

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DO PROCESSO DE
INFECÇÃO DE *Xanthomonas* CAUSADORAS DE DOENÇAS
EM CITROS**

**Flávia Campos Freitas Vieira
Bióloga**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DO PROCESSO DE
INFECÇÃO DE *Xanthomonas* CAUSADORAS DE DOENÇAS
EM CITROS**

Flávia Campos Freitas Vieira

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: Prof. Dr. José Belasque Junior

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

2018

V665a Vieira, Flávia Campos Freitas
Anatomia e ultraestrutura do processo de infecção de
Xanthomonas causadoras de doenças em citros / Flávia Campos
Freitas Vieira. -- Jaboticabal, 2018
xii, 104 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Coorientador: José Belasque Junior

Banca examinadora: Francisco André Ossamu Tanaka, Helen
Alves Penha, Henrique Ferreira, Roberto Hirochi Herai

Bibliografia

1. Interação planta-patógeno. 2. Cancro cítrico. 3. Microscopia
eletrônica. 4. Patogenicidade. 5. Resposta de hipersensibilidade. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:634.1

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DO PROCESSO DE INFECÇÃO DE Xanthomonas CAUSADORAS DE DOENÇAS EM CITROS

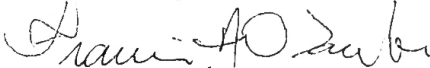
AUTORA: FLÁVIA CAMPOS FREITAS VIEIRA

ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

COORIENTADOR: JOSÉ BELASQUE JÚNIOR

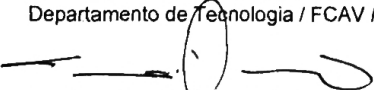
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, área: MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. FRANCISCO ANDRÉ OSSAMU TANAKA
Departamento de Fitopatologia e Nematologia / ESALQ/USP-Piracicaba/SP


Prof. Dr. ROBERTO HIROCHI HERAI
Pontifícia Universidade Católica do Paraná / Curitiba/PR


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


Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Instituto de Biociências / Unesp-Câmpus de Rio Claro/SP

Jaboticabal, 04 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Flávia Campos Freitas Vieira, nascida em Uberlândia – MG, em 26 de abril de 1990. Ingressou, em 2008, no curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Uberlândia, vindo a graduar-se em 2011. Foi contemplada com duas bolsas de iniciação científica (PIBIC), sendo que a primeira esteve vinculada ao Programa de Melhoramento de Soja da UFU e a segunda ao Laboratório de Genética do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, onde concluiu as pesquisas da monografia, resultando em um artigo científico. Em 2012, iniciou o mestrado no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Jaboticabal, SP, com auxílio financeiro da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação do Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, onde desenvolveu pesquisas para a identificação da função de uma proteína hipotética do patógeno do cancro cítrico, que resultou na publicação desse trabalho no ano de 2017. Em 2014, iniciou na mesma Universidade, o curso de Doutorado, junto ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, com auxílio financeiro da CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação do Prof. Dr. José Belasque Junior. Durante o curso do Doutorado, realizou parte da pesquisa no antigo Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA), na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP, sob orientação do Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka. Em 2017, foi contemplada com uma bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES, para realizar estágio no Laboratório de Patologia e Bacteriologia de Citros, do Professor Nian Wang, no *Citrus Research and Educational Center* (CREC), da Universidade da Flórida, em Lake Aldred, Flórida, Estados Unidos.

Dedico este trabalho, com amor:

À Deus,

*Porque d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.
Que quem eu sou e o que eu faço seja uma sincera retribuição do teu
incondicional amor por mim.*

À minha família:

Aos meus pais, Flávio César e Noemi

E ao meu irmão, Estêvão.

*O amor e o suporte incondicional de vocês foram meu porto seguro
nesta etapa. Saber que vocês sempre estão na primeira fileira torcendo
por mim, me encoraja a alçar voos cada vez mais altos.*

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, meu Pai, meu amigo e meu lugar seguro, que invariavelmente me sustentou e me capacitou a concluir mais uma etapa na minha vida profissional. Seu amor e fidelidade a mim são inexplicáveis.

À minha família, meus maiores incentivadores durante toda minha vida acadêmica. Agradeço por não medirem esforços para investirem em meus sonhos e futuro.

Ao Prof. Jesus Aparecido Ferro, pela orientação durante todo esse trabalho e pela confiança a mim depositada. Agradeço por todos esses anos de ensinamentos, conselhos e até puxões de orelha, que levarei para a vida. A dedicação e a integridade com que o senhor trabalha são admiráveis.

Ao Prof. José Belasque Junior, pela coorientação, ensinamentos, sugestões, que foram de extrema importância para este trabalho, por todos os conselhos para minha vida profissional e por me orientar durante o tempo que estive em Piracicaba.

À Profa. Maria Inês, por todas as dicas, conselhos e inúmeras intervenções perante o Conselho de Microbiologia Agropecuária em meu favor, e pelo suporte financeiro dispensado neste trabalho. Muito obrigada por não medir esforços em ajudar, não só a mim, mas a todos os membros do laboratório!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante os três anos do meu curso de Doutorado e pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche (PDSE).

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, por meio do qual estive vinculada à UNESP, que com um corpo docente de excelência e todos os recursos acadêmico-científicos, como cursos, fóruns, proporcionaram a minha formação e pela oportunidade de fazer o Doutorado Sanduíche.

À equipe da Seção Técnica de Pós-graduação, que vez após vez esclareceram minhas dúvidas com paciência e presteza, e deram todo o suporte necessário nas questões burocráticas, em especial ao Diego, a Branca e a Márcia.

Aos atuais e ex-membros do LBM e do CREBIO: Claudênia, Lucília, Aline, Bruna, Thaísa, Fernando, Tamiris, Julie, Rafael, Danilo, Ana, Flávia “mãe”, Juliana, Michelle (Best), Jéssica, Catarina, Helen, Iashilei, Danyel, Amanda, Wallynson, Luis, Agda, Mariza e Renata. Em algum momento (ou vários), todos tiveram sua participação

neste trabalho, seja com conselhos, sugestões, troca de experiências, dúvidas sanadas, auxílio em experimentos, momentos de descontração ou com palavras de incentivo. Em especial, ao grupo das “Só godinhas”, o companheirismo e a alegria de vocês no dia-a-dia, em meio a prazos apertados, resultados negativos e momentos de tensão, os quais foram fundamentais para eu chegar até aqui, sem mencionar todas as gordices que nos sustentaram.

A todos os alunos que conheci através do NAP/MEPA: Gillyade, Gressa, Guilherme, Samuel, Geisa, Aline, muitos dos quais se tornaram amigos. Obrigada pela troca de conhecimento e pelo companheirismo. Em especial a Gressa, por me ajudar diretamente na análise de amostras de microscopia. Ao técnico Renato, por toda a ajuda prestada durante meus experimentos. E ao Prof. Kitajima por me receber com tanta cordialidade.

Ao Prof. Francisco Tanaka, por gentilmente me acolher em seu laboratório e me orientar em uma área, até então, completamente nova para mim. Obrigada pela paciência em me ensinar desde o “bê-á-bá” da microscopia, por sempre se dispor a responder minhas dúvidas e corrigir meus textos, por todo o companheirismo fora do laboratório, durante o tempo que estive em Piracicaba. Muito obrigada, porque a realização deste trabalho não seria possível sem a sua participação.

Ao Professor Roberto Herai, por me auxiliar tão prontamente com a análise dos dados do transcriptoma e por todos as sugestões e correções que culminaram no fechamento deste trabalho.

Ao Prof. Henrique Ferreira, da UNESP, Câmpus Rio Claro, por me receber em seu laboratório para a realização dos experimentos de curva de crescimento. E à Lúcia, que me auxiliou, prontamente, durante o todo o tempo necessário desse experimento e, gentilmente, me recebeu em sua casa.

Ao Dr. Fabrício Jaciani, por gentilmente, ter cedido as estirpes de *Xanthomonas* usadas neste trabalho e por ter participado da minha banca de qualificação. Suas sugestões são sempre muito bem-vindas.

Ao Prof. Nian Wang, da Universidade da Flórida, que me recebeu em seu laboratório, cuja experiência grandemente contribuiu para minha formação profissional.

Aos membros do Lab Wang, ao CREC latino e todas as pessoas que contribuíram para esse período de desenvolvimento profissional e pessoal tão marcante na minha vida.

Aos amigos da ABU (Aliança Bíblica Universitária), pelo incentivo, orações e companheirismo.

À minha família em Jaboticabal: Marina, Raiza, Stéfany, Claudênia e Bya. Nós não dividimos somente uma casa, mas um lar. Vocês são pessoas incríveis e foi um privilégio compartilhar minha vida com vocês. Vocês foram imprescindíveis para o progresso e conclusão dessa etapa. Muito obrigada. Amo vocês.

À Marina Chioda, uma amizade que nasceu na metade deste doutorado e que foi indispensável nos momentos mais críticos do mesmo. Obrigada por enxergar em mim a capacidade que muitas vezes achei não existir.

Às queridas amigas: Raphaela, Cláudia e Dayane. A amizade de vocês deixa o caminho mais leve e divertido. Obrigada por estarem presentes mesmo à distância.

À Clara Maria, minha companheira fiel durante toda essa etapa, cheia de idas e vindas, mas principalmente, na fase de escrita da tese, sua companhia me acalmou inúmeras vezes.

Foi uma jornada de quatro anos e só foi possível chegar ao final pela participação de todos mencionados e de muitos não mencionados, por falta de espaço ou lapso na memória.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	p. v
Lista de tabelas.....	p. xii
1. INTRODUÇÃO.....	p. 1
2. OBJETIVOS.....	p. 3
2.1. Objetivo geral.....	p. 3
2.2. Objetivos específicos.....	p. 3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	p. 5
3.1. Citricultura.....	p. 5
3.1.1. Origem e dispersão dos citros.....	p. 5
3.1.2. Contexto atual da citricultura no mundo e no Brasil.....	p. 6
3.2. O cancro cítrico	p. 9
3.3. Espécies de <i>Xanthomonas</i> patogênicas a citros	p. 11
3.4. Fatores de virulência de <i>Xanthomonas</i>	p. 13
3.5. Resposta de defesa de plantas contra patógenos.....	p. 17
3.5.1. Resposta de hipersensibilidade (HR).....	p. 19
3.5.1.1. Modificações na anatomia vegetal causadas pela HR.....	p. 19
3.6. O uso da microscopia eletrônica no estudo de interação planta-patógeno.....	p. 21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	p. 22
4.1. Estirpes bacterianas e meios de cultura utilizados.....	p. 22
4.2. Teste de patogenicidade <i>in planta</i>	p. 22
4.3. Curvas de crescimento <i>in vitro</i>	p. 24
4.4. Formação de biofilme <i>in vitro</i>	p. 24
4.5. Teste de motilidade “swimming”.....	p. 25
4.6. Teste de produção de goma xantana.....	p. 25
4.7. Teste de auto agregação celular.....	p. 26
4.8. Análise estatística.....	p. 26
4.9. Obtenção de material vegetal para análises microscópicas.....	p. 26
4.10. Coleta de amostras para análises microscópicas.....	p. 27
4.10.1. Microscopia de luz.....	p. 27
4.10.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	p. 28
4.10.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	p. 28
4.11. Análise comparativa dos efetores de virulência de <i>Xanthomonas</i> ..	p. 29
4.12. Análise de dados do transcriptoma de laranja doce ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ infectadas com XfaC.....	p. 29
5. RESULTADOS.....	p. 30
5.1. Teste de patogenicidade <i>in planta</i>	p. 30
5.2. Curvas de crescimento <i>in vitro</i>	p. 33
5.3. Características das estirpes envolvidas na virulência.....	p. 34
5.4. Análise comparativa da infecção de Xac306, XfaC1632 e XfaC1630 em diferentes variedades de citros por técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão.....	p. 38
5.4.1. Microscopia de luz.....	p. 39
5.4.1.1. Folhas saudas.....	p. 39
5.4.1.2. Folhas infectadas.....	p. 41

5.4.1.3. Folhas de laranja 'Hamlin' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630.....	p. 42
5.4.1.4. Folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630.....	p. 44
5.4.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	p. 46
5.4.2.1. Folhas sadias.....	p. 46
5.4.2.2. Folhas infectadas.....	p. 46
5.4.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	p. 49
5.4.3.1. Folhas sadias.....	p. 49
5.4.3.2. Folhas de laranja doce 'Hamlin' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630.....	p. 49
5.4.3.3. Folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630.....	p. 54
5.5. Análise comparativa da infecção de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas</i> em lima ácida 'Galego' por técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão.....	p. 56
5.5.1. Microscopia de luz.....	p. 56
5.5.1.1. Folhas inoculadas com Xac306.....	p. 56
5.5.1.2. Folhas inoculadas com Xac636.....	p. 60
5.5.1.3. Folhas inoculadas com Xac828.....	p. 60
5.5.1.4. Folhas inoculadas com Xacm1510.....	p. 61
5.5.1.5. Folhas inoculadas com XfaC1632.....	p. 61
5.5.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	p. 63
5.5.3. Microscopia eletrônica de transmissão.....	p. 64
5.6. Análise comparativa dos efetores de virulência do Sistema de Secreção do Tipo III de <i>Xanthomonas</i>	p. 67
5.7. Análise de dados do transcriptoma de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' infectadas com XfaC.....	p. 68
6. DISCUSSÃO.....	p. 71
6.1. Compreensão do processo de infecção de diferentes estirpes de <i>Xanthomonas</i> em lima ácida 'Galego'.....	p. 71
6.2. Processo de infecção de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> e <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> em diferentes variedades cítricas.....	p. 80
6.3. Resposta de defesa de laranja 'Hamlin' sob infecção de XfaC.....	p. 82
7. CONCLUSÃO.....	p. 90
REFERÊNCIAS.....	p. 91

ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DO PROCESSO DE INFECÇÃO DE *Xanthomonas* CAUSADORAS DE DOENÇAS EM CITROS

