

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/05/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE
Xanthomonas citri* subsp. *citri

Catarina Mardegan
Engenheira Agrônoma

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE
Xanthomonas citri* subsp. *citri

Catarina Mardegan

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientadora: Dra. Helen Alves Penha

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

2018

Mardegan, Catarina

M322c Caracterização funcional da ORF XAC0239 de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* / Catarina Mardegan. – – Jaboticabal, 2018
viii, 66 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientadora: Helen Alves Penha

Banca examinadora: José Belasque Junior, Daniel Guariz Pinheiro

Bibliografia

1. Celulose. 2. Fator sigma. 3. Proteína hipotética. 4. Proteína de
membrana. 5. Regulação gênica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE Xanthomonas
citri subsp. citri

AUTORA: CATARINA MARDEGAN

ORIENTADORA: MARIA INES TIRABOSCHI FERRO

COORDINADORA: HELEN ALVES PENHA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Pós-doutoranda HELEN ALVES PENHA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

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

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Catarina Mardegan - Nascida em 28 de maio de 1990, natural de Unaí, Minas Gerais, Brasil. Filha de André Guilherme Mardegan e Hilda Aparecida Souza Mardegan. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal em março de 2010. Durante o curso de graduação fez treinamentos supervisionados e estágios nas áreas de geomática e agricultura de precisão junto ao departamento de Engenharia Agrícola e melhoramento genético de soja, junto ao departamento de Produção Vegetal. No ano de 2014, fez estágio curricular na área de Regulamentação de Biotecnologias na empresa Dow AgroSciences Sementes e Biotecnologia, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Em março de 2016 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na FCAV/UNESP. Durante o Mestrado desenvolveu projetos e atividades científicas sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro e coorientação da pós doutoranda Dr^a. Helen Alves Penha, e a supervisão do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro. O trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia desta mesma faculdade e contou com o apoio do Centro de Recursos Biológicos (CREBio), do Laboratório de Genética de Bactérias de Rio Claro e o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com a concessão de bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro pela oportunidade e confiança em mim depositada;

Ao professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, pelos ensinamentos científicos e de vida e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Dr^a. Helen Alves Penha, que além de coorientadora, se tornou uma amiga, pelas sugestões e conselhos dados.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o convite, e terem contribuído significativamente com o trabalho.

Em especial, aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Jéssica, Ana, Flávia, Julie, Tamiris, Amanda, Flavinha, Juliana, Michelle, Natasha, Dani, Helô, Fernando, Rafael, Danilo, Luis, Bruno, Wallyngson, pelo excelente convívio, apoio nos experimentos e compreensão nos momentos mais difíceis. Com vocês aprendi muito!

Às amigas do CREBio, Agda e Marisa, que muito me ajudaram na realização do trabalho e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e Msc. Lúcia Bonci, ambos do Laboratório de Genética de Bactérias da UNESP, campus de Rio Claro, pelo suporte na realização do ensaio de curva de crescimento *in vitro*.

Às minhas amigas-irmãs jaboticabalenses: Natália, Kristina, Mariana, Gabriela, Talita, Cristal, Fernanda, pelas risadas, compreensão e pela grande família que formamos.

Aos meus familiares, pelo carinho, incentivo e confiança que me fez chegar aonde estou hoje. Especialmente minha mãe (Hilda), pai (André), irmã (Carol) e namorado (Victor), que estão comigo nos melhores e piores momentos. Amo vocês!

À todos que acreditaram, rezaram e permitiram que este momento chegasse.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Citricultura	3
2.2. <i>Xanthomonas citri</i> e o cancro cítrico	4
2.3. Interação planta-patógeno	9
2.4. <i>Domains of Unknown Function</i> (DUFs)	11
2.5. Mutagênese sítio-dirigida por PCR por sobreposição e extensão	12
2.6. Fatores de transcrição sigma	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Geral	16
3.2. Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Seleção e análises <i>in silico</i> da ORF XAC0239	17
4.2. Obtenção do DNA da ORF XAC0239	17
4.3. PCR por sobreposição e extensão	18
4.4. Clonagem no vetor suicida pNPTS138 e transformação de <i>E. coli</i>	21
4.5. Transformação em células eletrocompetentes de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	23
4.6. Teste de patogenicidade	24
4.7. Curva de crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	25
4.8. Curva de crescimento bacteriano <i>in vivo</i>	25
4.9. Ensaio de motilidade <i>swimming</i> e <i>swarming</i>	26
4.10. Ensaio de agregação bacteriana	27
4.11. Formação de biofilme bacteriano	27
4.12. Formação de goma xantana	28
4.13. Teste de degradação de celulose	29
4.14. Modelagem molecular	29
4.15. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Seleção e análises <i>in silico</i> da ORF XAC0239	31
5.2. Obtenção do mutante para a ORF XAC0239	33
5.3. Teste de Patogenicidade	37

