XAC3018	N/A	1,1851	1,8868	N/A	N/A
XLOC_003077	Proteína ABC transporte de ligação ATP	N/A	N/A	1,1692	N/A	N/A
XLOC_003177	Proteína de transporte de açúcar	N/A	N/A	4,0366	N/A	N/A
XLOC_003181	Proteína hipotética XAC2991	N/A	N/A	1,3755	N/A	N/A
XLOC_003187	Proteína família im30	N/A	N/A	1,6013	N/A	N/A
XLOC_003193	Proteína hipotética	N/A	N/A	1,6185	N/A	N/A
XLOC_003220	Proteína transmembrana	N/A	N/A	3,5359	N/A	N/A
XLOC_003360	Proteína da membrana	N/A	N/A	3,6039	N/A	N/A
XLOC_003459	Integrase fago relacionado	N/A	N/A	INF	N/A	N/A
XLOC_003469	Proteína chemotaxis	N/A	N/A	INF	N/A	N/A

INF: sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado

N/A: transcrito não detectado

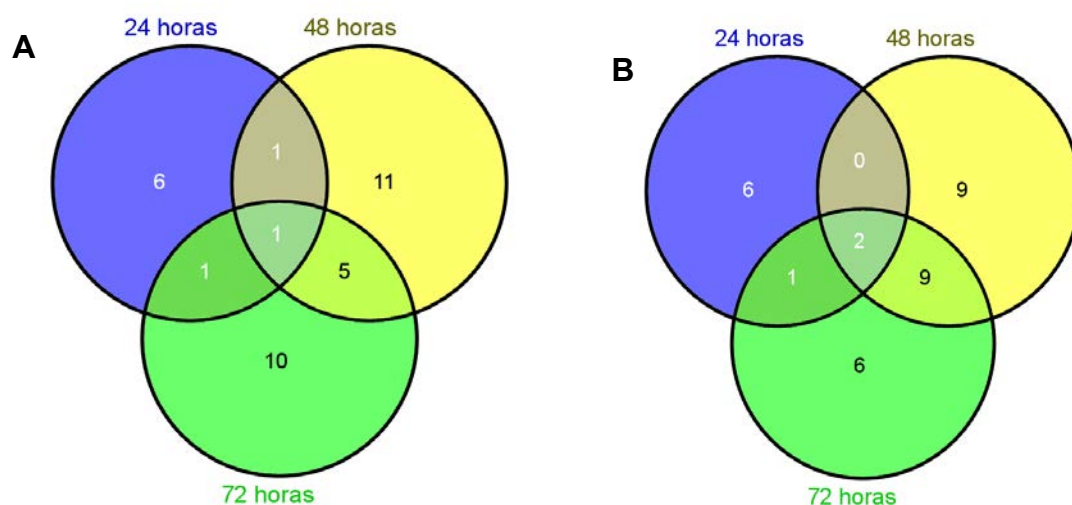


Figura 39. Diagramas de Venn mostrando o número de genes que foram reprimidos em Xac infectando as espécies Satsuma (A) e Hamlin (B) 48 e 72 horas após a inoculação. O tempo 24 horas é representado por GDEs em Xac cultivada em meio indutor XAM1 por 24 horas. Diagramas mostram o número de genes reprimidos que são expressos em comum ou são exclusivos de cada espécie.

Tabela 19. Lista dos genes reprimidos em Xac em todas as bibliotecas analisadas.

Transcrito	Produto	Fold-change XXAM1-24	Fold-change XH48	Fold-change XH72	Fold-change XS48	Fold-change XS72
XLOC_003006	RNA helicase ATP-dependente	0,7720	0	0,7247	N/A	0,2349
XLOC_003036	Regulador transcricional	0,8302	0,8635	N/A	0	N/A
XLOC_003077	Proteína ABC transporte de ligação ATP	0,7199	0	N/A	0	0
XLOC_003142	Proteína chemotaxis	0	N/A	N/A	-	0
XLOC_003501	Inibidor de iniciação de tradução	0,4636	0	N/A	0	0,4398
XLOC_003507	Prolina dipeptidase	0,1089	0,0961	0,2681	0,2766	N/A
XLOC_003036	Proteína triptofano repressora de ligação	0,8302	0,8635	N/A	0	N/A
XLOC_003181	Proteína hipotética XAC2991	N/A	0	N/A	0	0,3495
XLOC_003187	Proteína família im30	N/A	N/A	N/A	0	N/A
XLOC_003194	Proteína hipotética XAC3018	N/A	N/A	N/A	0	0,7873
XLOC_003195	Proteína hipotética XAC3019	N/A	0	0	0	0,7698
XLOC_003206	Precursor metaloendopeptidase	N/A	0	0	0	0
XLOC_003349	Gene antígeno de superfície	N/A	N/A	N/A	0	N/A
XLOC_003377	Nucleotidiltransferase DNA polimerase	N/A	0,7167	N/A	0	0,9168
XLOC_003378	DNA polimerase error-prone	N/A	0,6482	N/A	0	0,6095
XLOC_003394	Proteína reguladora	N/A	N/A	N/A	0	N/A
XLOC_003183	Proteína secretada	N/A	0	0,5189	N/A	0,2903
XLOC_003675	Proteína hipotética XACa0017	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
XLOC_003677	Proteína plasmídeo herança estável	N/A	N/A	N/A	N/A	0,3283
XLOC_003177	Proteína de transporte de açúcar	N/A	0	N/A	N/A	N/A
XLOC_003098	ATPase do sistema de secreção tipo I	N/A	N/A	0,4001	N/A	N/A
XLOC_003182	Endoproteínase arg-c	N/A	N/A	0,2282	N/A	N/A

INF:sinal de expressão detectado apenas no tecido infectado

N/A: transcrito não detectado

De todos os GDEs analisados foram discutidos neste trabalho apenas os transcritos que apresentaram a maior significância estatística (Tabela 20). Estes transcritos apresentam variação de expressão marcadamente diferente para cada par de amostra comparada (Controle vs. Infectada).

Tabela 20. Transcritos com variação de expressão com alta significância estatística, entre as amostras controle e infectadas de Xac. Os quatro transcritos, XLOC_003056, XLOC_003394, XLOC_003659, XLOC_003671, aparecem com expressão significativa aparecem distribuídos em sete comparações distintas.

Biblioteca de cDNA	Transcrito	Produto	Fold-change	P-valor
XS48	XLOC_003056	Proteína ligante do repressor do triptofano	0	0,0330
	XLOC_003394	Proteína reguladora	0	0,0330
	XLOC_003671	Transglicosilase lítica de mureína	14,0658	0,0092
XS72	XLOC_003671	Transglicosilase lítica de mureína	13,0374	0,0092
XH48	XLOC_003659	Proteína de avirulência	12,7313	0,0092
	XLOC_003671	Transglicosilase lítica de mureína	24,2707	0,0092
XH72	XLOC_003671	Transglicosilase lítica de mureína	14,5915	0,0092

Os transcritos XLOC_003056 e XLOC_003394 apresentaram uma expressão negativa, sendo considerados genes reprimidos. A proteína reguladora foi reprimida apenas na biblioteca de Xac inoculada e exsudada de folhas da espécie resistente Satsuma após 48 horas da inoculação. Esta proteína participa na regulação dos sistemas de dois componentes. Sistemas de dois componentes (TCS) são mediadores chave da transdução de sinal bacteriano. Os sinais de ativação destes sistemas promovem o estado fosforilado de um regulador de resposta, que é geralmente a forma que realiza as funções específicas, tais como a ligação ao DNA e a catálise de reações bioquímicas (MITROPHANOV; GROISMAN, 2008). A repressão da expressão deste gene deve interferir diretamente no poder de infecção do patógeno.

O transcrito XLOC_003056, que codifica uma proteína ligante do repressor do triptofano (WbrA), também foi reprimido na biblioteca XS48. Esta proteína não apresenta uma função biológica definida (GORMAN; SHAPIRO, 2005), mas sabe-se que ela está associada com a proteína repressora do triptofano TrpR. A proteína TrpR regula a transcrição de vários “operons” e quando associada ao triptofano se

liga a vários operadores para evitar a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de triptofano (ROSE; YANOFSKY, 1974).

Por outro lado, foi notável a expressão positiva dos transcritos XLOC_003659 e XLOC_003671. Estes genes foram induzidos nas quatro bibliotecas de Xac inoculadas em Satsuma e Hamlin, mostrando que a expressão destes genes independe do hospedeiro e, segundo a literatura, estes genes estão relacionados com a patogenicidade da bactéria.

O transcrito XLOC_003671 codifica para transglicosilase lítica de mureína (LT), uma importante classe de enzimas bacterianas. Esta enzima participa no crescimento celular e principalmente na divisão celular. Isto porque a parede celular bacteriana é composta por peptidoglicano, conhecido também como mureína, e durante o crescimento e a divisão celular a parede celular precisa aumentar de tamanho para, em seguida, se dividir em duas células filhas. Nesta etapa, várias enzimas são necessárias para executar a difícil tarefa de replicar uma macromolécula enovelada (HOLTJE, 1996; KORAIMANN, 2003). Adicionalmente, a mureína da parede celular não é uma estrutura estática e seu metabolismo envolve a criação de sítios para a inserção de flagelo e a criação de poros para os sistemas de secreção. As enzimas LTs são as enzimas chaves responsáveis pela clivagem da mureína e consequentemente, responsáveis pela criação destes apêndices (SCHEURWATER et al., 2007). Devido a estas ações, alguns autores relacionam as enzimas LTs com a patogenicidade (CLOUD-HANSEN et al., 2006). Algumas enzimas LTs de patógenos de animais e plantas, incluindo *Haemophilus influenza*, *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae* foram expressas positivamente durante a infecção no hospedeiro.

Em destaque, foi identificado também o transcrito XLOC_003659, que codifica para uma proteína de avirulência. Este transcrito apresentou uma expressão positiva marcante em todas as bibliotecas de Xac infectada em plantas (48 e 72 horas). Apesar da grande variação na significância estatística entre os pares, o transcrito aparece, em todos os casos, muito induzido na amostra infectada quando comparada com os controles. A expressão deste gene foi superior nas bibliotecas de Xac inoculadas na espécie suscetível Hamlin em ambos os tempos (Tabela 19). Os genes de avirulência (Avr) de patógenos foram identificados pela primeira vez com

base na sua capacidade de dirigir o reconhecimento específico, levando à resistência a doenças em interações planta-patógeno, baseada na teoria gene-a-gene (GABRIEL, 1999; BAI et al., 2000). As proteínas de avirulência (Avr) são proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo III e são reconhecidos pelos genes de resistência (R), presente no hospedeiro. Muitas proteínas Avr foram caracterizadas e, em alguns casos, o mecanismo de interação Avr-R foi estudado. Na ausência do gene R correspondente, as proteínas Avr podem atuar como fatores de virulência que contribuem para a suscetibilidade (KJEMTRUP et al., 2000; POTNIS et al., 2012). Desta forma, os genes Avr apresentaram uma segunda função relacionada com o controle de aptidão do patógeno, incluindo sua agressividade e expressão dos sintomas na interação planta-patógeno (LAUGE et al., 1998; ZHU et al., 1999; BAI et al., 2000). Vários genes Avr já foram identificados em bactérias do gênero *Xanthomonas* como o gene *avrBs2* de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (KEARNEY; STASKAWICZ, 1990), o gene *avrBs3* encontrado em *Xanthomonas citri*, *X. campestris* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *malvacearum*, (SWARUP et al., 1991), o gene *avrb6* de *X. campestris* pv. *malvacearum* (YANG et al., 1994) e mais recentemente, o gene *avrBs7* de *X. gardneri* e o gene *avrBs1.1* descrito em *X. euvesicatoria* (POTNIS et al., 2012).

Tabela 21. Expressão comparativa entre as amostras controle e as amostras infectantes do transcrito XLOC_003659.

Transcrito	Biblioteca de cDNA	Expressão na amostra controle	Expressão na amostra infectante	Fold-change	P-valor
XLOC_003659	XS48	600,057	3.177,354	5,2947	0,1811
XLOC_003659	XS72	600,057	2.707,59	4,5122	0,2595
XLOC_003659	XH48	600,057	7.639,52	12,7313	0,0091
XLOC_003659	XH72	600,057	2.885,35	4,8084	0,2498

Como os genes Avr contribuem diretamente para a patogenicidade e agressividade da doença, causar a perda da aptidão para estes genes no agente patogênico pode ser útil para manter a durabilidade do gene de resistência da planta no campo. Portanto, a identificação de novos genes de Avr em Xac é de grande importância para a sanidade da cultura dos citros.

5.8 Perspectivas

5.8.1 Validação dos resultados

Tanto os dados obtidos para os transcriptomas das duas variedades de *Citrus* sp. como para os de Xac, deverão ser validados por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para fins de publicação dos resultados.

5.8.2 Transcriptoma de novo

Os fragmentos filtrados serão montados para a construção de um transcriptoma de novo com base apenas nos dados sequenciados. A metodologia é baseada em grafos de Bruijn, no qual as sequências são quebradas em fragmentos menores de tamanho (k-mer) e, a partir disso, é criado um grafo onde os caminhos gerados passam a representar os transcritos montados. A montagem gerada será comparada com o transcriptoma de referência gerado anteriormente.

6 CONCLUSÕES

A espécie resistente Satsuma e a espécie suscetível Hamlin apresentam perfis de expressão gênica distintos em resposta à infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

A espécie resistente Satsuma apresentou de modo exclusivo, uma proteína proteinase aspártica altamente induzida no tempo 24 horas. Esta proteína está potencialmente envolvida na resistência da variedade ao cancro cítrico e é uma candidata para a validação da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real.

A espécie resistente Satsuma apresentou um valor de expressão cinco, duas e seis vezes maior para proteínas relacionadas à defesa da planta, endo-beta-glucanase, cisteína proteinase e proteína PAR1, respectivamente, comparado com a espécie suscetível Hamlin, no tempo 48 horas.

A indução de genes relacionados à defesa da planta em todos os tempos, não evitou a multiplicação da bactéria e nem o aparecimento dos sintomas de cancro cítrico na espécie suscetível Hamlin.

A espécie Hamlin reprimiu genes relacionados à parede celular, indicando que a espécie suscetível não consegue reestruturar sua parede celular após o ataque patogênico. A espécie suscetível Hamlin apresentou também a repressão de vários genes relacionados à fotossíntese.

Foram detectados dois genes em Xac que apresentaram a expressão positiva em todas as situações infectantes. Eles codificam uma transglicosilase lítica de mureína (LT) e uma proteína de avirulência (Avr). Estes resultados indicam que estes genes são candidatos para estudos mais aprofundados para confirmar o envolvimento dos mesmos na patogenicidade de Xac.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBA, R.; FEI, Z.; PAYTON, P.; LIU, Y.; MOORE, S.L.; DEBBIE, P.; COHN, J.; D'ASCENZO, M.; GORDON, J.S.; ROSE, J.K. ESTs, cDNA microarrays and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. **Plant Journal**, v. 39, n. 5, p. 697-714, 2004.

ALBERT, M.; WERNER, M.; PROKSCH, P.; FRY, S.C.; KALDENHOFF, R. The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase LeXTH1 is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. **Plant Biology**, v.6, n.4, p. 402-407, 2004.

ALMAGRO, L.; GOMEZ ROS, L.V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELO, A.; PEDRENO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.377–390, 2009.

AN, C.; MOU, Z. Non-host defense response in a novel Arabidopsis-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathosystem. **Plos one**, v.7, n.1, e31130, 2012.

ANTUNES, F. Papel da redutase do nitrato e asparagina em plantas de soja (*Glicine max* L.) sob condições de estresse de nitrogênio. 2007. 108 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BADRI, D.V.; LOYOLA-VARGAS, V.M.; BROECKLING, C.D.; DE-LA-PENA, C.; JASINSKI, M.; SANTELIA, D.; MARTINOIA, E.; SUMNER, L.W.; BANTA, L.M.; STERMITZ, F. Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of Arabidopsis ATP-binding cassette transporter mutants. **Plant Physiology**, v. 146, p. 762-771, 2008.

BADRI, D.V.; QUINTANA, N.; EL KASSIS, E.G.; KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; SUGIYAMA, A.; VERPOORTE, R.; MARTINOIA, E.; MANTER, D.K.; VIVANCO, J.M. An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provokes an overhaul of natural soil microbiota. **Plant Physiology**, v. 151, p. 2006–2017, 2009.

BAGNARESI, P.; BISELLI, C.; ORRU, L.; URSO, S.; CRISPINO, L. Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs. susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **PLoS ONE**, v. 7, e51609, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051609>>.

BAI, J.; CHOI, S-H.; PONCIANO, G.; LEUNG, H.; LEACH, J.E. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. **MPMI**, v. 13, p. 1322-1329, 2000.

BARAKAT, A.; STATON, M.; CHENG, C.H.; PARK, J.; YASSIN, N.B.M.; FICKLIN, S.; YEH, C.C.; HEBARD, F.; BAIER, K.; POWELL, W.; SCHUSTER, S.C.; WHEELER, N.; ABBOTT, A.; CARLSON, J.E.; SEDEROFF, R. Chestnut resistance to the blight disease: insights from transcriptome analysis. **BMC Plant Biology**, v. 12, p.38, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-38>>.

BARAKAT, A.; SZICK-MIRANDA, K.; CHANG, I-F.; GUYOT, R.; BLANC, G.; COOKE, R.; DELSENY, M.; BAILEY-SERRES, M. The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the Arabidopsis Genome. **Plant Physiology**, v. 127, p. 393-415, 2001.

BARTSEVICH, V.V.; PAKRASI, H.B. Molecular identification of a novel protein that regulates biogenesis of photosystem I, a membrane protein complex. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.6382-6387, 1997.

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

BERGAMIM FILHO, A.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M. Importância das doenças de plantas. In:_____. Manual de Fitopatologia. 4. ed. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2011. Cap. 2, p. 25-26.

BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. eds. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 : Princípios e conceitos, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 13-33, 1995.

BERRI, S.; ABBRUSCATO, P.; FAIVRE-RAMPANT, O.; BRASILEIRO, A.C.M.; FUMASONI, I.; SATOH, K.; KIKUCHI, S.; MIZZI, L.; MORANDINI, P.; PIFFANELLI, P. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v.9, p.120, 2009.

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

BISHOP, J.G.; RIPOLL, D.R.; BASHIR, S.; DAMASCENO, C.M.B.; SEEDS, J.D.; ROSE, J.K.C. Selection on Glycine -1,3-endoglucanase genes differentially inhibited by a *Phytophthora* glucanase inhibitor protein. **Genetics**, v. 169, p. 1009-1019, 2005.

BLOOM, J.S.; KHAN, Z.; KRUGLYAK, L.; SINGH, M.; CAUDY, A.A. Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. **BMC Genomics**, v. 10, p. 221, 2009.

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

BRAITHWAITE, M.; LEITE JUNIOR, R.P.; SMITH, J.J.; BOA, E.; SADDLER, G.S. First report of citrus cancer caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia. **Plant Pathology**, v.4, p.141-151, 2003.

BRENT, K.J. Biochemical plant pathology and plant disease control. In: CALLOW, J.A. **Biochemical Plant Pathology**. Chichester: Wiley, 1983.p.435-452.

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

BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 230-243.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação planta-patógeno. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.

CARDOSO, S.C. Avaliação da resistência a *Xylella fastidiosa* Wells et al. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. em plantas tranênicas de *Citrus sinensis* L. Osbeck expressando os genes *atacina A* ou *Xa21*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CARTIEAUX, F.; THIBAUD, M.C.; ZIMMERLI, L.; LESSARD P.; SARROBERT, C.; DAVID, P.; GERBAUD, A.; ROBAGLIA, C.; SOMERVILLE, S.; NUSSAUME, L. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. **The Plant Journal**, v. 36, p. 177-188, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01867.x>>.

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

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

CARVALHO, M. L. V.; MALAVOLTA JR., V. A.; PALAZZO, D. A.; ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E. M. C. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in soil and in nonhost plants. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.1, p.368-370, 1984.

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

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.5: p. 609-631, 2008.

CHEN, H.; ZHANG, D.; GUO, J.; WU, H.; JIN, M.; LU, Q.; LU, C.; ZHANG, L. A Psb27 homologue in *Arabidopsis thaliana* is required for efficient repair of photodamaged photosystem II. **Plant Molecular Biology**, v.61, p.567-575, 2006.

CHINI, A.; FONSECA, S.; FERNANDEZ, G.; ADIE, B.; CHICO, J.M.; LORENZO, O.; GARCIA-CASADO, G.; LOPEZ-VIDRIERO, I.; LOZANO, F.M.; PONCE, M.R.; MICOL, J.L.; SOLANO, R. The JAZ family of repressor is the missing link in jasmonate signalling. **Nature**, v. 448, p. 666–671, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

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

CLOONAN, N.; XU, Q.; FAULKNER, G.J.; TAYLOR, D.F.; TANG, D.T.; KOLLE, G.; GRIMMOND, S.M. RNA-MATE: a recursive mapping strategy for high-throughput RNA sequencing data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 2615–2616, 2009.

CLOUD-HANSEN, K.A.; PETERSON, S.B.; STABB, E.V.; GOLDMAN, W.E.; McFALL-NGAI, M.J.; HANDELSMAN, J. Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interaction. **Nature Review Microbiology**, v. 4, p. 710-716, 2006.

COLLINGE, M.; BOLLER, D. Differential induction of two potato genes Stpx2 and StNAC in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. **Plant Molecular Biology**, v.46, p.521-529, 2001.

COLLINS, F.S.; PATRINOS, A.; JORDAN, E.; CHAKRAVARTI, A.; GESTELAND, R.; WALTERS, L. New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. **Science**, v. 282, p. 682-689, 1998.