RESUMO – Os citros são um grupo de espécies vegetais, com alto potencial produtivo, porém, acometido por várias doenças. Do gênero de bactérias *Xanthomonas*, três espécies são patogênicas a citros: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, uma das doenças de maior preocupação da citricultura; *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B e C, que causam a cancriose; e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, responsável por causar a mancha bacteriana dos citros. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi a análise e descrição, em nível anatômico e ultraestrutural, dos processos de infecção de bactérias do gênero *Xanthomonas*, causadoras de doenças em citros, a correlação do fenótipo da interação XfaC-citros com o transcriptoma e a análise dos fatores de virulência das estirpes estudadas. O processo de infecção das estirpes Xac306, Xac636, Xac828, Xacm1510, XfaC1632 e XfaC1630 em lima ácida ‘Galego’ e/ou laranja doce ‘Hamlin’, foi avaliado em diferentes períodos de infecção, pelas técnicas de microscopia de luz e eletrônicas de varredura e transmissão. As seguintes características relacionadas a virulência das estirpes foram avaliadas: formação *in vitro* de biofilme, produção de goma, motilidade “swimming” e auto agregação celular. Os resultados mostraram que Xac306 é a estirpe mais agressiva dentre as demais, visto pelos sintomas e pela intensidade das alterações anatômicas no tecido de ‘Hamlin’ e ‘Galego’. O processo de infecção em lima ácida ‘Galego’ foi semelhante em todas as estirpes de *Xanthomonas* estudadas, pois induziram hiperplasia e hipertrofia, porém, em diferentes intensidades, sendo que as alterações provocadas pelas estirpes Xac828 e Xacm1510 não resultaram no rompimento da epiderme; todas as estirpes produziram goma, envolvendo as bactérias e favorecendo a colonização no ambiente intercelular. A microscopia de luz permitiu identificar alterações na anatomia de lima ácida ‘Galego’ infectada e a diferença de susceptibilidade entre as variedades de citros inoculadas com Xac306 e estirpes de XfaC. As microscopias eletrônicas de varredura e transmissão permitiram a identificação de aspectos em comum às estirpes, independente da variedade cítrica. A HR induzida por estirpes de XfaC foi caracterizada pela microscopia eletrônica de transmissão. Com a análise de microscopia, não foi possível estabelecer uma relação direta entre os testes de formação *in vitro* de biofilme, produção de goma e motilidade “swimming” das estirpes. A análise dos dados de transcriptoma revelou que a resposta de defesa de laranja ‘Hamlin’ contra XfaC foi uma resposta rápida e eficiente que levou a indução de HR, que em última instância, conteve a infecção pela morte celular programada no local da infecção. Esse trabalho ampliou o conhecimento da área sobre o comportamento de diferentes estirpes de *Xanthomonas* causadoras de doenças em citros, fornecendo informações sobre sua interação com o hospedeiro suscetível e a resposta de defesa de XfaC em interação incompatível.

Palavras-chave: interação planta-patógeno; cancro cítrico; microscopia eletrônica; patogenicidade; resposta de hipersensibilidade.

ANATOMY AND ULTRASTRUCTURE OF *Xanthomonas* INFECTIOUS PROCESS CAUSING DISEASES IN CITRUS

ABSTRACT – Citrus are a diverse group of plant species, with high yield potential, but affected by several diseases. The bacteria genus *Xanthomonas* has three species pathogenic to citrus: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causal agent of citrus canker, one of the most important diseases of citrus crop; *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* types B and C, causing citrus canker; and *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, which causes citrus bacterial spot. Therefore, the goal of this work was to analyze and describe, at the anatomical and ultrastructural level the infectious processes of *Xanthomonas* causing diseases in citrus, the correlation of the XfaC-citrus interaction phenotype with the transcriptome and the comparative analysis of virulence related factors, in order to elucidate morphophysiological traits of host-pathogen interaction. The infection process of Xac306, Xac636, Xac828, Xacm1510, XfaC1632 and XfaC1630 strains in 'Galego' Mexican lime and 'Hamlin' sweet orange were evaluated at different points of infection by light microscopy and scanning and transmission electron microscopy. The following virulence related characteristics of the strains were evaluated: *in vitro* biofilm formation, gum production, swimming motility and cellular auto aggregation. The results showed that Xac306 is the most aggressive strain among the others, due to the intensity of the symptoms and anatomical alterations in 'Hamlin' and 'Galego' tissue. The infection process in the susceptible host ('Galego' Mexican lime) was similar for all *Xanthomonas* strains studied, since they induced hyperplasia and hypertrophy, however in different intensities, and the alterations caused by Xac828 and Xacm1510 strains did not result in epidermis rupture; all strains produce gum, involving bacteria and assisting colonization in the intercellular environment. Light microscopy was able to identify anatomical alterations in 'Galego' Mexican lime infected tissue and the susceptibility differences between citrus varieties inoculated with Xac306 and XfaC strains. The scanning and transmission electron microscopies was able to identify common traits to the strains, regardless of the citrus variety. The HR induced by XfaC strains was characterized by transmission electron microscopy. We could not establish a direct relation between the *in vitro* biofilm formation, gum production and "swimming" motility of the strains with the microscopy analysis. The transcriptome analysis revealed that 'Hamlin' defense response against XfaC is a quick and effective response that led to an HR induction, which ultimately contained the infection, by programmed cell death at the site of infection. This work expanded our knowledge about the behavior of different *Xanthomonas* strains causing citrus diseases, providing information on its interaction with the susceptible host and the defense response of XfaC in an incompatible interaction.

Keywords: plant-pathogen interaction; citrus canker; electron microscopy; pathogenicity; hypersensitivity response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação gráfica da produção de laranjas no Brasil, nas safras de 2011/12 até 2017/18..... p. 7
- Figura 2 – Mapa dos estados brasileiros mostrando a situação do cancro cítrico no país, em 2013 e em 2017..... p. 8
- Figura 3 – Sintomas típicos de cancro cítrico, mostrando necrose e lesões erupcentes no ponto de infecção, envoltos por clorose e encharcamento em frutos (A), frutos e folhas (B, C) e ramos (D) de laranjeira..... p. 10
- Figura 4 – Colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* apresentam coloração amarelo em meio sólido, devido a presença de xantomonadida.. p. 12
- Figura 5 – Esquema representativo dos tipos de interação planta-patógeno: interação susceptível (A) e interação resistente (B)..... p. 18
- Figura 6 – Teste de patogenicidade das bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (estirpes 306, 636, 828), *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (estirpe 1510) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (estirpes 1630 e 1632), inoculadas em folhas jovens de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' na concentração de 10^8 UFC/mL. O processo de infecção foi observado por 30 dias após inoculação (dai) e a folha apresentada é referente a 9 dai..... p. 32
- Figura 7 – Curvas de crescimento in vitro das estirpes de *Xanthomonas*. (A): Estirpes Xac306, Xac636, Xac828 e Xacm1510 foram avaliadas durante 24 h de crescimento. (B): Estirpes XfaC1630 e XfaC1632 foram avaliadas durante 48 h de crescimento, com medição da densidade ótica (DO_{600nm}) a cada 30 min, a 29°C, em meio NB. As curvas apresentadas são a média e o desvio padrão de três repetições de cada estirpe. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade..... p. 33
- Figura 8 – Teste de produção de goma xantana das estirpes de *Xanthomonas*. (A) As barras no gráfico representam a média de três colônias isoladas e os respectivos desvios padrões. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. (B) Fotografia representativa de cada amostra..... p. 35
- Figura 9 – Teste de motilidade "swimming" das estirpes de *Xanthomonas* em meio NB com 0,3% de ágar. (A) As barras no gráfico representam a média de três colônias isoladas com três repetições cada e os respectivos desvios padrões. Letras iguais

não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. (B) Fotografia representativa de cada amostra..... p. 36

Figura 10 – Teste de formação de biofilme in vitro pelas estirpes de *Xanthomonas* em tubos de vidro de borossilicato, corados com cristal de violeta a 0,1%. (A) Quantificação da absorbância (DO_{595nm}) do biofilme das estirpes solubilizado com solução álcool-acetona (80:20, v/v). As barras no gráfico representam a média de quatro colônias isoladas com três repetições cada e os respectivos desvios padrões. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. (B) Fotografia representativa do resultado de cada estirpe..... p. 37

Figura 11 – Teste de agregação das estirpes de *Xanthomonas*. As linhas no gráfico representam a média entre a DO_{600nm} final e a DO_{600nm} inicial da absorbância de três colônias isoladas e os respectivos desvios padrões ao longo de 10 horas de teste..... p. 38

Figura 12 – Microscopia de luz. Folhas controle (sem inoculação) de laranja doce 'Hamlin' (A) e de lima ácida 'Galego' (B). Folhas controle inoculadas por furo com agulha de laranja 'Hamlin' aos 5 dias após inoculação (dai) (C) e aos 20 dai (D), e de lima ácida 'Galego' aos 5 (E) e aos 20 dai (F). P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; CC: células coletoras; EI: espaço intercelular; Ed: epiderme da face adaxial (superior); Eb: epiderme da face abaxial (inferior); O: cavidade secretora de óleo; V: feixes vasculares; C: camada de cicatrização; E: estômatos; Cr: cristais romboédricos. Barra = 50 µm..... p. 40

Figura 13 – Microscopia de luz. Folhas de laranja doce 'Hamlin' aos 5 e 20 dias após inoculação (dai). Alterações na anatomia decorrentes da infecção com as bactérias Xac306: (A) hiperplasia e hipertrofia das células parenquimáticas, (B) intensificação da hiperplasia e separação do tecido vegetal morto pela camada de cicatrização; XfaC1632: (C) hiperplasia celular e acúmulo de substância, provavelmente, polissacarídeos, no citoplasma, (D) hiperplasia e intensa hipertrofia celular e células com acúmulo de uma substância de natureza polissacarídica; e XfaC1630: (E) hipertrofia e hiperplasia e células afetadas com vacúolos subdivididos, (F) hiperplasia celular e suberização do tecido no local do furo. P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; V: feixes vasculares; C: camada de cicatrização; S: súber; Seta: hiperplasia; Cabeça de seta: hipertrofia. Barra = 50 µm..... p. 43

Figura 14 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida 'Galego' aos 5 e 20 dias após inoculação (dai), evidenciando as alterações anatômicas decorrentes da infecção com as bactérias Xac306:

(A) intensa hipertrofia e hiperplasia celular e presença de goma e bactérias nos espaços intercelulares, (B) aumento da espessura do limbo foliar devido à hiperplasia celular; XfaC1632: (C) hiperplasia e hipertrofia celular com menor intensidade, (D) leve aumento do limbo foliar e presença de goma nos espaços intercelulares; e XfaC1630: (E) hiperplasia celular e acúmulo de goma e bactérias nos espaços intercelulares, (F) intensificação da hiperplasia e pouca hipertrofia celular. V: feixes vasculares; G: goma xantana; R: área de rompimento da epiderme; Seta: hiperplasia; Cabeça de seta: hipertrofia. Barra = 50 μm

p. 45

Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Folhas sadias de laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ usadas como controle: (A) mesofilo com características padrão da folha de citros. Barra = 20 μm . (B) mesofilo evidenciando camada celular de cicatrização. Barra = 25 μm . (C) aspecto normal de uma célula vegetal. Barra = 2 μm . (D) células vegetais evidenciando vacúolos subdivididos. E: epiderme; P: parênquima paliádico; L: parênquima lacunoso; I: idioblastos; C: camada de cicatrização; EI: espaço intercelular; N: núcleo; C: cloroplasto; V: vacúolo.....

p. 47

Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura. Folhas de laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ inoculadas com Xac306: (A) bactérias aderidas à parede celular do hospedeiro. Barra = 2 μm . (B) bactérias envoltas em goma xantana. Barra= 10 μm ; XfaC1632: (C) mesofilo com ausência de bactérias. Barra = 10 μm . (D) bactérias envoltas em goma, formando aglomerados. Barra = 10 μm ; e XfaC1630: (E) bactérias colonizando um estômato. Barra = 5 μm . (F) bactérias preenchendo o espaço intercelular. Barra = 5 μm . B: bactérias; EI: espaço intercelular; Estrela: goma xantana.....

p. 48

Figura 17 – Microscopia eletrônica de transmissão. Folhas de laranja ‘Hamlin’ aos 5 e 20 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) bactérias preenchendo os espaços intercelulares envoltas em goma; núcleo hipertrofiado e citoplasma degradado. Barra = 2 μm . (B) bactérias degeneradas no espaço intercelular. Barra = 1 μm ; XfaC1632: (C) células com citoplasma e organelas degradadas e vacúolo com resíduos de provável oxidação. Barra = 2 μm . (D) espaços intercelulares sem bactérias e vacúolos com substâncias de aspecto granuloso. Barra = 5 μm ; e XfaC1630: (E) citoplasma eletrondenso e degradado com muitos vacúolos subdivididos. Barra = 4 μm . (F) espaços intercelulares vazios, citoplasma degenerado. Barra = 2 μm . B: bactérias; EI: espaço intercelular; P: parede celular; C: citoplasma; N: núcleo; O: oxidação; V:

- vacúolo; Estrela: goma; Cabeça de seta: cloroplasto..... p. 51
- Figura 18 – Microscopia eletrônica de transmissão. Reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de laranja doce ‘Hamlin’ inoculadas com XfaC1632: (A) Desestabilização da membrana plasmática, cloroplasto, mitocôndrias e núcleo celular degenerados. Barra = 0,4 μm . (B) Células parenquimáticas com núcleo degenerado e vacúolos com substância com aspecto granular e espaços intercelulares vazios. Barra = 2 μm . (C) Células parenquimáticas com organelas degeneradas, subdivisão do vacúolo e núcleos hipertrofiados. Barra = 2 μm . (D) Células parenquimáticas degeneradas e com vacúolos subdivididos, organelas degeneradas e espaço intercelular vazio. Barra = 2 μm . Mp: membrana plasmática; V: vacúolo; M: mitocôndria; Cp: cloroplasto; Ct: citoplasma; N: núcleo; Vs: vacúolo subdividido; El: espaço intercelular..... p. 52
- Figura 19 – Microscopia eletrônica de transmissão. Reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de laranja doce ‘Hamlin’ inoculadas com XfaC1630: (A) Célula parenquimáticas com mitocôndria e cloroplasto degenerados, subdivisão do vacúolo, desestabilização da membrana plasmática (setas brancas) e presença de substância eletrondensa nos espaços intercelulares. Barra = 1 μm . (B) Bactérias, provavelmente, mortas, envoltas por goma xantana no espaço intercelular e circundadas por células degeneradas. Barra = 0,5 μm . (C) Células da epiderme, mostrando câmara subestomática, subdivisão do vacúolo e a presença de substâncias de aspecto granular no seu interior. Barra = 2 μm . (D) Células parenquimáticas com citoplasma e organelas degeneradas, subdivisão do vacúolo e espaços intercelulares vazios com substância eletrondensa. Barra = 1 μm . V: vacúolo; M: mitocôndria; Cp: cloroplasto; Ct: citoplasma; Vs: vacúolo subdividido; B: bactéria; C: célula; El: espaço intercelular; Ca: cutícula; Cs: câmara subestomática..... p. 53
- Figura 20 – Microscopia eletrônica de transmissão. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 5 e 20 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) bactérias envoltas em goma e degradação da parede celular. Barra = 0,5 μm . (B) bactérias vivas e degeneradas envoltas em goma com aspecto granular nos espaços intercelulares. Barra = 1 μm ; XfaC1632: (C) vacúolos com substância de aspecto granuloso e bactérias no espaço intercelular. Barra = 2 μm . (D) bactérias em aglomerados, envoltas em goma. Barra = 1 μm ; e XfaC1630: (E) bactérias envoltas em goma e degradação da parede celular. Barra = 0,5 μm . (F) bactérias vivas e degeneradas envoltas em goma com aspecto granular nos espaços intercelulares. Barra = 4