	II
5.4. Curvas de crescimento bacteriano	40
5.5. Motilidade bacteriana	42
5.6. Agregação bacteriana	43
5.7. Formação de biofilme bacteriano	44
5.8. Formação de goma xantana	45
5.9. Degradação de celulose	46
5.10. Modelagem molecular	47
6. DISCUSSÃO	49
8. REFERÊNCIAS	57

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO – A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é a bactéria causadora da doença cancro cítrico. A doença atinge todas as variedades comerciais de citros e, o entendimento da relação fitopatogênica permitirá conhecer formas mais eficientes de controle da bactéria. Com o sequenciamento e análise do genoma e transcriptoma da Xac, foram identificadas ORFs que, provavelmente, estão envolvidas em processos de ataque e colonização da bactéria. Para iniciar a caracterização de uma destas ORFs foram utilizadas, neste estudo, as estratégias de mutação sítio-dirigida de PCR por sobreposição e extensão e modelagem molecular. A ORF XAC0239, é predita como proteína de membrana plasmática, e por homologia, possivelmente, pode fazer parte de uma proteína transportadora de zinco, além disso, há indícios de que é regulada por um fator sigma. A mutação teve efeito negativo sobre a ação de celulases e motilidade *swimming* e efeito positivo sobre a formação de biofilme e a multiplicação bacteriana *in vivo*. Aqui é sugerido que na falta desta proteína, houve pouca absorção de zinco, necessário para a formação de biofilme e consequentemente, para a patogenicidade. Além disso, sugestiona-se que, como subterfúgio, a bactéria superexpressou genes para produção e/ou ação de celulases, tentando atacar o hospedeiro de forma alternativa.

Palavras-chave: Celulose, fator sigma, proteína hipotética, proteína de membrana, regulação gênica.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ORF XAC0239 OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ABSTRACT – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) causes the citrus canker disease. The disease reaches all commercial varieties of citrus and, the understanding of the phytopathogenic relationship allow knowing the ways of control of bacteria. With sequencing of the Xac genome and the realization of a transcriptome, ORFs have been identified that are probably involved in bacterial attack and colonization processes. To initiate the characterization of one of these ORFs, in this study, the strategies of site-directed mutagenesis by overlap extension PCR and molecular modeling were used. The ORF XAC0239 is predicted as plasma membrane protein, and by homology may possibly be part of a zinc transporter protein, moreover, there are indications that it is regulated by a sigma factor. The mutation had a negative effect at the cellulases action and swimming motility and a positive effect on biofilm formation and *in vivo* multiplication. Here it is suggested that in the absence of this protein, there was little absorption of zinc, necessary for biofilm formation and consequently for pathogenicity. In addition, it is suggested that, as a subterfuge, the bacteria overexpressed genes for production and / or cellulases action, trying to attack the host on alternative way.

Keywords: Cellulose, sigma factor, hypothetical protein, membrane protein, gene regulation.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Níveis de suscetibilidade de espécies do gênero *Citrus* e relacionadas em relação ao cancro cítrico (MURATA, 2013, adaptado de FEICHTENBERGER et al., 2005; LEITE JUNIOR, 1990; TAZIMA et al., 2008).

Tabela 2. Variedades cítricas contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico cujo transcriptoma foi analisado por RNA-Seq em condições de infecção por Xac.

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante.

Lista de Figuras

Figura 1. Sintomas de cancro cítrico em frutos (A), folhas (B) e ramos (C). Fontes: Fundecitrus (2018a); Gottwald e Graham (2005).

