

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EXPRESSÃO GÊNICA DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*
COLONIZANDO LARANJA DOCE ‘PÊRA RIO’ (*Citrus*
sinensis* (L.) Osbeck) e LIMA ÁCIDA ‘GALEGO’ (*Citrus
***aurantifolia* Swingle)**

Aline Cristina Lopes
Bióloga

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EXPRESSÃO GÊNICA DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*
COLONIZANDO LARANJA DOCE ‘PÊRA RIO’ (*Citrus*
sinensis* (L.) Osbeck) e LIMA ÁCIDA ‘GALEGO’ (*Citrus
***aurantifolia* Swingle)**

Aline Cristina Lopes

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Dr. Roberto Hirochi Herai

Coorientadora: Dra. Juliana da Silva Vantini

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

2016

L864e Lopes, Aline Cristina
Expressão Gênica de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* colonizando
laranja doce 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e lima ácida
'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle) / Aline Cristina Lopes. – –
Jaboticabal, 2016
vii, 74 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Coorientadores: Roberto Hirochi Herai, Juliana da Silva Vantini
Banca examinadora: Priscila Lupino Gratão, José Belasque Junior
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Estresse oxidativo. 3. Interação planta-
patógeno. 4. qRT-PCR. 5. RNA-seq. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.23:634.31

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

Aline Cristina Lopes – nascida em 09 de maio em 1990, no município de Bebedouro, São Paulo, filha de Valéria Cristina Motta Lopes e Luiz Arnaldo Lopes. Formou-se em Ciências Biológicas em 2012 pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA. Em agosto de 2013 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. O trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP, com bolsa da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e Coorientações do Dr. Roberto Hiroshi Herai e Dra. Juliana da Silva Vantini.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

À 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 de Jaboticabal – Unesp/FCAV, pela oportunidade da realização do mestrado.

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

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela orientação e ensinamentos, que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À minha coorientadora Dra. Juliana da Silva Vantini pela excepcional ajuda no trabalho, pelos anos de amizade e pela paciência em sempre estar disposta a me incentivar, apoiar e confiar.

Ao meu coorientador Dr. Herai, pela disponibilidade e apoio para o bom desenvolvimento do meu trabalho.

À Profa. Dra. Maria Inês T. Ferro, pelo apoio e disponibilidade de materiais e das instalações do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão, por ceder o espaço e equipamentos do Laboratório de Fisiologia Vegetal e em especial à Soninha, Antônio, Lucas e Cássia pela ajuda concedida.

Aos professores, pesquisadores e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular da Unesp (LBM) e do CREBIO pela convivência, amizade e apoio nos experimentos, especialmente o Prof. Daniel por toda sua colaboração.

Aos amigos do LBM e CREBIO Agda, Amanda, Ana, Ângela, Claudênia, Daniele, Flávia Carvalho, Flavinha, Helen, Julie, Lucília, Mariza, Michele, Rafael, Raquel, Tamiris, Thaísa, obrigada por tudo.

Ao Doutorando Elkin Fernando (“hijo”), não teria palavras que poderiam expressar minha gratidão por esses anos de convivência, apoio e auxílio em meu trabalho, sua participação foi essencial para que chegasse ao fim, espero que nossa amizade atravessasse fronteiras.

À Aline Belesini e Bruna, pelos momentos de amizade e descontração nas nossas caminhadas, e por me acolherem com tanto carinho nas vezes que precisei, obrigada pela amizade;

À Sônia, por estar sempre presente mesmo que por telefone nos momentos em que mais precisei, e por sempre me incentivar a acreditar em mim.

Ao Kalil, pela amizade, confiança, e por estar sempre disponível, quando mais precisei conversar.

À minha família, aos meus pais, Valéria (*in memoriam*) e Luiz, à minha avó Alice, e à minha gata Pandora, em especial minha prima Allana, pelos momentos de descontração.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Citricultura.....	3
2.2. Cancro Cítrico.....	4
2.2.1. História e sintomas da doença.....	4
2.2.2. Agente etiológico.....	6
2.3. Interação Planta-Patógeno.....	7
2.4. Espécies reativas de Oxigênio (EROS).....	10
2.5. PCR quantitativa em Tempo Real.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Material vegetal e estirpe bacteriana.....	14
4.2. Curva de crescimento e avaliação dos sintomas.....	14
4.3. Extração de RNA total de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	15
4.4. Concentração, pureza e integridade do RNA Total extraído.....	16
4.5. Sequenciamento RNA-Seq.....	17
4.6. Análise dos transcriptomas nas duas interações de Xac com citros.....	18
4.7. PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).....	19
4.7.1. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA).....	19
4.7.2. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	19
4.7.3. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores.....	21
4.7.4. Curva Padrão e eficiência da amplificação da PCR.....	22
4.7.5. Método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct).....	23
4.7.6. Análises estatísticas dos dados.....	23
4.8. Peroxidação Lipídica.....	24
4.9. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	25
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Curva de crescimento e avaliação dos sintomas de de Xac em laranja doce ‘Pêra Rio’ e lima ácida Galego’.....	25

5.2. Análise do transcriptoma da Xac infectando laranja doce 'Pêra Rio' ou lima ácida 'Galego'	28
5.3. Expressão gênica global e temporal de Xac inoculada em laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego'	29
5.4. Análise da expressão relativa dos genes de patogenicidade.....	40
5.5. Identificação e classificação dos genes modulados em Xac em resposta ao estresse oxidativo dos citros.....	43
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE.....	70

EXPRESSÃO GÊNICA DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COLONIZANDO LARANJA DOCE ‘PÊRA RIO’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e LIMA ÁCIDA ‘GALEGO’ (*Citrus aurantifolia* Swingle)

RESUMO - A citricultura é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro. Entretanto, inúmeras pragas e doenças atacam os citros, causando grandes prejuízos econômicos. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), é um grave problema para o setor, não havendo ainda um método eficaz para o seu controle. Neste estudo, utilizando RNASeq, foram analisados os perfis transcricionais de Xac inoculada em duas espécies de citros contrastantes à doença: laranja doce ‘Pêra Rio’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck), menos suscetível e lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* Swingle), altamente suscetível, às 48 e 72 horas após a infecção (hai), com o objetivo de identificar genes de Xac envolvidos no processo de infecção. Foram identificados 80 genes de Xac diferencialmente expressos (GDEs) no hospedeiro laranja doce ‘Pêra Rio’, sendo 41 e 39 nos tempos de 48 e 72 hai, respectivamente. Em lima ácida ‘Galego’ foram identificados 82 GDEs, sendo 40 no tempo de 48 hai e 42 em 72 hai. Alguns destes genes diferencialmente expressos foram avaliados pela técnica de PCR quantitativa em tempo real, sendo estes *hpa1*, *hrpE*, *hrpW*, *virK*, *ahpC*, *katE*, *katG*, *cydA* e *cydB*, os quais estão envolvidos na patogenicidade e virulência, na defesa ao estresse oxidativo e na fosforilação oxidativa. Os genes de patogenicidade e virulência foram induzidos em Xac em ambos os hospedeiros, enquanto que os genes relacionados à cadeia respiratória foram inibidos em ambos os hospedeiros, com maior inibição em lima ácida ‘Galego’. No entanto, os genes relacionados ao estresse oxidativo apresentaram um perfil de expressão maior em Xac na interação com laranja doce ‘Pêra Rio’ do que em lima ácida ‘Galego’, principalmente *ahpC* e *katG*. A determinação da concentração de H₂O₂ nas folhas revelou que laranja doce ‘Pêra Rio’, espécie menos suscetível ao cancro cítrico, possui maior quantidade de H₂O₂ do que lima ácida ‘Galego’, espécie altamente suscetível. Isso sugere que a menor susceptibilidade ao cancro cítrico da laranja ‘Pêra Rio’ pode estar relacionada com a maior quantidade de H₂O₂ presente nesta espécie, o que leva a bactéria a ativar seu arsenal de enzimas para combater o estresse oxidativo do meio, retardando a infecção.

Palavras-chave: cancro cítrico, estresse oxidativo, interação planta-patógeno, qRT-PCR e RNA-Seq.

GENE EXPRESSION OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri* COLONIZING SWEET ORANGE 'PÊRA RIO ' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and MEXICAN LIME 'GALEGO' (*Citrus aurantifolia* Swingle)

ABSTRACT - The citrus industry is one of the main activities of Brazilian agribusiness. However, many pests and diseases attack citrus, causing great economic losses. The citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), is a major problem for the sector, there is not yet an effective method for its control. In this study, the transcriptional profiles of Xac inoculated in two species of contrasting citrus disease were analyzed using RNA-Seq : sweet orange 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), moderately tolerant and Mexican Lime 'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle) highly susceptible at 48 and 72 hours after infection (hai) aiming to identify Xac genes involved in the infection process. We identified 80 Xac differentially expressed genes (DGE) in sweet orange 'Pera Rio', 41 and 39 at 48 and 72 hai, respectively. In Mexican Lime 'Galego' 82 DGE were identified, 40 at 48 and 42 at 72 hai. Some of these differentially expressed genes were evaluated by real time quantitative PCR : hpa1, hrpE, hrpW, Virk, ahpC, KatE, katG, cyda and cydB, which are involved in pathogenicity and virulence, oxidative stress defense and oxidative phosphorylation. The pathogenicity and virulence genes were induced in Xac in both hosts, whereas the respiratory chain-related genes were inhibited in both hosts with greater inhibition in Mexican lime 'Galego'. However, genes related to oxidative stress showed a higher expression profile in Xac interaction with sweet orange 'Pera Rio' than with Mexican lime 'Galego', mainly ahpC and katG. The determination of H₂O₂ concentration in leaves revealed a higher amount of H₂O₂ in sweet orange 'Pêra Rio' moderately tolerant to citrus canker, than in Mexican Lime 'Galego' highly susceptible to citrus canker. The results suggests that the lower susceptibility to citrus canker orange 'Pera Rio' may be related to the greater amount of H₂O₂ present in this specie, which leads the bacteria to activate their arsenal of enzymes to fight oxidative stress environment, slowing the infection.

Keywords: citrus canker, oxidative stress, plant-pathogen interaction, qRT-PCR and RNA-Seq.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sintomas de cancro cítrico na forma de lesões em folha, ramo e fruto de citros. Fonte: FUNDECITRUS.....	5
Figura 2. Curva de crescimento de Xac nas espécies laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego' até o 20º dia após a inoculação. Valores em Log ₁₀ UFC/mL.....	26
Figura 3. Comparação dos sintomas de cancro cítrico em ambos os hospedeiros, aos 6, 11, 16 e 25 dias após inoculação com suspensão de Xac a 10 ⁶ UFC/mL.....	27
Figura 4. Diagramas de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos de Xac inoculada em laranja doce 'Pêra Rio' (A) e lima ácida 'Galego' (B) nos tempos de 48 e 72 horas. Os diagramas mostram o número de genes em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou que são exclusivos de cada tempo.....	29
Figura 5. Distribuição dos genes diferencialmente expressos (GDEs) de Xac nas espécies moderadamente tolerante laranja doce 'Pêra Rio' e altamente suscetível lima ácida 'Galego', 48 e 72 horas (RNA-seq). As barras em vermelhas indicam a quantidade de genes induzidos e as barras verdes indicam a quantidade de genes reprimidos.....	30
Figura 6. Classificação dos genes induzidos de Xac inoculada no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada caso.....	35
Figura 7. Classificação dos genes reprimidos de Xac inoculada no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada caso.....	36
Figura 8. Classificação dos genes induzidos de Xac inoculada no hospedeiro lima ácida 'Galego' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada caso.....	36
Figura 9. Classificação dos genes reprimidos de Xac inoculada no hospedeiro lima ácida 'Galego' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada caso.....	37

- Figura 10. Matriz de expressão (“Heatmap”) dos genes relacionados à patogenicidade de Xac nos hospedeiros lima ácida ‘Galego’ (LG) e laranja doce ‘Pêra Rio’ (PR), ambos nos tempos 48 e 72 horas após a inoculação. A escala de cores varia da cor verde, que indica os genes reprimidos para a cor vermelha que indica os genes induzidos..... 38
- Figura 11. Matriz de expressão (“Heatmap”) dos genes relacionados ao estresse oxidativo, fosforilação oxidativa e sistema locomotor de Xac nos hospedeiros lima ácida ‘Galego’ (LG) e laranja doce ‘Pêra Rio’ (PR), ambos nos tempos 48 e 72 horas após a inoculação. A escala de cores varia da cor verde, que indica os genes reprimidos para a cor vermelha que indica os genes induzidos..... 38
- Figura 12. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *hpa1*, *hrpE*, *hrpW* e *virK* de Xac nos hospedeiros laranja doce ‘Pêra Rio’ e lima ácida ‘Galego’. (A) 48 horas após a infecção. (B) 72 horas após infecção..... 40
- Figura 13. Quantidade de MDA (nmol/mg massa fresca) em folhas de lima ácida ‘Galego’ nos tempos de 48 horas e 72 horas..... 43
- Figura 14. Quantidade de MDA (nmol/mg massa fresca) em folhas de laranja doce ‘Pêra Rio’ nos tempos de 48 horas e 72 horas..... 43
- Figura 15. Quantidade de H₂O₂ em lima ácida ‘Galego’ e laranja doce ‘Pêra Rio’ 48 horas após a inoculação de Xac. Os dados acompanhados por asteriscos (*) possuem significância estatística segundo o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. 45
- Figura 16. Quantidade de H₂O₂ em lima ácida ‘Galego’ e laranja doce ‘Pêra Rio’ 72 horas após a inoculação de Xac. Os dados acompanhados por asteriscos (*) possuem significância estatística segundo o teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 45
- Figura 17. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *cydA* e *cydB* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* no hospedeiro lima ácida ‘Galego’ nos tempos de 48 e 72 horas após infecção..... 48
- Figura 18. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *cydA* e *cydB* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* no hospedeiro laranja doce ‘Pêra Rio’ nos tempos de 48 e 72 horas após infecção..... 48
- Figura 19. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *ahpC*, *katE* e *katG* de Xac no hospedeiro lima ácida ‘Galego’ nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção..... 50

Figura 20. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *ahpC*, *katE* e *katG* de Xac no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção..... 51

Figura 21. Modelo esquemático dos mecanismos envolvidos na interação da Xac com o hospedeiro citros. (1) Um sinal externo da planta induz a expressão de diversos genes de virulência na Xac, principalmente os relacionados com o SST3, efetores proteicos do tipo III e genes do sistema de secreção tipo II (SST2). Paralelamente, os LPS e outros PAMPs (Padrões moleculares associados à patógeno) da bactéria são identificados por receptores específicos da planta hospedeira, ativando os genes de defesa contra o patógeno. (2) Esta resposta é denominada imunidade ativada por PAMP (PTI- PAMP-triggered immunity), que induz uma cascata de sinais, resultado na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e reação de hipersensibilidade (HR) se a planta for resistente. (2) Por outro lado, a bactéria também produz e transloca proteínas da família AVrB3/PthA que modulam a expressão de genes da planta hospedeira. (3) No caso de EROS, a bactéria tenta anular a ação desses produtos através da produção de catalases e peroxidases que são reguladas pelo regulador OxyR. (4) Diminuindo também a expressão de genes envolvidos na própria cascata respiratória..... 53

1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades agroindustriais que contribui enormemente para a economia mundial, mas sua produção vem sendo constantemente ameaçada por várias doenças, entre elas o cancro cítrico asiático ou cancriose A, forma mais agressiva e propagada da doença. Esta doença é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que afeta diversos hospedeiros de citros de importância comercial. Como não há um método curativo para esta doença, a mesma leva a significativas perdas de produção não só no Brasil como em todo o mundo (GUO et al., 2011), ocasionando assim um grande impacto econômico na atividade citrícola.

A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica estrita, bastonetiforme e uniflagelar. Ela invade os tecidos da planta hospedeira através dos estômatos ou hidatódios, ou por meio de ferimentos mecânicos, instalando-se no apoplasto de folhas, frutos e ramos jovens (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; ZIMARO et al., 2013). Além disso, a presença nos pomares da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) auxilia na disseminação do cancro cítrico, devido à formação de galerias na superfície foliar, facilitando a penetração da bactéria (CHAGAS et al., 2001). Comercialmente, existem vários hospedeiros de citros que se comportam de maneira diferente em relação ao cancro cítrico, podendo apresentar suscetibilidade ou resistência à doença. A maioria das espécies cultivadas são hospedeiras da Xac e suscetíveis à doença (GOTTWALD et al., 2002).

Os sintomas da doença incluem lesões de cancro nos frutos e partes aéreas da planta, e as infecções podem resultar em desfolha e queda de frutos, diminuindo desse modo a produtividade de árvores afetadas. Até o momento não há uma maneira eficiente de controle do cancro cítrico (AN; MOU, 2012). Uma forma de conter essa doença é por meio da erradicação e queimada das plantas suspeitas ou infectadas (FU et al., 2013).

As informações sobre os mecanismos de resposta de defesa das plantas é um passo indispensável para um possível sucesso no controle efetivo da doença, uma vez que estes mecanismos estão sob controle genético. Compreender a interação dos genes de tolerância do hospedeiro com genes de virulência do patógeno é extremamente importante para se interferir positivamente a favor do hospedeiro. Após o sequenciamento completo do genoma da Xac isolado 306 (DA SILVA et al., 2002), tornou-se possível a utilização de ferramentas de genômica funcional para a identificação dos genes responsáveis pela interação com o hospedeiro citros.

Diversos genes envolvidos em patogenicidade e virulência foram descritos no genoma da Xac. No entanto, o conhecimento completo do arsenal utilizado pela Xac na colonização e no desenvolvimento da doença ainda não é totalmente conhecido, considerando que 31% das ORFs contidas no genoma correspondem a proteínas sem função definida e que, dentre essas, muitas podem codificar proteínas com funções importantes na patogenicidade e virulência da bactéria, porém ainda desconhecidas (DA SILVA et al., 2002).

Desta forma, estudos de expressão gênica no patossistema Xac-citros se fazem necessários para a identificação dos genes envolvidos na patogenicidade e virulência de Xac. O sequenciamento em larga escala, por sequenciadores de segunda geração, dos mRNAs expressos em um dado momento ou situação, denominado de RNA-Seq, é uma ferramenta poderosa para o estudo da expressão gênica, sendo capaz de revelar transcritos raros e até mesmo transcritos ainda não identificados em banco de dados, proporcionando assim um quadro mais preciso e acurado do transcriptoma (MARTINELLI et al., 2012). O conhecimento do transcriptoma comparativo de Xac infectando genótipos contrastantes quanto aos níveis de suscetibilidade ao cancro cítrico, é uma estratégia que possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares utilizados pela Xac para sobrepujar os mecanismos de defesa da planta. Assim, no presente trabalho, analisou-se o transcriptoma de Xac infectando laranja doce ‘Pêra Rio’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), hospedeiro menos suscetível ao cancro cítrico, e lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* Swingle), hospedeiro altamente suscetível à doença

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura

A citricultura é uma atividade economicamente importante em termos mundiais, possuindo uma produção em mais de 80 países. Os citros são cultivados em diferentes regiões do mundo, sendo que a exploração comercial se concentra, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais (SENTELHAS, 2005). As áreas de maior produção são encontradas nas Américas, liderada pelo Brasil e, em segundo, pelos Estados Unidos.

Anualmente, a produção total de citros é estimada como sendo maior que 124,5 milhões de toneladas, sendo, os principais países produtores a China, Brasil, Estados Unidos, México e Índia. Dentre os citros, as laranjas, os limões, as tangerinas e as toranjas são os mais cultivados (FAO, 2011). Em função do clima, das condições hidrográficas e de solos favoráveis, além dos esforços tecnológicos e logísticos, desde a década de 80 o Brasil lidera a produção mundial de laranja (atualmente 26% da produção mundial) e a exportação de suco concentrado congelado (85% do comércio internacional), sendo a Europa, seu principal mercado consumidor (CITRUS BR, 2014).

Mesmo ocupando a liderança do setor no mundo, a citricultura brasileira vem enfrentando problemas nos últimos anos. Em 2012 encarou uma de suas maiores crises, ocasionada por fatores climáticos, fitopatológicos e mercadológicos, que impactou a safra de 2013/2014 (CONAB, 2013). A produção de suco de laranja do Brasil, na temporada 2015/2016, deverá cair para 810 mil toneladas congeladas e concentradas, contra 1,122 milhão de toneladas no período anterior, com uma queda da safra da fruta destinada à indústria (CITRUS BR, 2015).