µm. B: bactérias; El: espaço intercelular; P: parede celular; C: citoplasma; V: vacúolo; Estrela: goma xantana.....

p. 55

Figura 21 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 40 e 70 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) hiperplasia e hipertrofia celular e presença de bactérias e goma xantana nos espaços intercelulares. (B) hiperplasia e hipertrofia celular, espessamento do limbo foliar e rompimento da epiderme; Xac636: (C) hiperplasia e hipertrofia celular que levaram ao espessamento do limbo foliar e rompimento da epiderme, além da presença de goma nos espaços intercelulares. (D) hiperplasia celular; Xac828: (E) hiperplasia e hipertrofia celular e presença de bactérias e goma xantana nos espaços intercelulares. (F) hiperplasia celular e a presença acentuada de goma; Xacm1510: (G) intensa hiperplasia, pouca hipertrofia celular e presença de goma nos espaços intercelulares. (H) espaços intercelulares vazios e prováveis compostos fenólicos acumulados no interior das células parenquimáticas; XfaC1632: (I) hiperplasia celular, presença de goma e bactéria nos espaços intercelulares e prováveis compostos fenólicos na região do furo. (J) hiperplasia e hipertrofia, espaços intercelulares vazios e suberização do tecido na região do furo. B: bactérias; G: goma xantana; R: rompimento da epiderme; E: espaço intercelular; C: camada de cicatrização; F: compostos fenólicos; Seta: hiperplasia; Cabeça de seta: hipertrofia. Barra = 50 µm.....

p. 57

Figura 22 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 40 e 70 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) e (B) bactérias e goma nos espaços intercelulares e prováveis compostos fenólicos na parede e citoplasma de algumas células. Barra = 50 µm e 20 µm, respectivamente; Xac636: (C) degradação de células do parênquima lacunoso e células intactas no parênquima paliçádico. Barra = 20 µm. (D) bactérias e goma nos espaços intercelulares e degradação de células ao redor dos feixes vasculares. Barra = 20 µm; Xac828: (E) bactérias e goma nos espaços intercelulares. Barra = 50 µm. (F) acúmulo de prováveis compostos fenólicos no citoplasma celular. Barra = 20 µm. P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; B: bactéria; E: espaço intercelular; G: goma xantana; F: compostos fenólicos; N: núcleo; V: feixes vasculares.....

p. 59

Figura 23 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 40 dai, 70 e 120 dai, inoculadas com Xacm1510: (A) bactérias e goma nos espaços intercelulares. Barra = 20 µm. (B) hipertrofia celular e acúmulo, provavelmente, de compostos fenólicos no citoplasma das células do parênquima. Barra = 20

μm ; XfaC1632: (C) presença de goma nos espaços intercelulares e em células degradadas. Barra = 50 μm . (D) aumento dos espaços intercelulares devido ao rompimento das células do parênquima. Barra = 50 μm . P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; G: goma xantana; F: compostos fenólicos; V: feixes vasculares; H: hipertrofia; Seta: espaços intercelulares.....

p. 62

Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura de folhas de lima ácida ‘Galego’, inoculadas com Xac306: (A) bactérias colonizando os estômatos. Barra= 2 μm ; (B) bactérias aderidas à parede celular e envoltas em goma xantana. Barra = 5 μm ; Xac636: (C) bactérias dentro de uma célula rompida. Barra = 2 μm ; Xac828: (D) bactérias formando aglomerados, envoltas em goma. Barra = 1 μm ; Xacm1510: (E) bactérias aparentemente imobilizadas em goma xantana. Barra = 4 μm ; XfaC1632: (F) bactérias preenchendo os espaços intercelulares. Barra = 5 μm . B: bactérias; E: estômato; Ei: espaço intercelular; C: célula.....

p. 64

Figura 25 – Microscopia eletrônica de transmissão. Folhas de lima ácida ‘Galego’, inoculadas com Xac306: (A) degradação celular. Barra = 2 μm . (B) colonização de bactérias dentro de células rompidas. Barra = 2 μm ; Xac636: (C) degradação da parede celular. Barra = 0,5 μm . (D) bactérias degeneradas no espaço intercelular. Barra = 1 μm ; Xacm1510: (E) vacúolos nos espaços intercelulares, provenientes de células rompidas. Barra = 4 μm ; XfaC1632: (F) bactérias imersas em goma com aspecto granular e com retração da mesma ao redor das bactérias. Barra = 1 μm . N: núcleo; V: vacúolo; M: mitocôndria; Cp: cloroplasto; PD: parede degradada; B: bactérias; G: goma; C: célula; Ei: espaço intercelular; BD: bactéria degenerada; BV: bactéria viva; FB: fissão binária; RG: retração da goma.....

p. 66

Figura 26 – Modelo da resposta de defesa da laranja doce ‘Hamlin’ à infecção por XfaC. O patógeno se adere à parede celular da planta e libera efetores no apoplasto celular através do T3SS. A célula vegetal reconhece os PAMPs do patógeno pelas proteínas NLR no citoplasma, ou pelas proteínas RLK/RLP na membrana plasmática e ativa a ETI e as vias de sinalização, que regulam a expressão de genes relacionados à defesa no núcleo. O influxo de íons importantes, como o Ca^{+} e o K^{+} , bem como a regulação negativa dos genes da fotossíntese, ajudam a planta a realocar energia para responder à infecção. Uma via de sinalização importante é a cascata MAPK que induz vários mecanismos de defesa: produções de fitoalexinas e de ROS, fosforilação dos fatores de transcrição, expressão de PR-1, reforço de parede celular. As vias de sinalização

hormonal via ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) também são ativadas e induzem diversas alterações. O AS pode induzir diretamente a expressão de PRs e ROS e a Resposta Sistêmica Adquirida (SAR), que também pode ser induzida por PRs. Diversas enzimas participam do reforço da parede celular, também induzidas por ROS. As ROS geram uma resposta rápida à infecção e levam a PCD (morte celular programada) ou a HR (resposta de hipersensibilidade), para conter a progressão da infecção.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécie, origem geográfica, hospedeiro, e nome das doenças causadas pelas estirpes de <i>Xanthomonas</i> utilizadas no presente estudo.....	p. 23
Tabela 2 – Presença ou ausência de alterações macroscópicas em folhas de laranja doce ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’, decorrentes da infecção com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> estirpes 306, 636 e 828, <i>Xanthomonas alfafae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> estirpe 1510 e <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C estirpes 1632 e 1630.....	p. 30
Tabela 3 – Intensidade das alterações observadas por microscopia de luz em folhas de laranja doce ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’, decorrentes da infecção com <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> estirpe 306 e <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C estirpes 1632 e 1630.....	p. 41
Tabela 4 – Intensidade dos aspectos observados por microscopia de luz em folhas de lima ácida ‘Galego’ decorrentes da infecção com as estirpes de <i>Xanthomonas</i>	p. 63
Tabela 5 – Presença (P) ou ausência (A) de efetores do Sistema de Secreção do Tipo 3 (T3SS) de <i>Xanthomonas</i> , no genoma das estirpes estudadas (Xac306, Xac636, Xac828, Xacm1510 e XfaC1632).....	p. 67
Tabela 6 – Genes de laranja doce ‘Hamlin’ e de lima ácida ‘Galego’ modulados 5 dias após infecção com XfaC1632.....	p. 70

1. INTRODUÇÃO

Os citros são um grupo de espécies vegetais com alto potencial de produção, porém, suscetíveis a várias doenças. Entre as doenças causadas por bactérias que afetam essa cultura, estão as *Xanthomonas*, um grande gênero de bactérias Gram-negativas, predominantemente fitopatogênicas, que causam doenças em centenas de hospedeiros vegetais, ocasionando perdas de alto impacto econômico (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; WHITE et al., 2009). Três são as espécies de *Xanthomonas* patogênicas de citros: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), agente causal do cancro cítrico, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B (XfaB) e C (XfaC), que causam a cancriose e, *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm), responsável por causar a mancha bacteriana dos citros (VAUTERIN; RADEMAKER; SWINGS, 2000; SCHAAD et al., 2006).

O cancro cítrico está entre as doenças de maior preocupação para a citricultura, pois afeta todas as variedades de importância econômica e ainda não existem métodos curativos eficazes para o seu controle (DAS, 2003). Essa doença está presente, atualmente, em 12,92% dos talhões no parque citrícola paulista e Triângulo Mineiro, com tendência ao aumento de incidência, o que demonstra a necessidade de melhor compreender a doença para a elaboração de estratégias eficazes de controle e cura (FUNDECITRUS, 2017).

Desta forma, com o sequenciamento dos genomas de Xac (DA SILVA et al., 2002), XfaC (MOREIRA et al., 2010) e Xacm (JALAN et al., 2011) foi possível a identificação de genes envolvidos na patogenicidade, virulência e nos mecanismos moleculares de infecção dessas bactérias (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; CERNADAS et al., 2008; LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2012; GOCHEZ et al., 2015). A colonização de *Xanthomonas* causadoras de doenças em citros é inicialmente epifítica. A motilidade do único flagelo polar dessas bactérias promove a entrada do patógeno no mesofilo, através dos estômatos, hidatódios ou a partir de feridas, que favorecem a instalação da bactéria em locais específicos para a formação de biofilme (DANHORN; FUQUA, 2007; MALAMUD et al., 2011). A bactéria, então, injeta através do Sistema de Secreção do Tipo 3 ("Type 3 Secretion

System” - T3SS), vários efetores de virulência para o interior da célula hospedeira, desencadeando os sintomas da doença e induzindo a resposta de defesa do hospedeiro para sua sobrevivência no espaço intercelular (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; BÜTTNER; BONAS, 2010).

O estudo da interação planta-patógeno pode ser feito por diversas técnicas para a compreensão do processo infeccioso. O uso de técnicas de microscopia para o estudo da interação *Xanthomonas*-citros tem sido utilizado em várias espécies cítricas, a fim de auxiliar na compreensão do processo de infecção, com base nas alterações anatômicas e ultraestruturais (LAWSON, DIELNET, CIVEROLO, 1989; GALLETI, 2003; LEE et al., 2009; WANG et al., 2011).

Esse trabalho fornece a descrição comparativa do processo de infecção de estirpes de *Xanthomonas* (306, 636, 828, 1510 e 1632) com diferentes níveis de agressividade, em um hospedeiro comum susceptível, a lima ácida ‘Galego’. Também fornece a comparação da infecção de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e duas estirpes da bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (1630 e 1632) em variedades contrastantes de citros e a avaliação da resposta de defesa dessas variedades sob infecção de XfaC. Além da avaliação e comparação das características envolvidas na virulência de *Xanthomonas* como formação de biofilme, motilidade, produção de goma e autoagregação celular (RIGANO et al., 2007; MALAMUD et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar e descrever em nível anatômico e ultraestrutural os processos de infecção de bactérias de *Xanthomonas*, causadoras de doenças em citros, correlacionar o fenótipo da interação XfaC-citros com o transcriptoma e analisar os fatores de virulência das estirpes estudadas a fim de elucidar os aspectos morfofisiológicos da interação planta-patógeno.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a sintomatologia das estirpes em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego';
- Analisar a curva de crescimento *in vitro* das estirpes;
- Analisar e comparar os fatores de virulência das estirpes: formação *in vitro* de biofilme, produção de goma, motilidade flagelar e capacidade de agregação celular;
- Analisar, descrever e comparar as características estruturais (microscopia de luz) e ultraestruturais (microscopia eletrônica de varredura e transmissão) de folhas de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' infectadas com as bactérias: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, estirpe 306 e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C estirpes 1630 e 1632, em dois períodos de infecção, utilizando como parâmetro de comparação material de plantas saudáveis;
- Analisar, descrever e comparar as características estruturais e ultraestruturais de folhas de lima ácida 'Galego' infectadas com as bactérias: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, estirpes 306, 636 e 828, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C estirpe 1632 e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*, estirpe 1510, em três períodos

de infecção, utilizando como parâmetro de comparação material de plantas saudáveis;

- Caracterizar a reação de hipersensibilidade (HR), por microscopia eletrônica de transmissão, em folhas de laranja 'Hamlin' inoculadas com XfaC1632 e XfaC1630;
- Comparar os efeitos de virulência das estirpes estudadas;
- Correlacionar as alterações estruturais e ultraestruturais de laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' infectadas com XfaC, com os dados do transcriptoma dessas espécies cítricas infectadas com XfaC.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Citricultura

3.1.1. Origem e dispersão dos citros

O gênero *Citrus* abrange várias espécies de laranja, limão, lima e tangerinas. Juntamente com os kumquats (*Fortunella*) e os trifoliata (*Poncirus*), pertencem à família Rutaceae, originários das regiões tropicais e subtropicais do continente asiático e do arquipélago malaio (ALVES; MELO, 2003; DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). A dispersão das plantas cítricas permeou a história da humanidade por quase todos os continentes, desde os registros dos primeiros ancestrais (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

Nesse sentido, estudiosos buscam identificar e rastrear o centro de origem e distribuição de diversas espécies cultivadas. Acredita-se que a laranja doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck) é originária da Indochina e do Sul da China, chegando até o Sul da Indonésia. A laranja azeda originou-se no Sul da Ásia, possivelmente na Índia, enquanto que a lima ácida (*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle) é nativa, provavelmente, do arquipélago do Leste da Índia (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

A partir de sua dispersão, os citros alcançaram várias regiões no mundo, adaptando-se em áreas tropicais e subtropicais favoráveis à cultura, instalando-se e permitindo o desenvolvimento de uma agroindústria com mais de sete milhões de hectares, distribuídas em centenas de países (SOBRINHO et al., 2013). Atualmente, as plantas cítricas são cultivadas em uma ampla faixa ao redor do mundo, compreendida entre os paralelos 44° N e 41° S (AGUSTÍ, 2000), porém as principais áreas produtoras estão concentradas em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20° N ou 20° S (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

No Brasil, os citros foram introduzidos com a colonização dos portugueses em meados do século XVI. Desde então, expandiu-se por todo o território, encontrando

condições favoráveis para o desenvolvimento de uma citricultura forte e sustentável (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

3.1.2. Contexto atual da citricultura no mundo e no Brasil

O gênero *Citrus* tem um alto potencial produtivo, sendo considerada uma das culturas frutíferas mais importantes e com abrangência de cultivo. Nos maiores países produtores de citros, a citricultura é considerada um importante “commodity” para o comércio global e de grande valor econômico, tanto para fruto fresco ou processado. As regiões produtoras mais significativas estão nas Américas (liderada pelo Brasil, Estados Unidos, México e Argentina), bacia do Mediterrâneo (liderada pela Espanha, Itália, Egito e Turquia), sul e leste da Ásia (liderada pela China, Índia e Japão) (TALON, GMITTER, 2008).