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

COSGROVE, D.J.; LI, L.C.; CHO, H-T; HOFFMANN-BENNING, S.; MOORE, R.C.; BLECKER, D. The growing world of expansins. **Plant Cell Physiology**, v. 43, n.12, p. 1436–1444, 2002.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews**, v.6, p. 850-861, 2005.

COTÉ, F.; HAM, K.-S.; HAHN, M. G., BERGMANN, C. W. Oligo saccharide elicitors in host-pathogen interactions: generation, perception, and signal transduction. **Subcellular Biochemistry Plant Microbe Interactarion**, v.29, p.385–432, 1998.

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

DANNA, C.H.; MILLETA, Y.A.; KOLLER, T.; HAND, S.H.; BENT, A.F.; RONALD, P.C.; AUSUBEL, P.C. The *Arabidopsis* flagellin receptor FLS2 mediates the perception of *Xanthomonas* Ax21 secreted peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.9286–9291, 2011.

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

DELCHER, A.L.; HARMON, D.; KASIF, S., WHITE, O.; SALZBERG, S.L. Improved microbial gene identification with GLIMMER. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4636-4641, 1999.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; WEIJERS, D.; LECHNER, E.; YAMADAM, M.; HOBBIE, L.; EHRISMANN, J.S.; JURGENS, G.; ESTELLE, M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. **Developmental Cell**, v. 9, p. 109–119, 2005.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Review Genetics**, v.11, p. 539-548, 2010.

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

FAO. The Statistics Division. **FAOSTAT**: core production data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no Brasil. In: DONADIO, L. C.; RODRIGUEZ, O. eds. **Anais do Quinto Seminário Internacional de citros** – Tratos culturais. Bebedouro: Fundação Cargil, p. 23-65, 1998.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR.; J. **Doenças dos citros**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia. Volume 2. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **Plant Journal**, v. 18, p. 265-276, 1999.

FRANCIS, M.I.; REDONDO, A.; BURNS, J.K.; GRAHAM, J.H. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. **European Journal Plant Pathology**, v. 124, p. 283-292, 2009.

FRANCO, F. **Cancro cítrico – Manual técnico**. Araraquara: Fundo de Defesa da Citrucultura. 2001.

FU, X.; FU, N.; GUO, S.; YAN, Z.; XU, Y.; HU, H.; MENZEL, C.; CHEN, W.; LI, Y.; ZENG, R.; KHAITOVICH, P. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. **BMC Genomics**, v. 10, p. 161, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-161>>.

FU, X-Z.; GONG, X-Q.; ZHANG, Y-X.; WANG, Y.; LIU, J-H. Different transcriptional response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kunquat and Sweet orange with contrasting canker tolerance. **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.e41790, 2012.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. **Cancro cítrico atinge 0,99% dos talhões do parque citrícola**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/16.01.12---Cancro-citrico-atinge-0,99--dos-talhoes-do-parque-citricola,243>. Acesso em: 16 jan.2012.

GABRIEL, D. W. 1999. Why do pathogens carry avirulence genes? **Physiological Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 205-214, 2000.

GARBER, M.; GRABHERR, M.G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature Methods**, v. 8, p. 469-477, 2011.

GAUFICHON, L.; REISDORF-CRENA, M.; ROTHSTEINC, S.J.; CHARDONA, F.; SUZUKI, A. Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant Science**, v.179, p.141-153, 2010.

GIBLY, A.; BONSHTIEN, A.; BALAJI, V.; DEBBIE, P.; MARTIN, G.B. Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 1212–1222, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1212>>.

GILCHRIST, M. **Bringing it all back home: Next-generation sequencing technology and you**. Disponível em: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/mill-hill-essays/bringing-it-all-back-home-next-generation-sequencing-technology-and-you>. Acesso em: 10 fev.2013.

GMITTER, F.G.; CHEN, C.; MACHADO, M.A.; DE SOUZA, A.A.; OLLITRAULT P.; FROELICHER, Y.; SHIMIZU, T. 2012. Citrus genomics. **Tree Genetics Genomes**, v. 8, p. 611–626, 2012.

GÓNGORA-CASTILHO, E.; IBARRA-LACLETTE, E.; TREJO-SAAVEDRA, D.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). **Virology Journal**, v. 9, p. 295, 2012.

GONZALEZ-BALLESTER, D.; CASERO, D.; COKUS, S.; PELLEGRINI, M.; MERCHANT, S.S.; GROSSMAN, A.R. RNA-seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. **Plant Cell**, v.2, p. 2058–2084, 2010.

GORMAN, J.; SHAPIRO, L. Crystal structures of the tryptophan repressor binding protein WrbA and complexes with flavin mononucleotide. **Protein Science**, v. 14, p. 3004–3012, 2005.

GOTO, M. Studies on citrus canker in Japan. **Proceedings of the First International Citrus Symposium**, v.3, p.1251–1252, 1969.

GOTO, M. Survival of *Xanthomonas citri* in the bark tissues of citrus trees. **Canadian Journal of Botany**, 50:629-635, 1972.

GOTO, M.; HYODO, H. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. **Annual Phytopathology Society of Japan**, v.51, p.22-31, 1985.

GOTTWALD, T.R., GRAHAM, J.H., CIVEROLO, E.L., BARRETT, H.C. AND HEARN, C.J. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. **Plant Disease**, v. 77, p. 1004–1009, 1993.

GOTTWALD, T.R., GRAHAM, J.H. AND SCHUBERT, T.S. (2002) Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**. doi: 10.1094/ PHP-2002-0812-01-RV. Disponível em: <<http://plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>>. Acesso em: 12 ago. 2002.a

GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v.92, p.361-377, 2002b.

GOTTWALD, T. R.; TIMMER, L. W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Tropical Agriculture**, v.72, p.194-201, 1995.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.M.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v.5, p.1-15, 2004.

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

GRIFFITH, M.; GRIFFITH, O.L.; MWENIFUMBO, J.; GOYA, R.; MORRISY, A.S.; MORIN, R.D.; CORBETT, R.; TANG, M.J. Alternative expression analysis by RNA sequencing. **Nature Methods**, v. 7, p. 843-847, 2010.

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

GUO, H.; ECKER, J.R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, v. 115, p. 667–677, 2003.

GUO, A.; SALIN, G.; KLESSIG, D.F.; Activation of a diverse set of genes during tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid induction of a subset is also ethylene independent. **The Plant Journal**, v.21, n.5, p.409-418, 2000.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo: Edição de Duprat, 1987. 296p.

HARDCASTLE, T.J.; KELLY, K.A. BaySeq: empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. **BMC Bioinformatics**, v.11, p.422, 2010.

HAYWARD, A.C. **The hosts of *Xanthomonas***. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. p.1–17.

HEJGARD, J.; JACOBSEN, S.; SVENDSEN, I. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grains. **FEBS Letters**, v. 291, p. 127-131, 1991.

HOLTJE, J. V. A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 142, p. 1911–1918, 1996.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 15 mar. 2013.

JAIN, M. Next generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. **Briefings in functional genomics**, v. 2, p. 63-70, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bfpg/elr038>>.

JIANG, H.; WONG, W.H. Statistical inferences for isoform expression in RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1026-1032, 2009.

KANG, J.; PARK, J.; CHOI, H.; BURLA, B.; KRETZSCHMAR, T.; LEE, Y.; MARTINOIA, E. Plant ABC Transporters. **The Arabidopsis Book**, e0153, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1199/tab.0153>>.

KHALAF, A.A.; GMITTER, F.G.; CONESA, A.; DOPAZO, J.; MOORE, G.A. *Fortunella marguerita* transcriptional reprogramming triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 159- 166, 2011.

KEARNEY, B.; STASKAWICZ, B. J. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. **Nature**, v. 346, p. 385-386, 1990.

KEGG. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>. Acesso em: 01 jul. 2013.

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

KJEMTRUP, S.; NIMCHUK, Z.; DANGL, J. L. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: Bifunctional signals in virulence and host recognition. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 73-78, 2000.

KOGENARU, S.; QING, Y.; GUO, Y.; WANG, N. RNA-Seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC Genomics**, v. 13, p. 629, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bfpg/elr038>>.

KORAIMANN, G. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. **Cellular Molecular Life Science**, v. 60, p. 2371-2388, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3056-1>>.

LAHAYE, T.; BONAS, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 479-485, 2001.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, v. 411, p. 848-853, 2001.

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

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 3, p. 25, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>>.

- LAUGÉ, R.; JOOSTEN, M. H. A. J.; HAANSTRA, J. P. W.; GOODWIN, P. H.; LINDHOUT, P.; DEWIT, P. J. G. M. Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 9014-9018, 1998.
- LECOURIEUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. **New Phytologist**, v. 171, p. 249-269, 2006. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x
- LEITE JÚNIOR, R. P. **Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná** (Circular nº 61). Londrina: IAPAR, 1990.
- LEUBNER-METZGER, G.; MEINS JR., F. **Functions and regulation of plant -1,3-glucanases (PR-2)**. In: DATTA, S.K.; MUTHUK, S.R. Pathogenesis Related Proteins in Plants. CRC Press LLC: Boca Raton, 1999. p. 49–76.
- LIMA, J.D.; SODEK, L. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. **Plant Science**, v. 165, p. 649-656, 2003.
- LIN, R.; ZHAO, W.; MENG, X.; WANG, M.; PENG, V. Rice gene OsNAC 19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea*. **Plant Science**, v.172, p.120-130, 2007.
- LIU, Y.; SCHIFF, M.; SERINO, G.; DENG, X.W.; DINESH-KUMAR, S.P. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to tobacco mosaic virus. **Plant Cell**, v.14, p.1483–1496, 2002.
- LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MPAK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **Plant Journal**, v.38, p. 800–809, 2004.
- LU, J.; DU, Z-X.; KONG, J.; CHEN, L-N.; QIU, Y-H. Transcriptome analysis of *Nicotiana tabacum* infected by *Cucumber mosaic virus* during systemic symptom development. **PLoS ONE**, v.7, e43447, 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043447>>.
- LYSØE, E.; SEONG, K-Y.; KISTLER, H.C. The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. **MPMI**, v. 24, p. 995-1000, 2011.
- MAC DOWELL, J. M.; DANGL, J. L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, n.2, p.79-82, 2000.
- MACHADO, E.C. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranja „Natal” com clorose variegada dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, p. 911-918, 2006.
- MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 569–579, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>>.

MARIONI, J.C.; MASON, C.E.; MANE, S.M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v.18, p. 1509-1517, 2008.

MARQUES, M.V.; SILVA, A.M. **Genômica funcional: transcriptoma**. In: Luis Mir. (Org.). Genômica. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

MARTIN, J.A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Review Genetics**, v.12, p. 671–682, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3068>>.

MARTINELLI, F.; URATSU, S.L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R.L.; PHU, M.L.; BRITTON, M.; BUFFALO, V.; FASS, J.; LEICHT, E.; ZHAO, W.; LIN, D.; D'SOUZA, R.; DAVIS, C.E.; BOWMAN, K.D.; DANDEKAR, A.M. Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. **PLoS ONE**, v.7, e38039, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038039>>.

MCGREGOR, C.E.; MIANO, D.W.; LABONTE, D.R.; HOY, M.; CLARK, C.A.; ROSA, G.J.M. Differential gene expression of resistant and susceptible sweet potato plants after infection with the causal agents of sweet potato virus disease. **Journal American Society Horticulture Science**, v. 134, n.6, p.658–666, 2009.

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

METZKER, M.L. Sequencing Technologies – the next generation. **Nature reviews**, v.11, p. 31-46, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2626>>.

MITROPHANOV, A.Y.; GROISMAN, E.A. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. **Genes Development Journal**, v. 22, p. 2601-2611, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gad.1700308>>.

MOREIRA, L.M.; SOUZA, R.F.; ALMEIDA JR., N.F.; SETUBAL, J.C.; OLIVEIRA J.C.F.; FURLAN, L.R.; FERRO, J.A.; DA SILVA, A.C.R. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 163-184, 2004.

MORTAZAVI, A.; WILLIAN, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621 – 628, 2008.

NAGALAKSHMI, U.; WANG, Z.; WAERN, K.; TRAPNELL, C. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science**, v. 320, p. 1344-1349, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOGUEIRA, F.T.S.; SCHLOGE, P.S.; CAMARGO, S.R.; FERNANDEZ, J.H.; ARRUDA, P. SSNAC23, member of the NAC domain protein family, is associated to cold, herbivory and water stress in sugarcane. **Plant Science**, v.189, p.93-106, 2005.

OKUMURA, M.H. Uso de geoestatística para aprimorar o controle de pragas na citricultura. **Dissertação (Mestrado)** – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

OLIVEIRA, M.L.; LIMA SILVA, C.C.; ABE, V.Y.; COSTA, M.G.; CERNADAS, R.A.; BENEDETTI, C.E. Increased resistance against citrus canker mediated by a citrus MAP kinase. **MPMI**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-04-13-0122-R>>.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. **Cultivares de laranjeiras resistentes ao cancro cítrico** (Documento 249). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 31 p.

OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, 2007. Acesso em 14 abr. 2013.

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

OZSOLAK, F.; MILOS, P.M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Review Genetics**, v. 12, p. 87-98, 2011.

PALUSA, S.G.; GOLOVKIN, M.; SHIN, S.B.; RICHARDSON, D.N.; REDDY, A.S. Organ-specific, developmental, hormonal and stress regulation of expression of putative pectate lyase genes in Arabidopsis. **New Phytologist**, v.174, p. 537-550, 2007.

PANDEY, S.P.; SOMSSICH, I.E. The role of WRKY transcription factor in plant immunity. **Plant Physiology**, v.150, p.1648-1655, 2009.

PANTHEE, D.R.; YUAN, J.S.; WRIGHT, D.L.; MAROIS, J.J.; MAILHOT, D. Gene expression analysis in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) in an early growth stage. **Functional & Integrative Genomics**, v. 7, p. 291–301, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10142-007-0045-8>>.

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

PASSOS, G.A.S.; JORDAN, C.N.B. Projeto transcriptoma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.12, p.34-37, 2000.

PATEL, R.K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **PLoS ONE**, 7(2): e30619, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030619>>.

POTUSCHAK, T.; LECHNER, E.; PARMENTIER, Y.; YANAGISAWA, S.; GRAVA, S.; KONCZ, C.; GENSCHIK, P. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F-box proteins: EBF1 and EBF2. **Cell**, v. 115, p. 679–689, 2003.

PAUL, M.J.; FOYER, C.H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1383-1400, 2001.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copa. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, . p. 37-66, 2005.

POTNIS, N.; MINSAVAGE, G.; SMITH, J.; HURLBERT, J.C.; NORMAN, D.; RODRIGUES, R.; STALL, R.E.; JONES, J.B. Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. **MPMI**, v. 25, p. 307-320, 2012.

RAZ, T.; KAPRANOV, P.; LIPSON, D.; LETOVSKY, S.; MILOS, P.M.; THOMPSON, J.F. Protocol dependence of sequencing-based gene expression measurements. **PLoS One**, v. 6, e19287, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019287>>.

RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v.57, p.929-967, 2001.

RODRIGUES, CM. Expressão diferencial de genes em laranja doce (*Citrus sinensis* L.) e em tangerina (*Citrus reticulata* blanco) em resposta à infecção por *Xylella fastidiosa*. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Impensa Universitária. 1995.

ROSE, J.K.; Yanofsky, C. Interaction of the operator of the tryptophan operon with repressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, p. 3134-3138, 1974.

ROSSETTI, V. Citrus Canker in Latin America: a review. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 2., Orlando, **Proceedings...**Riverside: International Society of Citriculture, 3:918-924, 1977.

ROSSETTI, V.; FEICHTENBERGER, E.; SILVEIRA, M.L. **Cancro citrico** (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*): Bibliografia analítica. São Paulo: Instituto Biológico, 1981. 203p.

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

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

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, p.311-315, 1998.

SÁ, M.E.L.; LOPES, M.J.C.; CAMPOS, M.A.; PAIVA, L.V.; SANTOS, R.M.A.; BENEVENTI, M.A.; FIRMINO, A.A.P.; SÁ, M.F.G. Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 272-282, 2012.

SANDERS, D.; PELLOUX, J.; BROWNLEE, C.; HARPER, J.F. Calcium at the crossroads of signalling. **Plant Cell**, v.14, p.S401–S417, 2002.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACYB, G.; SECHLERA, A.; AGARKOVAC, I.; STROMBERGA, P.E.; STROMBERGB, V.K.; VIDAVERC, A.K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.

SCHALLER, A.; RYAN, C.A. Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. **Plant Molecular Biology**, v.31, p.1073-1077, 1996.

SCHEURWATER, E.; REID, C.W.; CLARKE, A.J. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p. 586-591, 2008.

SCHUBERT, T. S.; RIZBI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. **Plant Disease**, v. 5, p. 340-356, 2001.

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

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, P. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, Fundag, 2005. p. 319-341

SHIN, J-H; JEONG, D-H; PARK, M.C.; AN, G. Characterization and transcriptional expression of the α -expansin gene family in rice. **Molecular Cells**, v.20, n.2, p. 210-218, 2005.

SIEDOW, J.N. Plant Lipoxygenase: Structure and Function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.145-188, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001045>>.

SIKES, A.; MARCY, R.B. Differentiation of food bacteria on the basis of their ability to utilize different proteins. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1228-1232, 1979.

SILVA, M.D.; OLIVEIRA, M.G.A.; LANNA, A.C.; PIRES, C.V.; PIOVESAN, N.D.; JOSÉ, I.C.; BATISTA, R.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e suscetíveis a *Diaphorthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro da haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.3, p.129-134, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-31312001000300007>>.

SIMÕES, I; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 2067-2075, 2004.

SINGH, K.B.; FOLEY, R.C.; ONATE-SANCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.430–436, 2002.

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

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. pp.507-540

STALL, R.E.; MARCO, G.M.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B.I. (1982) Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to cancrrosis of citrus. **Phytopathology**, v. 72, p. 1097–1100, 1982.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. A defesa vegetal contra fitopatógenos . **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.

STEGMAYER, G.; MILONE, D.H.; GARRAN, S.; BURDYN, L. Automatic recognition of quarantine citrus diseases. **Expert Systems with Applications**, v. 40, p. 3512–3517, 2013.

STRADER, L.C.; RITCHIE, S.; SOULE, J.D.; MCGINNIS, K.M.; STEBER, C.M. Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.12771–12776, 2004.

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

SUN, W.; XU, X.N.; ZHU, H.S.; LIU, L.; LI, J.; XUEJUN, H. Comparative transcriptomic profiling of a salt-tolerant wild tomato species and a salt-sensitive tomato cultivar. **Plant and Cell Physiology**, v.51, p. 997-1006, 2010.

SUN, L.; KNOCKER, S.V. Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v.10, p.152-160, 2010.

SWARUP, S.; DE FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology**, v. 81, p. 802-809, 1991.

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

TAJI, T.; SEKI, M.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; KOBAYASHI, M.; ISHIYAMA, K.; NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; ZHUAND, J-K.; SHINOZAKI, K. Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis microarray. **Plant Physiology**, v. 135, p.1697-1709, 2004.

TAN, X.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.; SHARON, M.; ZHENG, C.; ROBINSON, C.V.; ESTELLE, M.; ZHENG, N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **Nature**, v.446, p.640–645, 2007.

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

TEZZA, R.I.D. Predição computacional de promotores em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista „Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S.Y.; HOWE, G.A.; BROWSE, J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. **Nature**, v.448, p.661–665, 2007.

TRAPNELL, C.; SALZBERG, S.L. How to map billions of short reads onto genomes. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 455–457, 2009.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1105–1111, 2009.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B.A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M.J.; SALZBERG, S.L.; WOLD, B.J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v.5, p. 511-515, 2010. doi: 10.1038/nbt.1621.

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

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

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

VAN VELLET, A.H. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, p. 1-7, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01767.x>>.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plants tissues. **Phytopathology**, v. 93, p. 832-843, 2003.

VOGEL, J.P.; RAAB, T.; SOMERVILLE, C. PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.14, p.2095-2106, 2002.

WALIA, H.; WILSON, C.; CONDAMINE, P.; LIU, X.; ISMAIL, A.M. Comparative transcriptional profiling of two contrasting under salinity stress during the vegetative growth stage. **Plant physiology**, v. 139, p. 822-835, 2005.

WANG, T.; CHEN, X-P; LI, H-F; LIU, H-Y.; HONG, Y-B.; YANG, Q-L.; YU, S-L.; LI, L.; LIANG, X-Q. Transcriptome identification of the resistance-associated genes (RAGs) to *Aspergillus flavus* infection in pre-harvested peanut (*Arachis hypogaea*). **Plant Biology**, v. 40, p. 292-303, 2013.

WANG, Y.; GHAFARI, N.; JOHNSON, C.D.; BRAGA-NETO, U.M.; WANG, H.; CHEN, R.; ZHOU, H. Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens. **BMC Bioinformatics**, v.10, p.S5, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-S10-S5>>.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Review Genetics**, v.10, p. 57–63, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>>.

WENGELNIK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; BONAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.1061-1069, 1996.

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

WOOD, R.K.S. Physiological plant pathology come of age. **Annual review of Phytopathology**, v.26, p.26-40, 1987.

XIA, Y.; SUZUKI, H.; BOREVITZ, J.; BLOUNT, J.; GUO, Z.; PATEL, K.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Na extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. **The EMBO Journal**, v.23, p.980–988, 2004.

YANG, Y.; DE FEYTER, R.; GABRIEL, D. W. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of pthA and avrb6, respectively. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.7, p.345-355, 1994.

ZHANG, X.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIC, V. Overexpression of the *Arabidopsis* NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal Plant Pathology**, v.128, p.91-100, 2010.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 5, p. 821-829, 2008. doi: 10.1101/gr.074492.107.

ZHANG, J.; LIANG, S.; DUAN, J.; WANG, J.; CHEN, S.; CHENG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, X.; LI, Y. De novo assembly and characterization of the transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Genomics**, v.13, p.90-102, 2012.