O aumento na incidência das doenças pode comprometer seriamente a economia e a competitividade de um dos setores agroindustriais mais importantes do país. Entre as doenças mais importantes que afetam a citricultura estão o *Huanglongbing* (HLB ou *Greening*), causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter*

spp., a Clorose Variegada do Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, a Morte Súbita dos Citros (MSC), causado pelo Vírus da Tristeza e o Cancro Cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), sendo o agente causal desta última doença, alvo de investigação do presente trabalho (NEVES et al., 2010).

2.2. Cancro Cítrico

2.2.1. Histórico e sintomas da doença

O conhecimento da origem da doença é essencial para compreender a evolução do patógeno. No entanto, a origem geográfica exata desta doença ainda é motivo de controvérsia (DAS, 2003). LEE (1918) relatou a presença da doença no sul da China, no hospedeiro *Fortunella hindsii*. Mas uma investigação posterior relatou a presença de lesões de cancro em folhas herborizadas de *Citrus medica* (cidra), coletadas na Índia (1827-1831) e em *Citrus aurantifolia* (lima), coletadas na Indonésia (1842-1844), sugerindo que o cancro cítrico pode ter se originado em áreas tropicais da Ásia, como sul da China, Indonésia e Índia.

A distribuição geográfica do cancro cítrico tem continuado a expandir-se para novas áreas de citrinos, uma vez que foi observada pela primeira vez no Sudeste Asiático. A doença se espalhou por todos os continentes produtores de citros, exceto a Europa (SCHUBERT et al., 2001; DAS, 2003). Em 1915, a doença foi descrita na região do Golfo do México e acredita-se que a sua introdução ocorreu pelo transporte de mudas em navios cargueiros (DAS, 2003). No Brasil, a doença foi diagnosticada pela primeira vez em 1957 no estado São Paulo, na região de Presidente Prudente (BITTANCOURT, 1957). De imediato, medidas de exclusão e erradicação foram tomadas e foi iniciada uma campanha de erradicação do cancro cítrico (GIMENESFERNANDES et al., 2000). Apesar dos esforços iniciais, o cancro cítrico propagou-se rapidamente pelo Brasil e foi encontrado nos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul (AMARAL, 1957). Recentemente, em 2002, foram encontradas plantas com cancro cítrico no Estado de Roraima (NASCIMENTO et al.,

2003). Atualmente o cancro cítrico está presente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima.

Plantas infectadas por Xac podem apresentar lesões em todos os órgãos da parte aérea (SCHUBERT; SUN, 1996). Em infecções severas pode ocorrer desfolha, queda de frutos e seca de ramos, sendo mais comuns em hospedeiros mais suscetíveis (GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989). Os sintomas da doença constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, aspecto eruptivo e rodeadas por anasarca, presentes em folhas, ramos e frutos (BITTANCOURT, 1957; ROSSETTI, 2001) (Figura 1). A doença pode comprometer a produção e frutos com sintomas têm seu valor comercial reduzido (RYBAK et al., 2009).



Figura 1. Sintomas de cancro cítrico na forma de lesões em folha, ramo e fruto de citros. Fonte: FUNDECITRUS.

A disseminação do patógeno ocorre através de chuvas ou ventos e por interferência humana, por meio de mudas, materiais de colheita e veículos. Após entrar em contato com a planta, a bactéria penetra pelas aberturas dos estômatos ou por ferimentos mecânicos. A presença de água na superfície da planta é um fator fundamental para a entrada da bactéria e isso faz com que o estado de São Paulo possua condições favoráveis ao desenvolvimento da doença devido às chuvas que ocorrem durante a primavera (FUNDECITRUS, 2013).

No Brasil o controle do cancro cítrico baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação de plantas e pomares quando afetados pela doença (BARBOSA et al., 2001). Pela lei estadual em vigor (Resolução SAA - 147, publicada em 1º de novembro de 2013, no Diário Oficial), passa a adotar eliminação da planta contaminada e pulverização com cobre das outras plantas cítricas existentes em um raio de 30 metros. A pulverização deve ser repetida a cada brotação. O citricultor deverá realizar, no mínimo, uma vistoria trimestral em todas as plantas de citros da propriedade com o objetivo de identificar e eliminar plantas que apresentem sintomas do cancro cítrico. No Sul do Brasil (Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) a erradicação de plantas doentes, e das suspeitas de infecção, não é obrigatória e é permitida a adoção de práticas de manejo da doença, como a pulverização com agentes cúpricos e implantação de cortinas quebra-vento (LEITE JÚNIOR; MOHAN, 1990).

2.2.2. Agente etiológico

O cancro cítrico asiático ou cancrose A é a forma mais agressiva e propagada da doença. Esta doença é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), Gram-negativa, em forma de bastonete, aeróbica, e que possui um único flagelo polar. Em meio de cultura, apresenta colônias de formato côncavo de pigmentação amarela e aspecto viscoso devido à produção de polissacarídeos extracelulares (BEDENDO, 1995; BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Esta bactéria desenvolve-se facilmente na maioria dos meios de cultura utilizados em microbiologia e é facilmente isolada do tecido vegetal infectado. Quando cultivada

em meio de cultura Ágar Nutriente apresenta colônias visíveis após dois ou três dias de incubação a 28° C (ROSSETTI; FEICHTENBERGER; SILVEIRA, 1981; CARDOSO, 2008).

As condições ideais para o crescimento da bactéria são temperatura entre 28° e 30° C e umidade elevada. No ambiente, a Xac sobrevive por poucos dias em materiais inertes e por até três meses em solo. Entretanto, pode conservar-se viável por vários anos em tecidos do hospedeiro, mesmo após a queda destes ou quando estes se encontram desidratados (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Bactérias do gênero *Xanthomonas* tornaram-se modelos importantes para o estudo da interação planta-patógeno e para a compreensão de patogenicidade bacteriana e mecanismos de virulência (BÜTTNER; BONAS 2010).

O sequenciamento do genoma completo da Xac isolado 306 possibilitou a identificação de um cromossomo circular, de 5.175.554 pares de base (pb), e de dois plasmídeos: pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb). A anotação dos genes presentes no genoma possibilitou a identificação de alguns mecanismos que a Xac utiliza para a sua sobrevivência e para a infecção da planta hospedeira (DA SILVA et al., 2002).

As bactérias fitopatogênicas modulam a expressão de seu arsenal de genes responsáveis pelos processos de infecção e virulência, que suplantam os mecanismos de defesa da planta, e propiciam um meio adequado para sua sobrevivência e multiplicação. Desta maneira, o estudo da interação planta-patógeno é um dos principais desafios para compreender os mecanismos moleculares que regulam esta interação (BÜTTNER; BONAS, 2009).

2.3. Interação Planta-Patógeno

As plantas desenvolveram uma completa rede de defesa contra microrganismos invasores patogênicos. O encontro entre células da planta e microrganismos iniciam uma série de respostas celulares dinâmicas na planta como reorganização do citoesqueleto, translocação de organelas, produção de enzimas hidrolíticas, de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), de peroxidases, de

inibidores de proteases e a deposição de calose, lignina e hidroxiprolina na parede celular e a resposta de hipersensibilidade (HR) (LINDGREEN et al., 1992; DANGL; JONES, 2001; STASKAWICK, 2001; LIPKA; PANSTRUGA, 2005).

A resistência específica de hospedeiro, chamada de “*effector-triggered immunity*” (ETI), é baseada na interação específica entre efetores do patógeno e produtos de genes de resistência (genes R) da planta. De acordo com esta teoria, denominada de Teoria Gene a Gene (CUI et al., 2009), a resistência genética é controlada por um gene de resistência (R) na planta e um gene de avirulência (*avr*) correspondente no genoma bacteriano. O termo avirulência (*avr*) é definido para genes bacterianos que determinam o reconhecimento específico das bactérias por plantas que possuem os genes de resistência (R) correspondentes; tal interação é chamada de incompatível. Este reconhecimento leva à indução de reações de defesa que geralmente incluem a reação de HR (MOREL; DANGL, 1997; FRITIG et al., 1998; DANGL; JONES, 2001). Na ausência do gene R ou do correspondente *avr*, o reconhecimento não ocorre e o patógeno infecta a planta, o que caracteriza uma interação compatível (FLOR et al., 1971; FRITIG et al., 1998; STASKAWICZ, 2001). Assim, o receptor de resistência possui duas funções: reconhecimento específico do patógeno e habilidade para sinalizar genes de resposta de defesa (ELLIS et al., 2000).

A resposta HR é caracterizada por sintomas visíveis nas folhas da planta como morte celular localizada, lesões necróticas para limitar e conter o patógeno no local de infecção (MUR et al., 2008), modificações estruturais, produções de espécies reativas de oxigênio (EROS), acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) em espaços intracelulares e a expressão dos fatores de transcrição que ativam os genes das plantas que caracterizam a resposta do hospedeiro (DAURELIO et al., 2013).

Entretanto, 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 se instala e esta interação é conhecida como interação compatível (GREWAL et al., 2012). Nesse caso a interação Avr/R não ocorre (FEBRES et al.,

2009; DOMINGUES et al., 2011) e se dá a multiplicação do patógeno às custas do hospedeiro (DAURELIO et al., 2013).

O reconhecimento do patógeno pela planta hospedeira é resultante da evolução conjunta do hospedeiro e do patógeno (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). A maioria dos genes R codifica proteínas citoplasmáticas contendo um sítio de ligação de nucleotídeo (*nucleotide binding site*-NBS) e um domínio C-terminal rico em leucina (*leucine rich repeats*-LRR), razão pela qual são geralmente denominados de genes NBS-LRR (TOR et al., 2002). Alguns genes de resistência apresentam um terceiro domínio variável no N-terminal, com homologia aos receptores Toll e interleucina 1 (TIR), que são fatores envolvidos na imunidade inata em animais, ou um domínio *coiled-coil* (CC) (DEYOUNG; INNES, 2006). A análise das sequências de genes de resistência a doenças de plantas mostram que, apesar de conferirem resistência a patógenos diferentes tais como vírus, bactérias e fungos, os mesmos contêm sequências similares e codificam peptídeos com semelhanças estruturais (KANAZIN et al., 1996).

Alguns trabalhos sugerem que várias vias metabólicas são estimuladas após a ativação do sistema imune PTI e ETI das plantas. As vias do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e do etileno resultam na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa (DE SOUZA et al., 2009; AN; MOU., 2012).

A ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode acontecer tanto nas interações compatíveis quanto incompatíveis, variando, no entanto, na magnitude e velocidade para cada tipo de interação. Para compreender esses mecanismos do estabelecimento da interação planta-patógeno, estudos do transcriptoma em condições infectantes ajudam a prever papéis de genes individuais ou interações mais complexas de vias de sinalização e a interação entre elas (DAURELIO et al., 2013). Esta informação pode contribuir para o uso efetivo desse conhecimento no desenvolvimento de novos métodos para o controle das doenças.

2.4. Espécies reativas de Oxigênio (EROS)

A interação entre os patógenos de plantas e seus hospedeiros é complexa. Esta complexidade surge como resultado de uma batalha evolutiva de longa data, na qual o patógeno tenta invadir e se multiplicar e a planta tenta reconhecer e defender-se desta invasão. O agente patogênico deve, então, tomar medidas para evitar a detecção e o desencadeamento uma resposta por parte da planta, o que impediria a sua entrada nos tecidos da planta.

Um processo bem caracterizado sobre a resposta de uma planta à invasão do patógeno é conhecido como o estresse oxidativo, o qual parece ter papel crucial nos estágios iniciais da indução das respostas da planta. As seguintes ações são atribuídas a ele: ação como sinalizador para outras respostas de defesa, participação em reações catalisadas por peroxidases que levam à polimerização de fenóis e a formações de lignina e de ligações cruzadas de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e ao fortalecimento da parede celular vegetal e toxidez direta sobre patógenos (LABANCA, 2002).

As concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidas na membrana plasmática nas imediações do agente patogénico (DOKE, 1983; LAMB; DIXON, 1997; WOJTASZEK, 1997). Embora EROS são produzidas como parte do metabolismo normal, durante a fotossíntese como também na respiração celular (KIM et al., 1999), as concentrações produzidas pela planta após a invasão do patógeno aumentam muito (VANACKER et al., 1998), podendo manifestar-se tóxico para os patógenos invasores (PENG; KUC, 1992; LAMB; DIXON, 1997).

Em bactérias, a maioria dessas espécies reativas de oxigênio é derivada da redução sequencial do oxigênio molecular catalisada por enzimas da cadeia transportadora de elétrons associadas à membrana (CABISCOL et al., 2000; CASH et al., 2007). A membrana das bactérias é sensível a radicais livres e, desse modo, o estresse oxidativo é considerado como parte das estratégias de defesa das plantas na limitação da colonização pelo patógeno invasor (ELSTNER, 1982).

Os tecidos da planta respondem a invasão por bactérias fitopatogênicas através da elevação da produção de H_2O_2 e superóxido e hidroxílicos que podem inibir o desenvolvimento da doença. A capacidade de bactérias fitopatogênicas se multiplicarem nos tecidos da planta pode ser, em parte, devido à capacidade de desintoxicar o meio ao redor do sítio de infecção da presença do H_2O_2 , o qual, dentre os compostos de oxigênio, é o que penetra mais facilmente através da membrana, afetando uma série de processos celulares.

O provável candidato para modulação da ação de H_2O_2 é a enzima catalase, que converte H_2O_2 em H_2O e O_2 . Para minimizar os efeitos danosos dessas espécies os organismos desenvolveram mecanismos capazes de combater as mesmas, denominado de sistema antioxidativo de defesa, que pode ser enzimático ou não enzimático. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com propriedades antioxidante, os quais ajudam manter o ambiente redutor (CABISCOL et al., 2000), como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico, NADPH e NADH. Já os mecanismos enzimáticos envolvem a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GOPX, EC 1.11.1.7), glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2), glutathiona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), dentre outras (GRATÃO et al., 2005).

2.5. PCR quantitativa em Tempo Real

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), devido à sua alta sensibilidade e reprodutibilidade, vem sendo muito utilizada com a finalidade de quantificar níveis de expressão de um determinado gene.

Na técnica qRT-PCR, diferentemente da técnica de PCR convencional, não é necessário a análise do produto de PCR através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida após o último ciclo de amplificação (PELT-VERKUIL et al., 2008). Os produtos da PCR em tempo real podem ser mensurados a cada ciclo e este monitoramento é feito durante a fase exponencial de amplificação, e com isso, pode-se definir a quantidade inicial do alvo com grande precisão (AHMED, 2002). Para isso, a técnica utiliza corante (sistema de detecção) que se associa à amplificação

do gene alvo e emite fluorescência, que aumenta em proporção direta ao número de moléculas de produtos de PCR (fragmentos) gerados (BUSTIN; NOLAN, 2004; WONG; MEDRANO, 2005). Os sistemas de detecção mais utilizados são o SYBR® Green e o TaqMan® (APPLIED BIOSYSTEMS).

O sistema SYBR® Green, possui capacidade de se ligar à fita dupla de DNA de forma covalente e emitir uma fluorescência que é medida e convertida numa quantidade de DNA (MACKAY et al., 2007), enquanto o sistema TaqMan® utiliza uma sonda fluorescente que se liga à sequência alvo, a qual tem total complementaridade, e que permite a detecção de um produto específico, conforme este se acumula durante os ciclos da PCR (PELT-VERKUIL et al., 2008). A principal diferença entre os dois sistemas é que o SYBR® Green se intercala por todo o DNA fita dupla, inclusive produtos inespecíficos da reação e, por isso, é necessário que as reações sejam otimizadas para a obtenção de resultados precisos.

A qRT-PCR pode ser realizada por meio de duas técnicas: quantificação absoluta ou quantificação relativa. O ensaio de quantificação absoluta descreve um experimento de qRT-PCR no qual amostras de quantidades conhecidas são diluídas em série e em seguida, amplificadas para gerar uma curva padrão. As amostras desconhecidas são então quantificadas por comparação com essa curva. Essa técnica permite que se saiba o número exato de cópias do DNA ou RNA alvo em uma determinada amostra biológica (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008). Em um experimento de quantificação relativa por qRT -PCR, a expressão de um gene de interesse é comparada entre duas amostras diferentes (amostra sob algum tipo de tratamento comparada às amostras sem tratamentos). Para isto, são necessários genes de referência. Segundo Robinson e colaboradores (2007), os genes de referência devem ser aqueles genes que manifestam o mesmo padrão de expressão entre diferentes tecidos ou células sob investigação, oriundas de diferentes tratamentos. Recomenda-se utilizar mais de um gene de referência, como forma de controlar possíveis valores discrepantes e grandes diferenças entre os genes (VANDESOMPELE et al., 2002). No presente trabalho fizemos as quantificações relativas, utilizando genes de referência cuja expressão não foi alterada pelas condições experimentais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão gênica da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, quando inoculada em dois hospedeiros de citros contrastantes quanto à susceptibilidade ao cancro cítrico: laranja doce 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), menos suscetível, e lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle), altamente suscetível ao cancro cítrico, aos 48 e 72 horas após a infecção.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar e identificar, através de ferramentas de bioinformática, os genes diferencialmente expressos quando a bactéria infecta laranja doce 'Pêra Rio', menos suscetível ao cancro cítrico, nos tempos iniciais de 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria;
- Analisar e identificar, através de ferramentas de bioinformática, os genes diferencialmente expressos quando a bactéria infecta lima ácida 'Galego', altamente suscetível ao cancro cítrico, nos tempos iniciais de 48 e 72 horas após a infecção;
- Analisar as alterações no estresse oxidativo que ocorre nas plantas hospedeiras em resposta à presença do patógeno;
- Integrar as informações obtidas e os dados da literatura de modo a ser capaz de estabelecer hipótese(s) sobre os mecanismos moleculares utilizados pela bactéria para sobrepujar os mecanismos de defesa de hospedeiros citros com diferentes níveis de susceptibilidade ao cancro cítrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e estirpe bacteriana

Os experimentos foram conduzidos com plantas de laranja doce 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* Swingle), com idades de aproximadamente três anos, enxertadas em limão Cravo e cultivadas em vasos de doze litros. As mudas, livres de patógenos, foram adquiridas do viveiro Frutabella, localizado em Limeira - SP, e foram cultivadas em casa-de-vegetação. Para a realização dos experimentos, as plantas foram podadas e, após 60 dias, foram selecionadas as que apresentaram tamanho uniforme de expansão foliar em folhas jovens.

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), isolado 306, do estoque do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FCAV/UNESP, mantido à temperatura ambiente em frascos contendo água de torneira estéril. Este é o mesmo isolado sequenciado pelo projeto Genoma/FAPESP (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 água de torneira estéril foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura sólido Ágar Nutriente NA (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 15 g de ágar, q.s.p 1000 mL com água destilada) e cultivada em estufa a 28 °C por 72 horas. Uma colônia isolada foi repicada para outra placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura e, após o crescimento a 28 °C, por 72 horas, a massa de células foi coletada e diluída em tampão fosfato estéril (0,1 M, pH 7,0) em tubo Falcon estéril de 50 mL. A suspensão foi ajustada inicialmente para uma densidade ótica (DO) igual a 0,3 a 600nm ($DO_{600nm} = 0,3$), equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), após o que foi ajustada para uma concentração de 10^6 UFC/mL por meio de diluição seriada.

A suspensão bacteriana de 10^6 UFC/mL foi inoculada nas folhas através do método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa hipodérmica sem agulha. As inoculações foram feitas em quatro pontos por folha. Foram utilizadas três plantas (repetição biológica) por hospedeiro e inoculadas 20 folhas por planta. As folhas inoculadas foram coletadas aos 0, 1, 3, 6, 10, 15 e 20 dias após a inoculação.

Para cada tempo de coleta, quatro discos foliares com 1 cm de diâmetro foram recuperados do ponto de inoculação de cada hospedeiro. Imediatamente, o tecido vegetal foi macerado em 1 mL de tampão fosfato estéril (0,1 M, pH 7,0), seguido por uma diluição seriada de 10 vezes. Uma alíquota de 50 μ L de cada diluição foi plaqueada em meio NA com auxílio de um plaqueador em espiral (*Autoplate 4000*, *Spiral Biotech*). As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 72 horas, após o que foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os pontos inoculados foram fotografados para a caracterização dos sintomas. Durante todo o experimento as plantas inoculadas foram mantidas em ótimas condições de temperatura (28 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escurecimento) em um laboratório de segurança para a manipulação e inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em plantas cítricas. 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, evitando, dessa maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente.