Figura 2. Ciclo e epidemiologia da doença. Fonte: Adaptado de Gottwald e Graham (2005).

Figura 3. Esquema da estratégia de mutação utilizada. Os oligonucleotídeos B e C possuem caudas complementares, e as regiões AB e CD contém, aproximadamente, 800 pb para permitir a recombinação homóloga, eliminando a região compreendida entre os oligonucleotídeos B e C, a qual corresponde à ORF a ser estudada. Adaptado de Lee et al. (2004).

Figura 4. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC0239 (NCBI acesso: AE008923.1) e as regiões flanqueadoras correspondentes a, aproximadamente, 800pb *upstream* e *downstream* à ORF. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas em cinza, amarelo, azul e vermelho, respectivamente, e a região sublinhada corresponde à região nucleotídica da ORF XAC0239.

Figura 5. Mapa do vetor suicida pNPTS138. Fonte: Cappelletti (2010).

Figura 6. Perfil transcricional relativo (*fold-change*) da ORF XAC0239 em oito genótipos de citros e relativos contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico em 48 (verde) e 72 (vermelho) horas após a inoculação com Xac.

Figura 7. Resultados da busca *in silico* nas bases de dados (A) CDD (NCBI) e (B) SignalP 4.0.

Figura 8. Sequência nucleotídica da ORF XAC0239 (em negrito) e 50 nucleotídeos a montante. As sequências sublinhadas representam a região promotora, as sequências coloridas, as tricas dos códons de iniciação (verde) e de terminação (vermelho).

Figura 9. Localização dos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*) A, B, C e D e suas respectivas orientações em relação ao genoma da Xac. A região em rosa representa a ORF XAC0239. Mapa desenhado a partir do *software* 'SnapGene® Viewer' versão 4.1.2.

Figura 10. Diagrama esquemático do processo de deleção da ORF XAC0239, mostrando a região de deleção com os respectivos fragmentos de DNA AB e CD que, quando unidos, formam o fragmento AD.

Figura 11. Eletroforese em gel demonstrando os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados via PCR: AD (1685pb), AB (787pb), CD (767pb) e ADΔ (1554pb). M - padrão de peso molecular "O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder" (Thermo Fisher). Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (10mg.mL⁻¹).

Figura 12. Alinhamento pela ferramenta BLASTn. (A) Esquema da sequência da Xac Δ 0239 em relação à sequência genômica da Xac 306. (B) Comparação nucleotídica do fragmento AB. (C) Comparação nucleotídica do fragmento CD.

Figura 13. Fotodocumentação do teste de patogenicidade na variedade lima ácida 'Galego' em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Sintomas observados aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) das linhagens Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante). Estão representadas as superfícies adaxial (quadro superior) e abaxial (quadro inferior) das folhas.

Figura 14. Fotodocumentação do teste de patogenicidade na variedade laranja doce 'Pera Rio' em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Sintomas observados aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) das linhagens Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante). Estão representadas as superfícies adaxial (quadro superior) e abaxial (quadro inferior) das folhas.

Figura 15. Curva de crescimento bacteriano *in vitro*, contrastando-se o crescimento da Xac WT (selvagem) e da Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias das densidades ópticas por tempo de avaliação (horas). As barras representam os erros padrão.

Figura 16. Curva de crescimento bacteriano *in vivo* na variedade laranja doce 'Pera Rio', contrastando-se o crescimento da Xac WT (selvagem) e da Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias das UFC/mL/cm² por tempo (dias após a inoculação). As barras representam os erros padrão ($p \leq 0,5$).

Figura 17. Análise da motilidade *swimming* e *swarming* da Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante), demonstrando as áreas (cm²) de deslocamento das colônias (A). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), e as barras, o erro padrão das médias. Deslocamento das colônias formadas nos testes de motilidade (B).

Figura 18. Ensaio de agregação bacteriana comparando-se a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). (A) Gráfico com as médias das aferições de densidade óptica (600nm) por tempo de avaliação. (B) registro fotográfico comparando-se as suspensões bacterianas. As barras representam o erro padrão das médias.