ZHU, Q.-H.; STEPHEN, S.; KAZAN, K.; JIN, G.; FAN, L.; TAYLOR, J.; DENNIS, E.S.; HELLIWELL, C.A.; WANG, M.-B. Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. **Gene**, v.512, p.259–266, 2013.

ZOU, J.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ALDEA, M.; LI, M.; ZHU, J. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.18, p.1161–1174, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A – Figuras representando a categorização dos GDEs induzidos da espécie Satsuma em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

Apêndice B – Figuras representando a categorização dos GDEs reprimidos da espécie Satsuma em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

Apêndice C – Figuras representando a categorização dos GDEs induzidos da espécie Hamlin em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

Apêndice D – Figuras representando a categorização dos GDEs reprimidos da espécie Hamlin em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

Apêndice A – Figuras representando a categorização dos GDEs induzidos da espécie Satsuma em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

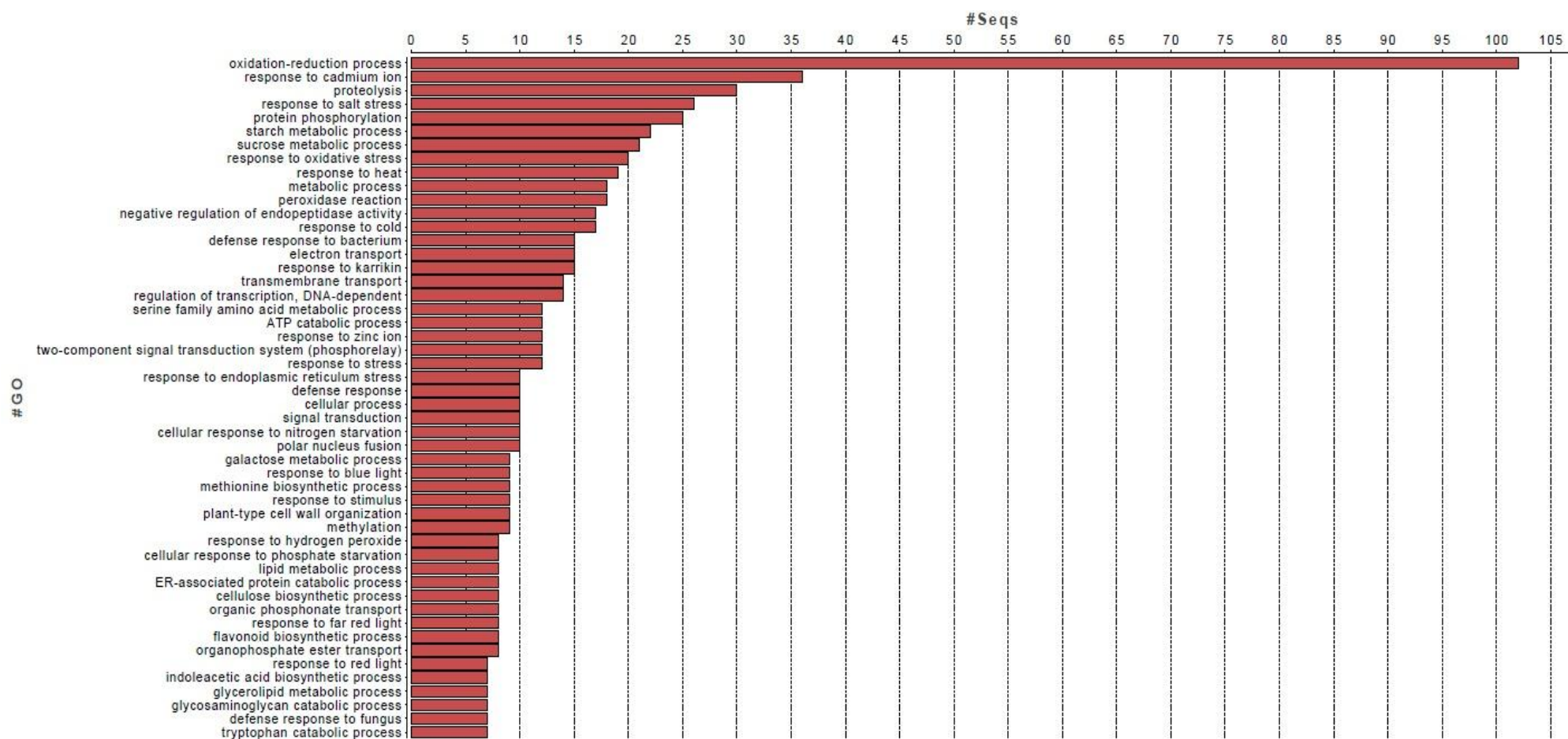


Figura 1. Categorização em processo biológico dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

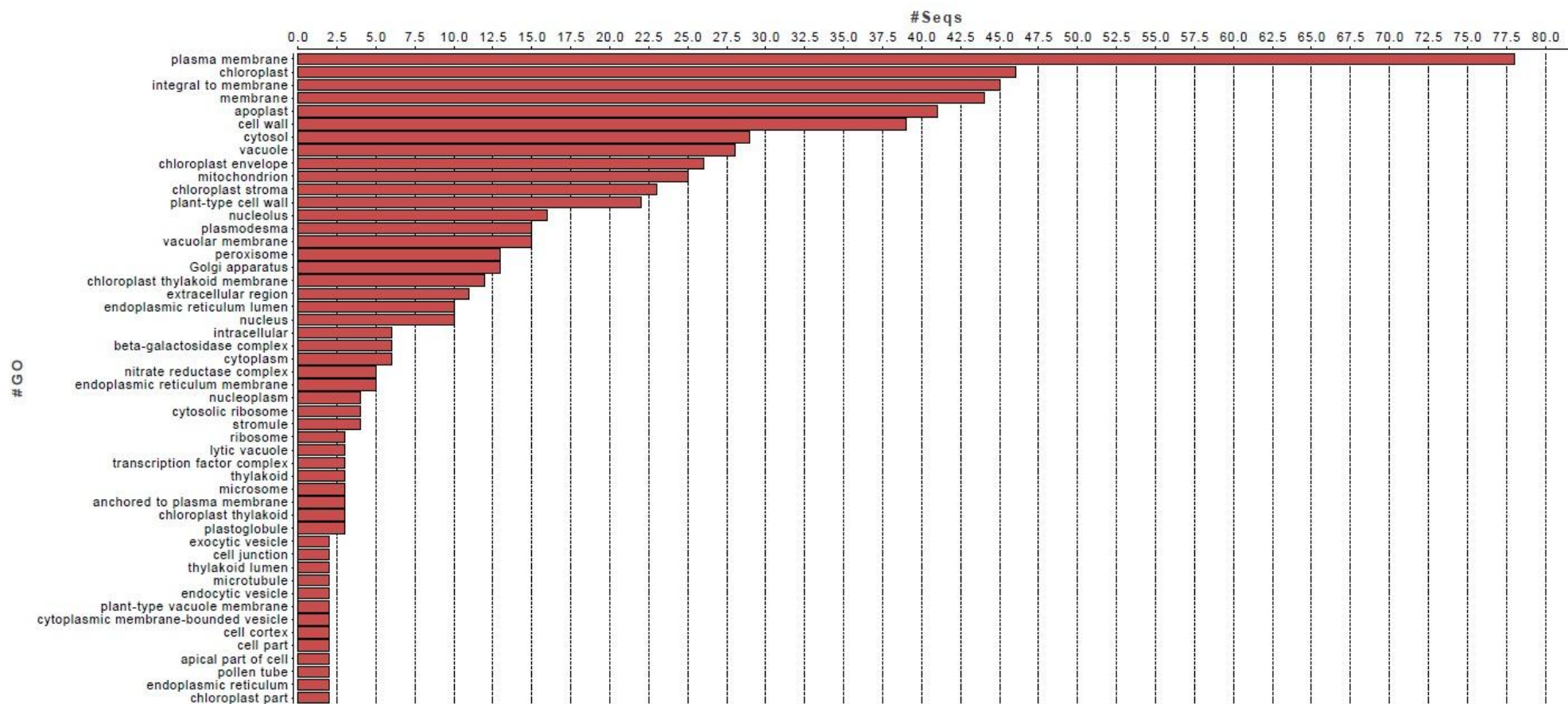


Figura 2. Categorização em componente celular dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

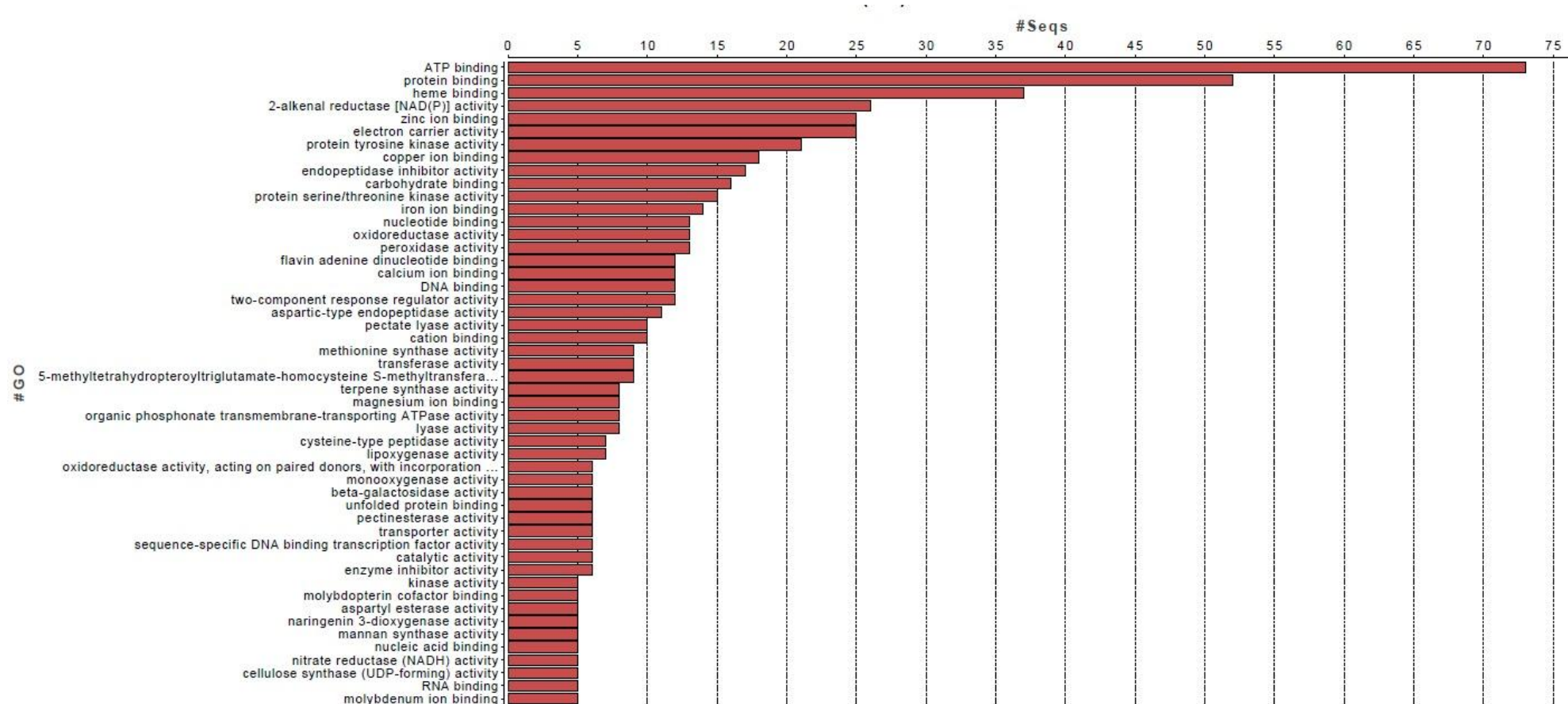


Figura 3. Categorização em função molecular dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

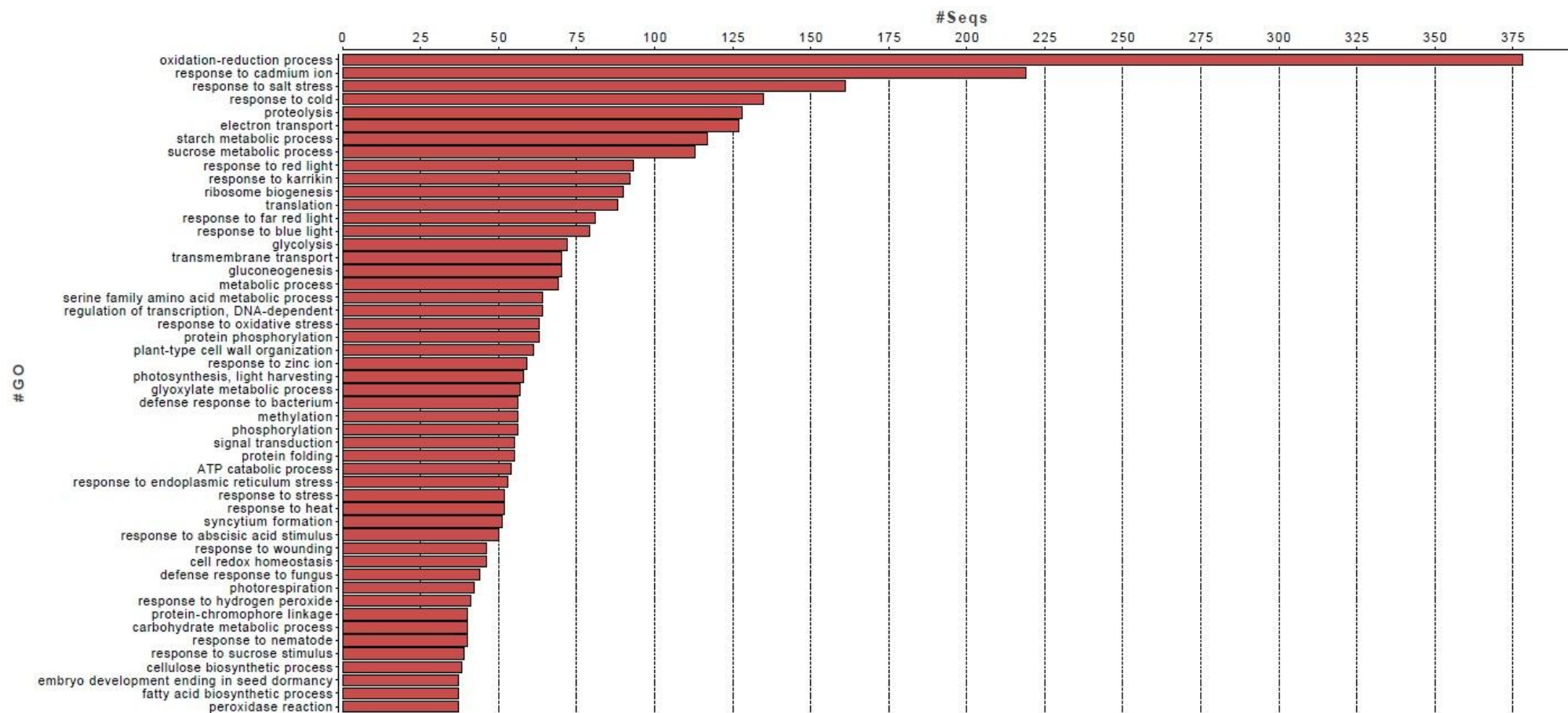


Figura 4. Categorização em processo biológico dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

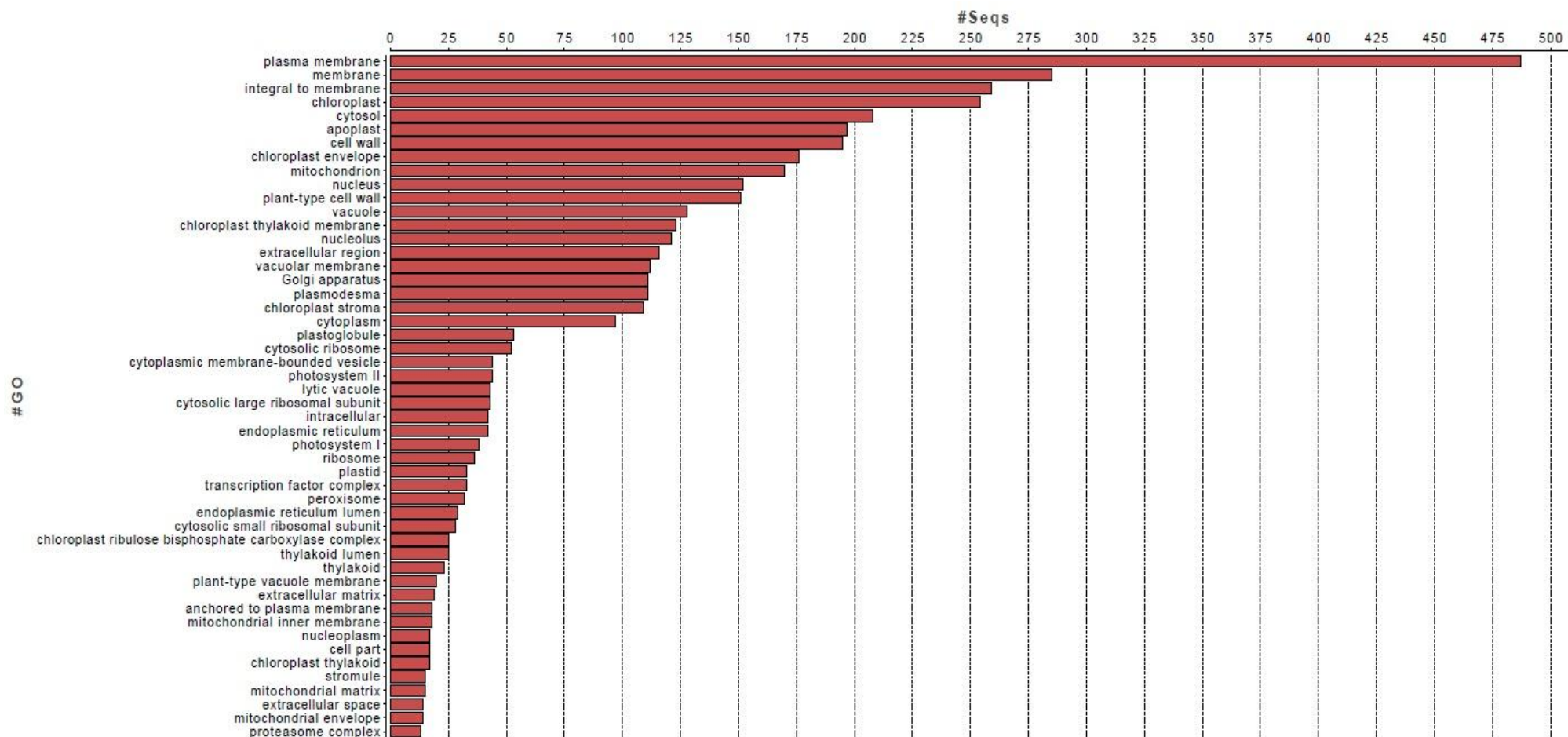


Figura 5. Categorização em componente celular dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de seqüências dentro de cada categoria.