O Brasil lidera a produção mundial de laranjas desde a década de 1980 e até hoje se mantém nesta posição, seguido por Estados Unidos e China (NEVES et al., 2010; CONAB, 2017). O cinturão citrícola, engloba São Paulo e Triângulo Mineiro, é a região brasileira responsável por mais de 80% da produção de laranjas (NEVES et al., 2010). O Brasil é, também, o maior produtor e exportador de suco de laranjas do mundo, contribuindo com 60% da produção mundial (FRANCO et al., 2016).

Dados do comércio mundial de citros divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (“United States Department of Agriculture” - USDA), de janeiro de 2018, mostram que o cenário da citricultura mundial não é muito otimista. A previsão para a produção global de laranjas na safra 2017/18 é de queda de quatro milhões de toneladas em relação à safra anterior. Do mesmo modo, existe previsão de queda de 16% no setor de frutos para processamento, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos.

A produção global de suco de laranjas também tem previsão de queda de 16% para a próxima safra (2017/18), atingindo 1,7 milhões de toneladas métricas, influenciada pela queda na produção brasileira do ano passado. Os Estados Unidos e a União Europeia lideram a previsão de queda para o consumo, enquanto que a exportação e estoques caem de 8% e 9%, respectivamente, nas produções brasileiras e americanas (USDA, 2018).

A previsão para o Brasil, segundo os dados da USDA, é de queda de 15% na produção de laranjas, levando a produção para 17,3 milhões de toneladas (Figura 1). Isso devido a um ano com baixas expectativas de rendimento e aliado ao clima desfavorável, resultou em prejuízo para a floração e produção de frutos. Apesar disso, essa queda ainda é menor quando comparada com a produção de dois anos atrás. Outros setores também têm previsão de queda, como o processamento de frutos que pode cair 2,9 milhões de toneladas, alcançando 12,3 milhões, a produção de suco de laranja para 1,2 milhões de toneladas e uma queda sutil no consumo de laranjas frescas.

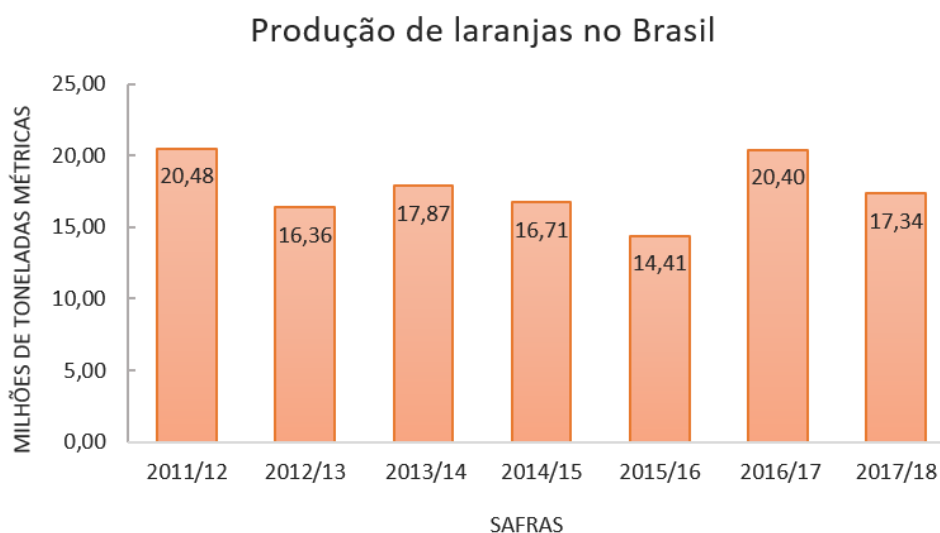


Figura 1 – Representação gráfica da produção de laranjas no Brasil, nas safras de 2011/12 até 2017/18.

Fonte: baseado nos dados de “Citrus – World Markets and Trade”, USDA.

Em 2011, a citricultura brasileira passou por uma severa crise e alguns fatores que contribuíram para esse cenário foram a retração na demanda europeia, os bloqueios alfandegários dos EUA e à perda de preferência no consumo de suco de laranja pelo mercado externo. Além disso, a queda do preço das caixas das frutas levou os produtores ao abandono dos pomares, resultando em problemas fitossanitários, com danos irreversíveis e erradicação completa de pomares. Após esse período, houve um ligeiro aumento na produção, contudo, a pequena reação do mercado não foi suficiente para que os produtores se reerguessem, pois

problemas fitossanitários como o “greening” e cancro cítrico ocasionaram perdas agrônômicas e econômicas irreversíveis para a cultura (CONAB, 2013).

Segundo dados do MAPA, em 2013, um período com elevada incidência do cancro cítrico, a doença estava presente em 10 estados brasileiros. Atualmente, o cancro ainda está presente nos estados do Paraná, Maranhão e Ceará, contudo, em outras regiões, houve mudança no “status” da doença. Algumas regiões declararam encontrar-se em sistema de mitigação de risco (MS, MT, RS, SC, SP) e outras, foram reconhecidas como áreas de supressão ou erradicação da doença (MG e RR). O cancro cítrico continua ausente nos estados de Goiás, Bahia e Tocantins. Os dados dos estados de Rondônia, Pernambuco, Piauí, Distrito Federal, Acre, Amapá, Rio Grande do Norte e Alagoas, ainda não foram atualizados, e o Pará é considerado uma região livre da doença (Figura 2).

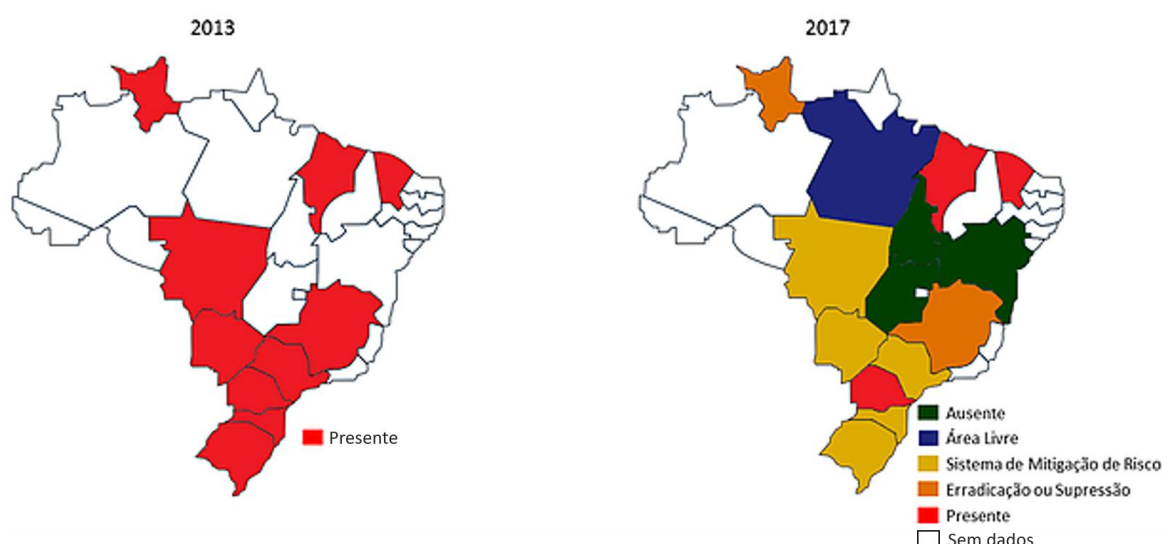


Figura 2 – Mapa dos estados brasileiros mostrando a situação do cancro cítrico no país, em 2013 e em 2017.

Fonte: <http://www.defesavegetal.net/single-post/2017/05/09/Todos-contra-o-Cancro-C%C3%ADtrico-no-Brasil>.

O Sistema de Mitigação de Risco (SMR) é a mais nova forma de controle do cancro cítrico prevista na Instrução Normativa (IN-37) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em vigor desde março de 2017. Através do SMR, medidas de manejo do pomar são adotadas a fim de prevenir a chegada da

doença ou mantê-la em níveis baixos. Entre essas medidas estão o uso preventivo com produtos à base de cobre; o plantio de mudas sadias e de variedades resistentes ao cancro; controle da larva minadora dos citros; uso de quebra-ventos; e a eliminação de frutos com a doença. Com esse sistema, os produtores podem transitar com frutos sem sintomas provenientes de áreas contaminadas e exportá-los para países que estão de acordo com a adoção desse sistema (FUNDECITRUS, 2017b).

3.2. O cancro cítrico

O cancro cítrico está entre as doenças de maior impacto econômico na citricultura. A doença tem sido extensivamente estudada e metodologias e produtos de manejo para erradicação continuam em pesquisas (REFERENCE et al., 2017). A provável região de origem do cancro cítrico está nas áreas subtropicais da Ásia, como sul da China, Índia e Indonésia (DAS, 2003). No Brasil, o primeiro aparecimento do cancro foi na década de 1950, na região da Alta Sorocabana, no estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Desde então, a doença se espalhou por várias regiões do país, causando extensivos danos, principalmente, no cinturão citrícola, região de maior produção de citros no país (OLIVEIRA et al., 2008).

A presença do cancro cítrico nos pomares acarreta em dois principais problemas econômicos para os citricultores: o aumento nos custos de produção decorrente do seu manejo integrado ou da erradicação de plantas e pomares; e as dificuldades no comércio de frutas frescas para regiões livres do patógeno, pois o cancro cítrico é uma “praga quarentenária” (AMARAL, 2003). Além disso, existe grande prejuízo econômico no mercado de frutas frescas, que não aceita os frutos com lesões cancrosas, depreciando seu valor comercial (DAS, 2003).

O cancro cítrico pode causar extensivos danos nos citros e a severidade das infecções varia conforme as diferentes espécies, variedades, condições climáticas predominantes e as medidas de controle adotadas (DAS, 2003). Os sintomas típicos do cancro cítrico surgem, em geral, nas duas faces foliares, mas podem surgir nos frutos e, mais raramente, nos ramos, e constituem-se de pequenos pontos salientes de coloração marrom claro, que circundam lesões do tipo encharcamento “water

soaking” e, à medida que a doença avança, aparecem lesões maiores e mais escuras. Em estágios avançados, as lesões podem apresentar rachaduras no centro, resultantes da morte do tecido foliar (Figura 3). Infecções severas podem ocasionar a desfolha, a deformação e a queda prematura de frutos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; MOREIRA et al., 2004).



Figura 3 – Sintomas típicos de cancro cítrico, mostrando necrose e lesões erupentes no ponto de infecção, envoltos por clorose e encharcamento em frutos (A), frutos e folhas (B, C) e ramos (D) de laranjeira.

Fonte: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>.

A disseminação da bactéria ocorre de forma direta, principalmente por chuvas associadas a ventos, mas também, por contaminação em práticas do manejo da cultura. A penetração da bactéria no tecido do hospedeiro ocorre por meio de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios ou ferimentos, podendo sua entrada ser facilitada por galerias feitas pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

A colonização no mesofilo do hospedeiro ocorre de forma pontual, a medida que o patógeno se utiliza dos nutrientes do espaço intercelular para sua multiplicação. Nesse processo, produzem enzimas que degradam a parede celular,

promovem o aumento da permeabilidade e o rompimento da membrana plasmática, o que libera nutrientes para a multiplicação bacteriana. Ademais, o patógeno induz hipertrofia e hiperplasia exacerbada de células do mesofilo. Como resultado, a epiderme é rompida e a bactéria alcança a superfície da planta, podendo iniciar novos ciclos da doença (BÜTTNER; BONAS, 2010; BEHLAU; BELASQUE Jr., 2014).

3.3. Espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros

O gênero *Xanthomonas* (do grego *xanthos*: amarelo e *monas*: entidade) pertence à família Xanthomonadaceae e compreende mais de 100 bactérias, quase exclusivamente fitopatogênicas, que causam doenças em, aproximadamente, 400 hospedeiros vegetais. Entre esses, estão espécies economicamente importantes como arroz, pimenta, tomate, cebola, cana-de-açúcar, maracujá e citros (RYAN et al., 2011; ADRIKO et al., 2014). *Xanthomonas* é o gênero entre as bactérias fitopatogênicas com a maior gama de hospedeiros e maior especificidade das estirpes. Cada estirpe em particular é limitada a um pequeno número de hospedeiros, tornando esse gênero ideal para os estudos de especificidade da interação planta-patógeno (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

As *Xanthomonas* são bactérias Gram-negativas, com formato de bastonetes, medindo de 0,4 a 0,7 μm de largura, 0,7 a 1,8 μm de comprimento e com flagelo. São aeróbias obrigatórias, quimiorganotróficas, pois utilizam fontes de carbono de diversos carboidratos para a obtenção de energia. São consideradas patógenos hemibiotróficos, porque inicialmente se alimentam do tecido do hospedeiro, mas com o avanço da infecção, causam a morte celular vegetal. Sua temperatura ótima de crescimento é de 25°C a 30°C e, apresentam colônias lisas, viscosas e, geralmente, amarelas. A coloração amarela é devido a xantomonadina, um pigmento amarelo ligado a membrana (Figura 4) (BRADBURY, 1984; BÜTTNER; BONAS, 2010).