4.3. Extração de RNA total de Xac

As folhas de laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego' foram inoculadas com suspensão bacteriana em água estéril na concentração de 10^8 UFC/mL ($OD_{600} = 0,3$). A suspensão bacteriana foi infiltrada em folhas jovens (30-60 folhas por planta) por todo o limbo foliar utilizando o método de infiltração por pressão, como descrito no item anterior.

O experimento foi conduzido em triplicata biológica para ambos os hospedeiros de citros nos tempos de 48 e 72 horas após a inoculação (hai) com Xac. Como controle (Xac em estágio não infectante) foi utilizada Xac cultivada em meio de cultura NA por 72 horas a 28 °C. Após 48 e 72 hai, as folhas inoculadas foram coletadas e foi feito um *pool* das triplicatas biológicas para cada hospedeiro de citros. Logo após a coleta, as folhas foram cortadas em tiras bem finas, com lâmina de bisturi estéril, e imersa em água bi-destilada gelada e esterilizada por autoclavagem, seguido de agitação suave por 20 minutos, em banho de gelo, para exsudação da bactéria. Os restos foliares foram separados por filtração em gaze estéril e as células bacterianas exsudadas foram recuperadas por centrifugação a 9000 xg por 10 minutos a 4 °C. A extração do RNA total das amostras de Xac, tanto da bactéria exsudada das folhas quanto da cultivada em meio de cultura sólido (controle), foi realizada com o “kit RNeasy Protect Bacteria Mini” (QIAGEN) conforme as recomendações do fabricante.

4.4. Concentração, pureza e integridade do RNA Total extraído

A determinação da concentração e pureza do RNA foi realizada através da determinação da absorbância no espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fischer Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007), nos comprimentos de ondas de 260, 280 e 230 nm. O valor de absorbância a 260 nm foi utilizado para determinar a concentração (ng/μL), a razão A260nm/A280nm foi utilizada para avaliar contaminação por proteínas e a razão A260nm/A230nm foi avaliada para avaliar a presença ou ausência de compostos aromáticos (como fenol) ou de contaminantes como carboidratos e peptídeos. As preparações que apresentam razão A260nm/A280nm entre 1,8 a 2,0 e razão A260nm/A230nm acima de 2,0 são consideradas de boa qualidade (SAMBROOK et al., 1989).

A concentração de preparações de RNA pode ser estimada pelo valor da absorbância a 260nm, sendo que valor de A260nm igual a 1,0 corresponde a uma solução com concentração igual a 40 μg/mL (SAMBROOK et al., 1989). Entretanto, se houver presença de DNA na solução ou de outros compostos que absorvam luz a

260nm, esta concentração estará sobrestimada. Portanto, o melhor método para se determinar a quantidade de RNA em uma solução e se há ou não a presença de DNA contaminante na mesma é através de métodos fluorimétrico, utilizando fluoróforos específicos que se ligam à fita simples ou dupla de ácido nucleico. Assim, a quantificação do RNA nas amostras foi feita no aparelho *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) utilizando o kit *Qubit RNA BR Assay* (Invitrogen) e, para averiguar possível contaminação com DNA, foi utilizado o kit *Qubit dsDNA HS Assay* (Invitrogen), que identifica quantidades de DNA de dupla fita presentes nas amostras em uma faixa de 0,2 a 100 ng.

A qualidade do RNA total foi verificada através do aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009), utilizando o kit *Agilent RNA 6000 Nano Chips* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Assim, pode ser gerado um relatório através do programa 2100 Expert Software (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009), no qual, a integridade do RNA pode ser visualizada através de um eletroferograma. Para que o RNA seja considerado íntegro, o eletroferograma deve apresentar dois picos bem definidos referentes às subunidades de RNA ribossomal 23S e 16S, com uma razão 23S:16S de 2:1. Caso haja degradação, esses picos diminuem sua amplitude e outros picos ficam evidentes, correspondendo a fragmentos de RNA degradados. Além disso, o relatório apresenta o Número de Integridade do RNA (RIN), que varia de 1 a 10, sendo 1 o resultado de um RNA totalmente degradado e 10 o resultado de um RNA completamente intacto (SCHROEDER et al., 2006).

4.5. Sequenciamento RNA-Seq

O sequenciamento RNA-seq de Xac infectando laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego' foi realizado anteriormente no laboratório. Neste trabalho foram analisados os dados obtidos. Tendo em vista que a descrição de como foi obtido o material para sequenciamento, a montagem do banco de dados e as análises realizadas, estas etapas serão descritas a seguir.

Para o sequenciamento dos RNAs mensageiros (mRNA) de Xac em estágio infectante (48 h e 72 h após infecção de laranja doce ‘Pêra Rio’ e lima ácida ‘Galego’) e não infectante (crescimento em meio de cultura NA por 72 horas a 28 °C), foi utilizado o kit *TruSeq RNA Sample Preparation v2* (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O mRNA foi fragmentado, seguido da síntese da primeira e segunda fita de cDNA, reparo das extremidades e ligação dos adaptadores. Em seguida foi realizada a etapa de clusterização utilizando o Kit *TruSeq™ SR Cluster Kit v3* (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) e o aparelho cBot (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA). Após o processo de clusterização, os “clusters” presentes na “flow cell” foram sequenciados na Facility de sequenciamento da FCAV/UNESP utilizando a plataforma HiScanSQ System Illumina, seguindo as instruções do fabricante para sequenciamento de fragmentos do tipo *pairedend* de 50 pb em cada extremidade.

4.6. Análise dos transcriptomas nas duas interações de Xac com citros

Para o estudo do transcriptoma de Xac foi realizada uma análise de expressão diferencial durante os tempos de 48 e 72 horas após a infecção em citros. Na construção do banco de dados de transcriptoma de Xac foi utilizado como referência o genoma completo da bactéria e seu transcriptoma previamente anotado e disponível no NCBI. Utilizando a ferramenta *Bowtie2*, os fragmentos sequenciados durante cada um dos tempos por RNA-Seq foram filtrados e alinhados contra o genoma de referência (LANGMEAD et al., 2012). A identificação dos genes e o cálculo normalizado de expressão gênica foram feitos com o software *Cufflinks* (TRAPNELL et al., 2010). Com os dados normalizados, foram realizados os cálculos dos *Fold-change*, Log base 2 do *Fold-change* e a significância estatística (p-valor). O *Fold-change* indica a variação de expressão normalizada entre duas amostras (controle e inoculada). No presente trabalho os genes considerados diferencialmente expressos (GDEs) foram aqueles que apresentaram significância estatística (p-valor) menor ou igual a 0,05. Além do p-valor, foi adotado o valor de alteração absoluta (*Fold-change*) de pelo menos duas vezes (≥ 2 ou $\leq 0,5$) para considerar um transcrito

induzido ou reprimido. Os transcritos com uma expressão maior no tecido infectado de duas vezes ou mais (*Fold-change* ≥ 2) foram denominados genes induzidos e os transcritos com uma expressão maior no controle de duas vezes ou mais (*Fold-change* $\leq 0,5$) foram denominados genes reprimidos.

4.7. PCR Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

4.7.1. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)

Fleige e Pfaffl (2006) sugerem que, na qRT-PCR, a eficiência da PCR em geral não é afetada pela integridade do RNA e recomendam um RIN superior a cinco como de boa qualidade e maior do que oito como perfeito para esta aplicação. No presente trabalho, as amostras de RNA utilizadas para análise por qRT-PCR apresentavam RIN entre 5.1 e 8.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, realizada com o *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesi kit* (Thermo Fisher Scientific), segundo as instruções do fabricante, foi utilizada a concentração final de 1 µg de RNA total para cada amostra. Após a síntese, o cDNA foi quantificado utilizando o valor da A260nm obtida no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) e estocado a -80 °C.

4.7.2. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

As sequências de nucleotídeos das ORFs alvo (XAC0907, XAC0416, XAC0397, XAC0435, XAC1211, XAC1301, XAC2336, XAC2337 e XAC2922) foram obtidas no *GenBank* (NCBI) e submetidas ao programa *Repeat Masker* (www.repeatmasker.org/) a fim de “mascarar” as sequências de nucleotídeos com repetições e sequências de baixa complexidade, substituindo-as pela letra N, possibilitando assim, a obtenção de pares de oligonucleotídeos adequados. Após este processo estas sequências foram submetidas ao programa *Primer Express v.3* (Applied Biosystems) e foram selecionados os pares que apresentaram menores valores de penalidade. Os oligonucleotídeos adequados para a qRT-PCR devem

amplificar uma região de 50 a 150 pb, possuir de 30 a 80% de C e G, ter uma variação de Tm de 58 a 60 °C e não conter mais do que duas bases C e/ou G na extremidade 3' (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001). Todos os oligonucleotídeos selecionados foram alinhados ao genoma da Xac selvagem utilizando o algoritmo BLASTn (NCBI), e foram escolhidos os pares que apresentaram um menor grau de similaridade com outras partes do genoma, de modo a evitar resultados falso positivos. Os oligonucleotídeos iniciadores dos genes de referência *gyrB* e *rpoB* foram os descritos no trabalho de Jacob (2011) (Tabela 1). Tais genes são indispensáveis para o experimento, pois são normalizadores de dados, tendo a sua expressão constante em qualquer estágio de desenvolvimento da Xac e em qualquer condição ambiental (JACOB et al., 2011).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores dos genes alvos e de referência e suas respectivas identificações no NCBI e tamanho dos fragmentos gerados.

Gene	XAC ID*	Identificação no NCBI	Iniciadores (5'- 3')**	Tamanho do Fragmento (pb)
<i>gyrB</i>	XAC0004	1154075	D: CGTCCCGGCATGTATTCG R: ACCACCTCGAACACATGTGA	67
<i>rpoB</i>	XAC0965	1155036	D: GGATTCCTATCGCGAATTCCT R: TG TAGCTGGAAATCGGGAACA	103
<i>hrpE</i>	XAC0397	1154468	D: ACGAGGCCCGAAGTCCAT R: CCACGTTGAAGTCCAGATCATTT	66
<i>hpa1</i>	XAC0416	1154487	D: GCAGCAGGCCGGTCAGT R: TTCATCAGCATCTGGGTGTATTG	57
<i>virK</i>	XAC0435	1154506	D: ATGCCACGTCTTGTTCTG R: GTGCTCACACTGACATCG	138
<i>ahpC</i>	XAC0907	1154978	D: GCGTTCGGCGTG CATATT R: CCTCCGGATTGATGATGAAG	564
<i>katE</i>	XAC1211	1155282	D: AGCTTCCGTTTCCTCAATGA R: GACGCCAATGGAATTTGAC	2112
<i>katG</i>	XAC1301	1155372	D: GGAATCGATGGGCTTGAAGA R: GGCCCCAGTACAGATCCTGAT	2247
<i>cydA</i>	XAC2336	1156407	D: TGGCGATCGAGGGACTGA R: GCGATTCCAGCCAAGAAAGA	1623

<i>cydB</i>	XAC2337	1156408	D: GTTGTTTCGTCGGCGGTTT R: GTGTAGAACGTGCGCATGCT	1152
<i>HrpW</i>	XAC2922	1156993	D: GGCGGACACACCGACATC R: TGCCTTTCAGGGTGGAGTCTT	58

*Número da ORF (*Open Reading Frame*) correspondente ao gene no genoma da Xac, como descrito na anotação original.

**D: iniciador direto (*forward*); R: iniciador reverso (*reverse*)

4.7.3. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

A etapa de titulação dos oligonucleotídeos é importante para garantir a amplificação apenas do fragmento de interesse, eliminando possíveis dímeros e produtos inespecíficos. Este procedimento é necessário devido ao uso do fluoróforo *Sybr Green* (Applied Biosystems), um intercalante de DNA. Na titulação foi fixada uma concentração de cDNA de 160 ng e foram testadas concentrações próximas àquelas indicadas no manual do fabricante (*Real Time PCR Handbook*, disponível em www.lifetechnologies.com). Para cada reação foram realizadas 3 réplicas técnicas nas concentrações de oligonucleotídeos diretos e reversos (100, 300 e 600 nM), totalizando 9 condições (Tabela 2). Além disso, realizou-se também três réplicas do controle negativo (água no lugar do cDNA) utilizando as mesmas concentrações de oligonucleotídeos diretos e reversos.

Tabela 2. Diferentes concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas titulações.

Iniciadores Reversos (nM)	Iniciadores Diretos (nM)			
		100	300	600
	100	100/100	100/300	100/600
	300	300/100	300/300	300/600
	600	600/100	600/300	600/600

As reações, foram realizadas no aparelho *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR* utilizando-se o kit *SYBR Green Power Master Mix* (Applied Biosystems,

Foster, CA, USA). Cada reação consistiu em 6,5 µL de *Syber Green*; 1,25 µL de iniciador direto, 1,25 µL de iniciador reverso; 1 µL do pool de cDNA dos controles das duas cultivares analisadas (20 ng) e água ultra pura para um volume final de 12,5 µL. A placa foi inserida no equipamento *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems) e submetida ao seguinte ciclo de amplificação: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundo e 60 °C por 1 minuto. Os resultados gerados foram analisados através do programa *7500 software v 2.0.6* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2011).

4.7.4. Curva Padrão e eficiência da amplificação da PCR

Após o estabelecimento da concentração de oligonucleotídeos iniciadores mais adequada para o experimento, foi realizada a construção de uma curva padrão para cada gene alvo e de referência, a fim de verificar a eficiência de amplificação das reações. Esta curva é necessária para a verificação da especificidade do oligonucleotídeo à molécula alvo e identificação de possíveis contaminações na reação, já que o *SYBR Green* se liga inespecificamente a qualquer molécula de DNA de fita dupla. A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de uma curva de diluição em série dos cDNAs das amostras controle e inoculada, com 7 pontos (80 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng e 1,25 ng). Foram determinados 7 pontos de diluição para que houvesse uma margem de segurança, sendo que a eficiência de amplificação pode ser calculada com o mínimo de 5 pontos. Os resultados de todas as curvas padrão foram analisados no mesmo programa *Applied Biosystems 7500 real-time PCR*, sendo consideradas eficientes aquelas reações que apresentaram valores de R^2 igual a 0,99 (pipetagem precisa) e EFF%: 90 a 110% (eficiência aceitável) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

4.7.5. Método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct)

A quantificação da expressão dos genes de Xac foi realizada através do método do Ct Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct). O Ct (*threshold cycle*) representa o número do ciclo no qual o sinal fluorescente da reação cruza o limiar (*threshold*) onde é detectado um aumento estatisticamente significativo no sinal detectado em relação ao sinal de linha de base. O Ct é usado para calcular o número inicial de cópias de DNA, sendo inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA alvo. Ou seja, quanto menor o Ct, maior a expressão do gene em questão. As reações de amplificação foram feitas como descrito no item 4.7.3., utilizando desta vez a concentração de cDNA definida como ideal na análise da curva padrão (40 ng). Cada placa continha todas as amostras (controle e inoculada), assim como todos os genes (referência e alvo), controles negativos e triplicatas técnicas. Os resultados foram analisados através do programa *Expression Suite Software v1.0.3* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

4.7.6. Análises estatísticas dos dados

Os dados gerados após a realização da quantificação pelo programa 7500 v 2.0.6 (Applied Biosystems) foram exportados para o programa *Expression suite* a fim de normalizar os genes de referência. A normalização foi feita analisando os valores ou pontuações (*Score*) gerados por este programa, que são medidas de estabilidade da expressão de um gene de referência comparado aos outros, sendo considerados satisfatórios valores menores que 1,5 (EXPRESSION SUIT SOFTWARE HELP, 2012; VANDESOMPELE et al., 2002). Os dados obtidos foram analisados de uma maneira relativa, utilizando a metodologia do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O método de análise proporciona os resultados em relação ao ΔCt de um gene normalizador. Para cada tratamento (inoculada e controle) foi obtido o valor de Ct, tanto para o gene alvo quanto para o de referência. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação foi detectado. O valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor da média do Ct dos três genes de referência para ajustar a reação nos diferentes

tratamentos e em cada hospedeiro analisada, sendo obtido o valor de ΔCt . O valor de ΔCt de cada gene alvo do tratamento (planta inoculada) foi subtraído do valor do ΔCt da amostra controle (calibrador – planta controle) para cada hospedeiro analisada, tendo-se o valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi então utilizado para o cálculo do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do gene de referência, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

4.8. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica em folhas de laranja doce ‘Pêra Rio’ e lima ácida ‘Galego’, inoculadas e não inoculadas com Xac, foi determinada pela estimativa do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo o método de Heath e Packer (1968), com modificações. Assim, em três réplicas biológicas, foram coletados 300 mg de material vegetal e macerados em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), contendo aproximadamente 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após a perfeita homogeneização o extrato foi centrifugado a 11.780 xg, a 4 °C por 15 min. A um volume de 250 μ L do sobrenadante adicionou-se 1 mL de solução contendo TCA 20% (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v). As amostras foram mantidas por 30 minutos a 95 °C e, em seguida, transferidas para banho de gelo. Após o completo resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 11.780 xg, a 4 °C por 10 minutos, com o intuito de separar qualquer resíduo sólido formado durante o aquecimento e também clarear as amostras. As leituras foram realizadas, em triplicata, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 535 e 600 nm. A determinação do equivalente da concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM.cm¹. Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/mg de MF (Matéria Fresca).

4.9. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego', inoculadas e não inoculadas com Xac foi realizada segundo o protocolo de Alexieva e colaboradores (2001). As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Após a perfeita homogeneização, foram centrifugadas a 11.780 xg, a 4°C por 15 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 200 µL aos quais foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras foram mantidas no gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação e, em seguida, foram realizadas as leituras, em triplicatas, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 390 nm. Os resultados foram expressos em µmol/g de MF (Matéria Fresca). Os dados foram analisados pelo teste de Tukey a 5% (Assistat 7.6 Beta) para verificar se havia diferença estatística entre os mesmos.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Curva de crescimento e avaliação dos sintomas de Xac em laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego'

O uso de plantas com genótipos contrastantes em relação a um dado patógeno (estresse biótico) é uma estratégia efetiva para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na interação, tendo já sido utilizada com sucesso para o cancro cítrico (FU et al., 2012). Entretanto, apenas as respostas das plantas foram analisadas. No presente trabalho foram analisadas as respostas do patógeno.

Em pesquisas anteriores foi demonstrado que o hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' é menos suscetível à doença cancro cítrico, enquanto que o hospedeiro lima ácida 'Galego' é altamente suscetível (LEITE JUNIOR, 1990; TAZIMA et al., 2008).

Para confirmar os níveis de suscetibilidade ao cancro cítrico dos hospedeiros utilizados neste trabalho, foi realizada a avaliação do crescimento de Xac em folhas inoculadas com suspensão bacteriana por meio de infiltração por pressão.

A curva de crescimento de Xac nas plantas de laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego' aos 0, 1, 3, 6, 10, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI), revelou que a bactéria se multiplica de maneira semelhante em ambos os hospedeiros até o 3º DAI. Entretanto, no 6º DAI, na laranja doce 'Pêra Rio' o valor de log foi 5,6, enquanto que na lima ácida 'Galego' o valor de log foi 6,4 (Figura 2), demonstrando um aumento que persistiu até o último dia de coleta. Assim, pode-se sugerir que no hospedeiro laranja 'Pêra Rio', tida como menos suscetível, os mecanismos de defesa ativados pela planta são mais eficientes em conter a bactéria do que aqueles ativados pelo hospedeiro lima ácida 'Galego', altamente suscetível. Esta diferença pode estar relacionada tanto à velocidade e/ou intensidade da resposta como à diferença nos mecanismos ativados, uma vez que nos dois hospedeiros a barreira física de entrada da bactéria foi sobrepujada pela inoculação por pressão.