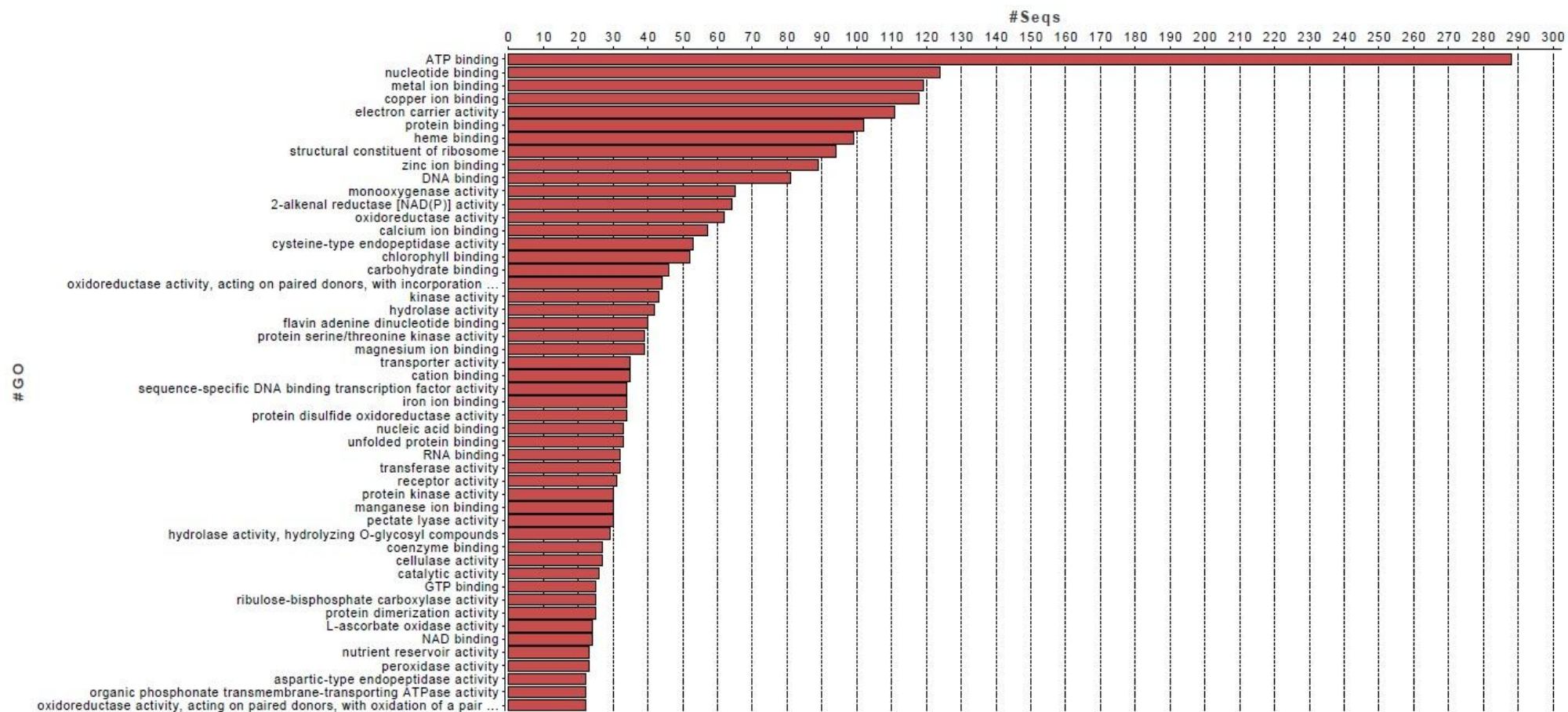


Figura 6. Categorização em função molecular dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

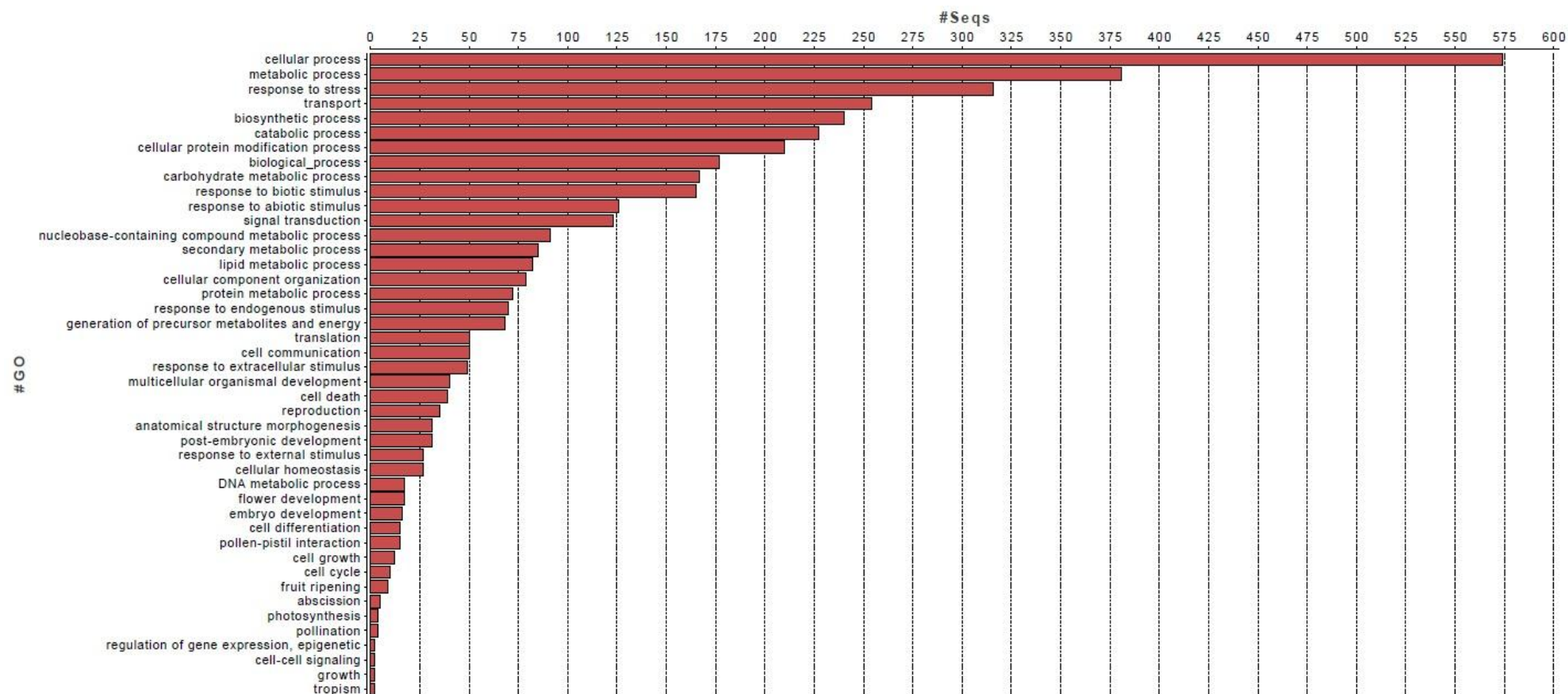


Figura 7. Categorização em processo biológico dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

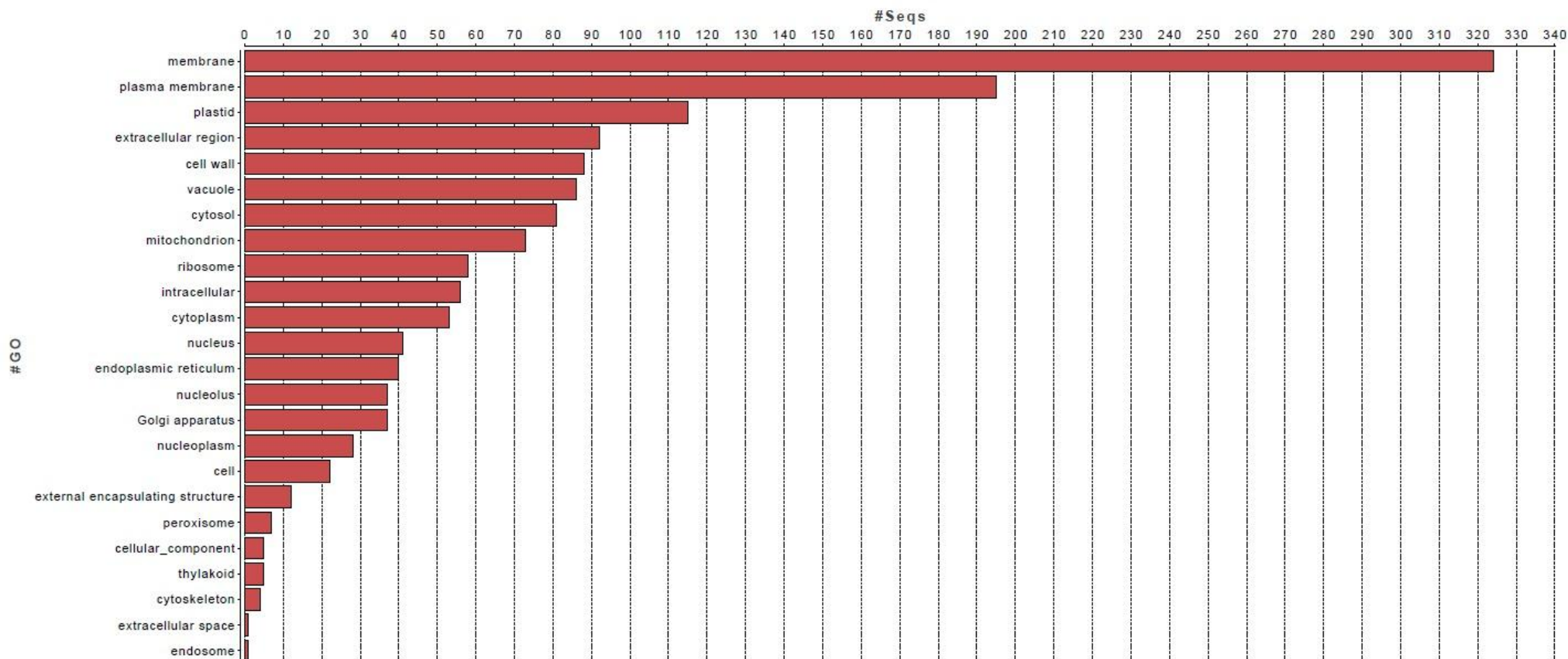


Figura 8. Categorização em componente celular dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

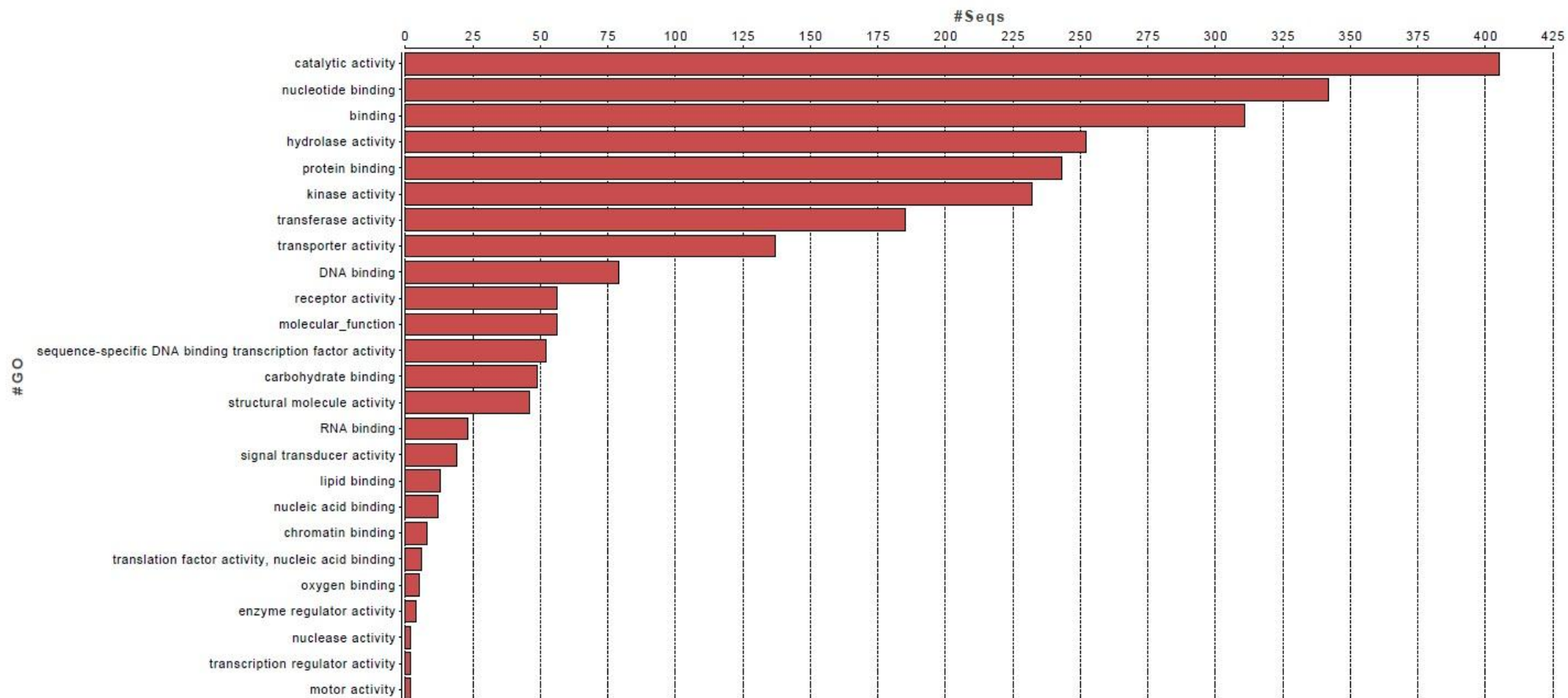


Figura 9. Categorização em função molecular dos GDEs induzidos na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

Apêndice B – Figuras representando a categorização dos GDEs reprimidos da espécie Satsuma em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

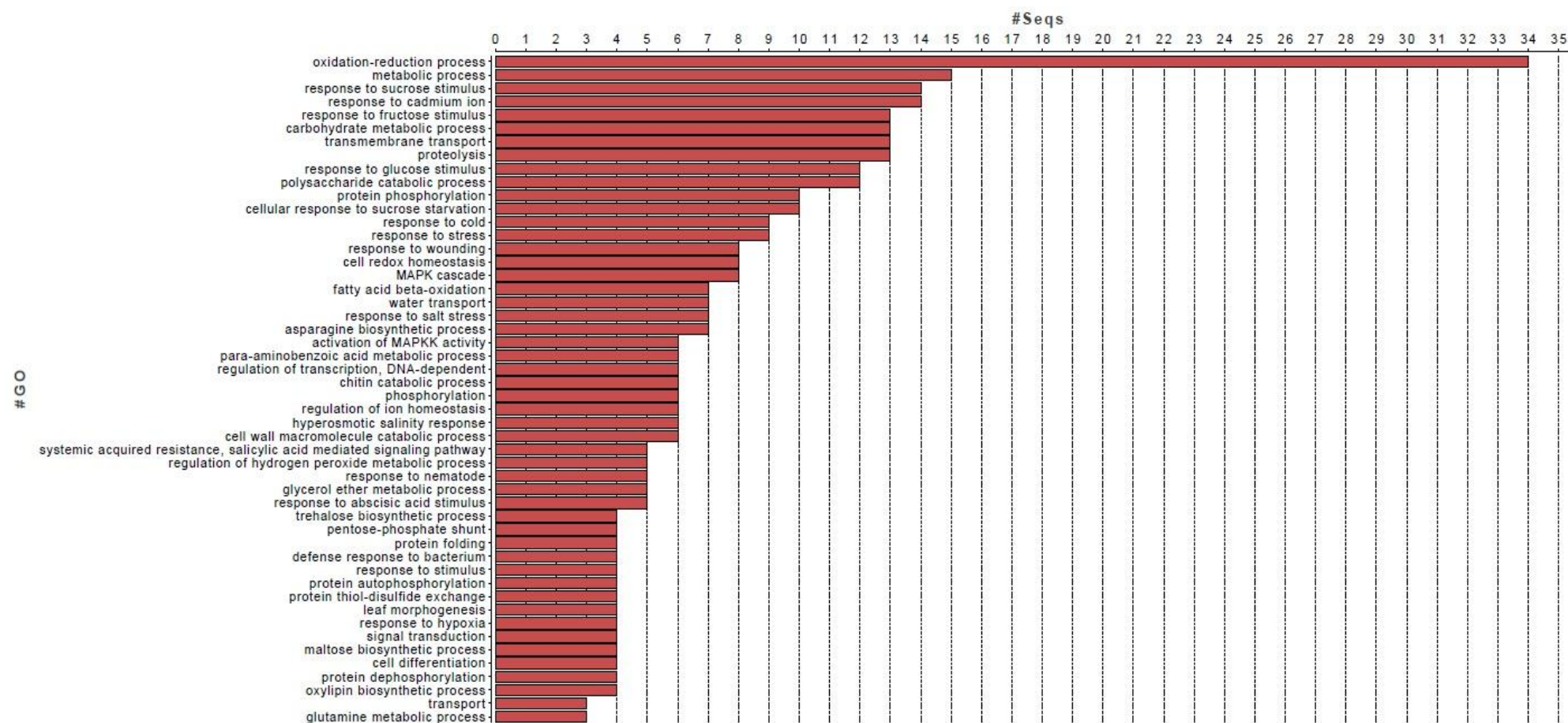


Figura 10. Categorização em processo biológico dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

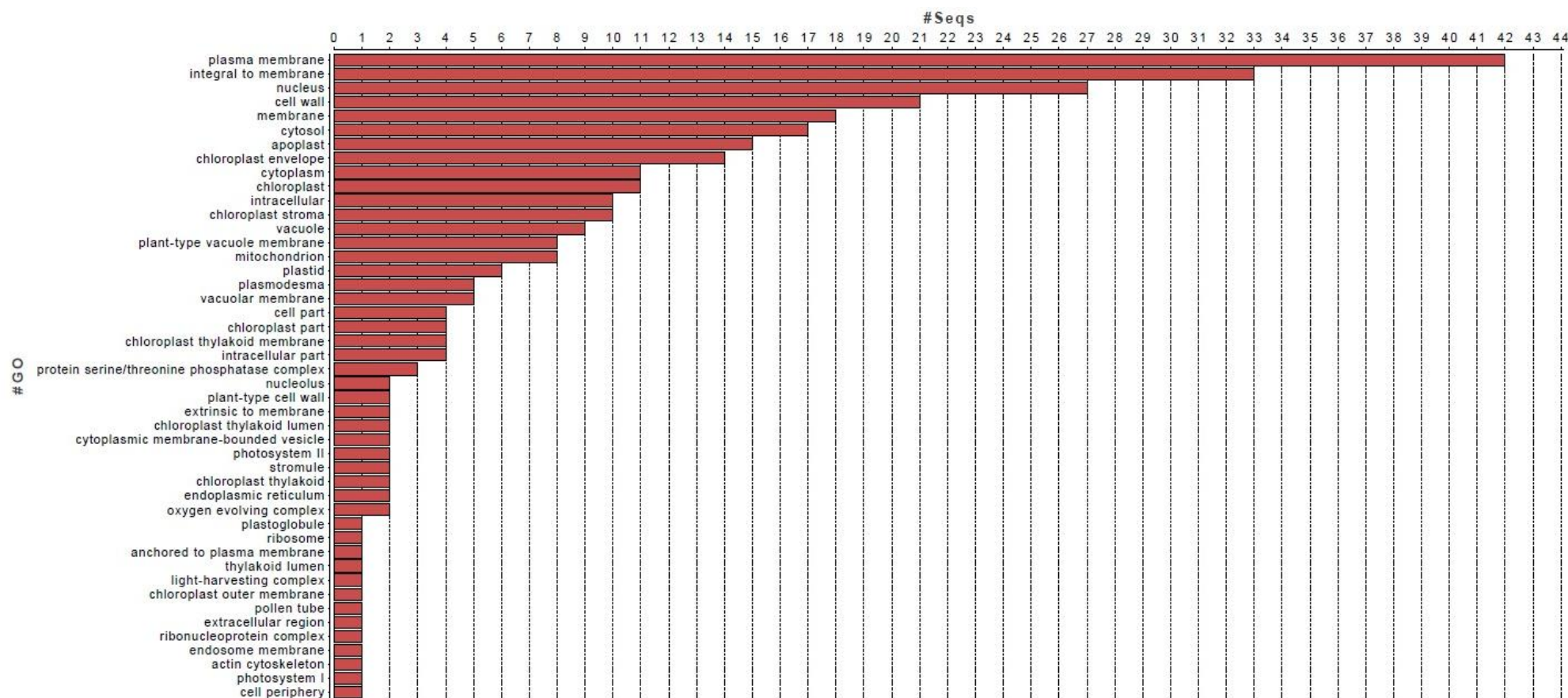


Figura 11. Categorização em componente celular dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

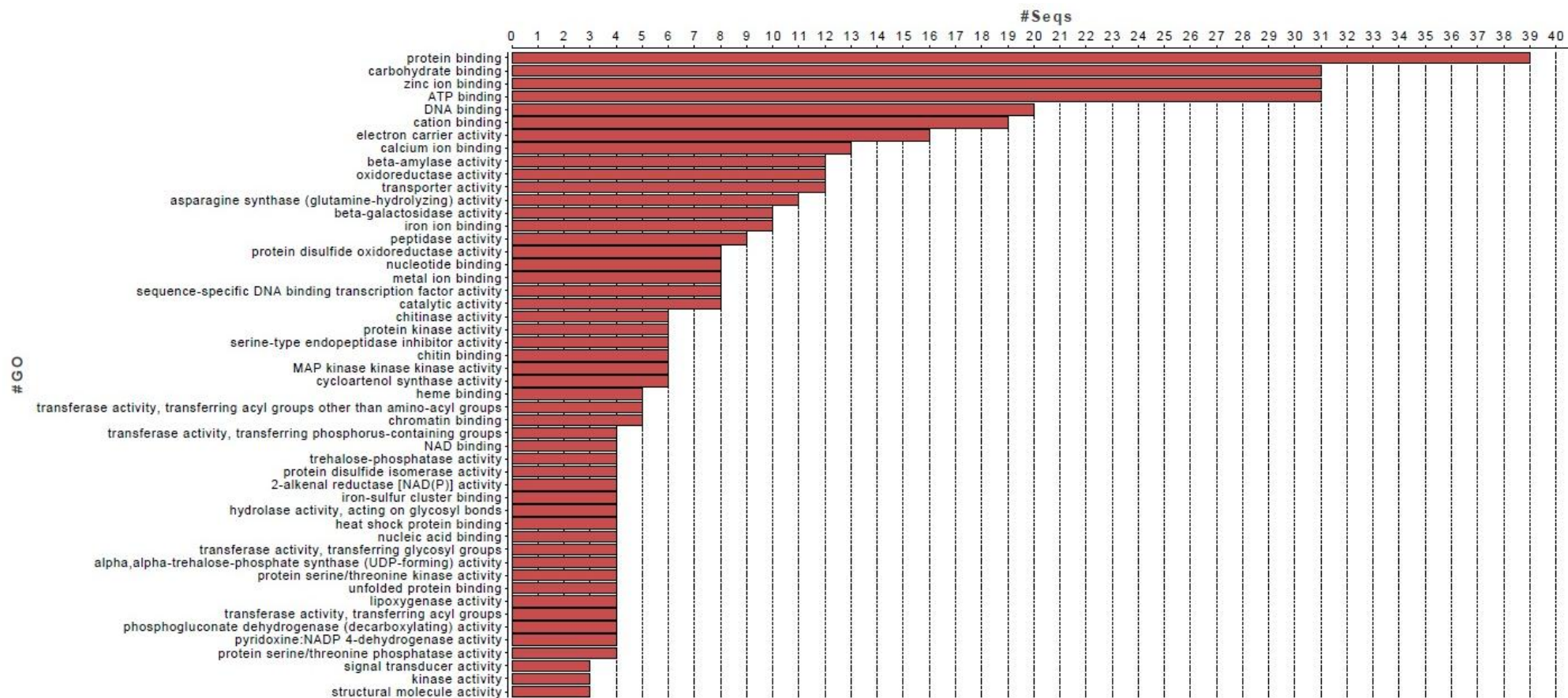


Figura 12. Categorização em função molecular dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