Figura 19. Ensaio de formação de biofilme em meio NB e XVM2 suplementado com glicose a 1%, comparando-se a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Os dados representam as médias dos valores de densidade óptica (595nm). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) e as barras, o erro padrão das médias.

Figura 20. Formação de goma xantana pela Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias de quantidade de goma (mg) produzida por bactéria (mg). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) e as barras, o erro padrão das médias.

Figura 21. Degradação de celulose pela Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante) avaliadas por meio da ação de CMCase (atividade de carboximetilcelulose). (A) valores médios das áreas degradadas pela celulase ao redor das colônias e, (B) colônias formadas em meio de cultura com CMC após a coloração com corante Vermelho Congo (1%). H: diâmetro do halo; C: diâmetro da colônia. Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), e as barras, o erro padrão das médias.

Figura 22. Resultados da modelagem molecular da proteína XAC0239 pela ferramenta PHYRE2. (A) Predição de estrutura secundária; (B) Modelo proteico final; (C) Visualização da topologia predita.

Figura 23. Resultado da modelagem molecular pela ferramenta I-TASSER. (A) Predição da estrutura secundária. (B) Modelo proteico final.

Figura 24. Modelo simples proposto para identificação da provável função da ORF XAC0239. A ausência do produto proteico dessa ORF acarretou na redução da formação do biofilme bacteriano, o qual está diretamente relacionado com a capacidade de multiplicação celular e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da doença. Ainda, de maneira compensatória, a bactéria pode estar superexpressando genes relacionados à motilidade tipo *swimming* e degradação de parede celular.

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico está entre as mais preocupantes doenças na produção citrícola, e é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (FERENCE et al., 2017; JALAN et al., 2014). Em decorrência do aumento desta doença abordagens e ferramentas biotecnológicas têm sido desenvolvidas com o intuito de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade e virulência. Com isso, é permitido o desenvolvimento de estratégias mais efetivas para o combate desse fitopatógeno.

Nesse contexto, muitas pesquisas têm sido feitas para elucidar os mecanismos de interação planta-patógeno, entre elas o sequenciamento do genoma da *X. citri* subsp. *citri* 306 realizado por da Silva e colaboradores (2002), o qual abriu portas para muitos estudos. Neste trabalho, foi revelada a presença de um cromossomo circular com 5.175.554 pares de bases (pb), e dois plasmídeos: pXac33 (33.699 pb) e pXac64 (64.920 pb). A anotação do referido genoma, pelo banco de dados UniProt, revelou 4.355 genes que codificam proteínas, entre eles, 1.603 (37,16%) não apresentam função predita, ou seja, são quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs) que codificam proteínas hipotéticas (*Taxon identifier*: 190486, acesso em 30/05/2018) (UNIPROT CONSORTIUM, 2018).

Com base nas informações contidas no genoma da Xac e no banco de dados (XanthostKB - HERAI, *dados não publicados*), o qual apresenta o perfil transcricional de genes deste organismo, foi selecionada para estudos funcionais a ORF XAC0239. Com alta expressão gênica em todas as variedades cítricas analisadas, esta ORF possui 52 aminoácidos, é caracterizada como hipotética, pertencente à família DUF (*Domain of Unknown Function*) 1328 e é classificada como componente celular de membrana plasmática, de acordo com a ferramenta InterProScan (FINN et al., 2016).

Quando se trata da interação patógeno-hospedeiro, há ainda muita informação a ser desvendada e uma forma de aumentar os conhecimentos sobre genes alvo nesse processo é através do estudo de proteínas hipotéticas. Pesquisas sobre domínios proteicos e famílias permitem sugerir uma função específica, entretanto essas predições são, geralmente, feitas *in silico*, devido à grande quantidade de informações contidas em bancos de dados. Para complementá-las, são necessárias evidências experimentais que comprovem suas funções (BASHIR et al., 2017), bem como seu papel na patogenicidade.

Devido ao déficit de pesquisas sobre a ORF XAC0239 da *X. citri* subsp. *citri*, o presente trabalho visou avaliá-la, permitindo inferir o papel deste gene no processo de infecção bacteriana. Dentre as abordagens utilizadas para esta finalidade, a mutação pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por sobreposição e extensão seguida de recombinação homóloga (LEE et al., 2004) foi a escolhida por se tratar de uma estratégia eficiente em estudos sobre função gênica, uma vez que torna exequível a deleção da ORF que codifica a proteína.