Figura 4 – Colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* apresentam coloração amarelo em meio sólido, devido a presença de xantomonadida.

Fonte: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/CitrusCankerPort.aspx>

As espécies de *Xanthomonas* que causam doenças em citros são: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XfaB) e tipo C (XfaC), e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm). A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causa o cancro cítrico asiático ou tipo A, que é uma das doenças de maior severidade, abrangência de hospedeiros e distribuição geográfica em citros (JALAN et al., 2014).

A cancriose dos citros, uma doença que induz sintomas similares aos do cancro cítrico, é causada pelas *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XfaB) e tipo C (XfaC) (NOCITI et al., 2006; JALAN et al., 2014). A XfaB foi primeiramente identificada na Argentina, em 1923, e está presente na Argentina, Paraguai e Uruguai e sua gama de hospedeiros está restrita aos limões e limas ácidas (GRAHAM et al., 2004; MOREIRA et al., 2010). Já a XfaC, foi descrita pela primeira vez em 1970 e está presente, exclusivamente, em São Paulo (MALAVOLTA JUNIOR et al., 1984; NOCITI et al., 2006). Em geral, essa bactéria induz a formação de sintomas em lima ácida ‘Galego’ e citrumelo ‘Swingle’, causando reação de hipersensibilidade (“hypersensitivity reaction” – HR) nas demais variedades cítricas (MALAVOLTA JUNIOR et al., 1984; MOREIRA et al., 2010; JACIANI, 2012). Apesar da doença causada por essas bactérias não ter relevância econômica, são

consideradas bactérias quarentenárias em muitos países da União Europeia, do norte da África e Austrália (PRUVOST et al., 2015).

A *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Xacm) (SCHAAD et al., 2006) causa a mancha bacterina dos citros, uma doença caracterizada por lesões necróticas e achatadas, que acometem folhas, ramos e frutos. Essa doença afeta, especialmente e, com mais severidade, o citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) e plantas jovens de viveiros (STALL; CIVEROLO, 1991; JALAN et al., 2014; PRUVOST et al., 2015).

3.4. Fatores de virulência de *Xanthomonas*

Para o estabelecimento bem-sucedido de uma bactéria fitopatogênica é necessário que esta consiga se aderir à superfície foliar, entrar no ambiente intercelular, adquirir nutrientes e driblar os mecanismos de defesa da planta. Para isso, a bactéria utiliza sistemas de secreção de proteínas, que secretam proteínas para o espaço extracelular, ou as transportem para o interior das células hospedeiras e, nesse caso, as proteínas são denominadas efetores. Assim como muitos patógenos, *Xanthomonas* também utilizam uma combinação de sistemas de secreção de proteínas, juntamente com outros fatores de virulência, a fim de garantir seu sucesso na multiplicação e sobrevivência no hospedeiro (BÜTTNER; BONAS, 2010).

As *Xanthomonas* podem utilizar todos os sistemas de secreção de proteínas conhecidos: do Sistema de Secreção do Tipo 1 - T1SS ("Type 1 Secretion System") até o Sistema de Secreção do Tipo 6 - T6SS. Os efetores do T3SS, utilizados pela maioria das *Xanthomonas*, são fatores conhecidamente importantes para explicar a virulência e a gama de hospedeiros de um patógeno e, em Xac, são os responsáveis por causar os sintomas típicos do cancro cítrico (THIEME et al., 2005; JALAN et al., 2011).

Existem duas grandes classes de efetores do T3SS: os efetores TAL ("transcription activator-like") e os efetores não-TAL ("non-TAL effectors"). Os efetores não-TAL são um grupo de proteínas diversificados estrutural e funcionalmente. Em *Xanthomonas* esses efetores podem contribuir para a indução

completa da virulência e o crescimento do patógeno em plantas hospedeiras (JIANG et al., 2008; JIANG et al., 2009; ZHAO et al., 2012).

Os efetores TAL são injetados através do sistema Hrp, transpassando a parede celular das células da planta, para dentro do citoplasma, onde invadem o núcleo e se ligam a sequências específicas de DNA, modulando a expressão gênica (WHITE et al., 2009; BOCH; BONAS, 2010; BOGDANOVE, SCHORNACK, LAHAYE, 2010). Estirpes específicas de *Xanthomonas* podem possuir poucas ou muitas dúzias desses efetores (YANG, WHITE, 2004). Os efetores do tipo TAL são eficazes porque reprogramam as células hospedeiras mimetizando os fatores de transcrição eucarióticos, além de alterar o desenvolvimento da planta, como divisões desenfreadas (hiperplasia) e aumento exagerado das células (hipertrofia), no caso do cancro cítrico (BOCH et al., 2009). Esses efetores pertencem à família AvrBs3/PthA e são denominados genes de patogenicidade *pthA*, conhecidos como indutores da formação do cancro e ativadores de genes de suscetibilidade do hospedeiro para desencadear a doença (AL-SAADI et al., 2007; ABE, BENEDETTI, 2015).

Além do T3SS, Xac utiliza outros fatores de virulência, como o EPS (polissacarídeos extracelulares), LPS (lipopolissacarídeos) e biofilme (RIGANO et al., 2007; PRUVOST et al., 2015). Uma característica do gênero *Xanthomonas* é a produção de polissacarídeos extracelulares (*extracellular polysaccharides* – EPS) ou goma xantana. O EPS é composto por polímeros de pentassacarídeos repetitivos ligados por cadeias laterais de trissacarídeos (BÜTTNER; BONAS, 2010). O “cluster” de genes *gum* é composto por 12 genes (*gumB* a *gumM*), altamente conservado em muitas bactérias do mesmo gênero e está envolvido na síntese da unidade pentassacarídica, na polimerização e secreção do EPS. No entanto, a síntese de goma é comandada pelo “cluster” gênico *rpf* (“regulation of pathogenicity factors”), que também regula a síntese de enzimas extracelulares, como proteases, endoglucanases e poligalactonurases (DENNY, 1999; DUNGER et al., 2007; BÜTTNER; BONAS, 2010).

A goma possui várias funções que beneficiam o patógeno, como proteção para as bactérias contra desidratação e compostos tóxicos, auxílio na concentração de nutrientes para o metabolismo e o aumento da adesão do patógeno a superfícies

bióticas ou abióticas (DENNY, 1999). A goma está envolvida na virulência de muitas bactérias, inclusive de *Xanthomonas*, porém, não determina sua patogenicidade, ou seja, a produção de goma pode aumentar ou diminuir o processo patogênico, mas não altera a capacidade da bactéria de causar ou não a doença (DUNGER et al., 2007). Além disso, não está relacionada a formação de lesões do tipo encharcamento (“water-soaking”), visto que mutantes deficientes de produção de goma continuaram produzindo os sintomas de encharcamento e se multiplicando normalmente (KANG et al.1999; VOJNOV et al. 2001).

Em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, a goma é necessária para a sobrevivência epifítica do patógeno, mas não para sua patogenicidade. Assim como em outras bactérias, a goma é produzida nos estágios tardios de infecção, na fase estacionária de crescimento do patógeno, não sendo necessário para seu estabelecimento. Contudo, a produção de goma pode aumentar a adesão bacteriana em estágios mais avançados de infecção, auxiliando a colonização de locais mais distantes, e está envolvida em um tipo de motilidade bacteriana, independente de flagelo, chamada “sliding”, auxiliando no seu deslizamento (DUNGER et al., 2007; MALAMUD et al., 2011).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um fator de virulência associado à superfície, também envolvido na formação de biofilme em *Xanthomonas*. O LPS é único de bactérias Gram-negativas e um dos principais componentes polissacarídeos da superfície celular. Estruturalmente, é composto, em geral, por três regiões: pelo lipídeo A, que se ancora à membrana externa, por um core de oligossacarídeos, e pelo antígeno O, um polissacarídeo na extremidade final (BÜTTNER; BONAS, 2010; LI; WANG, 2011). O LPS está envolvido na proteção da bactéria em ambientes hostis e na defesa contra antimicrobianos vegetais. É considerado uma molécula padrão associado ao patógeno (“Pathogen-Associated Molecular Pattern” – PAMP) por induzir a resposta de defesa da planta, levando a produção de compostos fenólicos, a resposta oxidativa e a ativação de óxido nítrico sintase (NOS). Além disso, o LPS pode suprimir a resposta de hipersensibilidade (“hypersensitive reaction” - HR) (NEWMAN et al., 2007; LI; WANG, 2011).

O gênero *Xanthomonas* apresenta diferentes tipos de motilidade: “swimming” (dependente de flagelo), “swarming” (dependente do número/local do flagelo),

“sliding” (dependente de EPS e de sinalização DSF) e *twitching* (dependente de pili) (MALAMUD et al., 2011; DUNGER et al., 2014). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* possuem um único flagelo polar com percepção da motilidade em meio de cultura semi-sólido (MOREIRA et al., 2010). Xac é capaz de realizar os quatro tipos de motilidade e sua motilidade flagelar está relacionada com a aderência superficial inicial e com a formação de um biofilme maduro e sua dispersão (MALAMUD et al., 2011; DUNGER et al., 2014).

O flagelo e o pili do sistema de secreção do tipo IV (T4SS) estão envolvidos na formação de biofilme em várias bactérias e são estruturas que permitem que células livres, planctônicas, nadem em direção aos nutrientes associados a uma superfície ou, por meio de quimiotaxia mediada por flagelo, aos sinais gerados por células ligadas a uma superfície. Essas estruturas também permitem que as bactérias alcancem e se adiram fisicamente a uma superfície, e uma vez aderidas e em divisão, que se espalhem pela superfície (LI; WANG, 2011b).

O biofilme é uma estrutura complexa formada por uma comunidade de microrganismos que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas, encapsuladas em uma matriz composta por EPS (polissacarídeos extracelulares), proteínas, lipídeos e DNA. É importante para proteger as bactérias contra os estresses do ambiente, contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e contra compostos antimicrobianos (BRANDA et al., 2005; DANHORN, FUQUA, 2007).

Em geral, a formação do biofilme acontece em quatro etapas: (a) adesão reversível, onde, inicialmente a bactéria se adere a superfície foliar de modo reversível, podendo se mover livremente nesse ambiente; (b) adesão irreversível, novos indivíduos são adicionados à comunidade, seja por recrutamento planctônico ou por divisão celular das bactérias inicialmente presentes; (c) maturação, formação inicial de microcolônias; e (d) destacamento, dispersão de algumas células do biofilme (STOODLEY et al., 2002; MALAMUD et al., 2011; CASTIBLANCO, SUDIN, 2015).

Pode existir variação na formação do biofilme de acordo com as condições ambientais e, também, em diferentes estirpes de uma mesma espécie (BRANDA et al., 2005; DANHORN, FUQUA, 2007). O biofilme, em *Xanthomonas*, é uma característica diretamente envolvida com a patogenicidade e virulência e sua

formação é dependente da movimentação do flagelo da bactéria. Em Xac, o biofilme influencia seu crescimento e o desenvolvimento do cancro cítrico (MALAMUD et al., 2011).

3.5. Resposta de defesa de plantas contra patógenos

As plantas, por serem organismos sésseis, estão sujeitas às mudanças das condições climáticas e ao constante ataque de patógenos (ZIPFEL, 2008). E em comparação com animais, como os mamíferos, as plantas não possuem um sistema imunológico integrado, mas dependem da imunidade inata de cada célula e sinais não sistêmicos provenientes do local da infecção (JONES; DANGL, 2006). Nesse sentido, as plantas possuem um sistema de defesa bastante eficaz, visto que grande parte das plantas é resistente à maioria dos patógenos de plantas (DANGL; JONES, 2001; ZIPFEL, 2009).

A interação entre uma planta e um patógeno pode ser classificada em dois grupos: interação incompatível, que ocorre quando a planta é resistente a ação do patógeno, levando a uma resposta de hipersensibilidade (“hypersensitive response” – HR), e interação compatível, quando a planta é suscetível à ação dos efetores de virulência, que desencadeiam uma doença (KEEN, 1990) (Figura 5).

Em uma interação compatível, existem dois níveis de resposta de defesa em plantas, induzida pelo reconhecimento de microrganismos. O primeiro nível é a imunidade desencadeada por PAMP (“PAMP-triggered immunity” - PTI), em que moléculas microbianas conservadas, denominadas padrões moleculares associados a patógenos ou a microrganismos (“Pathogen or Microbe Associated Molecular Patterns - PAMPs/MAMPs”), como a quitina de fungos, os peptidoglicanos, os LPS ou as flagelinas bacterianas, são reconhecidas através de receptores de reconhecimento padrão (“Pattern-Recognition Receptors” - PRR) (ZIPFEL, 2009). A PTI desencadeia um complexo grupo de respostas para a defesa contra o patógeno, entre essas estão o fluxo rápido de íons através da membrana plasmática, ativação da MAP (“Mitogen Activated Protein”) quinase, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mudanças rápidas na expressão gênica e reforço da parede celular

(GÓMEZ-GÓMEZ; BOLLER, 2002; ZIPFEL, 2008; GRANT, KAZAN, MANNERS, 2013).

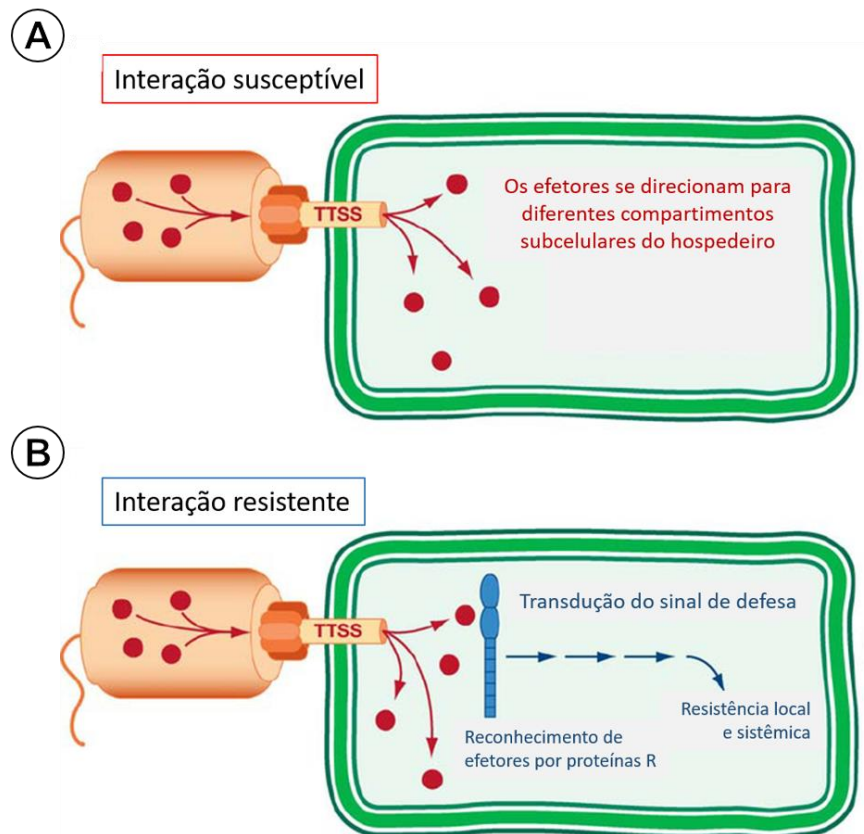


Figura 5 – Esquema representativo dos tipos de interação planta-patógeno: interação susceptível (A) e interação resistente (B).