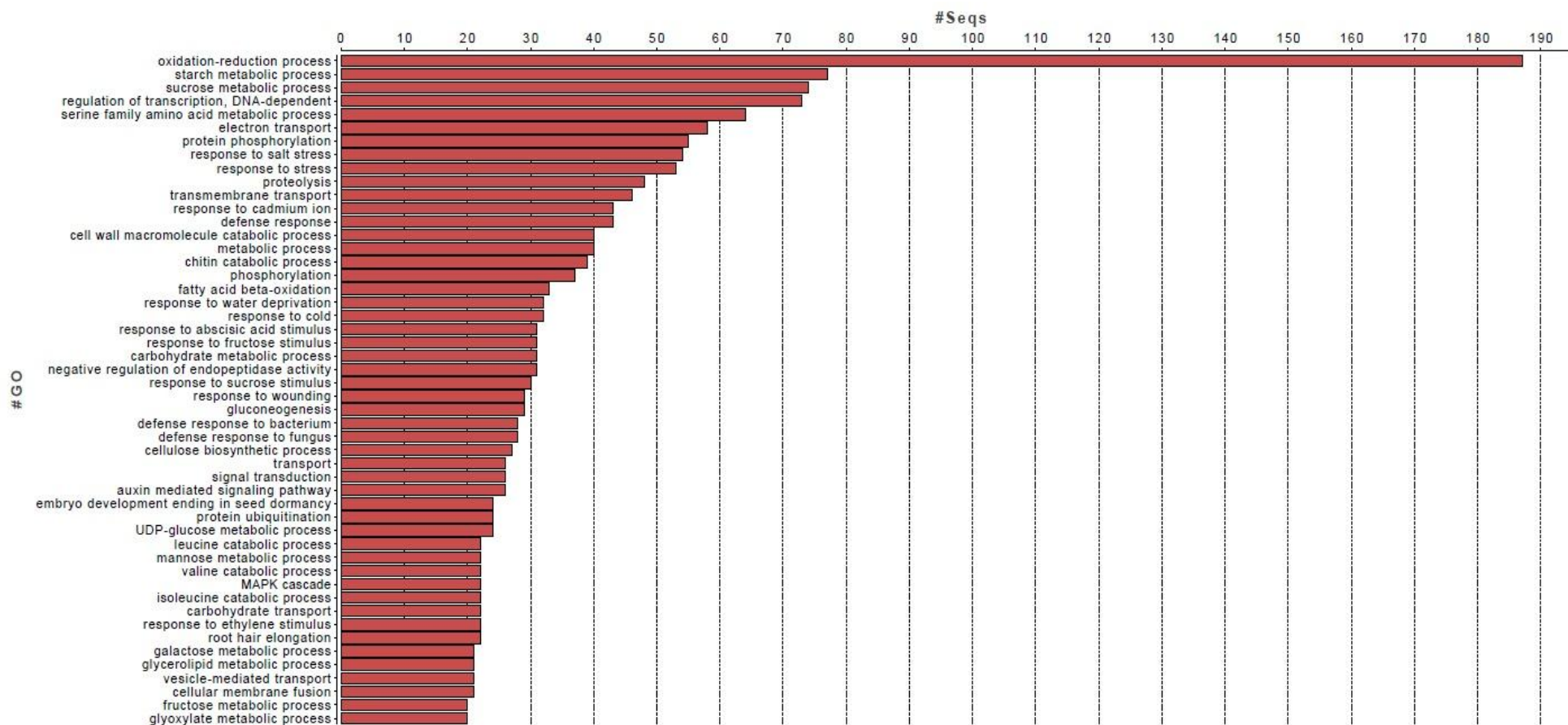


Figura 13. Categorização em processo biológico dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

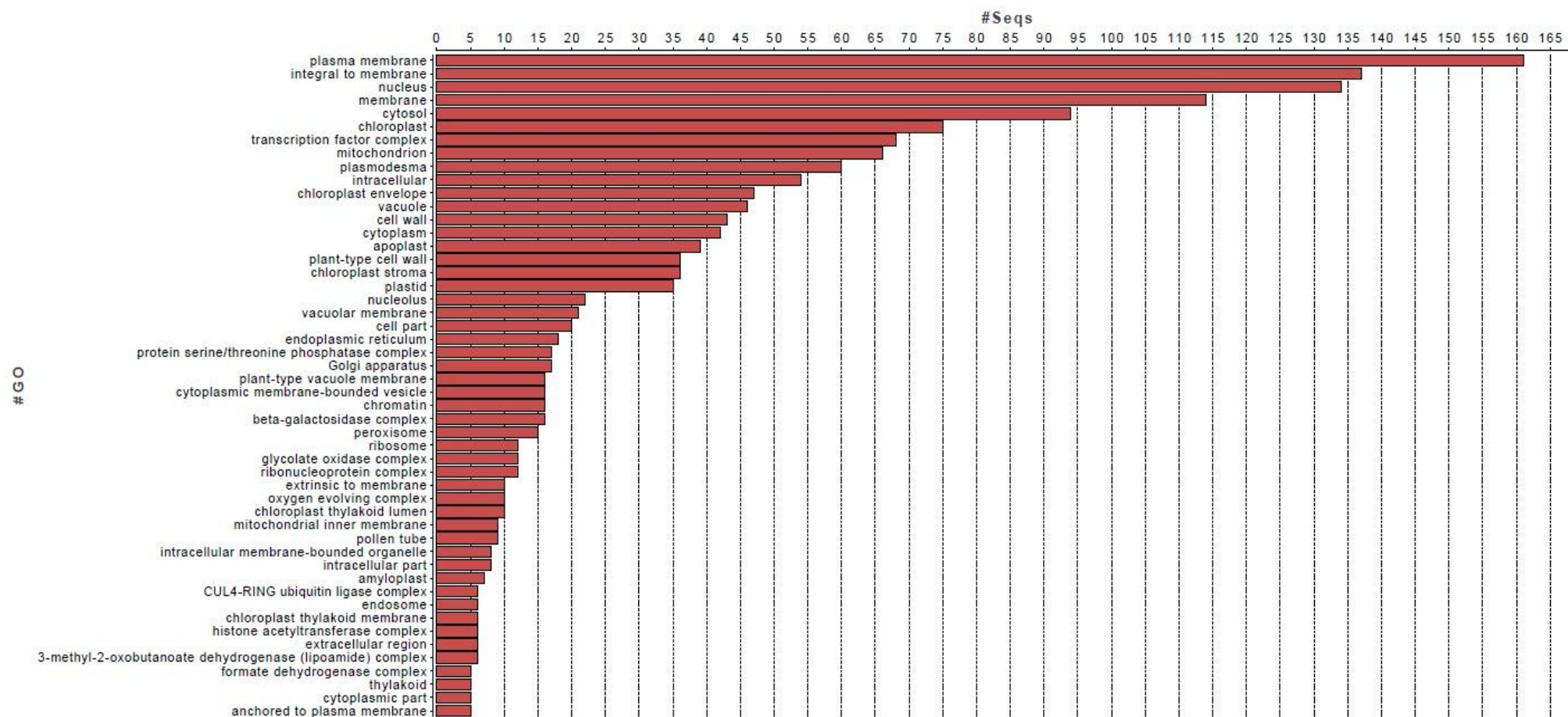


Figura 14. Categorização em componente celular dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de seqüências dentro de cada categoria.

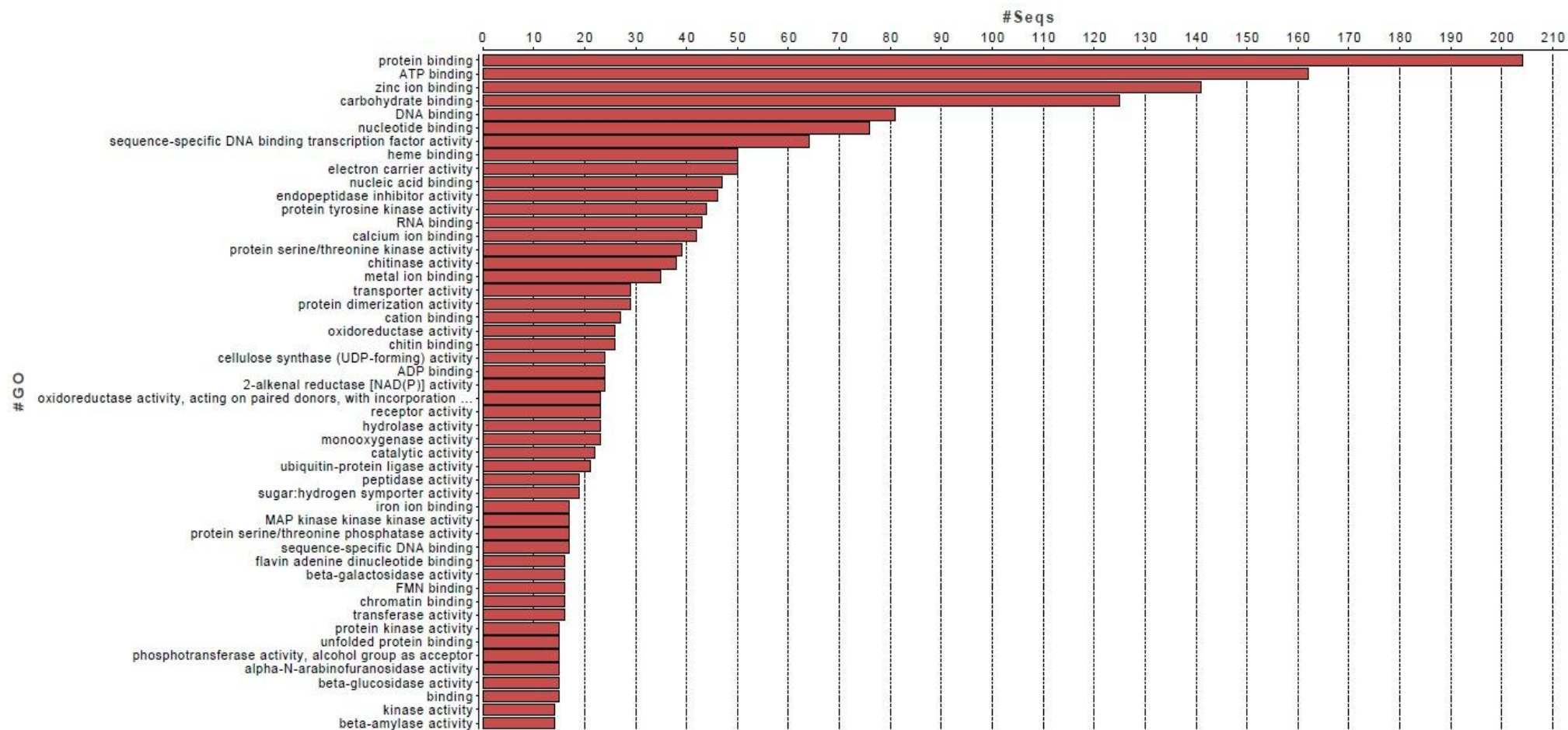


Figura 15. Categorização em função molecular dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

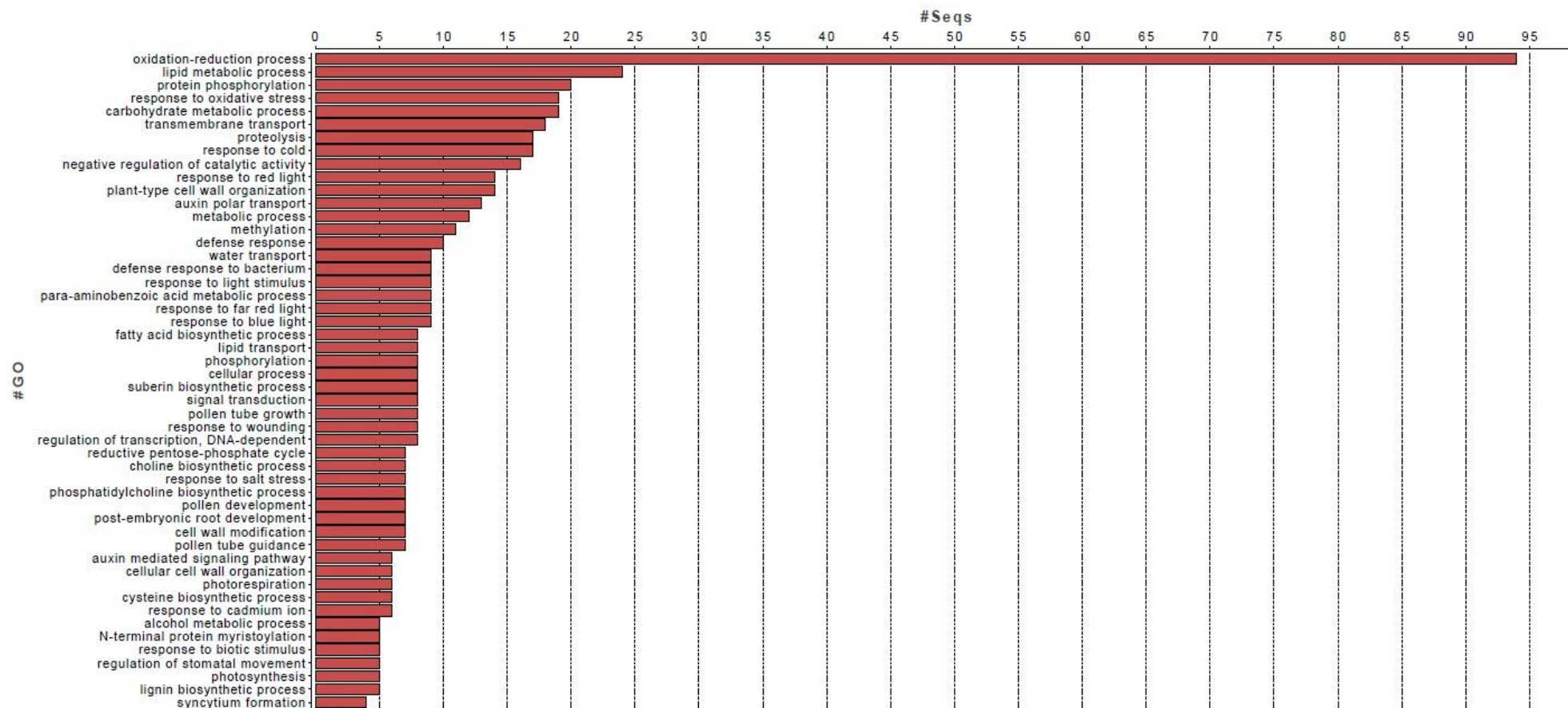


Figura 16. Categorização em processo biológico dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

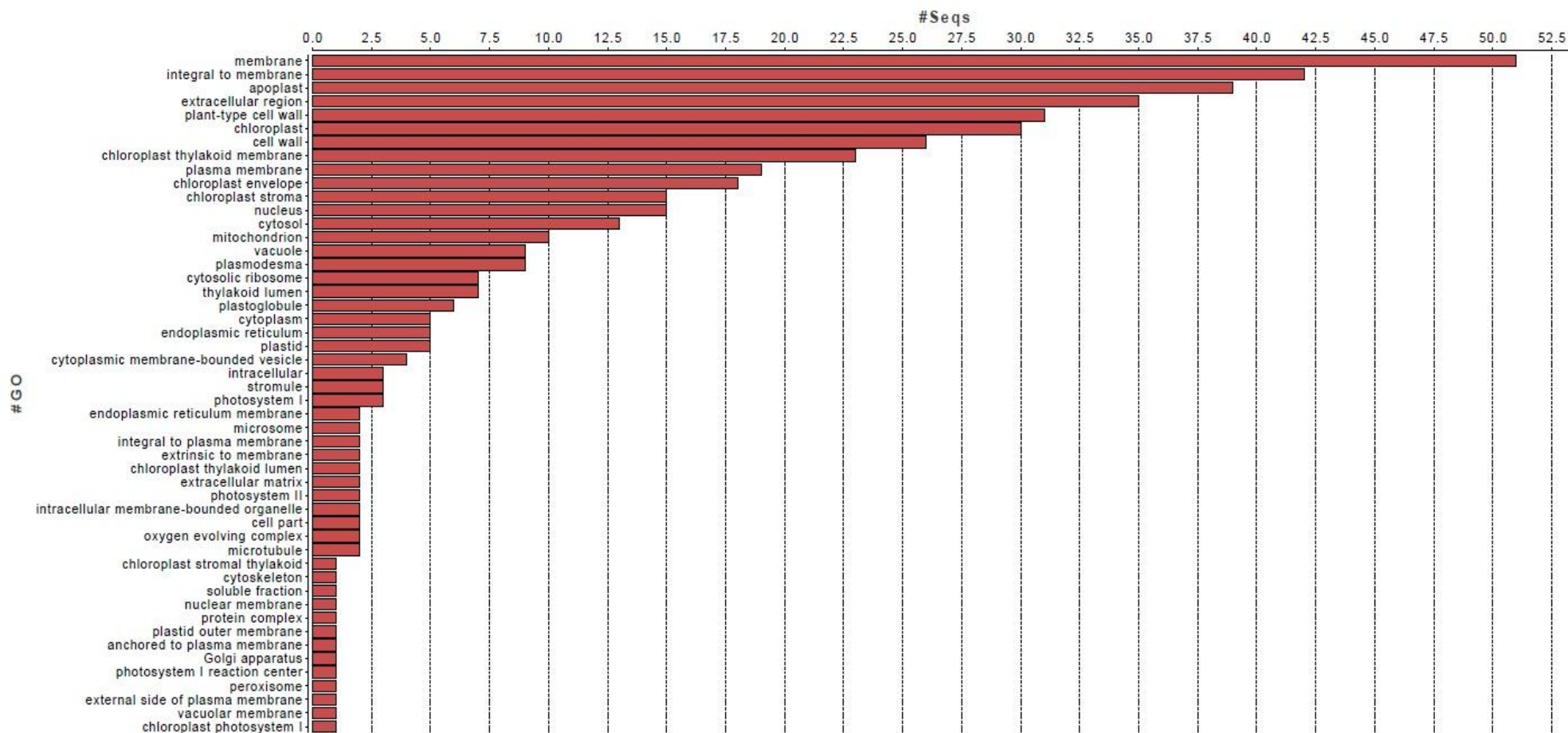


Figura 17. Categorização em componente celular dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

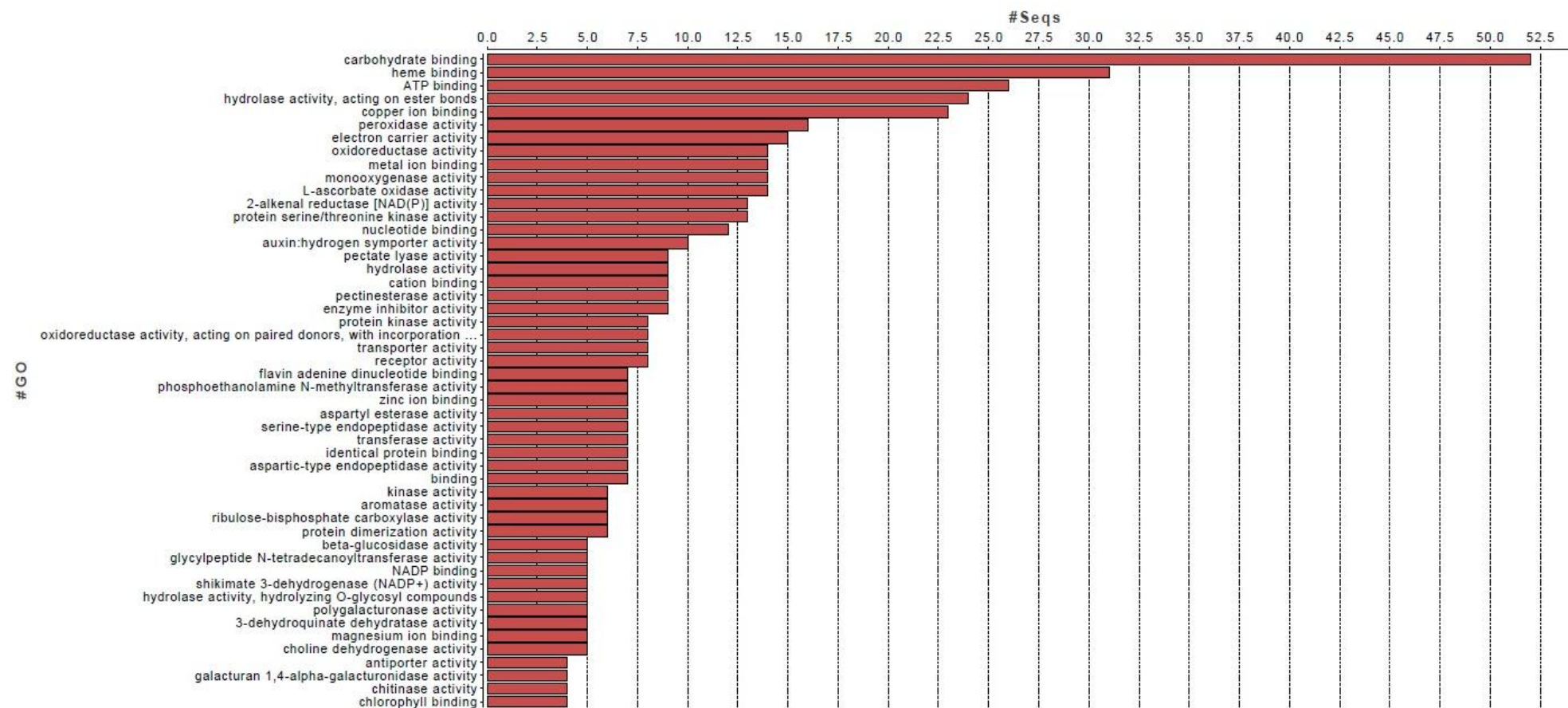


Figura 18. Categorização em função molecular dos GDEs reprimidos na espécie Satsuma 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

Apêndice C – Figuras representando a categorização dos GDEs induzidos da espécie Hamlin em relação ao processo biológico, função molecular e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