Uma vez obtido o mutante de Xac para a ORF XAC0239, foram feitos experimentos *in vivo* e *in vitro*, de modo a tentar classificá-la e/ou inferir o seu papel no desenvolvimento da doença.

7. CONCLUSÕES

O produto proteico da ORF XAC0239 possui relação direta ou indireta no processo de patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em citros, uma vez que:

O gene XAC0239 está altamente expresso nos processos de infecção iniciais de Xac 306 nas variedades 'Kumquat' (*Fortunella* spp.) e 'Pera-Rio' (*C. sinensis*);

A mutação do gene *Xac0239* afeta a multiplicação celular da Xac 306 e produção dos sintomas de cancro cítrico em laranja doce 'Pera Rio' e lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*);

O gene *Xac0239* atua na formação de biofilme, visto que, em sua ausência, foi reduzida sua produção em meio de cultura XVM2 e NB;

O gene *Xac0239* pode ter relação com a motilidade tipo *swimming*, dado que o mutante Δ Xac0239 apresentou um aumento nessa movimentação;

Na carência de colonizar a superfície do hospedeiro via formação de biofilme, a bactéria pode ter tentando, de maneira alternativa, infectar o hospedeiro por meio do aumento da degradação de celulose;

A proteína XAC0239 está ancorada na membrana plasmática e seu gene é regulado por um fator sigma, o qual possui ação diretamente relacionada a respostas de estresse, como condições infectantes.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. Transcriptome: connecting the genome to gene function. **Nat Educ**, v. 1, n. 1, p. 195, 2008.

AMARAL, A. M.; CARVALHO, S. A.; SILVA, L. F. C.; MACHADO, M. A. Reaction of genotypes of Citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology**, p. 519-524, 2010.

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S. A.; MACHADO, M. A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1201-1205, 2005.

AZGHANI, A. O.; IDELL, S.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. **Microbial Pathogenesis**, v. 33, n. 3, p. 109-114, 2002.

BAHADUR, R. P.; BASAK, J. Molecular modeling of protein–protein interaction to decipher the structural mechanism of nonhost resistance in rice. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 32, n. 4, p. 669-681, 2014.

BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A.; HOMEM, R. A.; TORRES, P. S.; VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M. D. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 146-153, 2010.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. 1. ed. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2015. p. 247-278.

BATEMAN, A.; COGGILL, P.; FINN, R. D. DUFs: families in search of function. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, n. 10, p. 1148-1152, 2010.

BEHLAU, F.; BARELLI, N. L.; BELASQUE JR, J. Lessons from a case of successful eradication of citrus canker in a citrus-producing farm in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 3, p. 561-568, 2014.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J. Cancro cítrico: a doença e seu controle. **Fundecitrus, Araraquara, Brasil**, 2014.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, n. 10, 1957.

BORATYN, G. M.; CAMACHO, C.; COOPER, P. S.; COULOURIS, G.; FONG, A.; MA, N.; MADDEN, T. L.; MCGINNIS, S. D.; MERZHUH, Y.; et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W29-W33, 2013.

BORUKHOV, S.; NUDLER, E. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 2, p. 93-100, 2003.

BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.

BRASIL. Instrução Normativa nº 37, 5 de setembro de 2016. Estabelece procedimentos a serem adotados no Estado de São Paulo visando a supressão/erradicação da praga denominada cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 2016.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

CAPPELLETTI, P. A. **Identificação e análise funcional de interações proteína-proteína do sistema de secreção do tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CAVALLINI, J. S. **Expressão gênica diferencial de laranja pêra rio (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e lima ácida “galego” (*Citrus aurantifolia* Swingle) em resposta à infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

CHATTERJEE, A.; CUI, Y.; LIU, Y.; DUMENYO, C. K.; CHATTERJEE, A. K. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1959-1967, 1995.

CHEN, H.; KANDEL, P. P.; CRUZ, L. F.; COBINE, P. A.; DE LA FUENTE, L. The Major Outer Membrane Protein MopB Is Required for Twitching Movement and Affects Biofilm Formation and Virulence in Two *Xylella fastidiosa* strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 11, p. 896-905, 2017.