Fonte: Adaptado de Thuleau e colaboradores (2013).

Patógenos bem-sucedidos conseguiram desenvolver estratégias para driblar o PTI, por meio da evasão do reconhecimento ou pela supressão de sinais subsequentes à ativação do PTI (GRANT, KAZAN, MANNERS, 2013). A supressão do PTI envolve, geralmente, a secreção de efetores de virulência pelos patógenos, em bactérias, codificados por genes *avr* e injetados nas células do hospedeiro através dos sistemas de secreção do tipo II (T2SS) ou do tipo III (T3SS) (GÖHRE, ROBATZEK, 2008; BIGEARD, COLCOMBET, HIRT, 2015).

O segundo nível de resposta de defesa por reconhecimento em plantas ocorre quando algum efector é especificamente reconhecido por proteínas R ("Resistance") (codificadas por genes R), resultando na imunidade desencadeada

por efetores (“Effector-Triggered Immunity” – ETI) (JONES; DANGL, 2006). O ETI é uma resposta amplificada e acelerada do PTI, resulta em resistência da doença além de estar associada à resposta de hipersensibilidade (HR) e a resistência sistêmica adquirida (“Systemic Acquired Resistance” - SAR) (JONES; DANGL, 2006).

3.5.1. Resposta de hipersensibilidade (HR)

As plantas, na maioria das vezes, respondem positivamente ao ataque de patógenos, evitando a ocorrência de doença. Nessa situação, as plantas reagem com a morte imediata de células no local da infecção, evitando a proliferação do patógeno e o avanço da infecção. Essa resposta, denominada de resposta de hipersensibilidade (HR), ocorre em plantas resistentes ou não hospedeiras. Pode ser acionada por uma variedade de patógenos, e está associada com vários processos bioquímicos que tornam as células mortas e adjacentes, ainda vivas, um ambiente inabitável para o patógeno (GOODMAN; NOVACKY, 1994; KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; HEATH, 1998).

As respostas induzidas por HR não são exclusivas de interação planta-patógeno, também podem ser ativadas por estresse físico e abiótico (MOREL, DANGL, 1997). Além do mais, as células vivas, adjacentes às células que estão sofrendo o processo de morte, expressam os genes que codificam as moléculas antimicrobianas (HEATH, 1998). No entanto, algumas características são estabelecidas como típicas de HR, e são compartilhadas por vários tipos de patógenos: dano na membrana, necrose e colapso de células afetadas (VASSE, de BILLY, TRUCHET, 1993; BESTWICK, BENETT, MANSFIELD, 1995).

3.5.1.1. Modificações na anatomia vegetal causadas pela HR

Logo após o reconhecimento do patógeno, ocorre um dos eventos iniciais mais importantes, a explosão oxidativa, que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, gerando superóxido e, o consequente acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Concomitantemente, ocorre o rápido influxo de íons através da

membrana plasmática (DOKE, 1983; BAKER; ORLANDI, 1995; LEVINE et al, 1994; MAY et al, 1996; MOREL, DANGL, 1997). Em seguida, modificações bioquímicas e metabólicas bem conservadas nas interações planta-patógeno são desencadeadas. Um conjunto de genes relacionados a defesa são induzidos, levando a modificações na anatomia da planta e desenvolvendo a resistência (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; MOREL, DANGL, 1997).

Entre as reações de defesa desencadeadas pela HR, estão: reforço da parede celular, acúmulo de moléculas antimicrobianas como PRs (quitinase, glucanase), fitoalexinas, síntese de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e, por consequência, a autofluorescência e o escurecimento de células mortas devido ao acúmulo de compostos fenólicos oxidados (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; MOREL, DANGL, 1997; HEATH, 1998).

Alguns patossistemas podem ser utilizados para explicar o desenvolvimento da HR em tecidos vegetais vivos, como interações incompatíveis, por exemplo, entre o fungo biotrófico *Uromyces vignae* e o feijão caupi. Nessa interação foram observados os eventos na seguinte ordem: (a) migração do núcleo para o local de penetração do fungo e intensa movimentação citoplasmática; (b) interrupção da movimentação citoplasmática e movimentação browniana das organelas, condensação do núcleo, acúmulo de grânulos na periferia do citoplasma, encolhimento do protoplasto; (c) colapso do citoplasma e morte da célula infectada (CHEN; HEATH, 1991; MOREL, DANGL, 1997). Em interações incompatíveis com patógenos bacterianos, detectou-se a formação de bolhas na membrana, encolhimento celular, condensação do núcleo e do citoplasma e estruturas semelhantes a corpos apoptóticos (LEVINE et al., 1996; GREENBERG; YAO, 2004).

A HR é um processo ativo do hospedeiro e pode ser considerada uma forma de morte celular programada (GREENBERG; YAO, 2004). Ainda em infecção com a bactéria avirulenta, *P. syringae*, em alface, a resposta inicial de HR foi caracterizada por inchaço mitocondrial e a não preservação das cristas, plasmólise, que levou a progressiva vacuolização do citoplasma, rompimento generalizado de organelas e colapso do tonoplasto (BESTWICK, BENETT, MANSFIELD, 1995).

3.6.O uso da microscopia eletrônica no estudo de interação planta-patógeno

A microscopia eletrônica tem sido utilizada para explorar os mecanismos moleculares de doenças e de interações bactéria-planta, para visualizar a arquitetura tridimensional de tecidos e células, para observar complexos macromoleculares em seu contexto biológico natural (HUANG, 1986). É extensivo o uso da microscopia de luz e eletrônicas para análises envolvendo *Xanthomonas* (LAWSON; DIELNET; CIVEROLO, 1988; PRUVOST et al., 2001; LEE et al., 2009; FAVARO et al., 2014; MENSI et al., 2014; ORCE et al., 2016). Essas técnicas fornecem informações valiosas que ajudam a compreender o processo de infecção dentro do tecido vivo, revelando aspectos não abrangidos por técnicas moleculares ou de fitotecnia, sendo, portanto, complementares para o entendimento da visão geral dessa interação.

A microscopia eletrônica de transmissão é bastante difundida no estudo de materiais biológicos, pois permite a definição de imagens intracelulares, possibilitando o estudo da morfologia celular, aspectos gerais das organelas e também da interação dos microrganismos com as células. Essas análises fornecem informações sobre alterações e efeitos citopáticos ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias e outros organismos diminutos, de impossível visualização na microscopia de luz (GALLETI, 2003). Essa técnica revela ultraestruturas de bactérias, células vegetais e interfaces bactérias-plantas (HUANG, 1986).

O microscópio eletrônico de varredura é um dos instrumentos mais versáteis e disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos (GALLETI, 2003). É utilizado, principalmente, para fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Além disso, possibilita a visualização tridimensional da imagem das amostras e o exame em pequenos aumentos com grande profundidade de foco (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007). Em interações planta-patógeno, mostra a relação espacial das bactérias e estruturas de superfície de tecidos vegetais nos locais de infecção (HUANG, 1986).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estirpes bacterianas e meios de cultura utilizados

As bactérias utilizadas neste trabalho foram gentilmente fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Araraquara, SP, Brasil (Tabela 1). Foram selecionadas três estirpes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: Xac306, a estirpe tipo selvagem, Xac636 que possui menor agressividade que a tipo selvagem e a Xac828, que é um mutante natural; duas estirpes de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C: Xfa1632, a estirpe que teve seu genoma sequenciado e Xfa1630, uma estirpe menos agressiva; e uma estirpe de *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*, Xacm1510, que teve seu genoma sequenciado.

Os meios de cultura utilizados para os experimentos neste trabalho foram: meio sólido *nutrient agar* (NA) (extrato de carne 3g/L, peptona 5 g/L e ágar 15g/L), meio líquido *nutrient buffer* (NB) (extrato de carne 3g/L, peptona 5 g/L) utilizados para o cultivo das bactérias, meio semi sólido para o teste de motilidade (10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl, 0,3% de ágar), meio goma (25 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de K₂HPO₄, 0,1 g/L de MgSO₄ x 7.H₂O, pH 7,0) e meio NBY (3 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 2 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de KH₂PO₄, pH 7,2).

4.2. Teste de patogenicidade *in planta*

Os sintomas causados pelas estirpes em citros foram avaliados pelo teste de patogenicidade *in planta*. As bactérias foram cultivadas a 29°C por 72h em meio NA. Uma massa de células foi ressuspensa em água deionizada estéril para o preparo da suspensão bacteriana com concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL (DO_{600nm} de 0,3). A suspensão bacteriana foi inoculada, pelo método de infiltração por pressão com o auxílio de uma seringa descartável sem agulha, na parte abaxial de folhas jovens de laranja doce 'Hamlin' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.). A água deionizada estéril foi infiltrada como

Tabela 1 – Espécie, origem geográfica, hospedeiro, e nome das doenças causadas pelas estirpes de *Xanthomonas* utilizadas no presente estudo.

Espécie	Estirpe ^a	Abreviação	Origem	Hospedeiros	Doença
	306 ^b	Xac306	Paranavaí, PR, Brasil	<i>Citrus</i> spp.	Cancro cítrico
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	FDC 636 (IAPAR 12853)	Xac636	Paranavaí, PR, Brasil	<i>C. sinensis</i>	Cancro cítrico
	FDC 828 (IBSBF 1350)	Xac828	Ubarana, SP, Brasil	<i>C. aurantifolia</i>	Cancro cítrico
<i>Xanthomonas alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>	1510 (IBSBF 1925)	Xacm1510	Flórida, Estados Unidos	<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Mancha bacteriana do citros
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> tipo C	FDC 1630 ^c	Xfa1630	Três Fronteiras, SP, Brasil	<i>C. aurantifolia</i>	Cancrose
	1632 (10535 ^b)	Xfa1632	Cândido Mota, São Paulo, Brasil	<i>C. aurantifolia</i> ; <i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Cancrose

^aEstirpes pertencentes à Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Fundecitrus (FDC, Araraquara/São Paulo). Os números entre parênteses representam o código original do isolado (IBSBF – Instituto Biológico de São Paulo; IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná).

^bEstirpes que tiveram seus genomas sequenciados (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010), cuja numeração é a mesma utilizada nas publicações.

^cEstirpe produtora de pigmento escuro em meio de cultura artificial.

tratamento controle dos ferimentos provocados pela seringa. Cada bactéria foi inoculada em três folhas de plantas diferentes. As plantas inoculadas foram mantidas em condições controladas de temperatura (28-30°C), umidade (55%) e fotoperíodo (12 h). O registro dos sintomas por meio de fotografia foi feito nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 20, 25 e 30 após inoculação (dai).

4.3. Curvas de crescimento *in vitro*

Para avaliar o crescimento das bactérias em meio rico, uma colônia isolada de cada bactéria foi inoculada em 20 mL de meio NB e incubadas por 16 h a 29°C, sob agitação de 180 rpm. Após esse período, suas concentrações foram ajustadas para a DO_{600nm} de 0,1 ($3,3 \times 10^7$), utilizando o espectrofotômetro DU-730 (Beckman, Coulter) e, 1,5 mL de cada cultura foi transferida, em triplicata, para placas de 24 poços de poliestireno e incubadas no leitor de placas *Synergy H1 Hybrid Microplate Reader* (BioTek) a 29°C. A absorbância (DO_{600nm}) do crescimento das culturas foi registrada a cada 30 min durante 24 h, exceto para as estirpes 1630 e 1632 de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xfa) tipo C, cujos crescimentos foram registrados durante 48 h. No mínimo duas curvas de crescimento provenientes de duas colônias isoladas de cada estirpe foram registradas. A curva de crescimento e os desvios padrões foram plotados no *GraphPad Prism* (versão 6).

4.4. Formação de biofilme *in vitro*

A avaliação da formação de biofilme *in vitro* das estirpes foi feita com base no protocolo de Yan, Hu e Wang, (2012). Inicialmente, foi feita uma suspensão celular em meio NB com concentração de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} de 0,3) com bactérias multiplicadas por dois dias em placas de NA. Adicionou-se 1 mL da suspensão em tubos de borosilicato de 20 mL estéreis, os quais foram tampados, permitindo aeração, e mantidos em estufa a 29°C por 48 h. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e os tubos foram lavados duas vezes com água de torneira esteril. O biofilme formado foi corado com 1,2 mL de cristal de violeta a 0,1%. Após 10 min, os tubos foram lavados duas vezes com água de torneira esteril. A solubilização do

biofilme foi feita com 1 mL da solução álcool-acetona (80:20, v/v) e a quantificação da absorbância (DO_{595nm}) foi realizada no leitor de placas *Bio-rad Imark Microplate Absorbance Reader*. O experimento foi feito com quatro colônias de cada estirpe e quatro repetições cada.

4.5. Teste de motilidade “swimming”

O teste de motilidade “swimming” foi feito com base no protocolo de Li e Wang (2011). Três colônias isoladas de cada estirpe foram inoculadas em 10 mL de meio NB e incubadas a 29°C, sob agitação de 180 rpm por 16 h. Em seguida, aplicou-se 2 µL dos inóculos com concentração ajustada para 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} de 0,3) no centro das placas com 20 mL de meio semi sólido (10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl, 0,3% de ágar). As placas foram incubadas em estufa a 29°C por 72 h e, após esse período, foi realizado o registro fotográfico. O experimento foi feito com três colônias de cada estirpe e três repetições cada. O diâmetro das colônias foi mensurado com o auxílio do software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). A média do diâmetro das colônias foi utilizada para avaliar a motilidade “swimming” das estirpes.