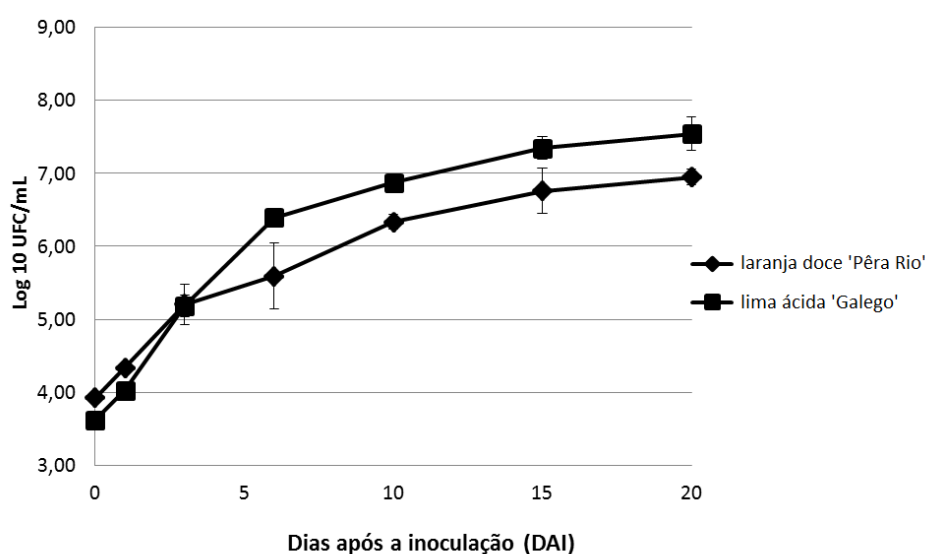


Figura 2. Curva de crescimento de Xac nos hospedeiros laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego' até o 20º dia após a inoculação. Valores em Log₁₀ UFC/mL.

Além da curva de crescimento, os sintomas ocasionados por Xac nas folhas dos dois hospedeiros foram documentados (Figura 3). No hospedeiro lima ácida 'Galego', aos 6 dias após a inoculação (DAI) já começaram a aparecer os primeiros sintomas de cancro, com o surgimento de lesões bem visíveis, enquanto no hospedeiro laranja doce 'Pera Rio' quase não aparece a manifestação da doença neste período. Transcorridos 25 DAI, nas folhas de lima ácida 'Galego' os sintomas evoluíram e as lesões espalharam-se rapidamente pelo tecido foliar, aumentando de diâmetro e tornando-se mais escuras, com aspecto corticoso e saliente; já nas folhas do hospedeiro laranja doce 'Pera Rio' os sintomas ficaram mais contidos, restritos ao ponto de inoculação, demonstrando menor multiplicação e propagação da bactéria (Figura 3).

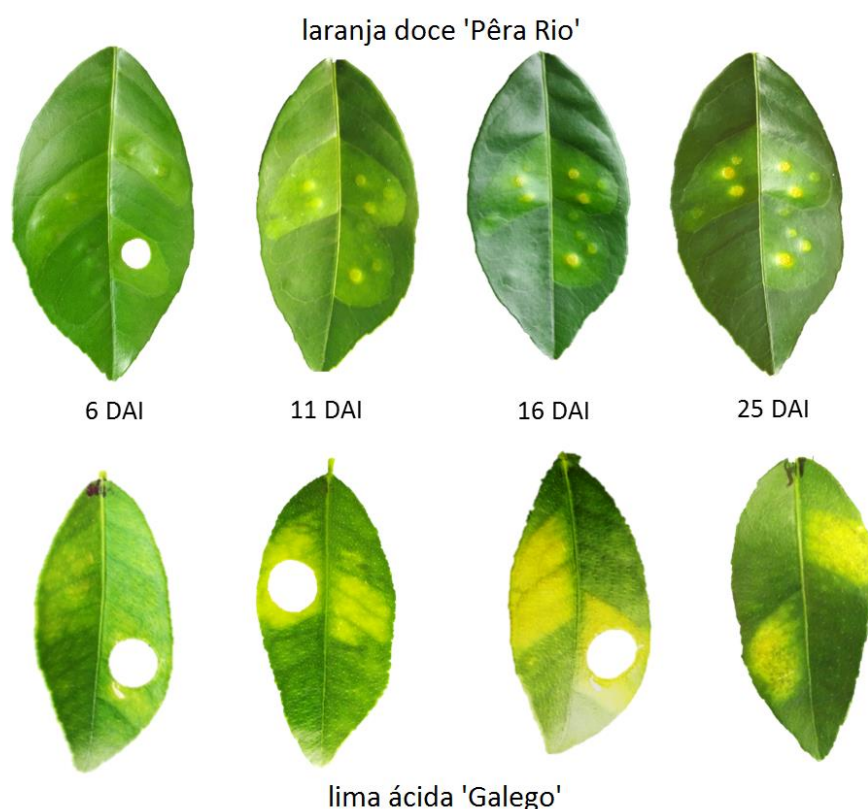


Figura 3. Comparação dos sintomas de cancro cítrico em ambos os hospedeiros aos 6, 11, 16 e 25 dias após inoculação com suspensão de Xac a 10^6 UFC/ml.

5.2. Análise do transcriptoma da Xac infectando laranja doce ‘Pêra Rio’ ou lima ácida ‘Galego’

Durante o seu trabalho de Dissertação de Mestrado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM), Cavallini (2013), utilizou a técnica de RNA-seq para analisar o transcriptoma de laranja doce ‘Pêra Rio’ e lima ácida ‘Galego’, infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. No presente trabalho está sendo analisado o transcriptoma da Xac.

A anotação inicial do genoma da Xac identificou 4.543 genes (DA SILVA et al., 2002). Estes 4.534 genes de Xac foram utilizados como referência para analisar os transcritos encontrados nos transcriptomas de Xac, oriundos das bibliotecas de cDNA sequenciadas. Um total de aproximadamente 121 milhões de fragmentos foram gerados a partir de sequências de 50 pares de base obtidas de 5 bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNA de Xac: cultivada em meio de cultura sólido AN (amostra controle – XC), inoculada e exsudada de folhas do hospedeiro menos suscetível laranja doce ‘Pêra Rio’ 48 e 72 horas após a inoculação (XPR48 e XPR72) e inoculada e exsudada de folhas do hospedeiro altamente suscetível lima ácida ‘Galego’ 48 e 72 horas após a inoculação (XLG48 e XLG72) (Tabela 3). O tratamento dos dados removeu de 7 a 11% das sequências, mas mantendo ainda uma grande cobertura de sequenciamento. Para todas as bibliotecas, o alinhamento contra o genoma de Xac foi de 100% para as sequências obtidas (Tabela 3).

Tabela 3. Dados gerados pelo sequenciamento RNA-Seq (Illumina).

Biblioteca de cDNA	Número de fragmentos com 50 pb	Cobertura* (número de vezes)	Sequências alinhadas com o genoma da Xac (%)
XC	17.804.274	168,78	100
XPR48	16.184.319	153,43	100
XPR72	14.443.283	136,93	100
XLG48	19.473.518	184,61	100
XLG72	14.916.362	141,41	100

XC: Xac cultivada em meio de cultura sólido NA; XPR48 e XPR72: Xac inoculada e exsudada de folhas do hospedeiro menos suscetível laranja doce 'Pêra Rio' 48 e 72 horas após inoculação, respectivamente; XLG48 e XLG72: Xac inoculada e exsudada de folhas do hospedeiro altamente suscetível lima ácida 'Galego' 48 e 72 horas após inoculação, respectivamente.

*Calculada a partir do tamanho do genoma da Xac, que é de 5.274.173 pb (DA SILVA et al., 2002).

5.3. Expressão gênica global e temporal de Xac inoculada em laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego'

A expressão gênica apresentada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) na interação com os hospedeiros laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego' foi avaliada pela tecnologia RNA-Seq. Foram considerados genes diferencialmente expressos (GDEs) aqueles que atendiam as condições descritas item no 4.6. No hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio', Xac apresentou 80 GDEs, sendo 41 em 48 horas após a inoculação e 39 em 72 horas após a inoculação, com 25 deles comuns aos dois tempos (Figura 4). Já em lima ácida 'Galego', apresentou 82 GDEs, sendo 40 em 48 horas após a inoculação e 42 em 72 horas após a inoculação, com 28 deles comuns aos dois tempos (Figura 4).

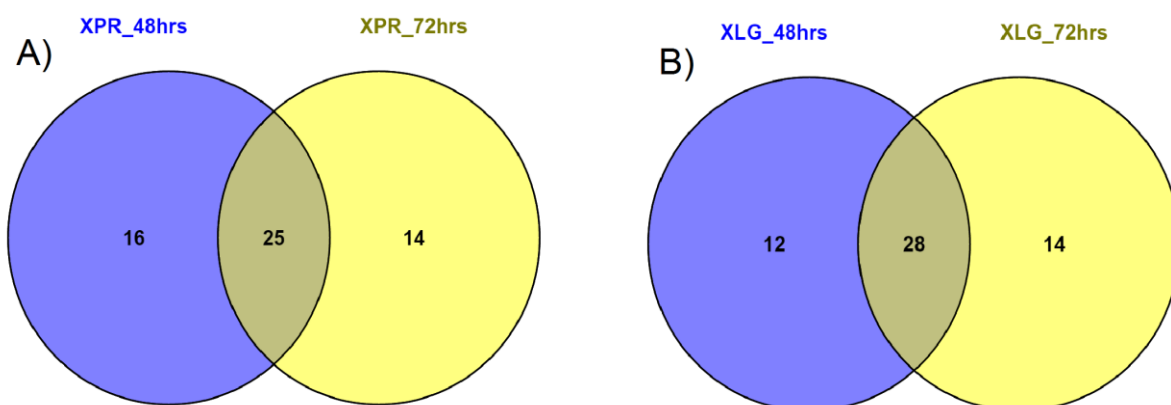


Figura 4. Diagramas de Venn mostrando o número de genes diferencialmente expressos de Xac inoculada em laranja doce ‘Pêra Rio’ (A) e lima ácida ‘Galego’ (B) nos tempos de 48 e 72 horas. Os diagramas mostram o número de genes em cada tempo e o número de genes que são expressos em comum ou que são exclusivos de cada tempo.

Quando se analisou os genes induzidos ou reprimidos em Xac pela interação com laranja doce ‘Pêra Rio’, observou-se que no tempo de 48 horas após a inoculação, foram encontrados 22 genes induzidos, enquanto 19 genes foram reprimidos (Figura 5 e Tabela 4). No tempo de 72 horas, 31 genes foram induzidos e 8 genes foram reprimidos (Figura 5 e Tabela 5). Por outro lado, em Xac inoculada em lima ácida ‘Galego’, foram encontrados 33 genes induzidos e 7 genes reprimidos no tempo de 48 horas após a inoculação (Figura 5 e Tabela 6), enquanto que no tempo de 72 horas foram encontrados 37 genes induzidos e 5 genes reprimidos (Figura 5 e Tabela 7).

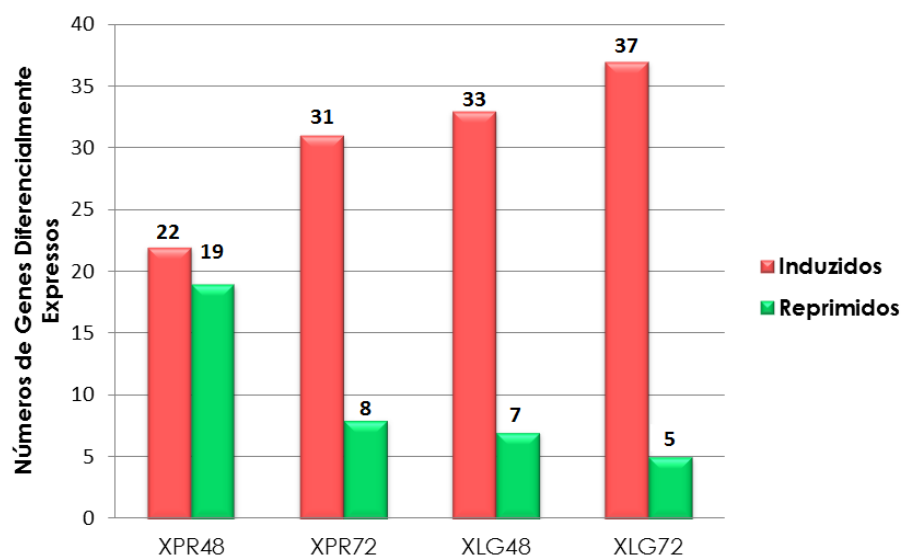


Figura 5. Distribuição dos genes diferencialmente expressos (GDEs) de Xac nos hospedeiros menos suscetível laranja doce ‘Pêra Rio’ (XPR) e altamente suscetível lima ácida ‘Galego’ (XLG), 48 e 72 horas (RNA-seq). As barras vermelhas indicam a quantidade de genes induzidos e as barras verdes indicam a quantidade de genes reprimidos.

Tabela 4. Genes induzidos em Xac na interação com laranja doce ‘Pêra Rio’.

Laranja doce ‘Pêra Rio’			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC0396	hpaB - HpaB protein	4,741	4,266
XAC0397	hrpE - HrpE protein	7,628	7,654
XAC0398	hrpD6 - HrpD6 protein	7,346	6,666
XAC0399	hrpD5 - HrpD5 protein	5,002	3,994
XAC0407	hrpB1 - HrpB1 protein	5,202	4,196
XAC0408	hrpB2 - HrpB2 protein	5,195	4,104
XAC0409	hrcJ - HrcJ protein	5,172	4,435
XAC0416	hpa1 - Hpa1 protein	10,297	9,506

*Valores de Log2 *Fold-Change*.

(continua)

Tabela 4. Genes induzidos em Xac na interação com laranja doce 'Pêra Rio'.

Laranja doce 'Pêra Rio'			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC0435	virK - VirK protein	5,085	4,971
XAC2370	Hypothetical protein	5,498	4,834
XAC2371	IS1479 transposase	4,662	4,034
XAC2654	Hypothetical protein	5,153	4,750
XAC2832	Hypothetical protein	6,998	5,152
XAC2853	Cysteine protease	6,503	6,232
XAC2922	hrpW HrpW protein	4,975	3,970
XAC3615	Hypothetical protein	4,708	4,160
XAC0394	HrpF protein	5,255	4,035
XAC0661	Peh	5,750	4,592
XAC2786	Hypothetical protein	5,976	6,235
XAC2831	Extracelular serine	4,537	4,658
XAC0239	Hypothetical protein	4,791	—
XAC0281	Transcrip.regulator	4,564	—
XAC0543	Hypothetical protein	—	4,502
XAC0906	AhpF subunit F	—	4,344
XAC0907	AhpC subunit C	—	3,930
XAC1251	RpsT 30S rib S20	—	4,178
XAC1301	KatG catalase	—	4,062
XAC1443	YybA Regulator	—	4,423
XAC2787	Hypothetical protein	—	4,253
XAC3241	FimA fimbrillin	—	4,334
XAC3506	Truncated cell S	—	5,942
XAC3507	CelS cellulase S	—	4,327
XAC4030	CatB catalase	—	3,911

*Valores de Log2 Fold-Change.

(continuação)

Tabela 5. Genes reprimidos em Xac na interação com laranja doce 'Pêra Rio'.

Laranja doce 'Pêra Rio'			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC2483	Hypothetical protein	-4,361	—
XAC3893	SSU 23S rib RNA	-5,839	—
XAC3896	SSU 16S rib RNA	-5,603	—
XAC2336	CydA	-4,874	-4,260
XAC2337	CydB	-6,141	-4,231

*Valores de Log2 Fold-Change

(continua)

Tabela 5. Genes reprimidos em Xac na interação com laranja doce ‘Pêra Rio’.

Laranja doce ‘Pêra Rio’			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC0145	Hypothetical protein	-4,950	—
XAC0527	Hypothetical protein	-Inf	—
XAC1816	Hemagglutinin	-3,763	—
XAC2223	Hypothetical protein	-5,104	—
XAC2642	P phage terminase	- Inf	—
XAC2986	PelB pectate lyase I	-4,518	—
XAC3026	Transcriptional reg	- Inf	—
XAC3282	Integrase	-4,210	—
XAC3736	CioB cyanide	-4,733	—
XAC3874	Hypothetical protein	-5,132	—
XAC4140	ClpB	-4,461	—
XAC4146	Hypothetical protein	- Inf	—
XACa0017	Hypothetical protein	-3,749	—
XACb0067	TnpA, Tn5045	-3,614	—
XAC0899	Hypothetical protein	—	-4,645
XAC2616	VirB2 protein	—	-3,421
XAC4045	Hypothetical protein	—	-3,429

*Valores de Log2 *Fold-Change*. (continuação)

Tabela 6. Genes induzidos em Xac na interação com lima ácida ‘Galego’.

Lima ácida ‘Galego’			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC0286	AvrXacE1protein	3,939	3,747
XAC0396	HpaB protein	5,427	4,900
XAC0397	HrpE protein	7,834	8,451
XAC0398	HrpD6 protein	7,690	7,027
XAC0399	HrpD5 protein	5,021	4,730
XAC0407	HrpB1 protein	5,193	4,800
XAC0408	HrpB2 protein	5,234	4,857
XAC0409	HrcJ protein	5,450	5,092
XAC0416	Hpa1 protein	9,938	10,285
XAC0417	Hpa2 protein	3,908	4,067
XAC0435	VirK protein	5,698	4,157
XAC0543	Hypothetical protein	5,068	4,125
XAC2370	Hypothetical protein	5,884	4,606

*Valores de Log2 *Fold-Change*. (continua)

Tabela 6. Genes induzidos em Xac na interação com lima ácida ‘Galego’.

Lima ácida ‘Galego’			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC2371	IS1479 transposase	5,345	4,098
XAC2654	Hypothetical protein	4,673	4,467
XAC2787	Hypothetical protein	4,324	4,759
XAC2832	Hypothetical protein	5,929	5,872
XAC2853	Cysteine protease	6,787	6,248
XAC2922	HrpW protein	4,920	5,149
XAC3506	Truncated cellulase S	5,165	4,859
orf00066		3,926	4,939
orf00301		4,610	4,491
XAC0394	HrpF protein	5,311	5,241
XAC0661	Peh-1	5,816	4,846
XAC2786	Hypothetical protein	6,457	5,947
XAC2831	Serine protease	4,620	5,244
XAC2372	IS1479 transposase	4,023	—
XAC3507	CelS	4,209	—
XAC3647	PheA	6,206	—
XAC3856	Hypothetical protein	4,361	—
XAC0552	Proteinase	4,839	—
XAC1266	HrpX	3,455	—
XAC4199	Polyvinylalcohol	4,485	—
XAC0401	HrcS protein	—	3,951
XAC0403	HrcQ protein	—	4,086
XAC1955	FliE flagellar protein	—	4,544
XAC1981	FlgG	—	4,396
XAC1986	FlgB flagellar protein	—	4,317
XAC3241	FimA fimbriin	—	3,609
XAC4333	Hypothetical protein	—	4,139
XAC0404	HpaP protein	—	3,884
XAC0612	EngXCA cellulase	—	4,345
XAC1172	Hypothetical protein	—	3,673
XAC1947	FliN	—	4,324

*Valores de Log2 *Fold-Change*.

(continuação)

Tabela 7. Genes reprimidos em Xac na interação com lima ácida ‘Galego’.

Lima Ácida ‘Galego’			
XAC ID	Descrição	48 horas	72 horas
XAC0899	Hypothetical protein	-4,501	-4,482
XAC2483	Hypothetical protein	-5,352	-4,458
XAC0767	RnpB	-3,353	—
XAC0900	Pms	-3,496	—
XAC4045	Hypothetical protein	-3,633	—
XAC2336	CydA	-4,363	—
XAC2337	CydB	-4,810	—
XAC3874	Hypothetical protein	—	-4,229
XAC3893	SSU 23S rib RNA	—	-7,292
XAC3896	SSU 16S rib RNA	—	-7,653

*Valores de Log2 Fold-Change.

Estes resultados revelam que o perfil transcricional de Xac apresenta diferenças frente aos hospedeiros laranja doce ‘Pêra Rio’ e lima ácida ‘Galego’. Entretanto, para os dois hospedeiros, o número de GDEs induzidos foi maior do que os reprimidos nos dois tempos analisados, sendo mais discrepante às 72 hai. Por outro lado, quando se compara a expressão gênica de Xac nos dois hospedeiros, nos dois tempos analisados, observa-se uma maior quantidade de genes reprimidos pelo hospedeiro laranja doce ‘Pêra Rio’ e uma maior quantidade de genes induzidos pelo hospedeiro lima ácida ‘Galego’ (Figura 5). Chama a atenção o fato da quantidade de genes reprimidos em Xac quando inoculada em laranja doce ‘Pêra Rio’ (menos suscetível), principalmente às 48 hai, ser 2,7 maior do que a da Xac inoculada em lima ácida ‘Galego’ (hospedeiro altamente suscetível) (Figura 5).