CHEN, Y. Y.; WU, C. H.; LIN, J. W.; WENG, S. F.; TSENG, Y. H. Mutation of the gene encoding a major outer-membrane protein in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causes pleiotropic effects, including loss of pathogenicity. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2842-2854, 2010.

CHOI, C. H.; LEE, J. S.; LEE, Y. C.; PARK, T. I.; LEE, J. C. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 216, 2008.

CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus [*Xanthomonas campestris*]. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 1984.

CLAYTON, S. R.; HEURILIER, K.; OSHIMA, T.; HOBMAN, J. L. Copper and zinc stress in bacteria. In: KIDD, S. P. **Stress response in Pathogenic Bacteria**. Adelaide, CABI, 2011. cap. 11. ISBN: 9781845937607.

COBINE, P. A.; CRUZ, L. F.; NAVARRETE, F.; DUNCAN, D.; TYGART, M.; DE LA FUENTE, L. *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm and planktonic cells. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54936, 2013.

COFRE, T. C. G. **Transcriptoma (RNA-seq) de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Kumquat (*Fortunella* spp.) infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

DA SILVA, A. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459, 2002.

DE OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. D. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. D. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Embrapa Clima Temperado**. 2014.

DONG, T. G.; MEKALANOS, J. J. Characterization of the RpoN regulon reveals differential regulation of T6SS and new flagellar operons in *Vibrio cholerae* O37 strain V52. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 16, p. 7766-7775, 2012.

DONG, T.; SCHELLHORN, H. E. Role of RpoS in virulence of pathogens. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 887-897, 2010.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, p. 239-269, 2005.

REFERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; & JONES, J. B. Recent Advances in Understanding *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathogenesis and Citrus Canker Disease Management. **Molecular Plant Pathology**, 2017.

FINN, R. D.; ATTWOOD, T. K.; BABBITT, P. C.; BATEMAN, A.; BORK, P.; BRIDGE, A. J.; CHANG, H. Y.; DOSZTÁNYI, Z.; EL-GEBALI, S.; GOUGH, M. F. J.; et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D190-D199, 2016.

FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SALAZAR, G. A.; et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279-D285, 2015.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. Doenças e Pragas. 2018. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em: 21 mar. 2018a.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. Levantamentos. 2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/levantamento-doencas-2017.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2018b.

GATI, C.; STETSENKO, A.; SLOTBOOM, D. J.; SCHERES, S. H.; GUSKOV, A. The structural basis of proton driven zinc transport by ZntB. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1313, 2017.

GICHARU, G. K.; SUN, D. L.; XUN, H. U.; FAN, X. J.; TAO, Z. H. U. O.; WU, C. W.; ZOU, H. S. The sigma 54 genes rpoN1 and rpoN2 of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* play different roles in virulence, nutrient utilization and cell motility. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 2032-2039, 2016.

GOODACRE, N. F.; GERLOFF, D. L.; UETZ, P. Protein domains of unknown function are essential in bacteria. **MBio**, v. 5, n. 1, p. e00744-13, 2014.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. Citrus canker. **The Plant Health Instructor**. 2000.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 10, p. 32, 2002.

GUO, Y.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649-661, 2011.

GUO, Y.; SAGARAM, U. S.; KIM, J. S.; Wang, N. Requirement of the *galU* gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth in planta of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2234-2242, 2010.

GUZZO, C. R.; SALINAS, R. K.; ANDRADE, M. O.; FARAH, C. S. PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, n. 4, p. 848-866, 2009.

HANSMANN, D.; FIER, G.; BUCETA, R. C. New Insights into the Dynamics of Swarming Bacteria: A Theoretical Study. **arXiv preprint arXiv:1612.06267**, 2016.

HERZBERG, M.; BAUER, L.; KIRSTEN, A.; NIES, D. H. Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 313-326, 2016.

HSIEH, P. F.; LIU, J. Y.; PAN, Y. J.; WU, M. C.; LIN, T. L.; HUANG, Y. T.; WANG, J. T. *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 10, p. 1580-1589, 2013.