4.6. Teste de produção de goma xantana

O teste de produção de goma xantana foi feito segundo Lo *et al.* (1997) com modificações. Três colônias isoladas de cada estirpe foram inoculadas em 10 mL de meio NB e incubadas a 29°C, 180 rpm por 16 h. Em seguida, transferiu-se 2,5 mL do inóculo com concentração ajustada para 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} de 0,3) para 100 mL de meio goma e incubou-se a 29°C, a 180 rpm por 96 h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 xg, a 4°C por 40 min, os sobrenadantes transferidos para béqueres e adicionados de 4 g de KCl sob agitação constante durante 15 min. Em seguida, foram adicionados 200 mL de etanol absoluto gelado. A goma formada foi transferida para copos plásticos pequenos e incubada em estufa a 37°C por 72 h, constituindo a massa de goma seca. Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de água deionizada estéril, transferidos para béqueres de

vidro e incubados em estufa a 70°C por 24 h, constituindo a massa celular seca. O cálculo da produção de goma de cada estirpe foi feito pela divisão da quantidade de goma seca pela quantidade de massa celular produzida. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7. Teste de auto agregação celular

O teste de auto agregação foi feito segundo protocolo estabelecido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da UNESP/FCAV. Assim, três colônias isoladas de cada estirpe foram transferidas para 15 ml de meio NBY, incubadas a 29°C até atingirem a faixa de DO_{600nm} de 2,0 a 2,5. Em seguida, transferiu-se 10 mL da cultura para tubos de borosilicato de 20 mL estéreis. Os tubos foram gentilmente agitados por 10 s e mantidos estáticos por 10 h consecutivas. A cada 1 h (incluindo o tempo zero), coletou-se 100 uL da parte superior da cultura (até 1 cm) e diluiu-se em 900 uL de meio NB para a leitura da absorbância (DO_{600nm}). O cálculo da agregação de cada estirpe foi feito pela divisão da leitura da absorbância (DO_{600nm}) inicial pela final. O experimento foi realizado em triplicata.

4.8. Análise Estatística

A análise de variância da curva de crescimento *in vitro* e dos testes de formação de biofilme *in vitro*, produção de goma xanta, motilidade “swimming” e auto agregação celular, foi feita pelo teste *t* ao nível de 5% de probabilidade usando o software *Assistat* (versão 7.7).

4.9. Obtenção de material vegetal para análises microscópicas

As análises por microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas com seis estirpes (Xac306, Xac636, Xac828, Xfa1632, Xfa1630 e Xacm1510). Para a análise comparativa da infecção de diferentes estirpes de *Xanthomonas*, as estirpes Xac306, Xac636, Xac828, Xfa1632 e Xacm1510 foram inoculadas em folhas jovens de lima ácida

‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) e coletadas aos 40, 70 e 120 dias após inoculação (dai). Para a análise comparativa da infecção de *X. citri* e *X. aurantifolii* em diferentes variedades de citros, as estirpes Xac306, Xfa1632 e Xfa1630 foram inoculadas em folhas jovens de laranja doce ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck)) e lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) e coletadas aos 5 e aos 20 dai.

Para o preparo da suspensão bacteriana, uma massa de células de cada estirpe foi ressuspensa em água deionizada estéril e ajustadas para a concentração de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} de 0,3). A suspensão bacteriana foi inoculada na parte abaxial de folhas jovens de lima ácida ‘Galego’ e de laranja doce ‘Hamlin’ através da perfuração do limbo foliar com o auxílio de uma agulha (0,45 mm). A água deionizada estéril foi inoculada para controle dos ferimentos provocados pela agulha. Cada estirpe foi inoculada em três plantas diferentes com três réplicas em cada planta.

4.10. Coleta de amostras para análises microscópicas

No período determinado para a coleta, três discos foliares ($3 \times 1 \text{ cm}^2$) de cada tratamento foram retirados ao redor do ponto de inoculação para cada análise microscópica. Os discos foram cortados em pedaços menores, $0,5 \times 1 \text{ cm}^2$ para a técnica de microscopia de luz e $0,2 \times 1 \text{ cm}^2$ para as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os fragmentos foram fixados em solução de “Karnovsky” modificada (2,5% de glutaraldeído, 2,0% de formaldeído em 0,05 M tampão de cacodilato de pH 7,2 e 0,001 M de CaCl_2), submetidos ao vácuo para a remoção do ar de dentro dos tecidos e armazenados a 4°C.

4.10.1. Microscopia de luz

As amostras a serem analisadas por microscopia de luz foram desidratadas em soluções de etanol em série crescente de concentração (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 10 min em cada etapa, sendo a última, de 100%, repetida por três vezes. Após desidratação, as amostras foram pré-infiltradas com resina acrílica e etanol PA

na proporção 1:1 por aproximadamente 5 h. Na sequência, a infiltração foi feita com resina pura por 16 h. As amostras infiltradas por resina foram levadas à polimerização em temperatura ambiente (25°C). Os blocos polimerizados foram seccionados em micrótomo rotativo manual (RM2235, Leica) e as secções resultantes (5 µm) foram coradas com azul de toluidina a 0,05%, em pH 3,6, e cobertas por lamínulas de vidro com a resina “Entellan” como meio de montagem. Após a secagem, a análise do laminário foi realizada no microscópio de luz (Zeiss Axioskop 2, Zeiss), adquirindo-se fotografias via câmera digital (AxioCam MRc Rev 3, Zeiss) em computador.

4.10.2. Microscopia eletrônica de varredura

Para análise de microscopia eletrônica de varredura, as amostras fixadas em solução de “Karnovsky” foram infiltradas com glicerol 30% por 1 h. Após esse período, as amostras foram rapidamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido dentro de um pedaço de papel de seda e, imediatamente, fragmentadas na região de intersecção do aparecimento do sintoma com o tecido sadio. Em seguida, as amostras foram colocadas em água milli-Q e submetidas à desidratação crescente com acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 20 min em cada diluição, sendo a última etapa repetida três vezes. As amostras foram levadas para secagem no equipamento de secagem ao ponto crítico com CO₂ (Leica EM CPD 300). As amostras foram colocadas em suportes metálicos (*stubs*), metalizadas com ouro (*sputtering*) e armazenadas em sílica gel. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO 435-VP).

4.10.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão as amostras fixadas foram cortadas em pedaços menores e lavadas em tampão cacodilato 0,05 M, três vezes por 15 min. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 1 h. Após esse processo, os fragmentos foram lavados com água destilada e submetidos à contrastação “en

bloc” com acetato de uranila 0,5% por 10 a 14 h. No dia seguinte, a desidratação foi realizada utilizando-se uma série crescente de acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 20 min em cada diluição, sendo a última etapa repetida três vezes. A pré-infiltração foi realizada utilizando-se acetona 100% e resina epóxi “Spurr” na proporção de 1:1, por pelo menos 5 h. Em seguida, a infiltração foi realizada com resina “Spurr” pura por 10 a 14 h, e a polimerização realizada em estufa aquecida a 70°C, por três dias. Os blocos oriundos da polimerização foram trimados e levados ao seccionamento em ultramicrotomo (Leica EM UC6) com navalha de vidro obtendo-se cortes com 70 nm de espessura os quais foram dispostos sobre telinhas de cobre. As telinhas de cobre contendo as secções foram contrastadas em acetato de uranila 3% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JSM, 1100).

4.11. Análise comparativa dos efetores de virulência de *Xanthomonas*

Os dados referentes ao conjunto de efetores de virulência das estirpes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, estirpes 306, 636 e 828, foram cedidos por Moreira, M. L. (dados não publicados). Os dados referentes ao conjunto de efetores de virulência de XfaC1632 e Xacm1510 foram obtidos por busca na plataforma Pintado, do Projeto BIGA *Xanthomonas* (<http://pintado.facom.ufms.br/xanthomonas/>).

4.12. Análise de dados do transcriptoma de laranja doce ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ infectadas com XfaC

A análise de dados do transcriptoma gerados em um trabalho anterior do nosso laboratório (DA SILVA, 2015) foi feita selecionando-se os genes diferencialmente expressos (GDEs) de ‘Hamlin’ aos 5 dai, com maior expressão diferencial (fold-change) e com significância estatística ($p\text{-value} \leq 0,05$) e relacionando com a expressão desses mesmos genes de ‘Galego’.

5. RESULTADOS

5.1. Teste de patogenicidade *in planta*

Os sintomas produzidos pelas estirpes de *Xanthomonas* em folhas jovens de laranja doce 'Hamlin' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) foram avaliados pelo teste de patogenicidade (Figura 6). As alterações decorrentes da infecção com as estirpes foram classificadas em necrose, clorose, encharcamento e lesão saliente, e a intensidade observada estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Intensidade das alterações macroscópicas observadas em folhas de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego', decorrentes da infecção com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpes 306, 636 e 828, *Xanthomonas alfafae* subsp. *citrumelonis* estirpe 1510 e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C estirpes 1632 e 1630.

Estirpes	Hamlin				Galego			
	Necrose	Clorose	Encharcamento	Lesão saliente	Necrose	Clorose	Encharcamento	Lesão saliente
Xac306	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
Xac636	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Xac828	+++	-	-	+	++	-	-	-
Xacm1510	++	-	-	-	+++	-	-	-
XfaC1632	+	-	-	-	-	-	-	+
XfaC1630	+	-	-	-	-	-	+	+

++++: muito alta; +++: alta; ++: intermediária; +: baixa; -: ausência da alteração.

Os sintomas mais severos foram causados pelas estirpes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, tanto em folhas de laranja doce, quanto em lima ácida. A infecção em 'Galego' com a estirpe Xac306 apresentou intensidade muito alta de necrose, clorose, encharcamento e lesões salientes, enquanto em 'Hamlin', as intensidades das alterações foram altas. A infecção com a estirpe Xac636, apresentou em 'Galego' intensidade alta das alterações observadas (necrose, clorose,

encharcamento e lesões salientes), porém, em 'Hamlin' a intensidade foi intermediária. A infecção com a estirpe Xac828 não apresentou encharcamento e clorose em nenhuma das espécies cítricas, porém, induziu necrose em alta intensidade em 'Hamlin' e intermediária em 'Galego', e lesões salientes somente estiveram presentes em 'Hamlin'.

A infecção com a estirpe Xacm1510 somente induziu necrose nas espécies cítricas, sendo que em 'Hamlin' a intensidade dessa alteração foi maior que em 'Galego'. Já a infecção com as estirpes XfaC1630 e XfaC1632, induziram somente necrose em 'Hamlin'. Em 'Galego', a estirpe XfaC1630 induziu encharcamento e lesões salientes com baixa intensidade, enquanto a estirpe XfaC1632 apresentou lesões salientes de baixa intensidade.

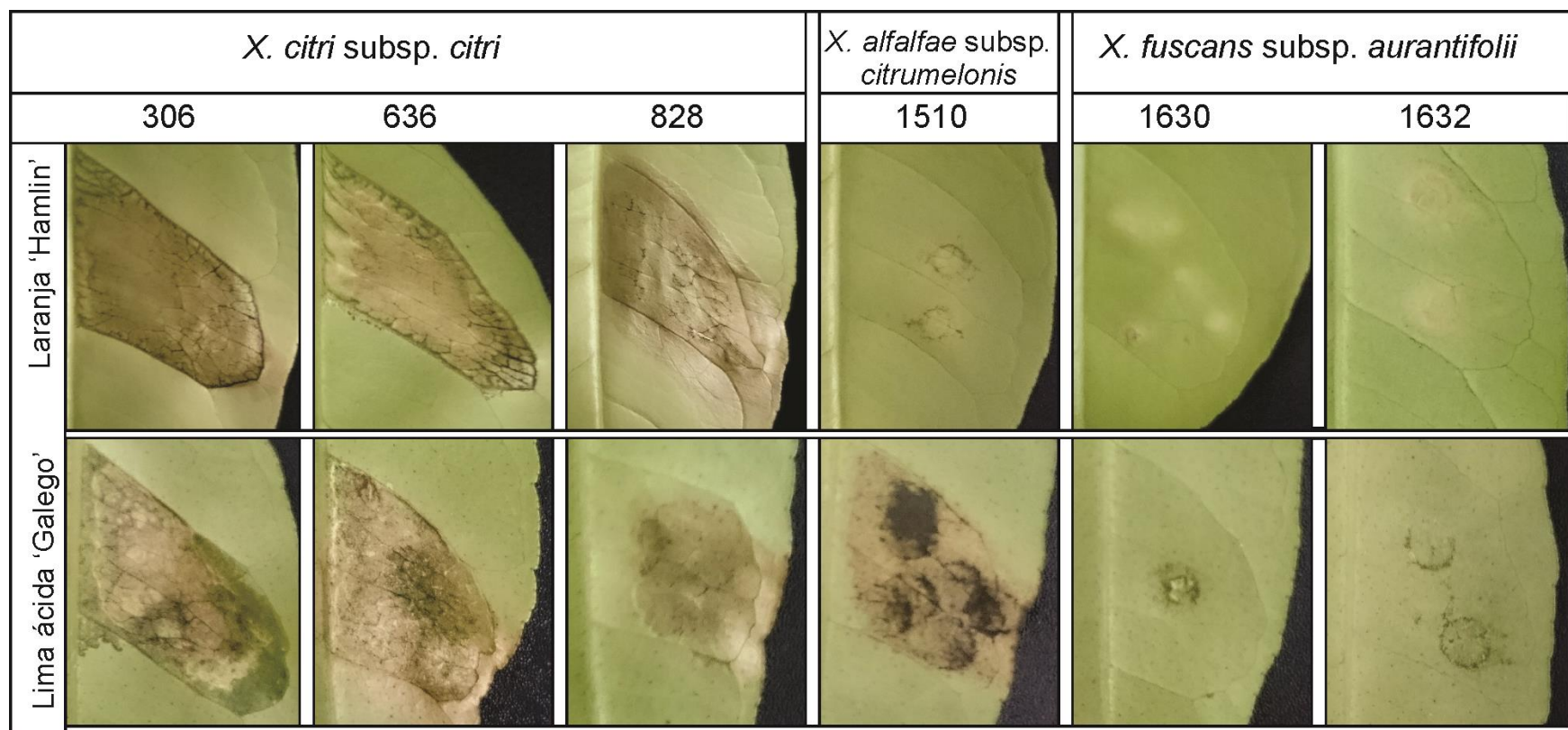


Figura 6 – Teste de patogenicidade das bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (estirpes 306, 636, 828), *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (estirpe 1510) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (estirpes 1630 e 1632), inoculadas em folhas jovens de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' na concentração de 10^8 UFC/mL. O processo de infecção foi observado por 30 dias após inoculação (dai) e a folha apresentada é referente a 9 dai.