A diferença na quantidade de GDEs reprimidos em Xac quando inoculada no hospedeiro laranja doce ‘Pêra Rio’, principalmente no início da infecção, pode estar relacionada ao fato do patógeno ser reconhecido mais rapidamente pelo hospedeiro menos suscetível. Por outro lado, o fato da quantidade de GDEs induzidos em Xac inoculada em lima ácida ‘Galego’ ser maior do que quando inoculada em laranja doce ‘Pêra Rio’, indicando que um arsenal maior de ataque é disparado pela bactéria contra o hospedeiro altamente suscetível, o que levaria a vencer mais

rapidamente as defesas desse hospedeiro, garantindo uma colonização mais rápida e o aparecimento dos sintomas da doença. Nesse trabalho, os GDEs de Xac inoculada em cada hospedeiro de citros foram analisados para se obter uma descrição funcional de cada transcrito, sendo categorizados de acordo com o processo biológico. Os resultados obtidos para Xac inoculada em laranja doce 'Pêra Rio' estão apresentados nas Figuras 6 e 7 e os obtidos para a Xac inoculada em lima ácida 'Galego' estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

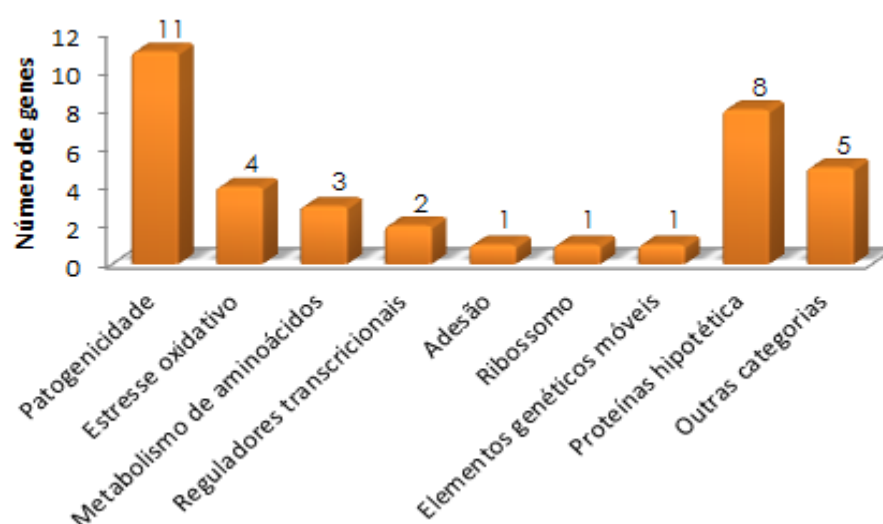


Figura 6. Classificação dos genes induzidos de Xac inoculada no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo com o processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada grupo.

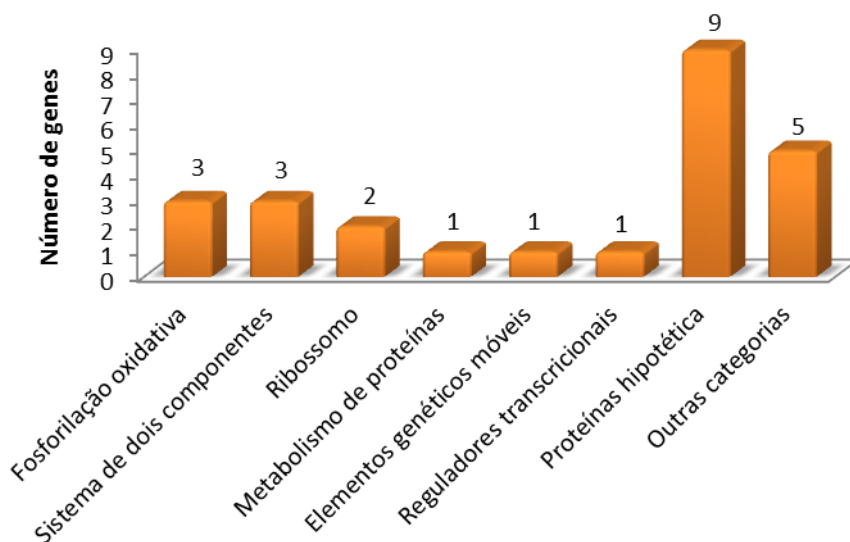


Figura 7. Classificação dos genes reprimidos de Xac inoculada no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada grupo.

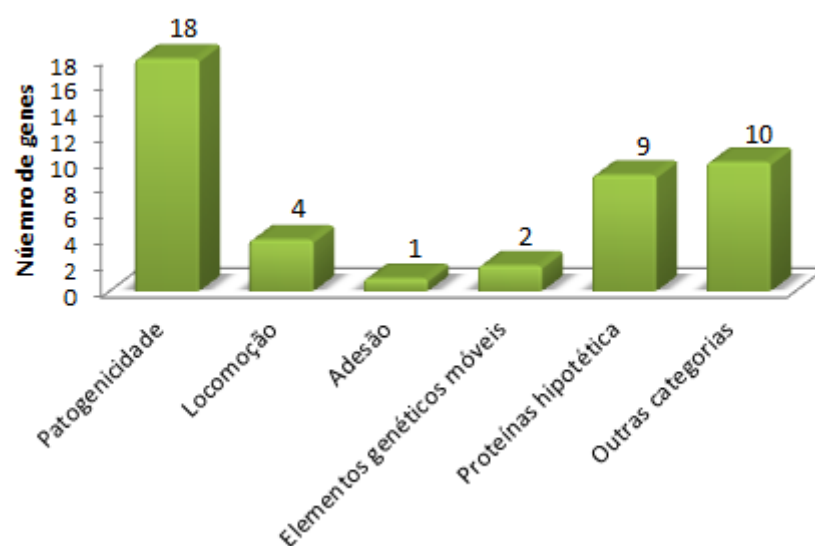


Figura 8. Classificação dos genes induzidos de Xac inoculada no hospedeiro lima ácida 'Galego' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada grupo.

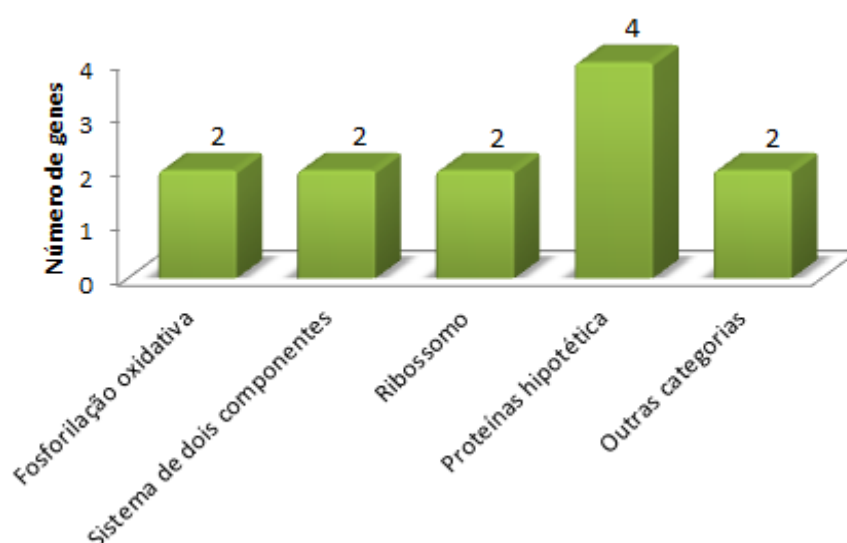


Figura 9. Classificação dos genes reprimidos de Xac inoculada no hospedeiro lima ácido 'Galego' nos tempos de 48 e 72 horas. Os genes foram categorizados de acordo processo biológico do qual participam. O número acima de cada barra indica o número de genes em cada grupo.

A categorização dos transcritos revelou que a maioria dos genes de Xac inoculado no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio', e que foram induzidos nos tempos de 48 e 72 horas, estão envolvidos, principalmente, com patogenicidade e estresse oxidativo (Figura 11), enquanto que os reprimidos estão envolvidos com a fosforilação oxidativa. Por outro lado, os genes de Xac inoculado no hospedeiro lima ácida 'Galego', e que foram induzidos nos tempos de 48 e 72 horas, estão envolvidos, principalmente, com patogenicidade (Figura 10) e locomoção (Figura 11), enquanto que os reprimidos estão envolvidos com a fosforilação oxidativa (Figura 11). Uma possível interpretação para estes resultados seria que em ambos os casos a bactéria diminui o seu metabolismo energético e direciona a sua maquinaria para a produção de agentes patogênicos e de combate às defesas da planta, mas com diferenças em relação ao hospedeiro.

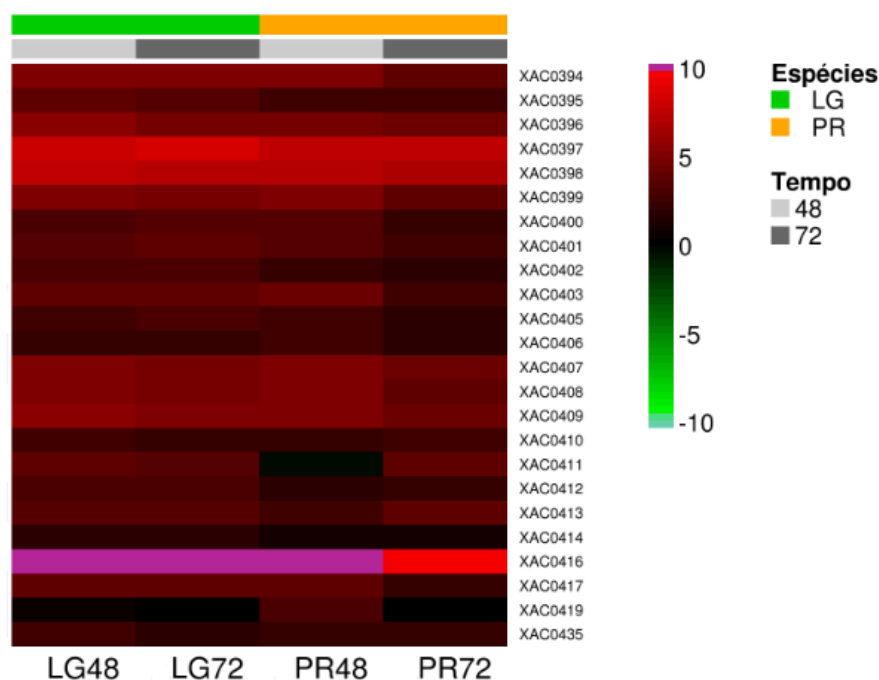


Figura 10. Matriz de expressão (“Heatmap”) dos genes relacionados à patogenicidade de Xac nos hospedeiros lima ácida ‘Galego’ (LG) e laranja doce ‘Pêra Rio’ (PR), ambos nos tempos 48 e 72 horas após a inoculação. A escala de cores varia da cor verde, que indica os genes reprimidos para a cor vermelha, que indica os genes induzidos.

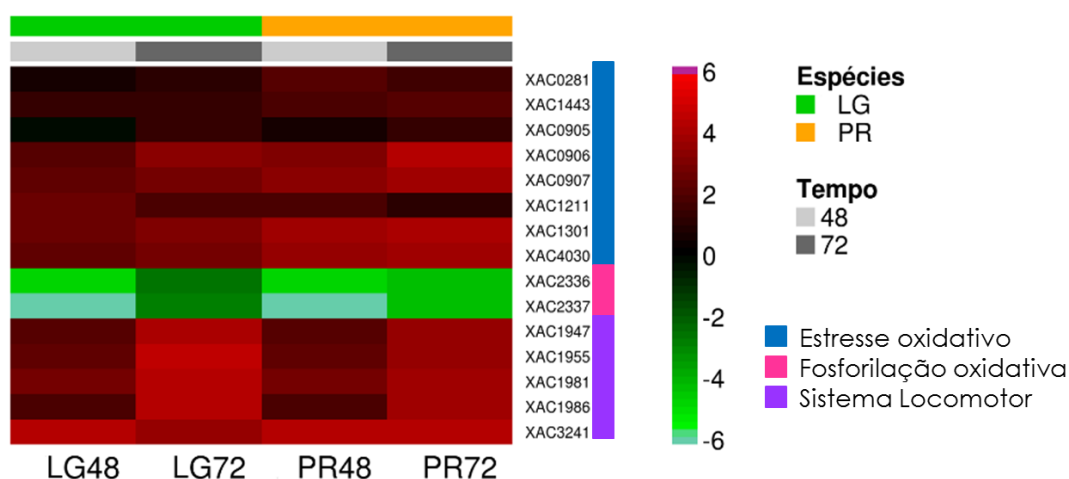


Figura 11. Matriz de expressão (“Heatmap”) dos genes relacionados ao estresse oxidativo, fosforilação oxidativa e sistema locomotor de Xac nos hospedeiros lima ácida ‘Galego’ (LG) e laranja doce ‘Pêra Rio’ (PR), ambos nos tempos 48 e 72 horas após a inoculação. A escala de cores varia da cor verde, que indica os genes reprimidos para a cor vermelha, que indica os genes induzidos.

Zhang e colaboradores (2013), usando RNA-seq e crescimento em meio de cultura que mimetiza o apoplasto da planta, investigaram a expressão gênica de três isolados da bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* provenientes de diferentes locais e que apresentavam diferença na virulência para o hospedeiro arroz. Eles encontraram que os isolados apresentaram um padrão diferente de genes diferencialmente expressos, com a maioria dos genes estando associados à virulência, incluindo exopolissacarídeos (EPS), os genes HR e efetores do tipo III. Liu e colaboradores (2013), também utilizando a técnica de RNA-seq, analisaram o transcriptoma da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) isolado 8004, cultivada em meio MMX (meio mínimo) e médio NYG. Os genes induzidos estavam envolvidos principalmente no metabolismo de aminoácidos, sistemas de transporte, adaptação à condição atípica e patogenicidade, especialmente o sistema de secreção do tipo III, enquanto os genes reprimidos estavam envolvidos principalmente com quimiotaxia e degradação de moléculas pequenas. Dos trabalhos descritos acima, todos feitos *in vitro* (meio de cultura), o grupo de genes comum encontrado nos transcriptomas foi o de patogenicidade e virulência, que foi também encontrado em nosso estudo. Entretanto, por ser tratar de um estudo *in vivo*, outros grupos de genes se destacaram no nosso estudo, como os relacionados ao estresse oxidativo, à fosforilação oxidativa, ao sistema de dois componentes e à locomoção. Assim, para validar os resultados do RNA-Seq, foram escolhidos alguns dos genes pertencentes a esses grupos, entre eles o *hrpE*, *hpa1*, *hrpW* e *Virk*, que são genes relacionados à patogenicidade, os genes *ahpC*, *katE* e *katG*, que estão relacionados ao estresse oxidativo e os genes *cydA* e *cydB*, que estão relacionados à fosforilação oxidativa. Estes genes tiveram suas taxas de expressão analisadas pela técnica da qRT-PCR.

5.4. Análise da expressão relativa dos genes de patogenicidade

O funcionamento do sistema de secreção tipo III permite que o patógeno, uma vez aderido à superfície da célula hospedeira, realize o envio de proteínas de virulência da célula bacteriana diretamente para o citoplasma da célula hospedeira

eucariota. Acredita-se que a patogenicidade e a virulência da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* esteja relacionada com o funcionamento desse sistema, que é altamente conservado em bactérias Gram-negativas patogênicas às plantas (BÜTTNER et al., 2002). No presente trabalho, a confiabilidade dos resultados do transcriptoma em relação à expressão de genes relacionados à patogenicidade foi comprovada pelos resultados obtidos na qRT-PCR para a expressão dos genes *hrpE*, *hpa1*, *hrpW* e *Virk* (Figura 12). A expressão de todos estes genes, em ambos os hospedeiros, nos tempos de 48 e 72 horas, se mostrou induzida, assim como havia sido observado no RNA-Seq (Tabelas 4 e 6).

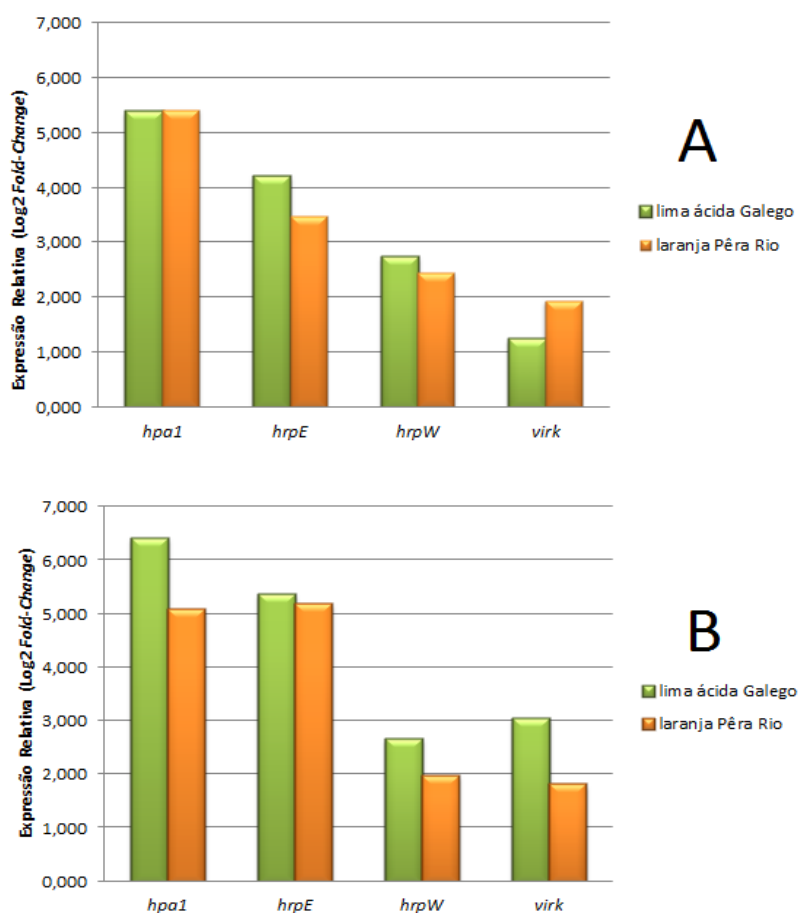


Figura 12. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *hpa1*, *hrpE*, *hrpW* e *virK* de Xac nos hospedeiros laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego'. (A) 48 horas após a infecção. (B) 72 horas após infecção.

O gene *hpa1*, que codifica uma proteína citoplasmática que contém 138 aminoácidos (Hpa1), foi o que apresentou maior expressão em relação aos demais genes testados. Zhu e colaboradores (2000) estudaram a ação da proteína Hpa1 no patossistema *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*:arroz. Em um experimento onde realizaram mutagênese e deleção do gene *hpa1*, eles verificaram que a perda deste gene resultou em uma drástica diminuição da patogenicidade na planta hospedeira.

Sgro e colaboradores (2012) sugerem que, embora Hpa1 induza a resposta de defesa nas plantas não hospedeiras em menor grau, em plantas hospedeiras sua principal característica é alterar a estrutura do mesófilo, onde fica a maior parte das células e agregar as células bacterianas, aumentando assim a virulência do patógeno. Para o gene *hrpE*, que codifica a proteína HrpE, a expressão desse gene foi maior às 72 horas. Weber e Koebnik (2006) analisaram a taxa evolutiva do gene *hrpE* e verificaram a natureza alfa-helicoidal anfipática do sinal do sistema de secreção tipo III (SST3) presente no seu produto, que foi o primeiro relato da estrutura da superfície de uma bactéria patogênica que evoluiu sob a restrição da seleção positiva. Em um outro trabalho, o gene *hrpE* foi nocauteado e observou-se que o mutante *hrpE* perdeu patogenicidade em arroz e a capacidade de provocar HR (reação de hipersensibilidade) no tabaco, sendo então sugerido que o gene *hrpE* era essencial para a formação do pilus *Hrp* através do qual o SST3 injeta efetores em células de arroz (YINPENG et al., 2009).