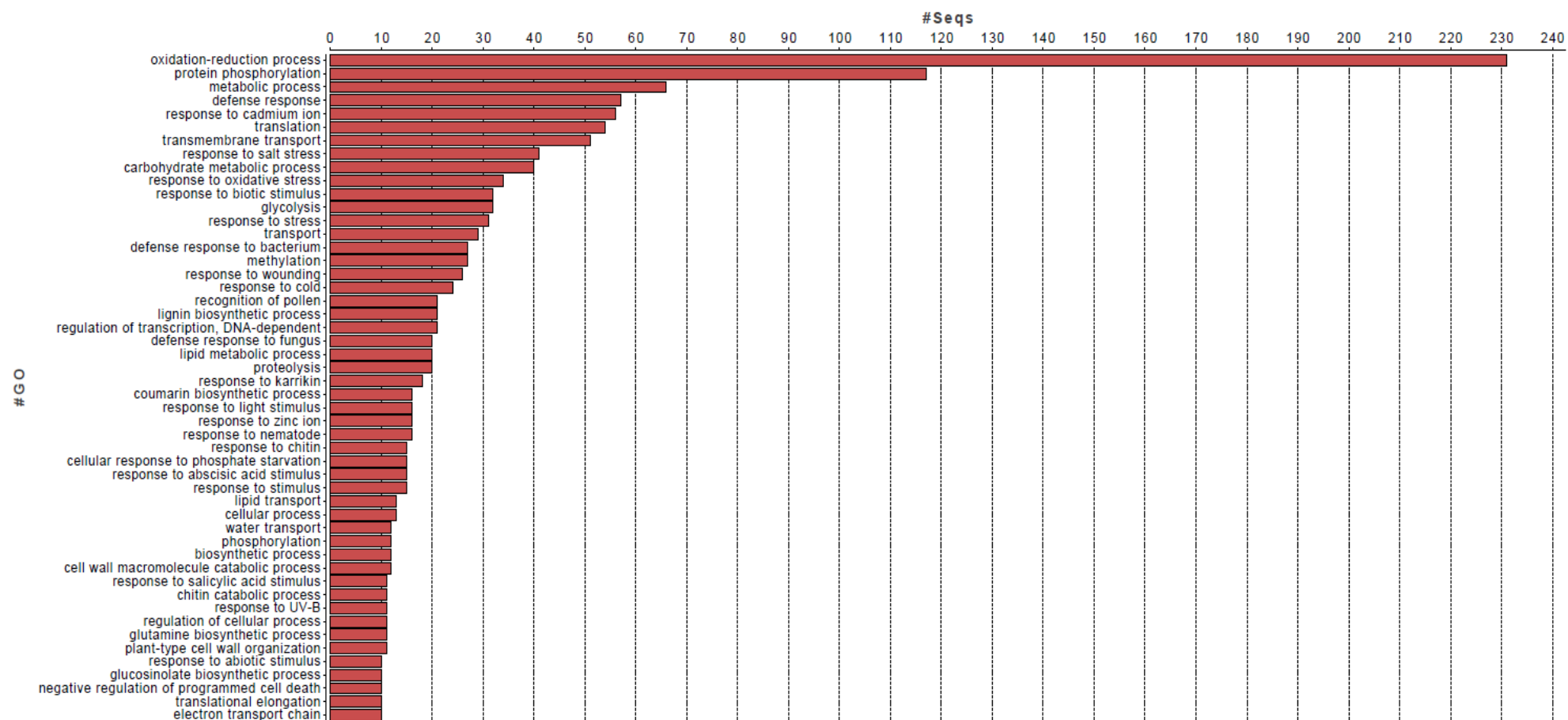


Figura 19. Categorização em processo biológico dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

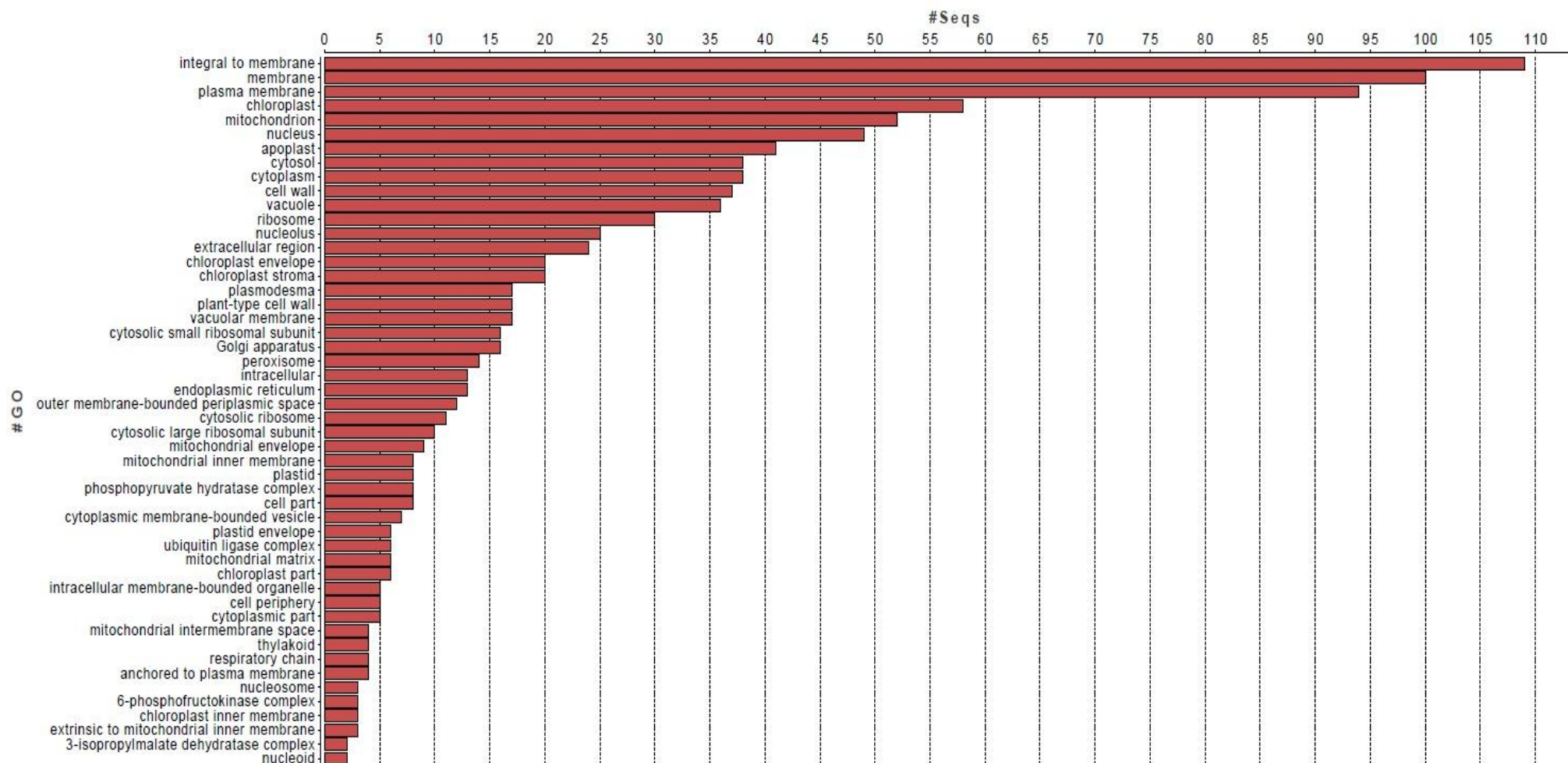


Figura 20. Categorização em componente celular dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

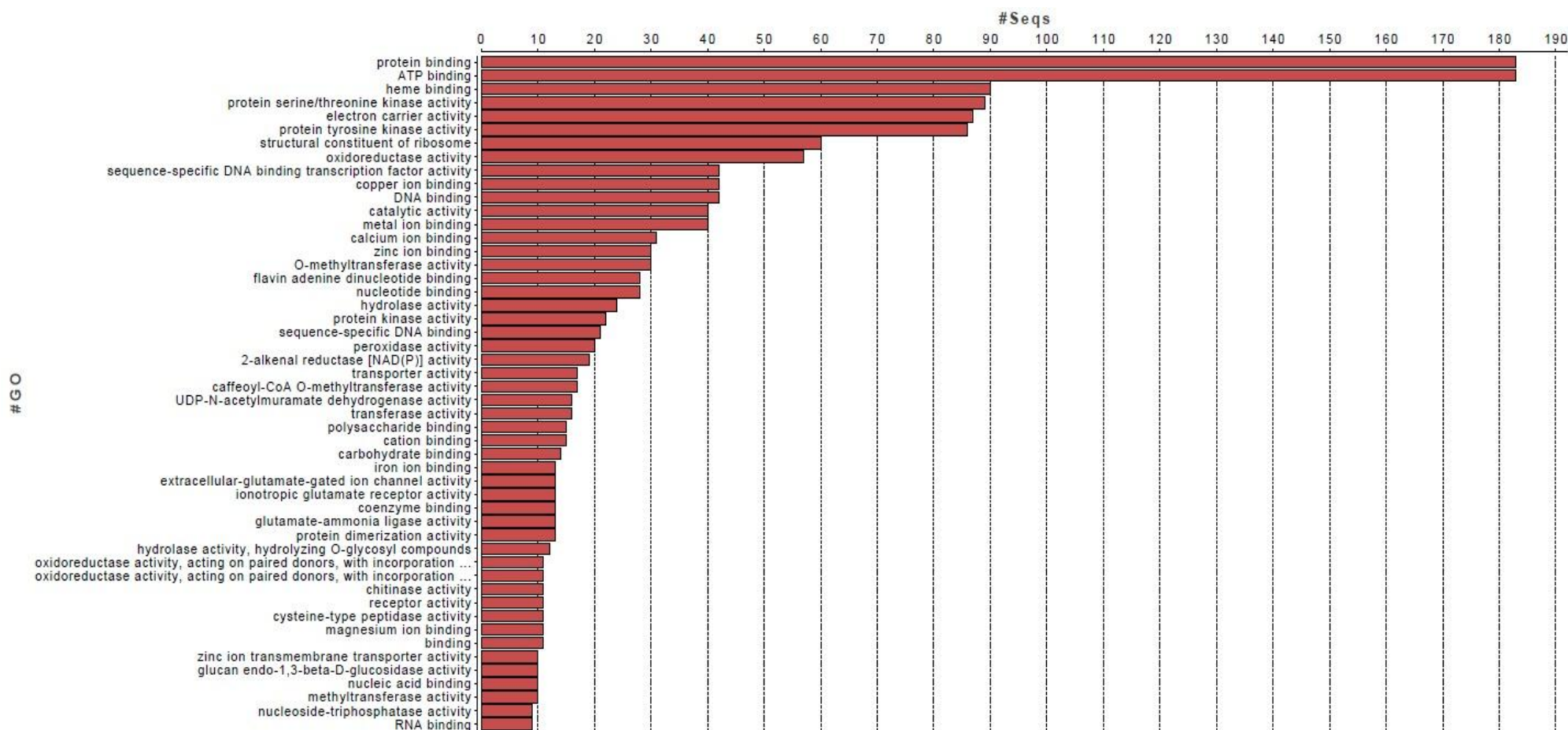


Figura 21. Categorização em função molecular dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

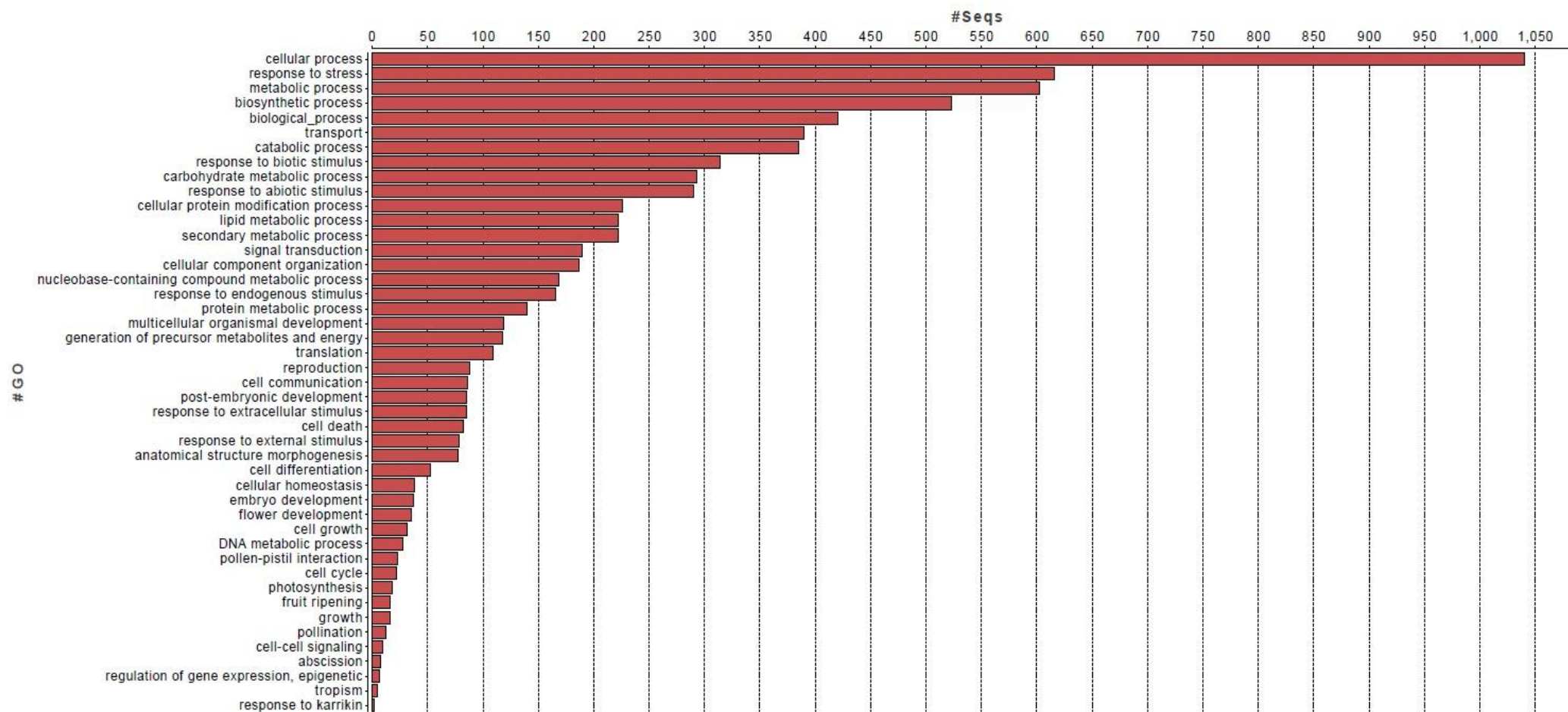


Figura 22. Categorização em processo biológico dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

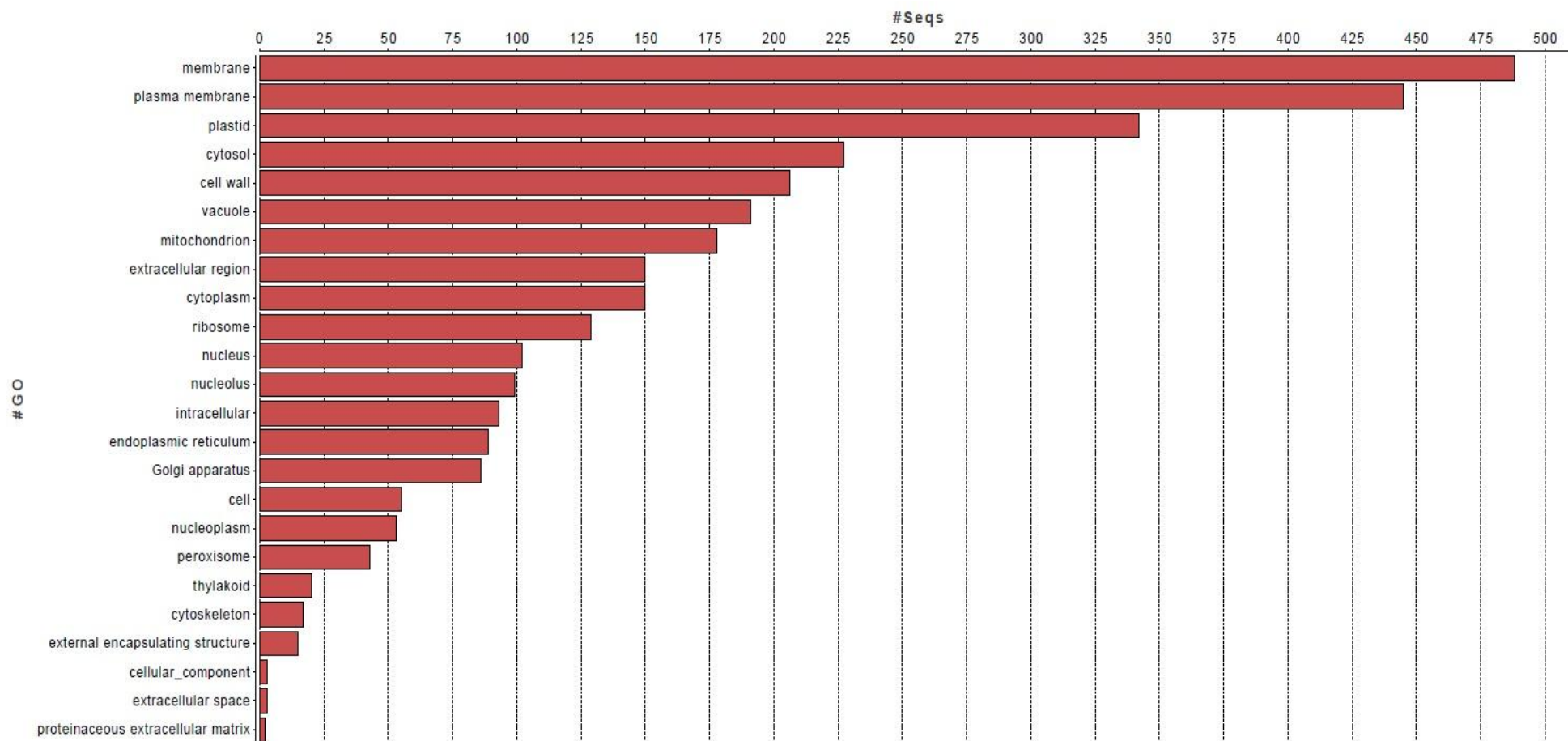


Figura 23. Categorização em componente celular dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

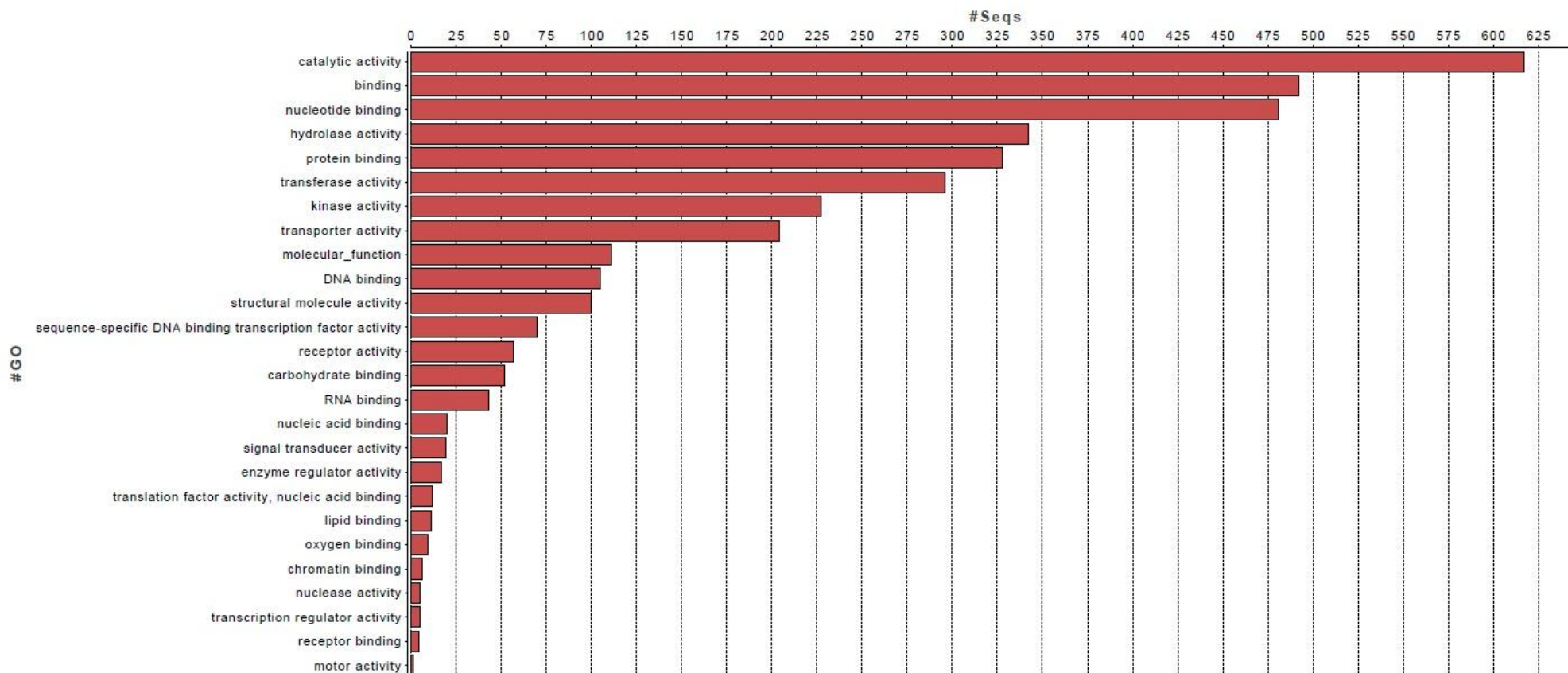


Figura 24. Categorização em função molecular dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