HU, Y.; DUAN, S.; ZHANG, Y.; SHANTHARAJ, D.; JONES, J. B.; WANG, N. Temporal transcription profiling of sweet orange in response to PthA4-mediated *Xanthomonas citri* subsp. *citri* infection. **Phytopathology**, v. 106, n. 5, p. 442-451, 2016.

HYUN, Y.; KIM, J.; CHO, S. W.; CHOI, Y.; KIM, J. S.; COUPLAND, G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. **Planta**, v. 241, n. 1, p. 271-284, 2015.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola** – Estatística da Produção Agrícola. 2018.

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

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 551, 2013.

JALAN, N.; YAN, Q.; KOGENARU, S.; GUO, Y.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WANG, N. Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species. In: **Genomics of Plant-Associated Bacteria**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 151-176, 2014.

JING, G.; XUE, S.; ZOU, L. F.; ZOU, H. S.; CHEN, G. Y. The small and large subunits of carbamoyl-phosphate synthase exhibit diverse contributions to pathogenicity in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 7, p. 1338-1347, 2015.

JING, Z.; FENG, H. Studies on the Molecular Docking and Amino Acid Residues Involving in Recognition of Substrate in Proline Iminopeptidase by Site-Directed Mutagenesis. **The Protein Journal**, v. 34, n. 3, p. 173-180, 2015.

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 527-543, 2005.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S. YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845, 2015.

KHAN, N. A.; SHIN, S.; CHUNG, J. W.; KIM, K. J.; ELLIOTT, S., WANG, Y.; KIM, K. S. Outer membrane protein A and cytotoxic necrotizing factor-1 use diverse signaling mechanisms for *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 1, p. 35-42, 2003.

KOGENARU, S.; QING, Y.; GUO, Y.; WANG, N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 629, 2012.

KULESUS, R. R.; DIAZ-PEREZ, K.; SLECHTA, E. S.; ETO, D. S.; MULVEY, M. A. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3019-3026, 2008.

LACERDA L. A.; CAVALCA L. B.; MARTINS P. M. M.; GOVONE M. B.; BACCI JR M.; FERREIRA H. Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, v. 90, p. 44-52, 2017.

LAGO M.; MONTEIL V.; DOUCHE T.; GUGLIELMINI J.; CRISCUOLO A.; MAUFRAIS C.; MATONDO M.; NOREL F. Proteome remodelling by the stress sigma factor RpoS/ σ^S in *Salmonella*: identification of small proteins and evidence for post-transcriptional regulation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2127, 2017.

LAIA M. L.; MOREIRA L. M.; DEZAJACOMO J.; BRIGATI J. B.; FERREIRA C. B.; FERRO M. I.; SILVA A.C .; FERRO J. A. OLIVEIRA J. C. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 12, 2009.

LEE, B. M.; PARK, Y. J.; PARK, D. S.; KANG, H. W.; KIM, J. G.; SONG, E. S.; PARK, I. C.; YOON, U. H.; HAHN, J. H.; KOO, B. S.; et al. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. 577-586, 2005.

LEE, J.; LEE, H. J.; SHIN, M. K.; RYU, W. S. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **Biotechniques**, v. 36, n. 3, p. 398-401, 2004.

LEE, M. C.; WENG, S. F.; TSENG, Y. Flagellin gene *fliC* of *Xanthomonas campestris* is upregulated by transcription factor Clp. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 307, n. 3, p. 647-652, 2003.

LEITE JÚNIOR, R. P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná (Circular nº 61). Londrina: IAPAR, 51 p. 1990.

LIU, H.; DONG, C.; ZHAO, T.; HAN, J.; WANG, T.; WEN, X.; HUANG, Q. Functional analysis of the ferric uptake regulator gene *fur* in *Xanthomonas vesicatoria*. **PloS One**, v. 11, n. 2, p. e0149280, 2016.

LUO, H.; GAO, F.; LIN, Y. Evolutionary conservation analysis between the essential and nonessential genes in bacterial genomes. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13210, 2015.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 819-829, 2011.

MARCHLER-BAUER, A.; BO, Y.; HAN, L.; HE, J.; LANCZYCKI, C. J.; LU, S.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D200-D203, 2016.