O gene *hrpW* codifica uma proteína efetora (304 aminoácidos) translocada pelo SST3 (CHARKOWSKI et al., 1998). Estruturalmente trata-se de uma proteína contendo domínio “harpin”, com repetições ricas de glicina e possui um domínio homólogo à pectato liase (enzima pectinolítica). Este gene se manteve com uma expressão similar para as duas interações planta-patógeno (‘Pêra Rio’:Xac e ‘Galego’:Xac), nos dois tempos analisados. A proteína HrpW está envolvida, nos mecanismos de ação da proteína Hpa1, o que revela um papel fundamental desta proteína para a patogenicidade e virulência de Xac. Além disso, estudos demonstraram que HrpW poderia ser utilizada como marcador de diagnóstico para o cancro cítrico (PARK et al., 2006). Um mutante de *hrpW* demonstrou perder a sua

capacidade para induzir a resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco, implicando na virulência de *P. cichorii* (KAJIHARA et al., 2012).

Em lima ácida 'Galego', a expressão do gene *virK*, que codifica a proteína VirK, foi bem maior às 72 horas após infecção do que às 48 horas, enquanto que praticamente não houve diferença em laranja doce 'Pera Rio' (Figura 9). A região Virk foi descrita como altamente conservada entre os grandes plasmídeos de virulência de *Shigella* e *Escherichia coli*, sugerindo que a função de *virK* é um determinante de virulência essencial para *Shigella flexneri* (NAKATA et al., 1992). Esta proteína Virk mostra uma relação estreita com a proteína HrpF (ROSSIER et al., 2000). Em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), a proteína Virk é essencial para patogenicidade (WANG et al., 2013).

5.5. Identificação e classificação dos genes modulados em Xac em resposta ao estresse oxidativo dos citros

As diferenças nas respostas de hospedeiros citros podem estar relacionadas com as características anatômicas e também com as características bioquímicas e moleculares das plantas (CERNADAS et al., 2008; JALAN et al., 2013). Caso a barreira física de entrada da bactéria fosse vencida pela inoculação sob pressão do patógeno, restariam as características bioquímicas e moleculares de cada hospedeiro.

O malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica, é um indicador em análises de estresse oxidativo em diversos modelos experimentais. Em lima ácida 'Galego' inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* a concentração de MDA demonstrou um aumento de estresse oxidativo em ambos os tempos quando comparado com amostra da planta sem inoculação e inoculada com H₂O (controle), sendo ligeiramente maior no tempo de 72 horas após a inoculação (Figura 13). Os resultados para laranja doce 'Pêra Rio' demonstraram um aumento do estresse oxidativo nas plantas inoculadas com Xac, principalmente no tempo de 48 horas após a inoculação (Figura 14). O nível de estresse apresentado pela laranja doce 'Pera Rio', às 48 horas após a inoculação, foi maior do que a apresentada pela lima

ácida 'Galego'. Ou seja, o hospedeiro menos suscetível apresentou uma produção de EROS maior do que o hospedeiro altamente susceptível.

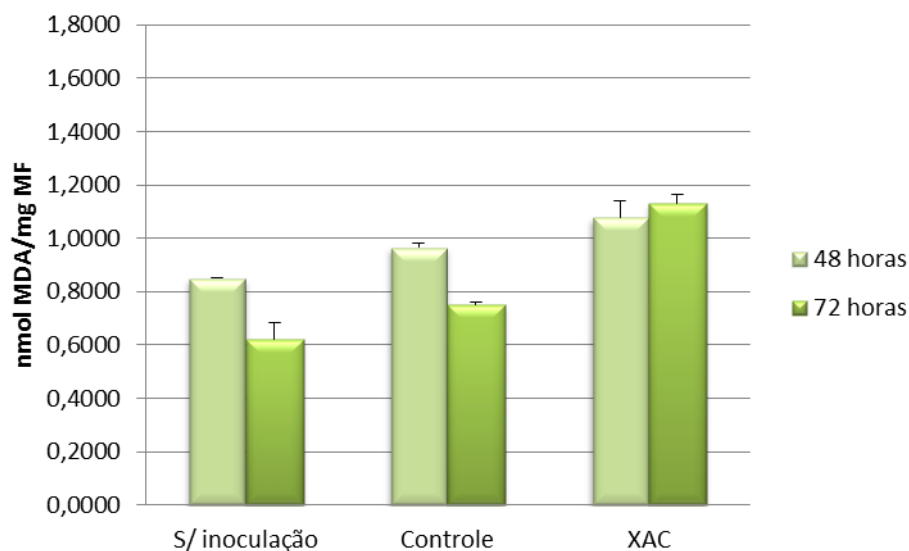


Figura 13. Quantidade de MDA (nmol/mg massa fresca) em folhas de lima ácida 'Galego' nos tempos de 48 horas e 72 horas.

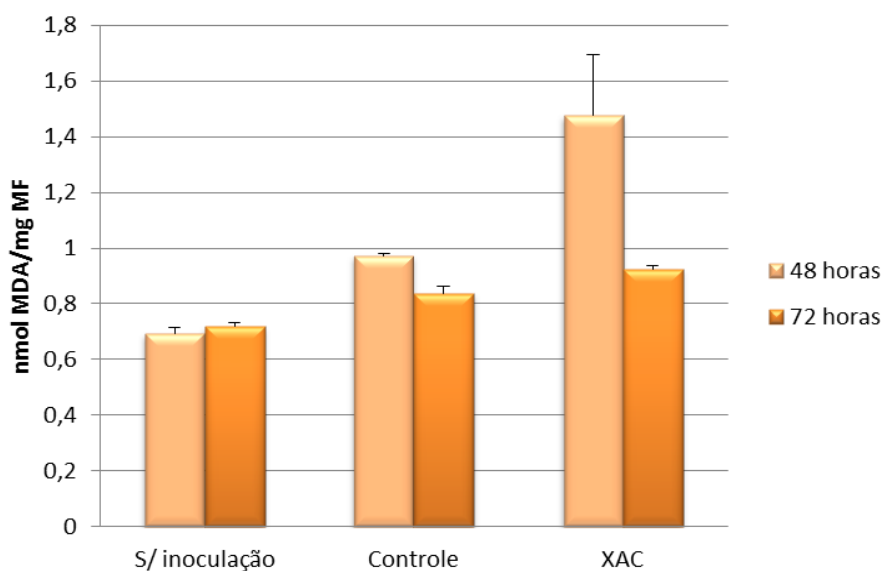


Figura 14. Quantidade de MDA (nmol/mg massa fresca) em folhas de laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 horas e 72 horas.

O SST3 é responsável por injetar os fatores patogênicos diretamente dentro das células hospedeiras, sendo um dos mais importantes sistemas de virulência e patogenicidade das bactérias Gram-negativas (BÜTTNER; BONAS, 2002). O reconhecimento da bactéria pelo hospedeiro, geralmente, se dá por meio da ligação de um elicitor, produzido pelo patógeno, a um receptor presente na membrana plasmática da parede celular da célula vegetal. Os elicitores podem ser hospedeiro-específicos, que são moléculas codificadas por genes de avirulência (Avr) do patógeno, ou não ser hospedeiro-específicos, como fragmentos da parede celular da planta liberados durante o processo de infecção, que originam uma resposta de defesa para minimizar a doença (DE WIT, 2007).

Devido ao potencial metabólico da Xac, acredita-se que essa bactéria possua uma gama complexa de genes relacionados à proteção contra danos oxidativos (MOREIRA, 2006). Segundo Nelson e Cox (2006), os hospedeiros reativos de oxigênio (EROS) são muito reativos, podendo danificar enzimas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos. São produzidas nas células em resposta ao estresse oxidativo e é um dos fatores que ocasionam a morte celular programada (apoptose).

A vulnerabilidade natural de organismos às EROS tem sido utilizada como alvo de plantas e microrganismos que esperam suprimir o desenvolvimento de seus competidores, sendo que os principais são peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico, que atuam não somente nos mecanismos de defesa, mas também na sinalização sinérgica com outras moléculas de sinalização (BOLWELL; DAUDI, 2009).

Quando a concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado em folhas de laranja doce 'Pêra Rio' e de lima ácida 'Galego' inoculadas com Xac, verificou-se que laranja doce 'Pêra Rio' possui, naturalmente, uma maior concentração de H_2O_2 do que a lima ácida 'Galego', que é estatisticamente significativa (Figuras 15 e 16). No tempo de 48 horas após a inoculação de Xac a quantidade de H_2O_2 apresenta um ligeiro aumento nas duas variedades de citros, mas que não é estatisticamente significativa (Figura 15). Entretanto, para o tempo de 72 horas após a inoculação, pode-se observar uma diminuição da quantidade de H_2O_2 , em ambos os hospedeiros, quando comparado com seus respectivos controles

(Figura 16). Acredita-se que a diminuição na concentração de H_2O_2 deve-se ao fato da Xac produzir enzimas que degradam o H_2O_2 .

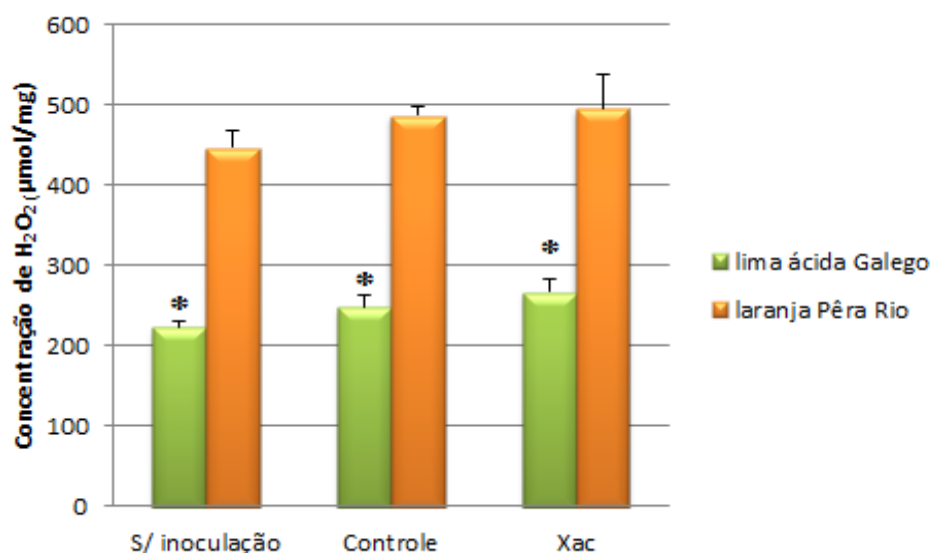


Figura 15. Quantidade de H_2O_2 em lima ácida 'Galego' e laranja doce 'Pêra Rio' 48 horas após a inoculação de Xac. Os dados acompanhados por asteriscos (*) possuem significância estatística segundo o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

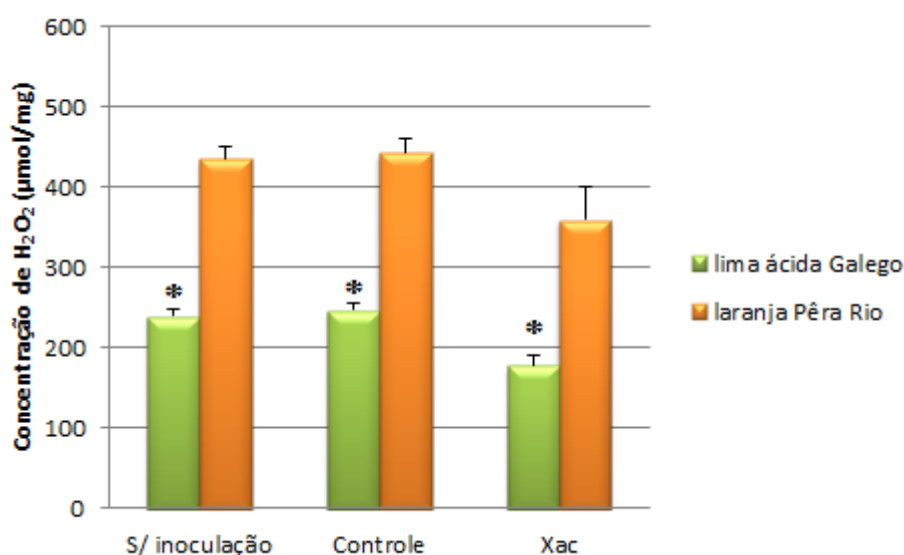


Figura 16. Quantidade de H_2O_2 em lima ácida 'Galego' e laranja doce 'Pêra Rio' 72 horas após a inoculação de Xac. Os dados acompanhados por asteriscos (*) possuem significância estatística segundo o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A quantidade de H_2O_2 presente nas células é de grande importância, visto que a mesma é um oxidante relativamente estável e pode iniciar o dano oxidativo nas células, levando à interrupção da função metabólica e perda da integridade celular. A geração de H_2O_2 é aumentada em resposta a diferentes condições de estresse, que geralmente desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Apesar de ser um composto danoso quando acumulado na célula, a H_2O_2 também desempenha um papel importante no processo de aclimação e tolerância cruzada. Isso quer dizer que quando a planta é exposta previamente a um determinado estresse, pode induzir tolerância a subseqüentes exposições ao mesmo estresse ou a outro tipo diferente deste (NEILL et al., 2002).

Principalmente através da respiração aeróbica, os organismos eucariotos e procariotos geram EROS como produto do seu metabolismo. Assim, sistemas antioxidantes são utilizados para prevenir danos causados pelas EROS, incluindo as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase (AGUIRRE et al., 2005). Os componentes liberados podem elevar a taxa de formação intracelular de EROS como parte de uma complexa rede de sinais em resposta ao ataque do patógeno e mediação de múltiplas respostas, algumas vezes com efeitos opostos, em diferentes contextos ou em resposta a diferentes patógenos, participando inclusive do processo de fortalecimento da parede celular vegetal (IMLAY, 2008; TORRES et al., 2006). As EROS geradas através da fosforilação oxidativa possuem um papel central no desenvolvimento da morte celular do hospedeiro durante a resposta de hipersensibilidade (GRANT; LOAKE, 2000).

A infecção por *Xac* altera o metabolismo de H_2O_2 das folhas de toranja, através de mudanças nas atividades de enzimas que controlam a ação das EROS (KUMAR et al., 2011). A habilidade de multiplicação da bactéria patogênica no tecido da planta hospedeira deve-se, em parte, à capacidade de desintoxicar o H_2O_2 produzido pela planta, que pode penetrar através da membrana e afetar uma variedade de processos celulares da bactéria. A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é uma bactéria estritamente aeróbia e esta fisiologia pode levar à geração de estresse oxidativo intracelular durante a respiração normal com o oxigênio molecular. Além disso, como um microrganismo patogênico, ela se depara com uma grande

quantidade de EROS produzido pela planta hospedeira. Assim, ela tem que combater tanto o estresse oxidativo gerado pelo seu metabolismo aeróbico como aquele gerado pela planta hospedeira como uma resposta de defesa. Portanto, Xac deve possuir e empregar uma defesa versátil de enzimas antioxidantes (GRANT; LOAKE, 2000; TONDO et al., 2010).

Os resultados obtidos por Tondo et al., (2010) indicam que o padrão de expressão de antioxidantes é modificado em resposta a qualquer estímulo associado com a planta ou o microambiente que ela fornece. A indução da atividade destas enzimas pode servir como proteção contra a exposição à H_2O_2 nos primeiros estágios da infecção, sendo que as EROS são produzidas pela planta como um dos primeiros eventos de resposta de defesa (O'BRIEN et al., 2012). O elevado número de genes que codificam enzimas antioxidantes em Xac fornece uma indicação da importância dos sistemas antioxidantes para a sobrevivência da bactéria (TONDO et al., 2010).

Klotz e Hutcheson (1992), trabalhando com estirpes do fitopatógeno *Pseudomonas syringae*, verificaram que esta bactéria era capaz de resistir a concentrações mais elevadas de H_2O_2 quando comparada a bactérias não-patogênicas, com taxas de atividade de catalase variando de 10 a 100 vezes mais. Esses mesmos autores verificaram ainda a presença de múltiplas atividades da catalase no espaço periplasmático e no fluído citoplasmático da bactéria e sugeriram que essa alta atividade da catalase em diferentes locais da célula são decisivos para o combate ao estresse oxidativo, sendo um fator de virulência determinante no sucesso da colonização.

Os genes *cydA* e *cydB* são genes do complexo da citocromo d oxidase que faz parte da cadeia respiratória, onde algumas de suas funções são atividade de oxidoredutase e transporte de elétrons, catalizando a oxidação do ubiquinol e a redução do oxigênio molecular a água. Assim, quanto maior a expressão dos genes *cydA* e *cydB*, maior deve ser a atividade respiratória, com o consequente aumento da produção de EROS, e vice-versa. Quando a expressão destes dois genes foi avaliada pela técnica de qRT-PCR em Xac inoculada nos hospedeiros laranja doce 'Pêra Rio' e lima ácida 'Galego', observou-se que, em ambos os hospedeiros, houve

uma drástica redução da expressão destes genes às 72 horas após a inoculação em comparação com a expressão dos mesmos às 48 horas após a inoculação (Figuras 17 e 18). A repressão destes dois genes, em ambos os tempos, é maior em lima ácida ‘Galego’ do que em laranja doce ‘Pêra Rio’ (Figuras 17 e 18).

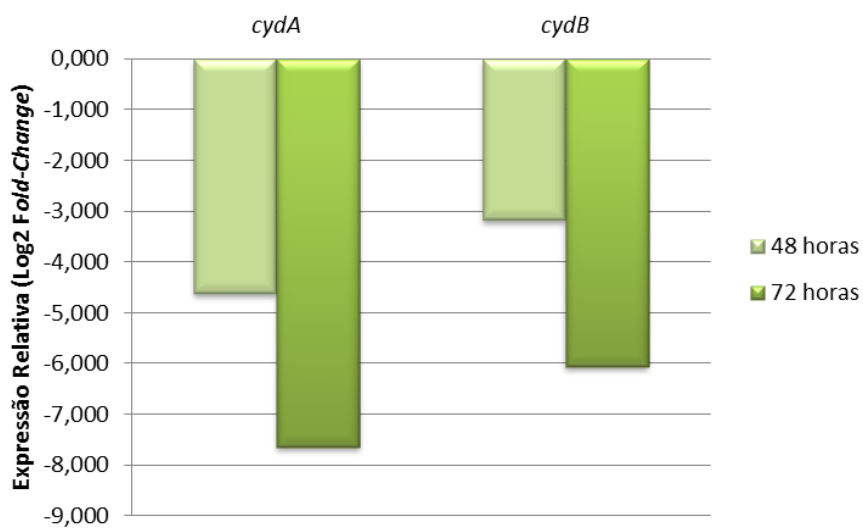


Figura 17. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *cydA* e *cydB* de Xac no hospedeiro lima ácida ‘Galego’ nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção.

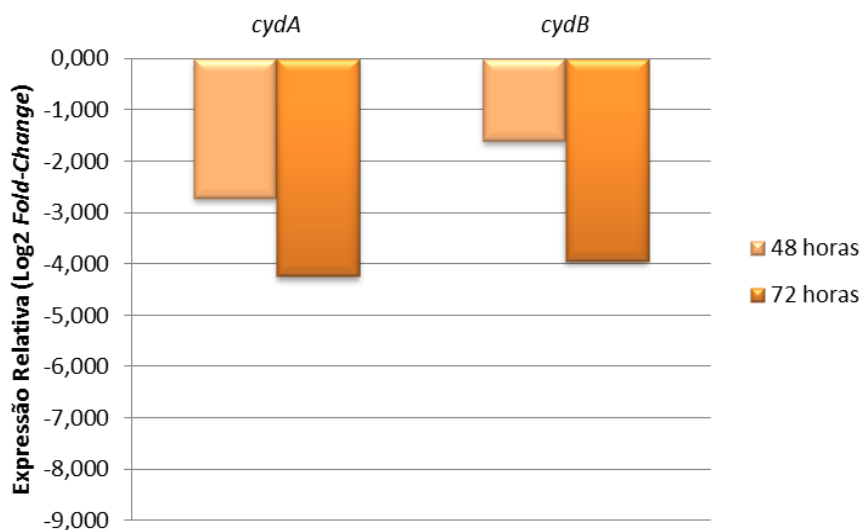


Figura 18. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *cydA* e *cydB* de Xac no hospedeiro laranja doce ‘Pêra Rio’ nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção.

A proteína OxyR é um regulador transcricional sensível a H_2O_2 (KULLIK et al., 1995). A existência de uma resposta adaptativa a H_2O_2 foi inicialmente descoberta em *E. coli*, sendo demonstrado que esta bactéria possui um sistema de defesa específico induzido por peróxidos que é intermediado pelo ativador de transcrição OxyR (CABISCOL et al., 2000). A proteína atua principalmente como um ativador transcricional sob condições oxidantes (DUBBS; MONGKOLSUK, 2012). A proteína OxyR, codificada pelo gene *oxyR*, possui dupla função, agindo tanto como sensor de estresse causado por peróxidos e como ativador de transcrição de um regulon de genes induzidos por H_2O_2 .