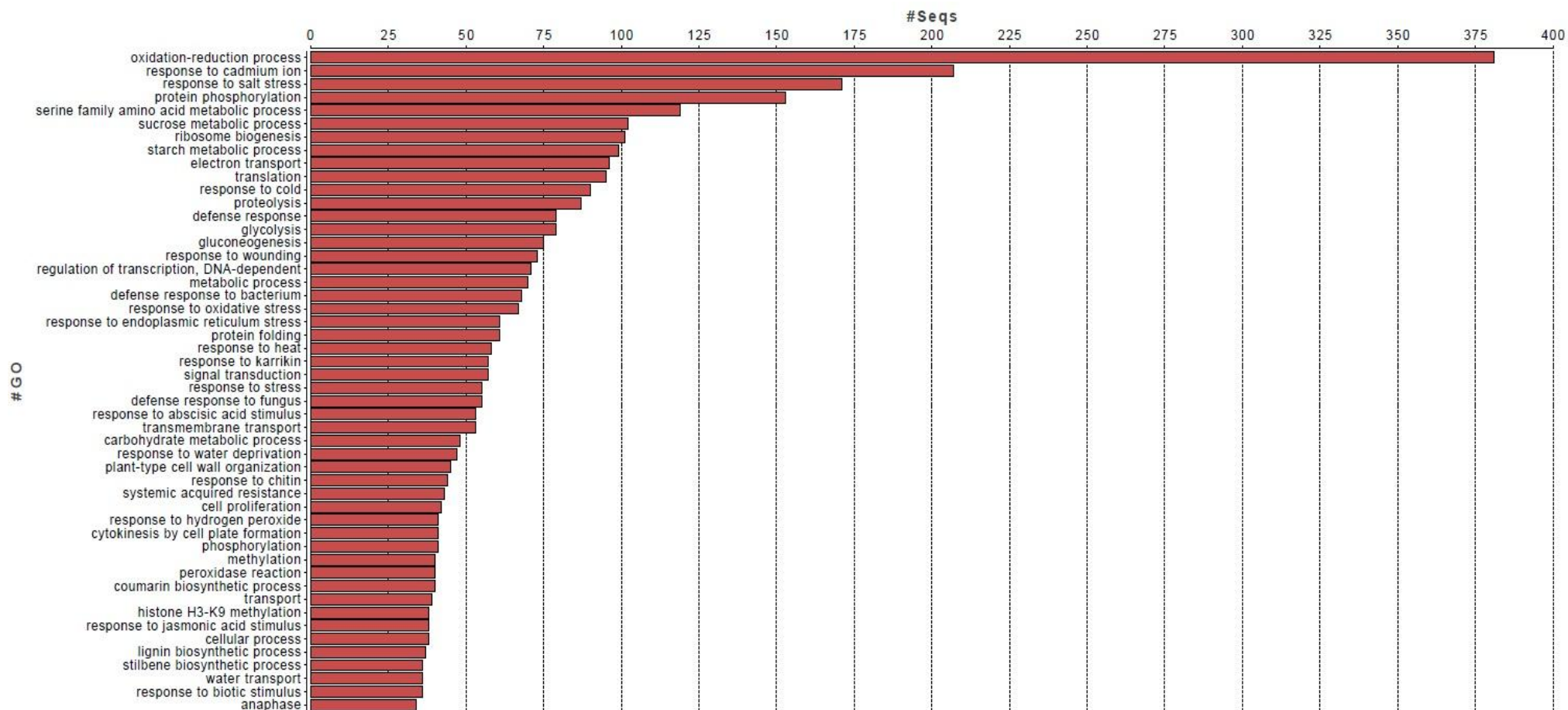


Figura 25. Categorização em processo biológico dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

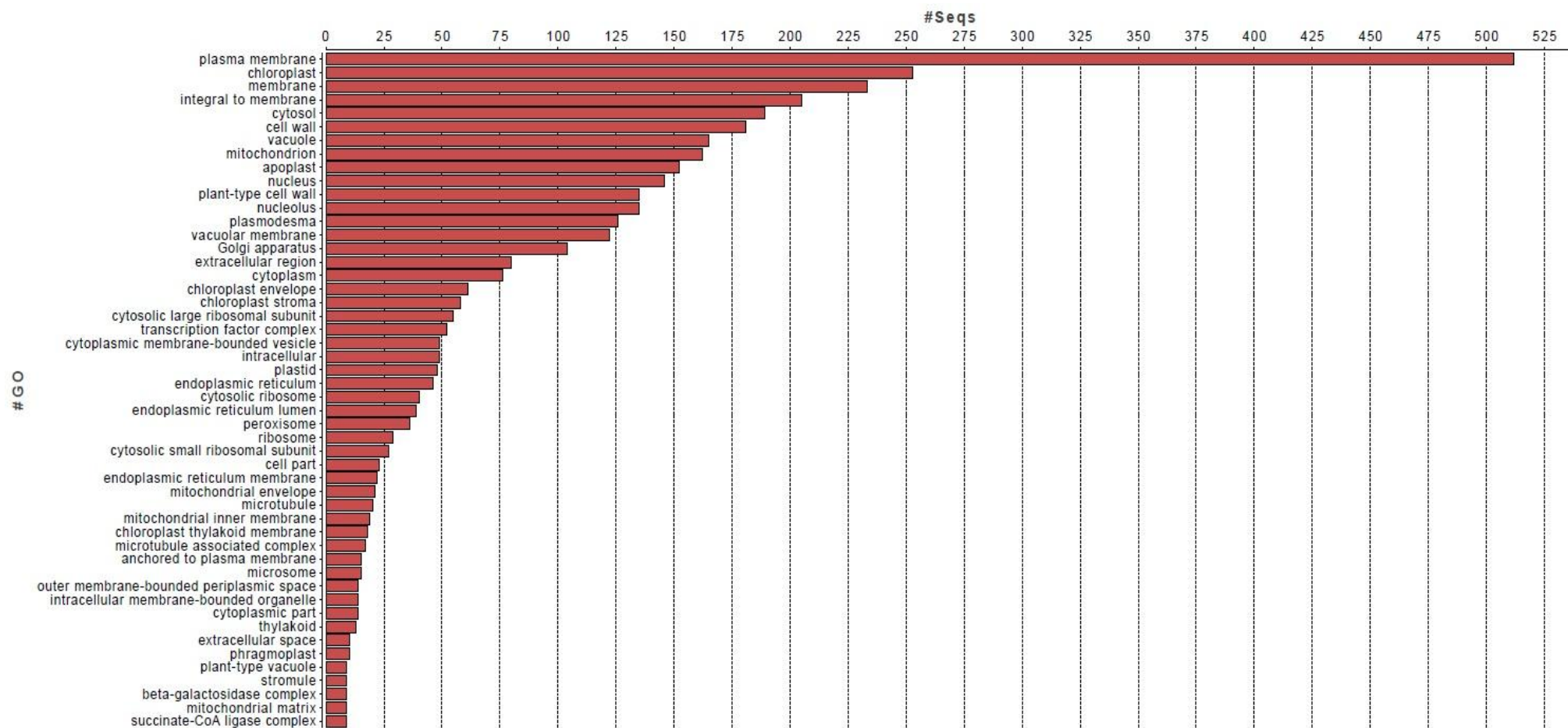


Figura 26. Categorização em componente celular dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

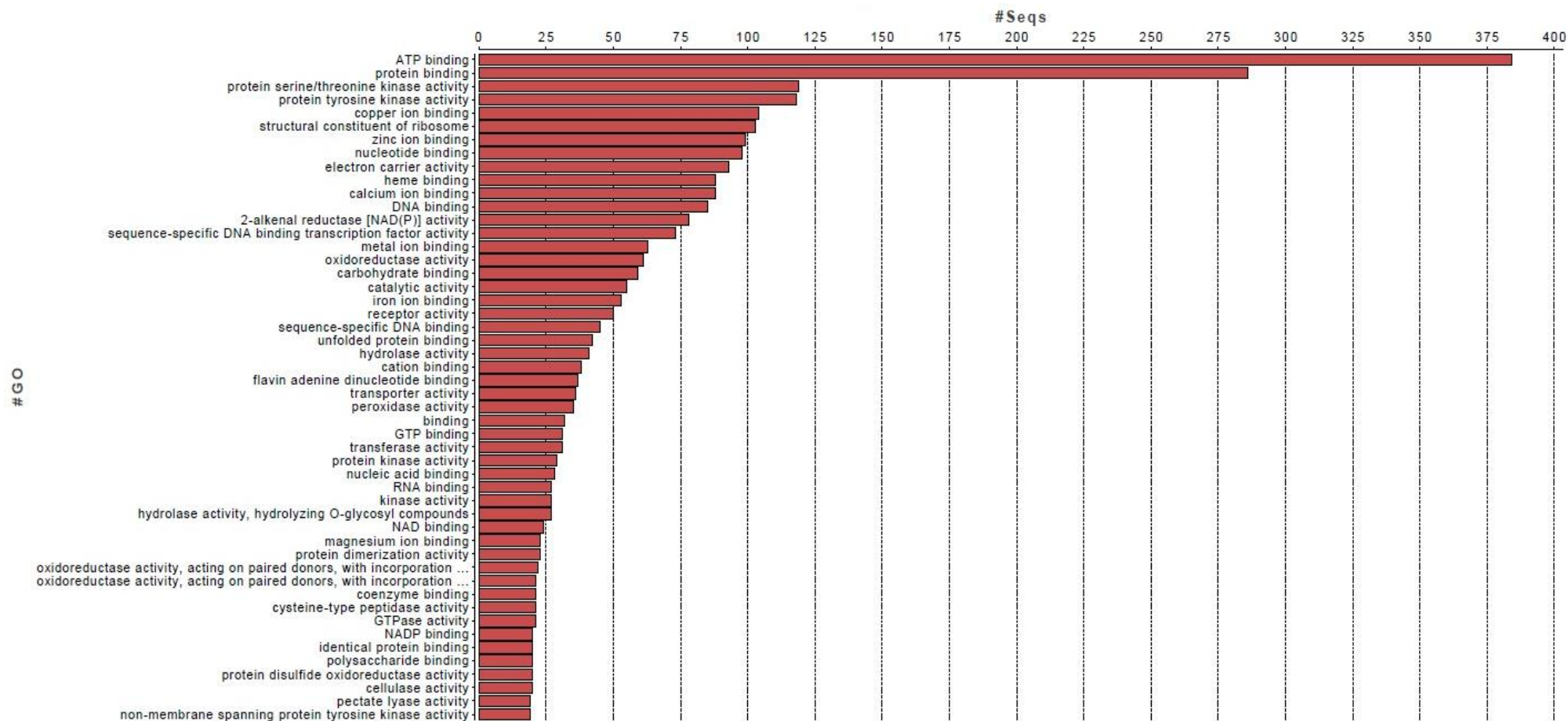


Figura 27. Categorização em função molecular dos GDEs induzidos na espécie Hamlin 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

Apêndice D – Figuras representando a categorização dos GDEs reprimidos da espécie Hamlin em relação ao processo biológico e componente celular nos tempos 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

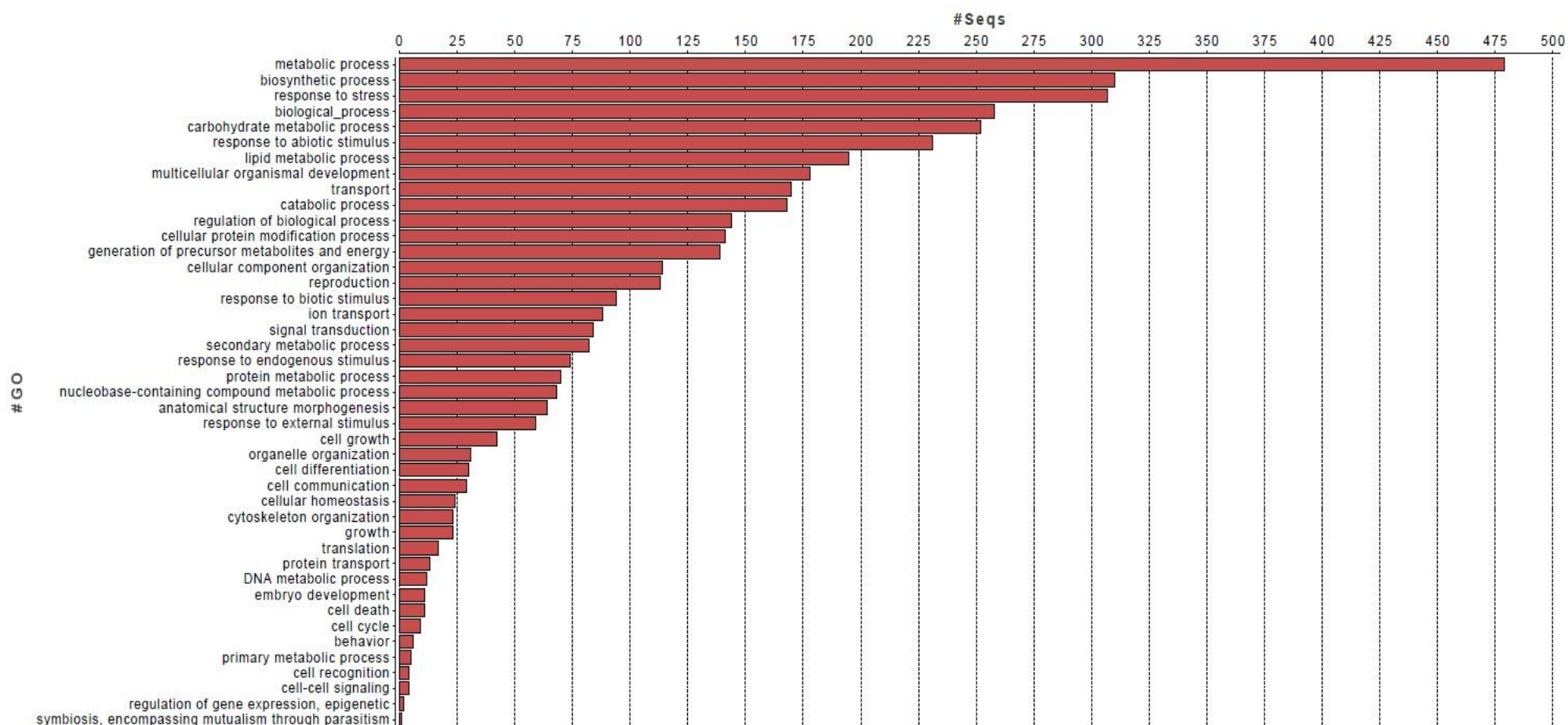


Figura 28. Categorização em processo biológico dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

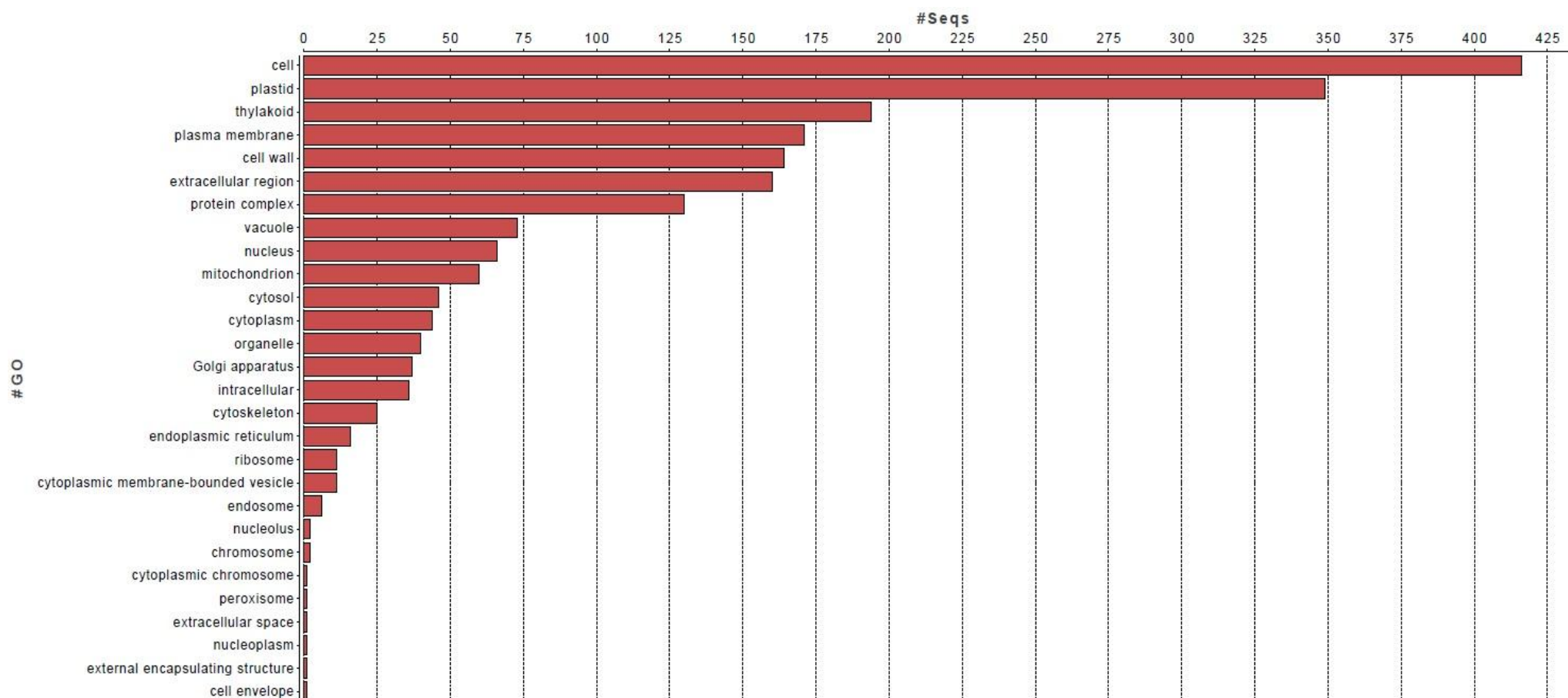


Figura 29. Categorização em componente celular dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

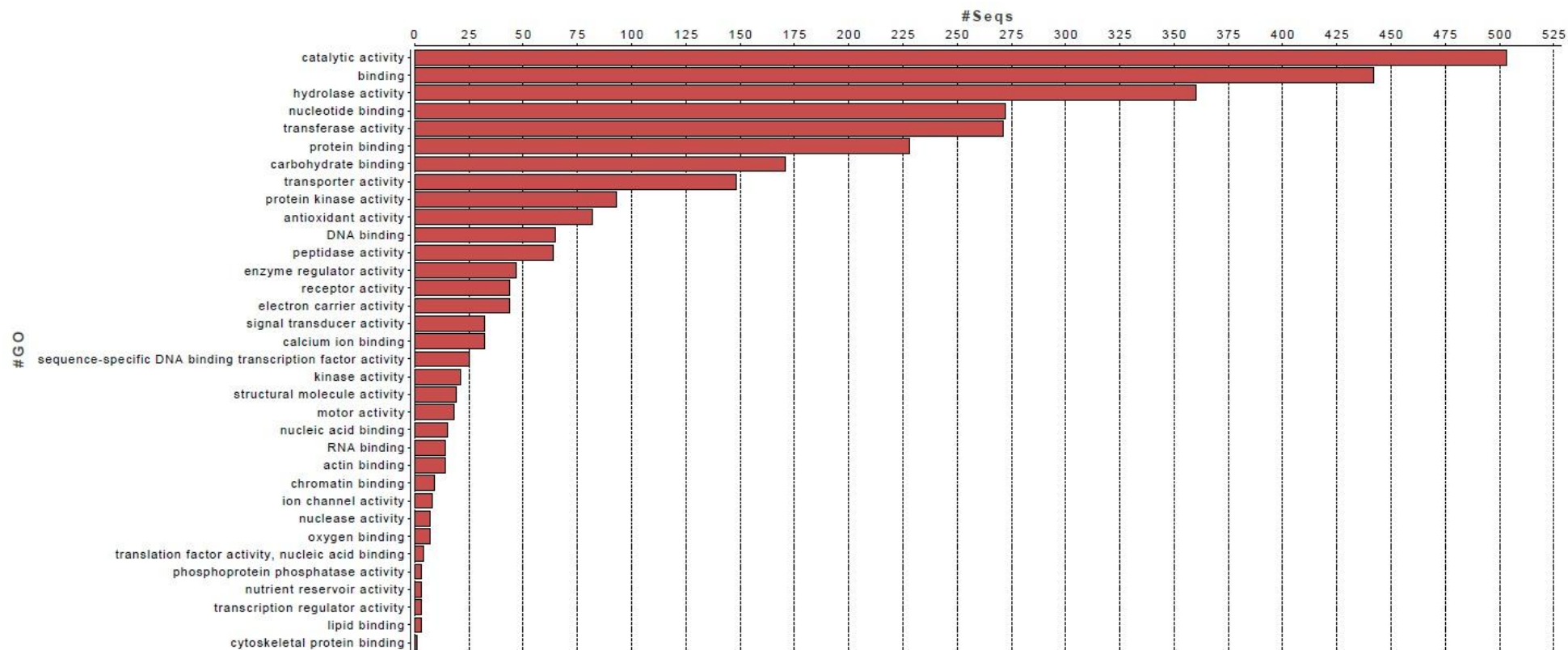


Figura 30. Categorização em função molecular dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 24 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