MARTINELLI, F.; URATSU, S. L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R. L.; PHU, M. L.; BRITTON, M.; BUFFALO, V.; FASS, J.; LEICHT, E.; ZHAO, W.; et al. Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e38039, 2012.

MATTINEN, L.; TSHUIKINA, M.; MÄE, A.; Pirhonen, M. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 12, p. 1366-1375, 2004.

MATTOS JUNIOR, D. D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. D.; POMPEU JUNIOR, J. **CITROS: principais informações e recomendações de cultivo**, 2005.

MUKHERJEE, A.; CUI, Y.; MA, W.; LIU, Y.; ISHIHAMA, A.; EISENSTARK, A.; CHATTERJEE, A. K. RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 14, p. 3629-3634, 1998.

MURATA, M. M. **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**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2. ed. Porto Alegre. 2014.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015. **Pensa Boletim Online**, São Paulo, 2006.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **Ribeirão Preto: CitrusBR**, 2010.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509-1519, 2017.

PERON, G. C. **Identificação de genes de resistência a *Xanthomonas citri* subsp *citri*, agente causal do cancro cítrico**. 2014. Monografia (Graduação em Agronomia) – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. . SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785, 2011.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S. X.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; LU, L. F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D. J.; TANG, H.; et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v. 15, n. 6, p. 757-767, 2005.

RANI, T. S.; TAKAHASHI, D.; UEMURA, M.; PODILE, A. R.; et al. Proteins associated with oxidative burst and cell wall strengthening accumulate during citrus-*Xanthomonas* non-host interaction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 5, p. 1349-1360, 2015.

RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P. S.; QÜESTA, J.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; et al. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 10, p. 1222-1230, 2007.

ROMEIRO, R. D. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring harbor laboratory press, 1989.

SCHUBERT, T. S.; SUN, X. Bacterial citrus canker. (Fifth revision) Florida Department of Agriculture & Conservancy Services. **Plant Pathology Circular**. v.377, 2003.

SHINGLER, V. Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409-416, 1996.

SOUW, P.; DEMAİN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.

SPIRIDONOV, N. A.; WILSON, D. B. A *celR* mutation affecting transcription of cellulase genes in *Thermobifida fusca*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 1, p. 252-255, 2000.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J. H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, p. gkw937, 2016.

TANG, D. J.; LI, X. J.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; CHEN, B.; TANG, J. L. The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 18, n. 7, p. 652-658, 2005.

TAZIMA, Z. H.; AULER, P. A. M.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JÚNIOR, R. P. Comportamento de clones de laranja ‘Valência’ na região norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 970-974, 2008.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, A.; KAY, S.; et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7254-7266, 2005.

TIAN, F.; YU, C.; LI, H.; WU, X.; LI, B.; CHEN, H.; WU, M.; HE, C. Alternative sigma factor RpoN2 is required for flagellar motility and full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Microbiological research**, v. 170, p. 177-183, 2015.

UNIPROT CONSORTIUM et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 5, p. 2699, 2018.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Citrus: World Markets and Trade. 2018. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: 06 fev, 2018.

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

WOLF, J. B. W. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 559-572, 2013.

WORLOCK, A. J.; SMITH, R. L. ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4369-4373, 2002.

WU, H.; YU, X.; CHEN, L.; WU, G. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27. **Protein expression and purification**, v. 95, p. 22-27, 2014.

XIA, T.; LI, Y.; SUN, D.; ZHUO, T.; FAN, X.; ZOU, H. Correction: Identification of an Extracellular Endoglucanase That Is Required for Full Virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **PloS One**, v. 11, n. 5, p. e0156458, 2016.

XU, Q.; CHEN, L. L.; RUAN, X.; CHEN, D.; ZHU, A.; CHEN, C.; BERTRAND, D.; JIAO, W. B.; HAO, B. H.; LYON, M. P.; et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 59, 2013.

YAN, Q.; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular Plant- Microbe Interactions**. v.25, n.1, p.69-84, 2012.

YAN, Q.; WANG, N. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1590-1599, 2011.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7, 2015.

YANG, T. C.; LEU, Y. W.; CHANG-CHIEN, H. C.; HU, R. M. Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2266-2275, 2009.