O regulon OxyR de *E. coli* inclui genes envolvidos no metabolismo e proteção contra peróxidos (*katG*, *ahpC*, *ahpF*). A catalase-peroxidase *katG* e as duas subunidades da alquil-hidroperóxido redutase (codificadas pelo operon *ahpCF*) protegem contra os efeitos tóxicos dos peróxidos por meio da eliminação direta dos oxidantes (STORZ; ZHENG, 2000). Em outras bactérias, OxyR também regula genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo. Ele reprime a expressão de *katG* de *Burkholderia pseudomallei* e *katA* de *Sinorhizobium meliloti* durante o crescimento normal, e ativa estas catalases-peroxidases durante a exposição ao estresse oxidativo (LOPRASERT et al., 2003; LUO et al., 2005). Em *Xanthomonas campestris*, OxyR promove a regulação compensatória entre os genes *katA* e *ahpC* (CHAROENLAP et al., 2005).

Alguns dos genes diferencialmente expressos se mostraram importantes para ativar mecanismos utilizados pela Xac em resposta à defesa dos dois hospedeiros de citros à infecção. Cinco destes genes estão envolvidos na degradação de espécies reativas de oxigênio produzidas pelas plantas em resposta à invasão do patógeno (Tabelas 4 e 6). Os genes *ahpF* e *ahpC* codificam hidroperóxido redutase, *katE* e *katG* codificam peroxidase e *catB* codifica uma catalase.

Os dados de expressão obtidos no RNA-seq para os genes *ahpC*, *katE* e *katG* foram validados por qRT-PCR (Figuras 19 e 20). Em Xac infectando lima ácida 'Galego', a expressão destes três genes é maior às 48 horas após a infecção do que às 72 horas (Figura 19), enquanto que em Xac infectando laranja doce 'Pêra Rio' a expressão é ligeiramente maior às 72 horas após a infecção (Figura 20). Quando se

compara a expressão destes genes de Xac nos dois hospedeiros, eles são mais expressos quando Xac se encontra infectando laranja doce 'Pêra Rio', exceto para o gene *katE* (Figuras 19 e 20). Este resultado está em concordância com o fato de que laranja doce 'Pêra Rio' produz mais H_2O_2 do que lima ácida 'Galego' quando infectada com Xac (Figuras 15 e 16), o que exigiria da bactéria uma maior quantidade de enzimas envolvidas na eliminação de EROS, principalmente no início da infecção.

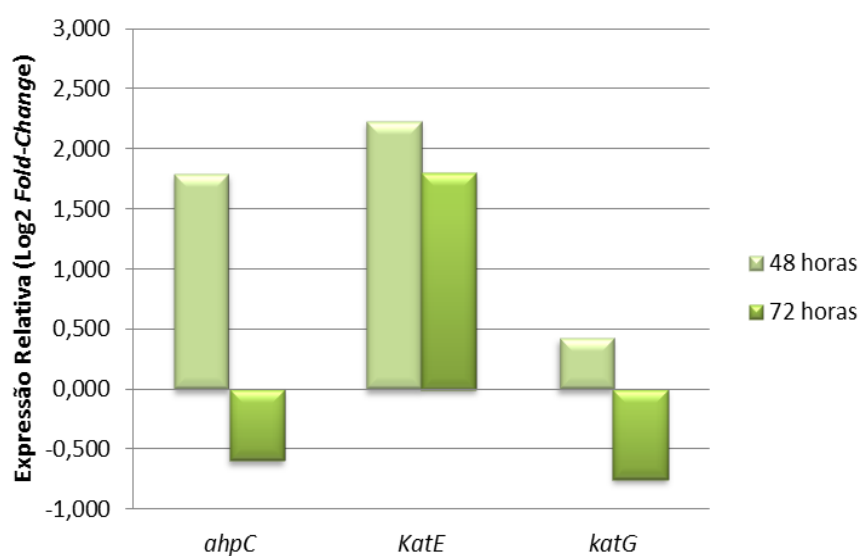


Figura 19. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *ahpC*, *katE* e *katG* de Xac no hospedeiro lima ácida 'Galego' nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção.

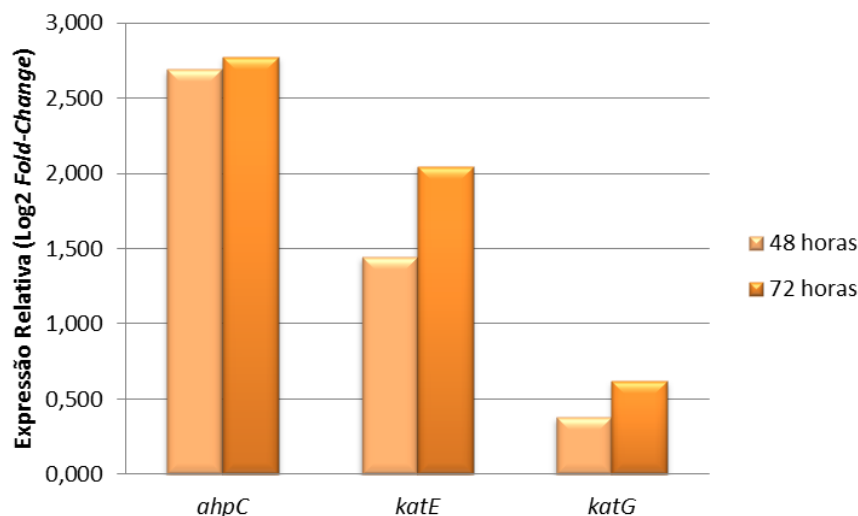


Figura 20. Análise por qRT-PCR da expressão dos genes *ahpC*, *katE* e *katG* de *Xac* no hospedeiro laranja doce 'Pêra Rio' nos tempos de 48 e 72 horas após a infecção.

O gene *ahpC* codifica a enzima hidróperóxido redutase que desempenha um papel importante de proteção contra a toxicidade do peróxido. O gene *ahpC* foi isolado a partir de *Salmonella typhimurium* e foi caracterizado como um membro da regulação de estresse oxidativo (TARTAGLIA et al., 1989). A proteína AhpC está associada com a desintoxicação das baixas concentrações de H_2O_2 gerada pelo metabolismo aeróbio normal e de hidróperóxidos orgânicos (SEEVER; IMLAY, 2001).

Jung e Kim (2003) produziram um mutante de *E. coli* deficiente em poliamina, o qual apresentou susceptibilidade aumentada à H_2O_2 . Este mutante apresentou um baixo nível intracelular da capacidade de remoção de H_2O_2 , devido à falha na indução dos genes *ahpC*, *KatG* e *KatE*, assim como falha na indução de *oxyR*. Li e colaboradores (2014) produziram um mutante do gene *ahpC* em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), o qual apresentou diminuição significativa da H_2O_2 endógena produzida pela respiração aeróbica normal do patógeno, afetando a quantidade total de H_2O_2 presente em plantas de arroz durante a interação com o patógeno. Este resultado sugere que Xoo contribui diretamente no acúmulo de H_2O_2 em arroz numa interação compatível e que este H_2O_2 produzido pelo patógeno está associado com o colapso das células do arroz.

Em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *katA*, *katG*, *katE*, e *ahpC* estão envolvidas na degradação de H_2O_2 , sendo que a que tem a melhor capacidade para desintoxicação de níveis elevados de H_2O_2 é a *katG* (JITTAWUTTIPOKA et al., 2009). As catalases de microrganismos patogênicos têm atraído a atenção como potenciais fatores de virulência (GUO et al., 2012). A KatG está entre as principais catalases envolvidos na virulência, sendo que KatE também pode fornecer alguma proteção *in planta*. Nossos resultados também indicam que estas catalases são potenciais fatores de virulência e são, coletivamente, necessárias para a patogênese de Xac.

Os genes *fliE*, *flgG*, *flgB* e *fliM* são genes que auxiliam no processo de motilidade do flagelo e também tiveram a expressão alterada em Xac em resposta ao hospedeiro lima ácida 'Galego' (Tabela 6).

Agrupando todos os genes de Xac que tiveram a expressão alterada de maneira significativa pela interação com o hospedeiro citros, foi possível sugerir um modelo dos mecanismos de resposta da Xac frente aos mecanismos de defesa ativados pela planta hospedeira (Figura 21).

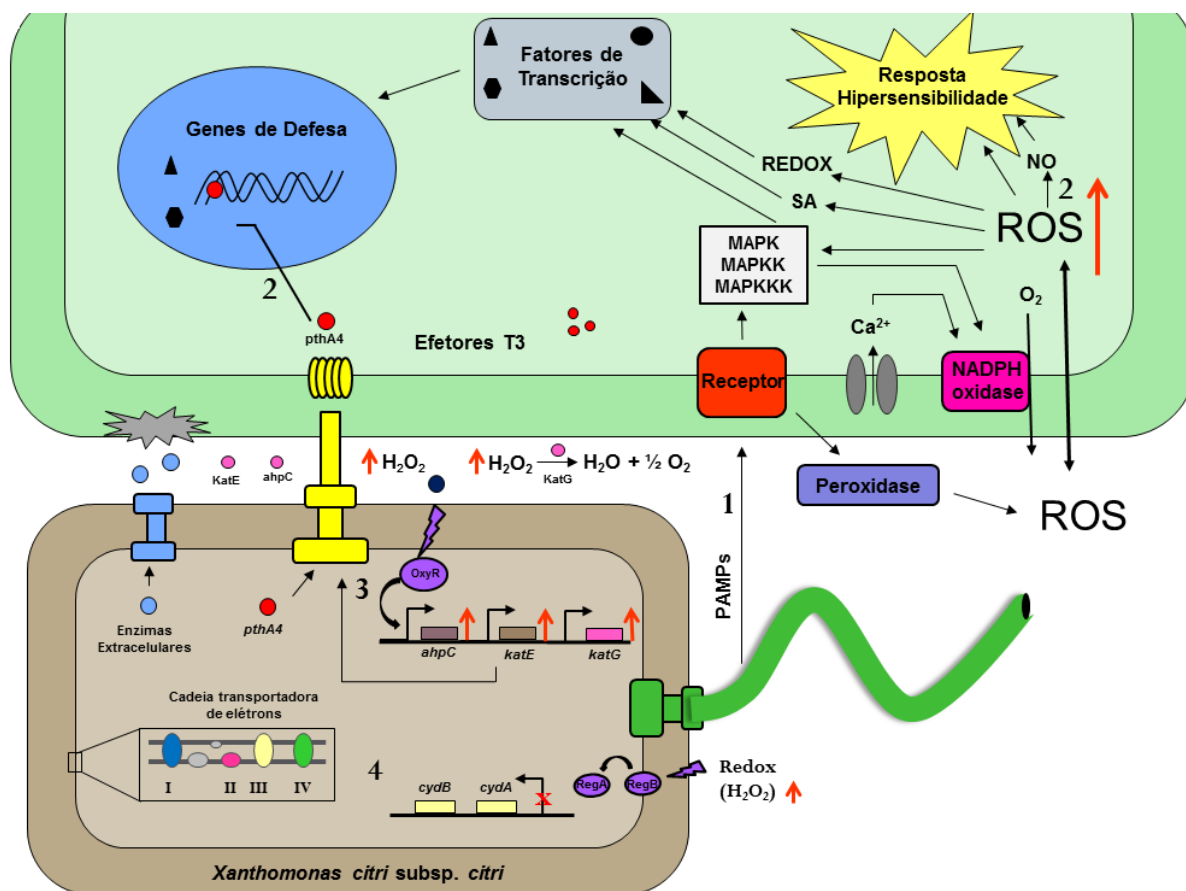


Figura 21. Modelo esquemático dos mecanismos envolvidos na interação da Xac com o hospedeiro citros. (1) Um sinal externo da planta induz a expressão de diversos genes de virulência na Xac, principalmente os relacionados com o SST3, efetoires proteicos do tipo III e genes do sistema de secreção tipo II (SST2). Paralelamente, os LPS e outros PAMPs (Padrões moleculares associados à patógeno) da bactéria são identificados por receptores específicos da planta hospedeira, ativando os genes de defesa contra o patógeno. (2) Esta resposta é denominada imunidade ativada por PAMP (PTI- PAMP-triggered immunity), que induz uma cascata de sinais, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e reação de hipersensibilidade (HR) se a planta for resistente. (2) Por outro lado, a bactéria também produz e transloca proteínas da família AVrB3/PthA que modulam a expressão de genes da planta hospedeira. (3) No caso de EROS, a bactéria tenta anular a ação desses produtos através da produção de catalases e peroxidases que são reguladas pelo regulador OxyR. (4) Diminuindo também a expressão de genes envolvidos na própria cascata respiratória.

6. CONCLUSÕES

Tanto no hospedeiro laranja 'Pêra Rio', menos suscetível ao cancro cítrico, como em lima ácida 'Galego', altamente suscetível à doença, houve indução de genes de patogenicidade e virulência de Xac, principalmente os do sistema de secreção tipo III (SST3).

Os genes relacionados à cadeia respiratória de Xac foram inibidos em ambos os hospedeiros, com maior inibição em lima ácida 'Galego'.

Os genes relacionados ao estresse oxidativo apresentaram um perfil de expressão maior em Xac na interação com laranja 'Pêra Rio' do que em lima ácida 'Galego', principalmente *ahpC* e *katG*.

A concentração de H_2O_2 nas folhas revelou que o hospedeiro menos suscetível ao cancro cítrico (laranja doce 'Pêra Rio') possui maior quantidade de H_2O_2 do que no hospedeiro altamente suscetível (lima ácida 'Galego');

A menor susceptibilidade ao cancro cítrico da laranja 'Pêra Rio' pode estar relacionada com a maior quantidade de H_2O_2 presente neste hospedeiro, o que leva a bactéria a ativar seu arsenal de enzimas para combater o estresse oxidativo do meio, retardando a infecção.

7. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 111-118, 2005.

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 215 – 233, 2002.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

AMARAL, S.F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **Biológico**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 112-123, 1957.

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

BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A.; AYRES, A. J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 1, p. 30-35, 2001.

BEDENDO, I. P.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 848-855, 1995.

BITTANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOLWELL, G. P.; DAUDI, A. Reactive oxygen species in plant–pathogen interactions. In: **Reactive oxygen species in plant signaling**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 113-133.

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

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Quantification of nucleic acids by PCR. **AZ of quantitative PCR**, p. 5-46, 2004.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO Journal**, New York, v. 2, n. 20, p. 5313-5322, 2002.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 3-8, 2000.

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.

CASH, T. P.; PAN, Y.; SIMON, M. C. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1219-1225, 2007.

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

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO P. T. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.

CHARKOWSKI, A. O.; ALFANO, J. R.; PRESTON, G.; YUAN, J.; HE, S. Y., ALAN COLLMER, A. The *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato HrpW* protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v. 180, p. 5211-5217, 1998.

CHAROENLAP, N., EIAMPHUNGORN, W., CHAUVATCHARIN, N., UTAMAPONGCHAI, S., VATTANAVIBOON, P., MONGKOLSUK, S. OxyR mediated compensatory expression between *ahpC* and *katA* and the significance of *ahpC* in protection from hydrogen peroxide in *Xanthomonas campestris*. **FEMS microbiology letters**, v. 249, n. 1, p. 73-78, 2005.

CITRUS BR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Comércio - Exportações Brasileiras. (2014-2015) Disponível em <<http://www.citrusbr.com/>>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Terceiro Levantamento. Brasília: CONAB, 2013. 11 p.

CUI, H.; XIANG, T.; ZHOU, J-M. Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 1453-1461, 2009.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOSO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Inglaterra, v.417, p.459-463, 2002.

DANGL, J. L., JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826-833, 2001.

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

DAURELIO, L. D.; ROMEROE, M.; PETROCELLI, S.; MERELO, P.; CORTADI, A.; TALÓN, M.; TADEO, F.; ORELIANO, E.; Characterization of *Citrus sinensis* transcription factors closely associated with the non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 10, p. 934-942, 2013.

DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature immunology**, v. 7, n. 12, p. 1243-1249, 2006.

DE SOUZA, A.A., Takita, M.A.; Coletta Filho, H.D.; Campos, M.A.; Teixeira, J.E.C.; Targon, M.L.P.N.; Carlos, E.F.; Ravasi, J.R.; Fischer, C.N.; Machado, M.A. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetic and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.965-971, 2009.

DE WIT, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal cell wall components. **Physiological Plant Pathology**, v. 23, n. 3, p. 345-357, 1983.

DOMINGUES, M. N. **Caracterização de proteínas de Citrus sinensis que interagem com a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico**, 2011. UNICAMP.

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

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. The generation of plant disease resistance gene specificities. **Trends in plant science**, v. 5, n. 9, p. 373-379, 2000.

ELSTNER, E. F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual review of plant physiology**, v. 33, n. 1, p. 73-96, 1982.

EXPRESSION SUIT SOFTWARE HELP; Expression Suite Software Version v.1.0, **Life Technologies Corporation**, Carlsbad, CA, USA, 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT: 1962-2007. (2011)

FEBRES, V. J.; KHALAF, A.; GMITTER, J. R; FG; MOORE, G. A. Production of disease resistance in *Citrus* by understanding natural defense pathways and pathogen interactions. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 3, p. 30-39, 2009.

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.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 126-139, 2006.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual review of phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275-296, 1971.

FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current opinion in immunology**, v. 10, n. 1, p. 16-22, 1998.

FUNDECITRUS - Fundo de Desfesa da Citricultura. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br>.

FU, X. Z.; LIU, J. H. Transcriptional profiling of canker-resistant transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) constitutively overexpressing a spermidine synthase gene. **BioMed research international**, v. 2013, 2012.

FU, X. Z.; GONG, X.Q.; ZHANG, Y. X.; WANG, Y.; LIU, J. H. Different Transcriptional Response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kumquat and Sweet Orange with Contrasting Canker Tolerance. **Plos One**. v. 7, n. 7, p. e41790, 2012.

GAUJOUX, R.; SEOIGHE, C. A flexible R package for nonnegative matrix factorization. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

GIMENES-FERNANDES, N.; BARBOSA, J. C.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Citrus**, p. 175, 2000.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. **Plant Physiology**, v. 124, n. 1, p. 21-30, 2000.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

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.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic *Citrus* canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of *Citrus* canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

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

GUO, J, YANG, X.; WESTON, D.; CHEN, J.; Absciscic Acid Receptors: Past, Present and Future. **Journal of integrative plant biology**, v. 53, n. 6, p. 469-479, 2011.

GUO W, ZOU L. F, LI Y. R, CUI Y. P, JI Z. Y. Fructose-Bisphosphate Aldolase Exhibits Functional Roles between Carbon Metabolism and the *hrp* System in Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. e31855, 2012.

GUO, M.; BLOCK, A.; BRYAN, C. D.; BECKER, D. F.; ALFANO, J. R. *Pseudomonas syringae* catalases are collectively required for plant pathogenesis. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 5054-5064, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 755, 2008.

JACOB, T.R.; DE LAIA, M. L.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 6, p. 1177-1184, 2011.

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

JITTAWUTTIPOKA, T.; BURANAJITPAKORN, S.; VATTANAVIBOON, P.; MONGKOLSUK, S. The catalase-peroxidase KatG is required for virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in a host plant by providing protection against low levels of H₂O₂. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7372-7377, 2009.

JUNG, I. L.; KIM, I. G. Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 301, n. 4, p. 915-922, 2003.

KAJIHARA, S., HOJO, H., KOYANAGI, M., TANAKA, M., MIZUMOTO, H., OHNISHI, K., HIKICHI, Y. Implication of *hrpW* in virulence of *Pseudomonas cichorii*. **Plant Pathology**, v. 61, n. 2, p. 355-363, 2012.

KANAZIN, V.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 21, p. 11746-11750, 1996.

KIM, Y.C.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J. Transcriptional regulation by iron and role during pathogenesis of genes encoding iron and manganese superoxide dismutases of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 6, p. 327-339, 1999.

KULLIK, I., STEVENS, J., TOLEDANO, M. B., STORZ, G. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1285-1291, 1995.

KUMAR, N.; EBEL, R. C.; ROBERTS, P. D. Antioxidant metabolism of grapefruit infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 41-49, 2011.