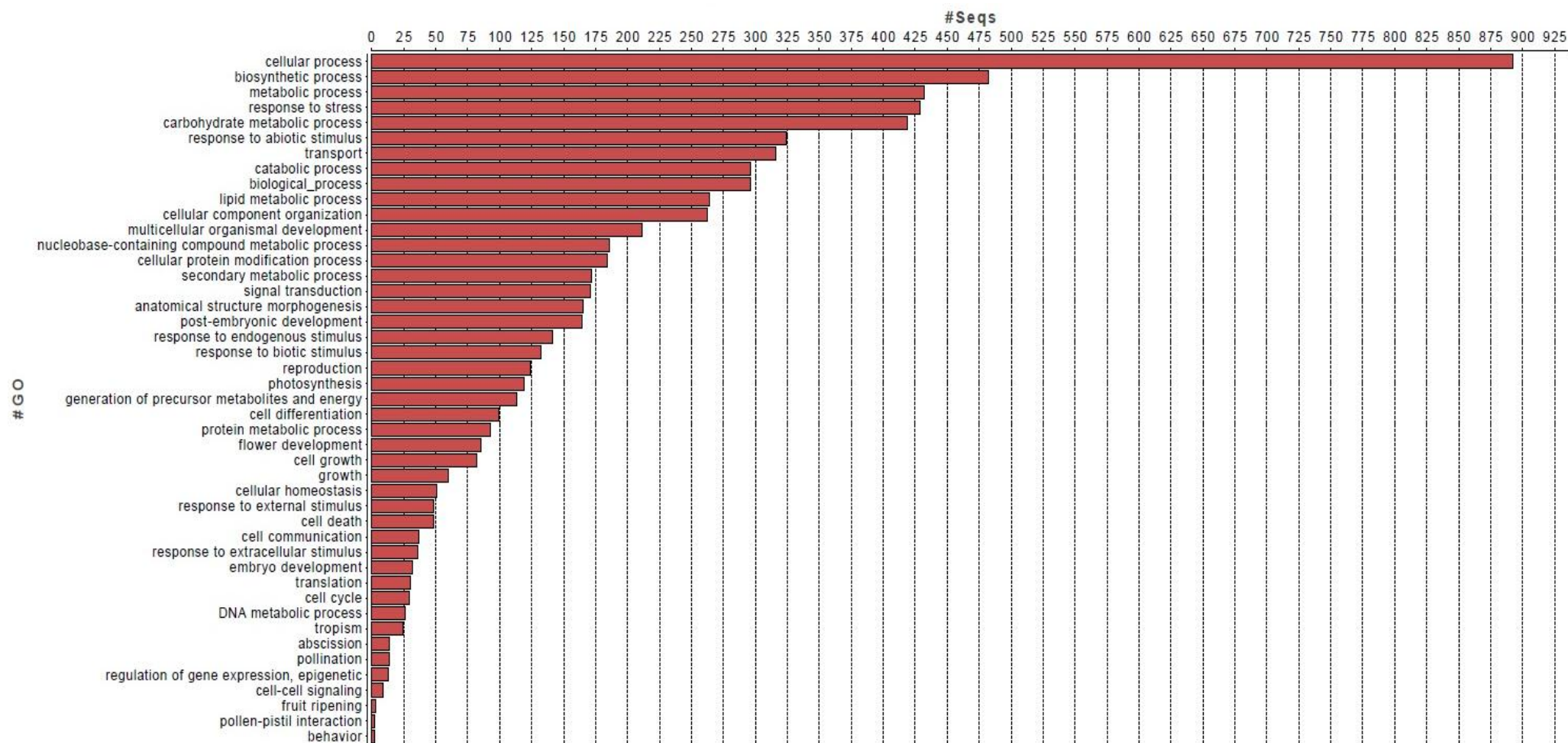


Figura 31. Categorização em processo biológico dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

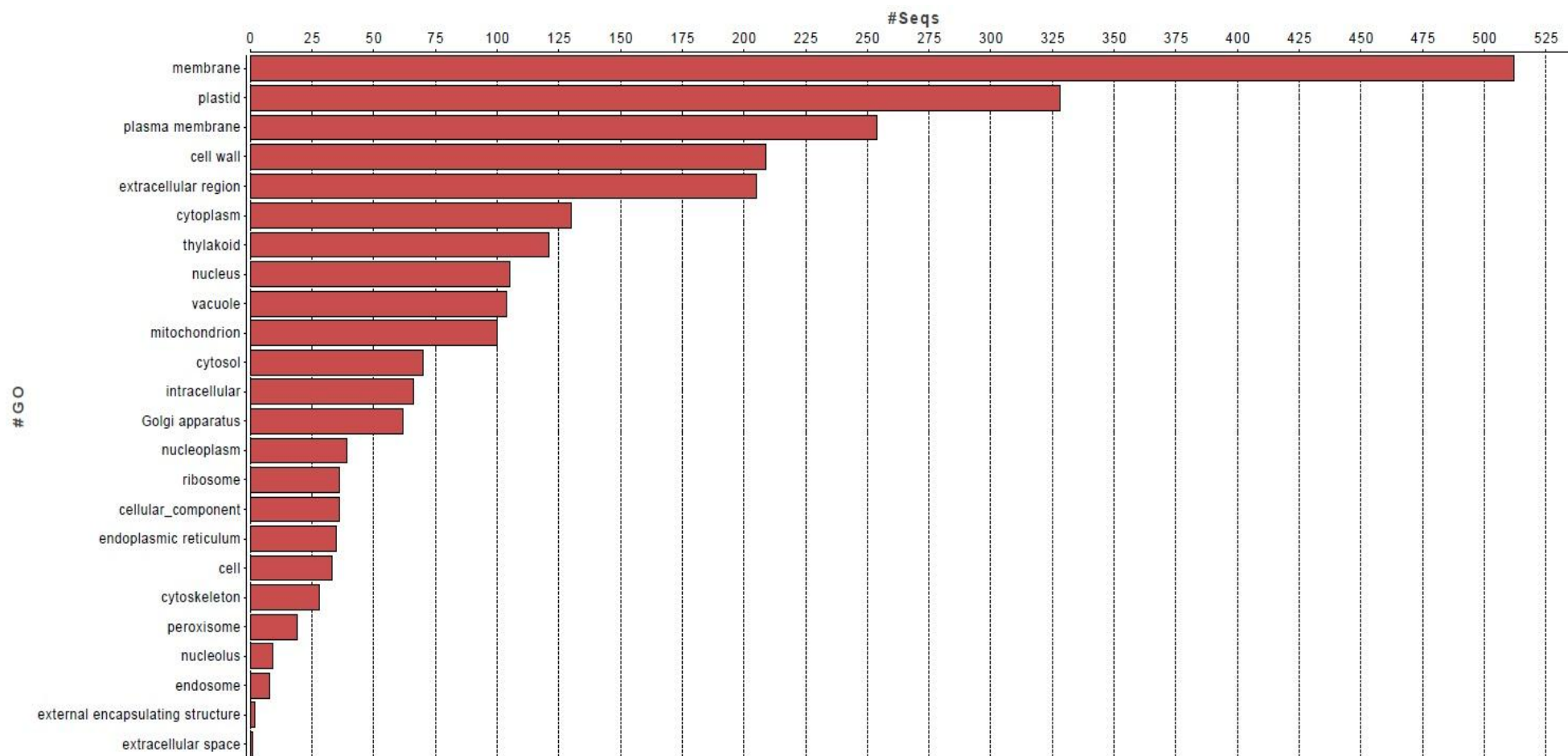


Figura 32. Categorização em componente celular dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

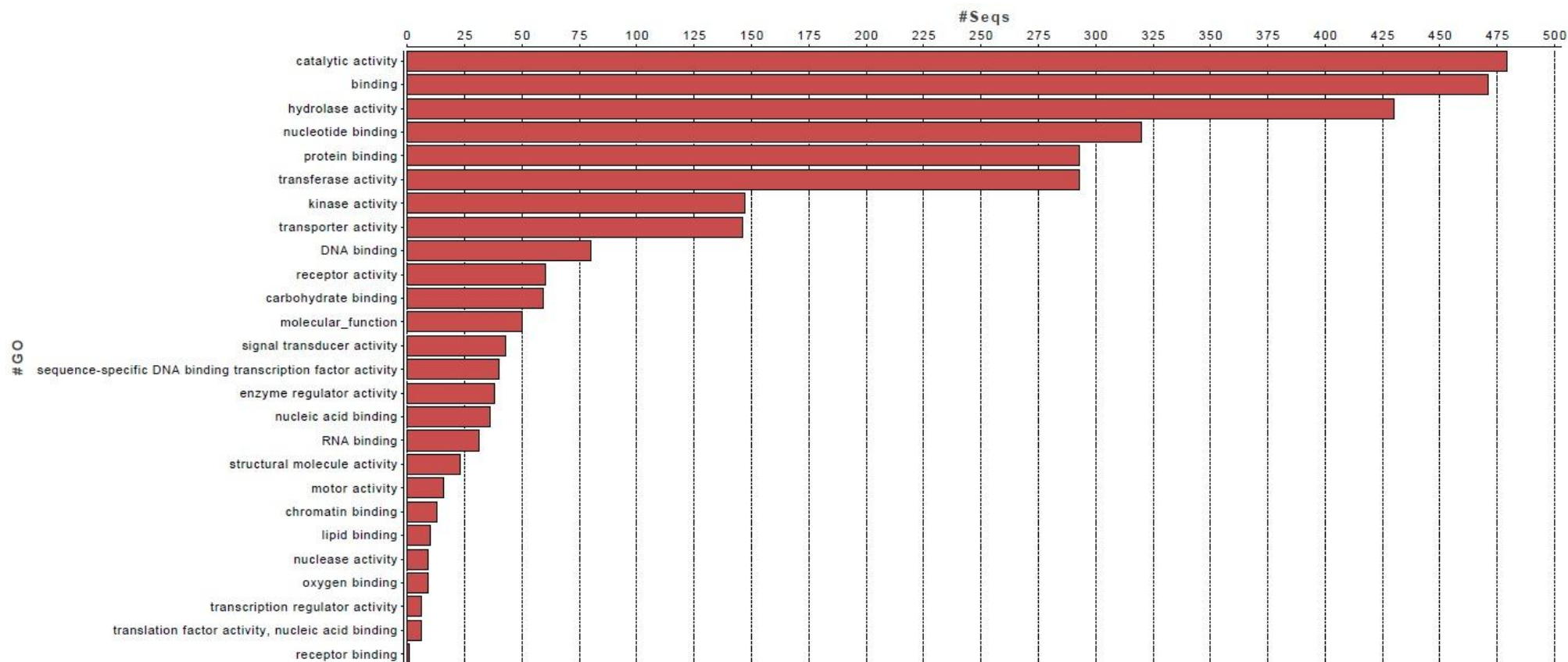


Figura 33. Categorização em função molecular dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 48 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

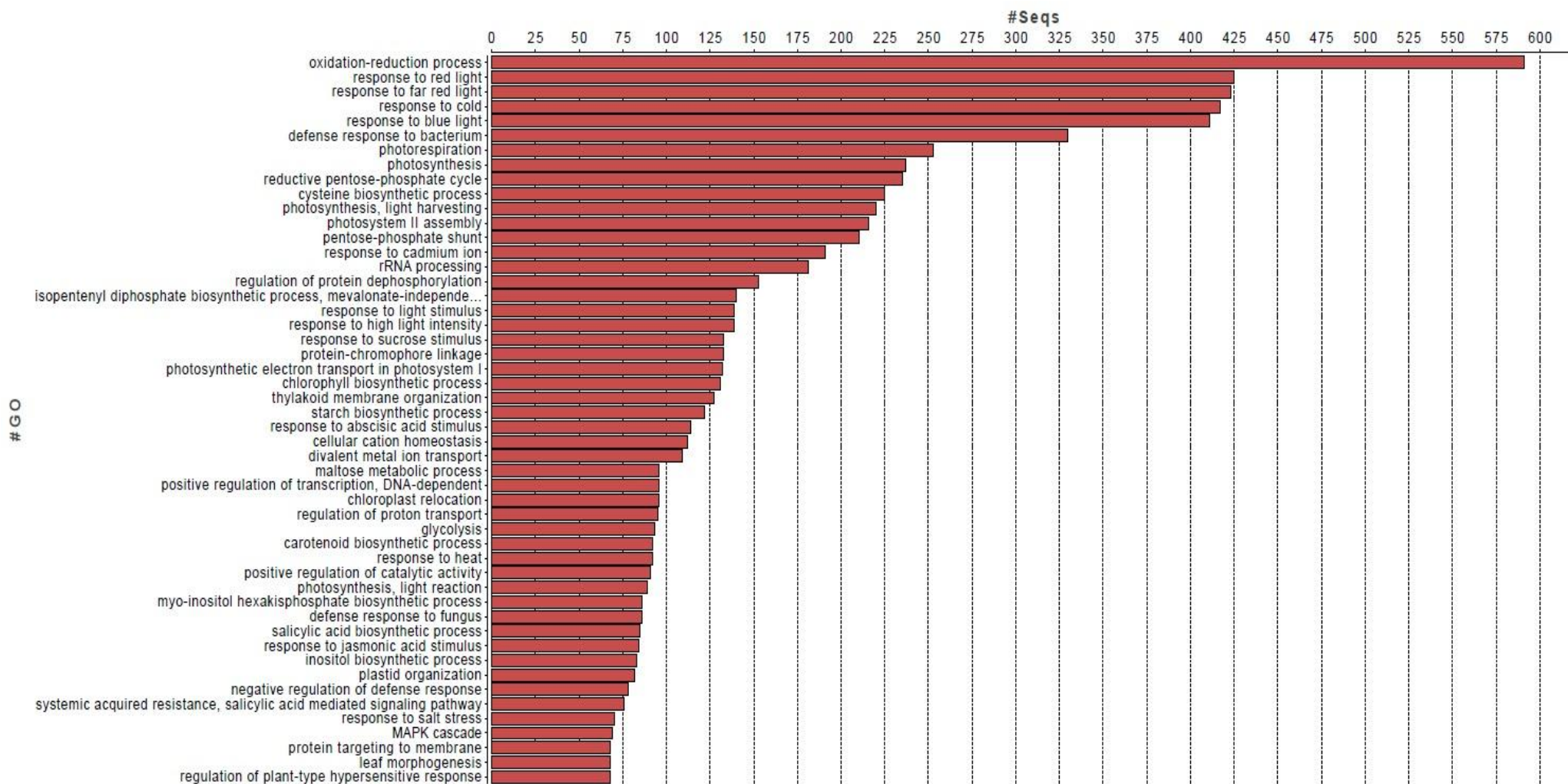


Figura 34. Categorização em processo biológico dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

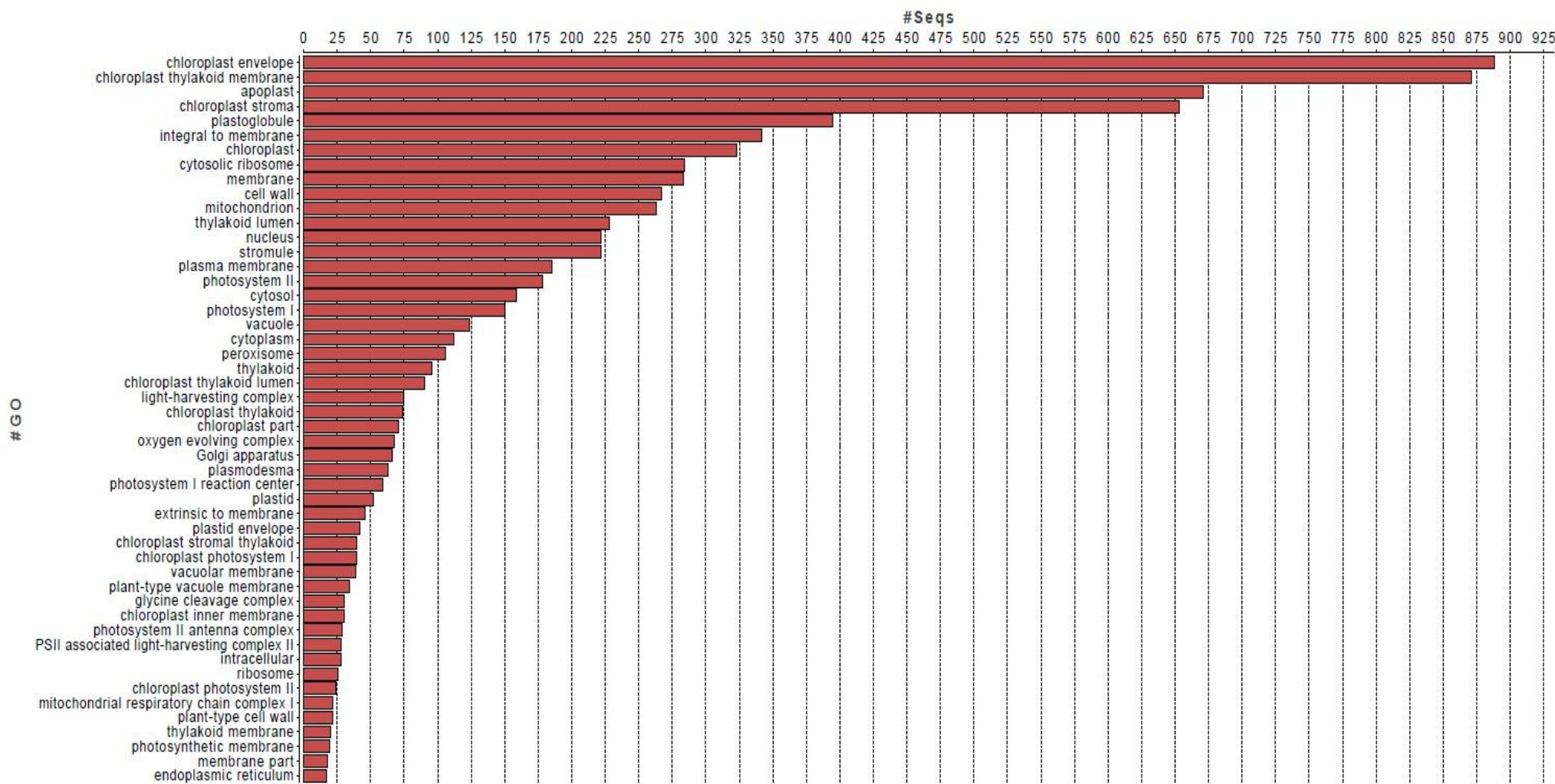


Figura 35. Categorização em componente celular dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de sequências dentro de cada categoria.

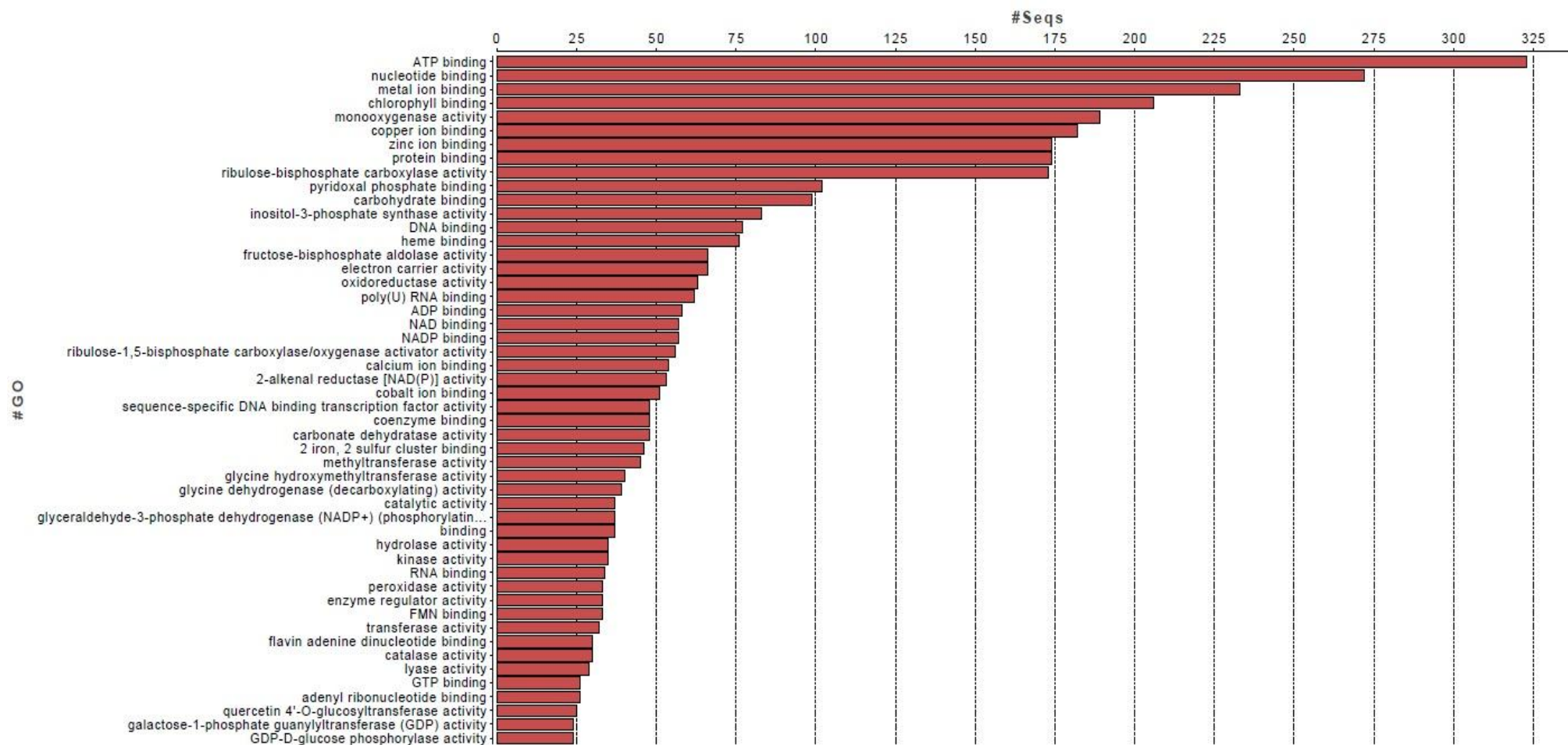


Figura 36. Categorização em função molecular dos GDEs reprimidos na espécie Hamlin 72 horas após a inoculação. O eixo Y representa as categorias e o eixo X o número de seqüências dentro de cada categoria.