KLOTZ, M. G.; HUTCHESON, S. W. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2468-2473, 1992.

LABANCA, E. R. G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LAMB, C., DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual review of plant biology**, v. 48, n. 1, p. 251-275, 1997.

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

LEE, JAMES S.; LI, SIGUANG. **The geology of China**. 1918. Tese de Doutorado. University of Birmingham.

LEITE, JR. R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v. 9, p. 3-7, 1990.

LI, C. M., BROWN, I., MANSFIELD, J., STEVENS, C., BOUREAU, T., ROMANTSCHUK, M., TAIRA, S. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. **EMBO J.**, Inglaterra, v. 21, p. 1909-1915, 2002.

LI, X.; QIAO, J.. YANG, L.; LI, X.; QIAO, S.; PANG, X.; HE, C. Mutation of alkyl hydroperoxide reductase gene *ahpC* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* affects hydrogen peroxide accumulation during the rice–pathogen interaction. **Research in microbiology**, v. 165, n. 8, p. 605-611, 2014.

LIFE TECHNOLOGIES. **Real Time Handbook**, Foster, 2012.

LINDGREEN, P. B.; JAKOBEK, J. L.; SMITH, J. A. Molecular analysis of plant defense responses to plant pathogens. **Journal of nematology**, v. 24, n. 3, p. 330, 1992.

LIPKA, V., PANSTRUGA, R. Dynamic cellular responses in plant–microbe interactions. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 6, p. 625-631, 2005.

LIU, W., YU, Y. H., CAO, S. Y., NIU, X. N., JIANG, W., LIU, G. F., TANG, J. L. Transcriptome profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown in minimal medium MMX and rich medium NYG. **Research in microbiology**, v. 164, n. 5, p. 466-479, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ ct method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPRASERT, S., WHANGSUK, W., SALLABHAN, R., MONGKOLSUK, S. Regulation of the *katG-dpsA* operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress. **FEBS letters**, v. 542, n. 1-3, p. 17-21, 2003.

LUO, L., QI, M. S., YAO, S. Y., CHENG, H. P., ZHU, J. B., YU, G. Q. Role of oxyR from *Sinorhizobium meliloti* in regulating the expression of catalases. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 37, n. 6, p. 421-428, 2005.

MA, H.; SHIEH, K. J.; CHEN, G.; QIAO, T.; CHUANG, M. Y. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**, v. 2, p. 1-15, 2006.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J.F.; NISSEN, M.D.; SLOOTS, T.P. **Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay**, p.1-40, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. Press Norfolk, UK, 2007.

MARTINELLI, F.; URATSU, S. L.; ALBRECHT, U., REAGAN, R. L.; PHU, M. L. Transcriptome Profiling of Citrus Fruit Response to Huanglongbing Disease. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e38039, 2012.

MOREIRA, L.M. **Análise estrutural e funcional do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 328 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, 2006.

MOREL, J. B., DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. **Cell death and differentiation**, v. 4, n. 8, p. 671-683, 1997.

MUR, L.A.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 501-520, 2008.

NAKATA, N.; SASAKAWA, C.; OKADA, N.; TOBE, T.; FUKUDA, I.; SUZUKI, T.; YOSHIKAWA, M. Identification and characterization of virK, a virulence-associated large plasmid gene essential for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 16, p. 2387-2395, 1992.

NASCIMENTO, J. F. *et al.* **Ocorrência de cancro cítrico no estado de Roraima**. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 29, p. 81-82, 2003.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signal molecules in Planting. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios da bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: MARKESTRAT - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. 137 p.

O'BRIEN, J. A., DAUDI, A., FINCH, P., BUTT, V. S., WHITELEGGE, J. P., SOUDA, P.; BOLWELL, G. P. A Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in Cultured Arabidopsis Cells Functions in MAMP-Elicited Defense. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 2013-2027, 2012.

PARK, D. S., HYUN, J. W., PARK, Y. J., KIM, J. S., KANG, H. W., HAHN, J. H., GO, S. J. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by PCR using pathovar specific primers based on hrpW gene sequences. **Microbiological Research**, v. 161, n. 2, p. 145-149, 2006.

PENG, M. KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. **Phytopathology**, v. 82, n. 6, p. 696-699, 1992.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification. **PCR primers**, Springer Netherlands, 2008.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2881-2887, 2007.

ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba. Fealq/Fundecitrus. 2001.

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

ROSSIER, O.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; BONAS, U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 4, p. 828-838, 2000.

RYBAK, M., MINSAVAGE, G. V.; STALL, R. E.; JONES, J. B. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 249–262, 2009.

SAMBROOK, J., FRITSCHI, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

SEAVER, L. C., AND IMLAY, J. A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 24, p. 7173-7181, 2001.

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.

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

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.

SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER G., Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to pathogen virulence. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 9, p. 1047-1059, 2012.

SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, M., MENZEL, W., GRANZOW, M., RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, 7: 3, 2006.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 73-76, 2001.

STORZ, G.; ZHENG, M. **Oxidative stress**: bacterial stress response. Washington. D.C.: ASM Press, 2000. 485p.

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.

TARTAGLIA, L. A.; STORZ, G.; AMES, B. N. Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. **Journal of molecular biology**, v. 210, n. 4, p. 709-719, 1989.

TONDO, M. L.; PETROCELLI, S.; OTTADO, J.; ORELLANO, E. G. The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. **Plos One**, v. 5, n. 5, p. e10803, 2010.

TOR, M., GORDON, P., CUZICK, A., EULGEM, T., SINAPIDOU, E., MERT-TURK, F., CAN, C., DANGL, J.L., AND HOLUB, E.B. (2004). Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. **The Plant Cell**, v. 14, n. 5, p. 993-1003, 2002.

TORRES, M. A.; JONES, J. D.; DANGL, J. L. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 373-378, 2006.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by rna-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.

VANACKER, H.; CARVER, T. L. W.; FOYER, C. H. Pathogen induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. **Plant Physiology**, v. 117, n. 3, p. 1103-1114, 1998.

VANDESOMPELE, J. O.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-

PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

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*). **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 3, p. 292-303, 2013.

WEBER, E.; KOEBNIK, R.; Positive Selection of the Hrp Pilin HrpE of the Plant Pathogen *Xanthomonas*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 4, p. 1405-1410, 2006.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 3, p. 681-692, 1997.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75, 2005.

YINPENG, W., LIFANG, Z., DAN, Z., GONGYOU, C. Key roles of hrpE gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in formation of Hrp pilus and pathogenicity in rice. **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 39, n. 4, p. 392-398, 2009.

ZHANG, F., DU, Z., HUANG, L., CRUZ, C. V., ZHOU, Y., LI, Z. Comparative transcriptome profiling reveals different expression patterns in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains with putative virulence-relevant genes. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. e64267, 2013.

ZHU, W. M.; MAGBANUA, M. M.; WHITE F. F. Identification of two novel hrp-associated genes in hrp gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Journal Bacteriology**, Estados Unidos, v. 182, p. 1844-1853, 2000.

ZIMARO, T.; THOMAS, L.; MARONDEDZE, C.; GARAVAGLIA, B. S.; GEHRING, C.; OTTADO, J.; GOTTIG, N. Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. **BMC Microbiology**, London, v. 13, n. 186, p. 1-14, 2013.

APÊNDICE

Apêndice A – Resultados da quantificação e integridade do RNA.

Apêndice B – Resultados da titulação dos oligonucleotídeos do experimento de PCR em tempo real.

Apêndice C – Resultados da curva padrão do experimento de PCR em tempo real.

Apêndice A - Quantificação e integridade do RNA

A qualidade das amostras de RNA total extraídos de bactéria foram avaliadas através da determinação da absorbância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230nm em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. A relação A260/A280nm para a maioria das amostras ficou entre 1,95 e 2,00, quanto mais próximo de 2,0 menor é a contaminação por proteína; na relação A260/A230nm as amostras ficaram acima de 2,00, maior que 2,0 indica baixa contaminação por compostos como fenol, álcool, entre outros. As concentrações de RNA total (ng/μL) variaram de 60 a 413,1 ng/μL.

As concentrações de RNA total (ng/μL) foram quantificadas pelo equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* e os resultados variaram de 53 a 362 ng/μL. Não ocorreram contaminações por DNA genômico. As quantificações das contaminações foram realizadas em equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* e os resultados revelaram que nas amostras de RNA total extraídas de Xac, a contaminação média foi de 0,09% (mínimo 0,01% e máximo 0,20%).

A integridade do RNA total, os picos referentes ao RNA ribossomal 16S e 23S, foi observada no eletroferograma gerado com o Bioanalyser. Além disso, as médias dos RINs (*RNA integrity number*) obtidos nas amostras estudadas ficaram em torno de 5,1 e 8,0. Assim, confirmou-se que as amostras não estavam degradadas e poderiam ser utilizadas na técnica de qRT-PCR.

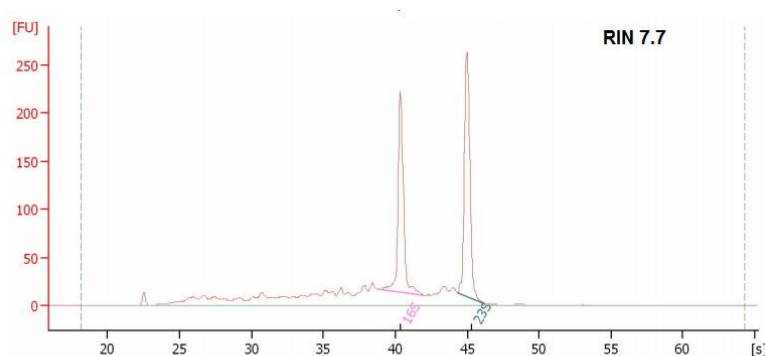


Figura 1. Eletroferograma e RIN obtidos para amostras de RNA total extraídas de Xac inoculada em laranja doce 'Pêra Rio' (72 horas).

Apêndice B – Resultados da titulação dos oligonucleotídeos do experimento de PCR em tempo real.

As melhores concentrações dos oligonucleotídeos para os genes alvo, *ahpC* (XAC0907), *katE* (XAC 1211), *katG* (XAC1301), *hrpE* (XAC0397), *hpa1* (XAC0416), *virK* (XAC0435), *cydA* (XAC2336), *cydB* (XAC2337), *hrpW* (XAC2922) e XAC 3086, estão demonstradas na Tabela 1. No entanto, para os genes de referência, *gyrB* (XAC0004) e *rpoB* (XAC0965), as concentrações utilizadas foram as mesmas de Jacob et al. (2011).

Tabela 1. Concentrações dos iniciadores dos genes de referência e dos genes alvos, diretos (F) e reversos (R).

Gene	XAC ID	Concentração Iniciadores (F/R)
<i>gyrB</i> *	XAC 0004	300 nM
<i>hrpE</i>	XAC 0397	300 nM
<i>hpa1</i>	XAC 0416	300 nM
<i>virK</i>	XAC 0435	300 nM
<i>ahpC</i>	XAC 0907	100 nM
<i>rpoB</i> *	XAC 0965	300 nM
<i>katE</i>	XAC 1211	100 nM
<i>katG</i>	XAC 1301	100 nM
<i>cydA</i>	XAC 2336	300 nM
<i>cydB</i>	XAC 2337	600 nM
<i>hrpW</i>	XAC 2922	300 nM

(*) Endógenos.

Estas concentrações foram determinadas primeiramente, analisando as curvas de dissociação (Figura 1), as quais devem exibir apenas um único pico bem definido, referente ao ponto em que 50% das moléculas estão em fita simples e 50% em fita dupla.

A presença de dímeros ou *hairpins* é constatada pela formação de mais de um pico na curva de dissociação. A análise da curva de dissociação aceita verificar a especificidade da reação, pois o corante se liga a qualquer molécula de fita dupla de DNA, podendo ser dímeros de iniciadores, DNA genômico e outros produtos

inespecíficos. A formação de dímeros de iniciadores é identificada pela formação de um pico da curva de dissociação em temperaturas mais baixas que a do *amplicon*. Somente um pico deve ser ressaltado na curva de dissociação, sugerindo a amplificação de apenas um alvo. Entretanto, os dados da curva de dissociação não podem ser analisados como definitivos, mas sim, combinados com outras informações para ter mais confiança na especificidade (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

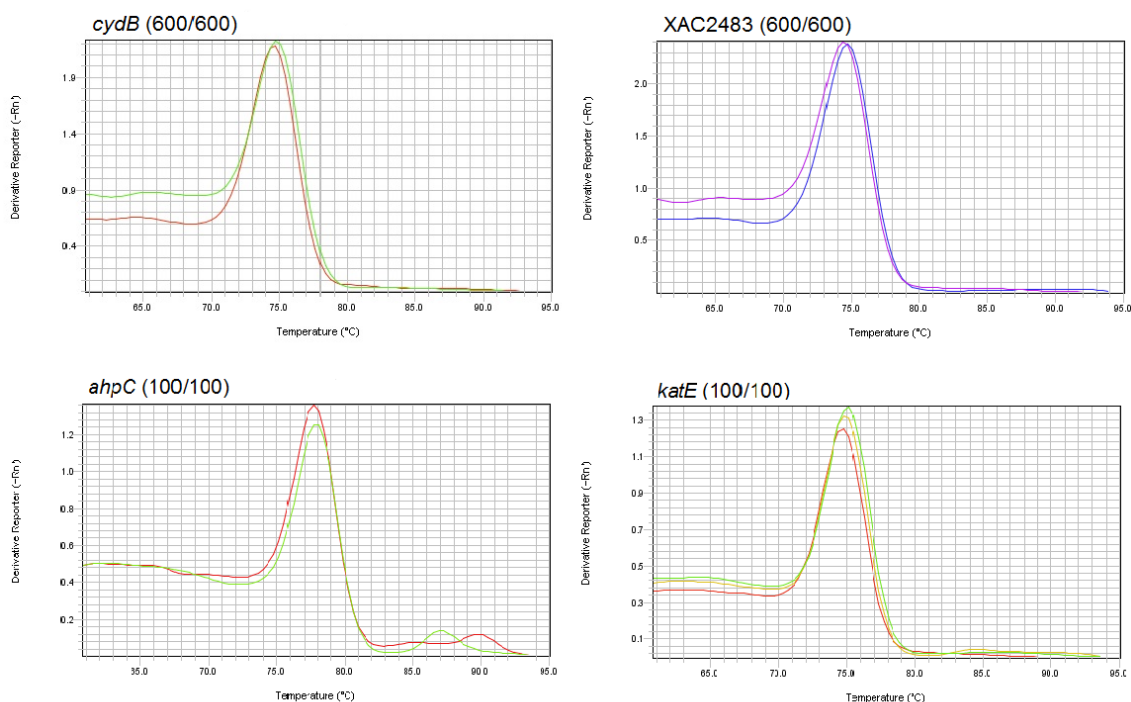


Figura 2. Curva de desnaturação da qRT-PCR, em triplicata, para os genes alvo *cydB*, *XAC2483*, *ahpC* e *katE*. Entre parênteses estão às concentrações escolhidas para os iniciadores diretos e reversos (F/R).

Apêndice C - Curva padrão e eficiência de amplificação da qRT-PCR

Foram construídas as curvas padrão para os genes de referência *gyrB*, *rpoB* e os genes alvo *ahpC*, *katE*, *katG*, *hrpE*, *hpa1*, *virK*, *cydA*, *cydB* e *hrpW* (Tabela 10). Nesse experimento, foram consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação, calculadas por meio da inclinação da curva padrão (*slope*), do gene alvo e do gene de referência, foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação, 90 a 110% (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), o que corresponde a uma inclinação da reta (*slope*) entre -3,58 e -3,10 (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). O coeficiente de correlação (R^2) é uma medida de quão próximos os dados estão da curva padrão, demonstrando pequena variação entre as replicatas técnicas. O valor ideal para R^2 é 1, porém, é aceitável valores que sejam muito próximos a 1. Fatores que ocasionam variações entre as réplicas técnicas, como pipetagem imprecisa, influenciam no valor de R^2 (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). No presente trabalho, todos os genes obtiveram resultados de eficiência dentro dos limites estabelecidos, portanto, as quantificações relativas dos genes alvos puderam seguir pelo método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$).

Tabela 2. Valores das curvas padrões, inclinação da reta (*slope*), coeficiente R^2 , e eficiência de amplificação (eff%) gerados para os genes *gyrB*, *hrpE*, *hpa1*, *virK*, *ahpC*, *rpoB*, *katE*, *katG*, *cydA*, *cydB* e *hrpW*.

Gene ID	XAC ID	Slope	Y-Inter	R^2	Eff %
<i>gyrB</i>	XAC 0004	- 3,444	29,738	0,994	95,165
<i>hrpE</i>	XAC 0397	- 3,296	27,202	0,991	101,085
<i>hpa1</i>	XAC 0416	- 3,22	23,707	0,997	104,437
<i>virK</i>	XAC 0435	- 3,41	27,52	0,998	96,455
<i>ahpC</i>	XAC 0907	- 3,138	24,016	0,995	108,273
<i>rpoB</i>	XAC 0965	- 3,233	27,952	0,996	103,859
<i>katE</i>	XAC 1211	- 3,16	25,274	0,907	107,208
<i>katG</i>	XAC 1301	- 3,554	25,837	0,969	91,139
<i>cydA</i>	XAC 2336	- 3,15	30,89	0,997	107,687
<i>cydB</i>	XAC 2337	- 3,347	29,29	0,996	98,981
<i>hrpW</i>	XAC 2922	- 3,55	28,966	0,997	91,279

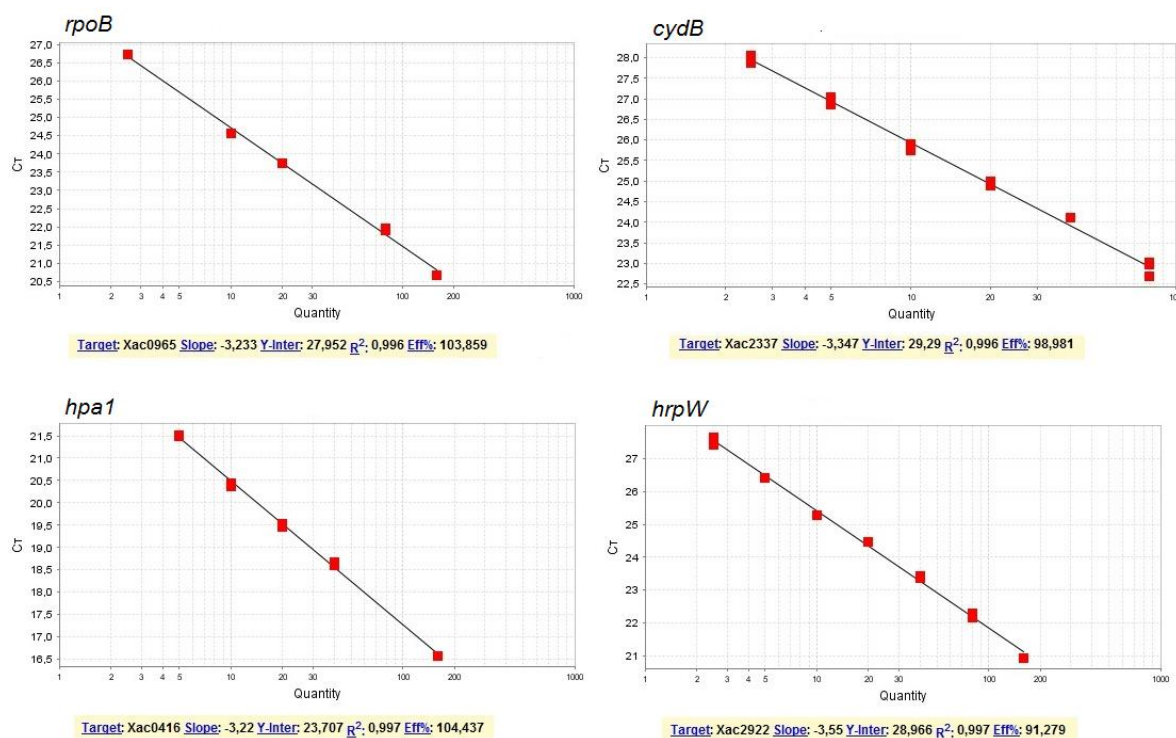


Figura 2. Curva Padrão, inclinação da reta (*slope*), coeficiente R2, e eficiência de amplificação (*eff%*) gerados para os genes *rpoB*, *cydB*, *hpa1* e *hrpW*.