5.2. Curvas de crescimento *in vitro*

As curvas de crescimento *in vitro* foram realizadas para avaliar o comportamento das estirpes em meio líquido NB. Na Figura 7A, observa-se que as estirpes Xac306, Xac828 e Xacm1510 entraram rapidamente na fase exponencial (log) com aproximadamente 1 h de crescimento, enquanto a estirpe Xac636 atingiu a fase exponencial próximo de 6 h de crescimento. A duração da fase exponencial da estirpe Xac828 foi de 10 h, da estirpe Xac306 foi de 11 h, da estirpe Xacm1510 de 14 h e da estirpe Xac636 de 15 h. As estirpes Xac306, Xac828 e Xacm1510 atingiram, na fase exponencial, a densidade óptica (DO) máxima entre 1,0 e 1,2, enquanto que a Xac636 atingiu a DO máxima de 0,8.

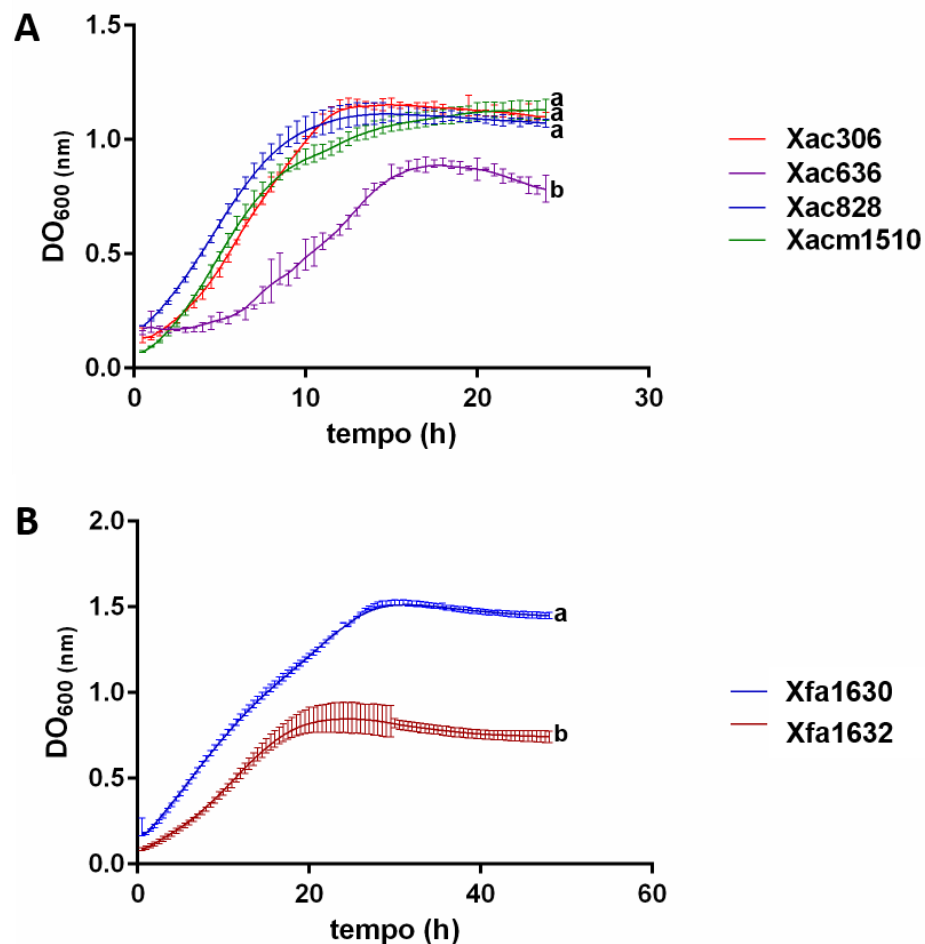


Figura 7 – Curvas de crescimento *in vitro* das estirpes de *Xanthomonas*. (A) Estirpes Xac306, Xac636, Xac828 e Xacm1510 foram avaliadas durante 24 h de crescimento. (B) Estirpes XfaC1630 e XfaC1632 foram avaliadas durante 48 h de crescimento, com medição

da densidade ótica (DO_{600nm}) a cada 30 min, a 29°C, em meio NB. As curvas apresentadas são a média e o desvio padrão de três repetições de cada estirpe. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Já as estirpes de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (XfaC), apresentadas na Figura 6B, tiveram um crescimento mais lento comparado com as demais estirpes. A fase exponencial da estirpe Xfa1630 durou aproximadamente 30 h, atingindo uma densidade ótica (DO) máxima de quase 1,5 nesta fase. Em comparação, a estirpe Xfa1632, teve uma fase exponencial mais curta, próximo de 20 h, e atingiu uma densidade ótica (DO) máxima próxima de 0,8. Em 24 h de crescimento, as curvas das estirpes Xac306, Xac828, Xacm1510 e Xfa1630 não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), mas diferiram das curvas das estirpes Xac636 e Xfa1632, que foram iguais entre si ($p < 0,05$).

5.3. Características das estirpes envolvidas na virulência

Os resultados mostraram diferenças na formação de biofilme, capacidade móvel, produção de goma e auto agregação celular entre as espécies estudadas e as estirpes da mesma espécie. O teste de produção de goma revelou que a estirpe Xac306 foi substancialmente a maior produtora de goma entre as demais estirpes, com 5,08 mg de goma/mg de bactéria ($p < 0,05$), seguida pela produção de goma da estirpe Xac828 com 3,86 mg de goma/mg de bactéria ($p < 0,05$). As estirpes Xacm1510 e XfaC1630 produziram quantidades similares de goma, 2,88 e 2,75 mg de goma/mg de bactéria ($p < 0,05$), respectivamente. A produção de goma da estirpe Xac636 foi de 2,53 mg de goma/mg de bactéria ($p < 0,05$), enquanto que a estirpe XfaC1632, produziu a menor quantidade de goma entre as estirpes, 0,93 mg de goma/mg de bactéria ($p < 0,05$) (Figura 8).

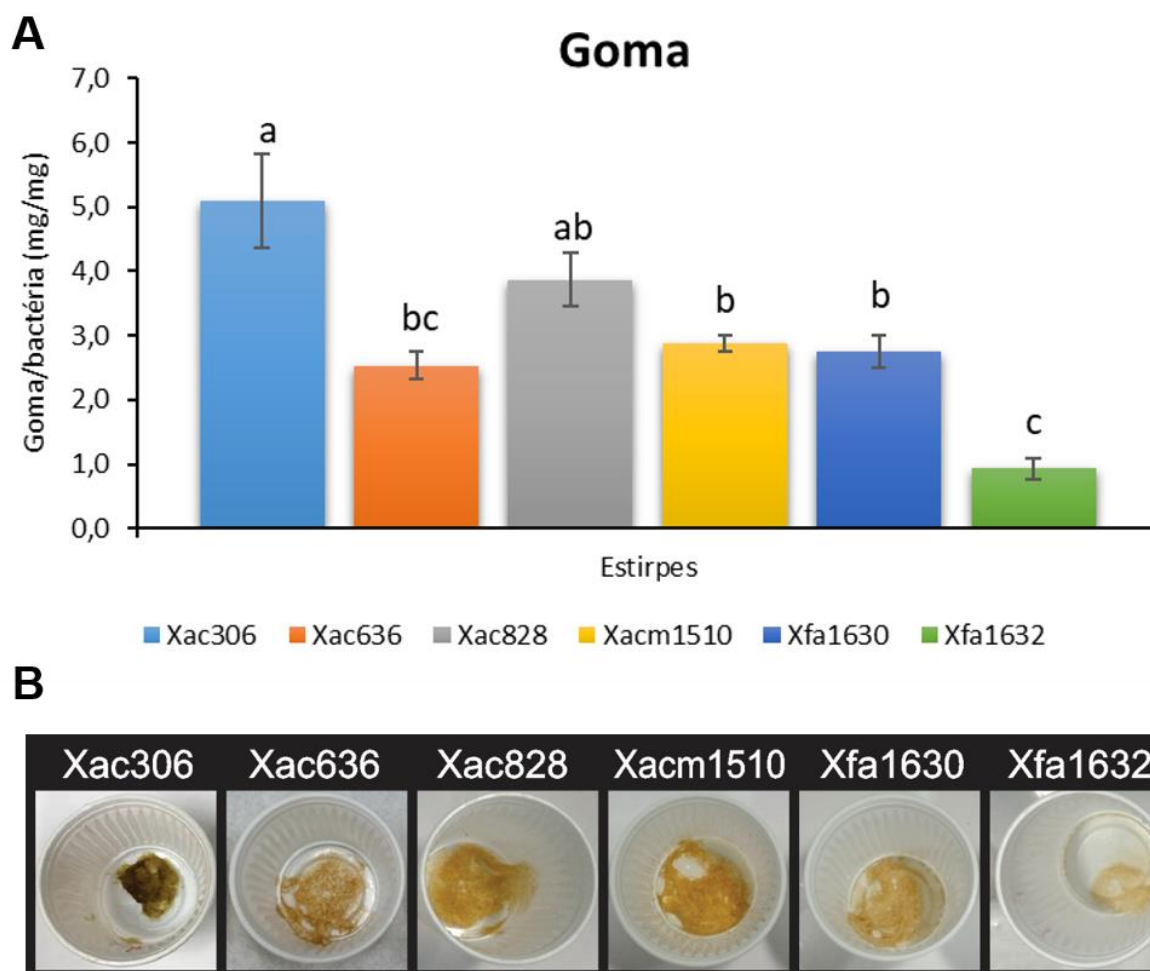


Figura 8 – Teste de produção de goma xantana das estirpes de *Xanthomonas*. (A) As barras no gráfico representam a média de três colônias isoladas e os respectivos desvios padrões. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. (B) Fotografia representativa de cada amostra.

O teste de motilidade *swimming* (dependente de flagelo) mostrou que as estirpes Xacm1510 e Xac828 apresentaram capacidade de motilidade similar seguida pela estirpe XfaC1632 ($p < 0,05$). Do mesmo modo, as estirpes Xac306 e Xac636 ($p < 0,05$) apresentaram motilidade similar, enquanto a estirpe XfaC1630 apresentou a menor capacidade de motilidade entre as estirpes (Figura 9).

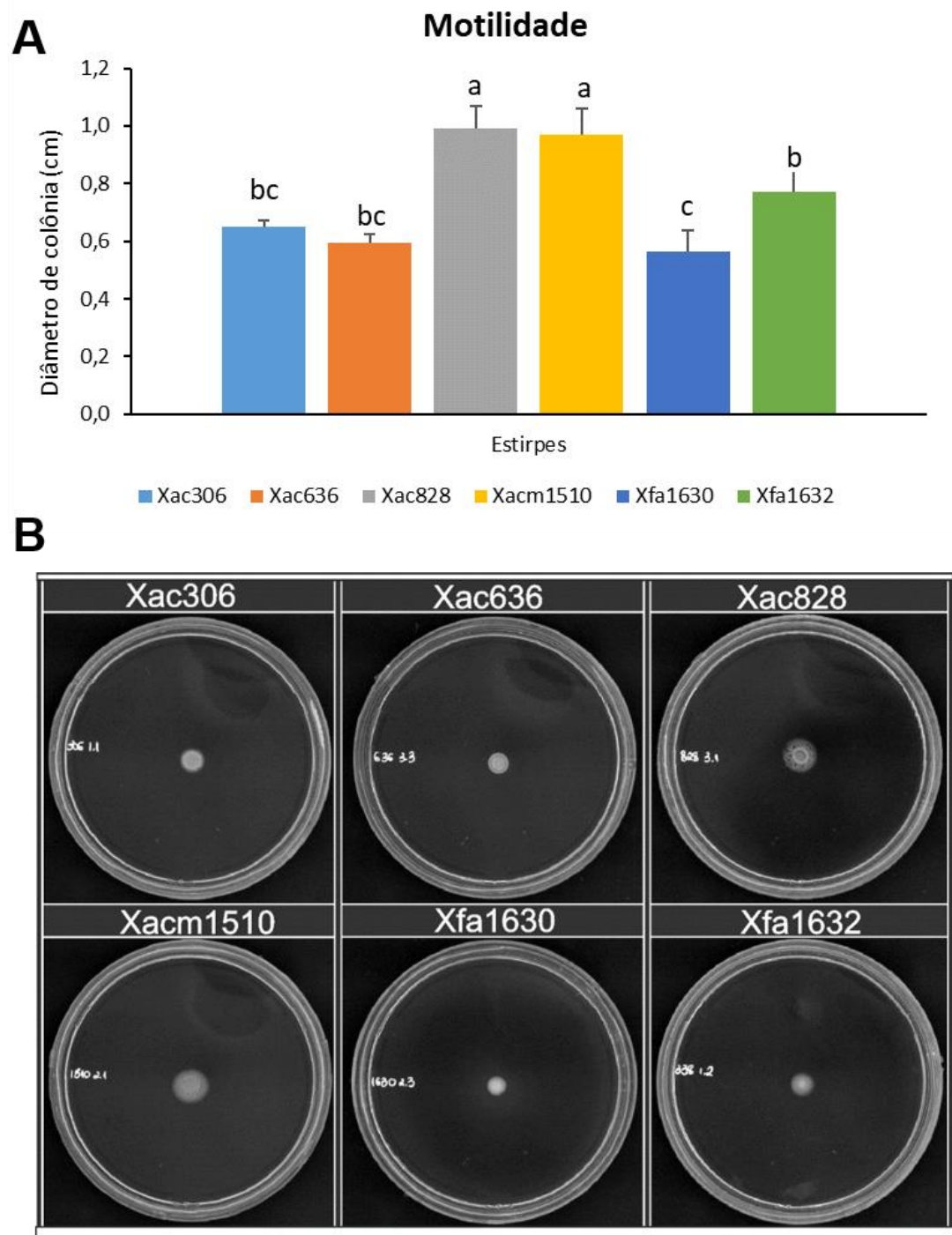


Figura 9 – Teste de motilidade “swimming” das estirpes de *Xanthomonas* em meio NB com 0,3% de ágar. (A) As barras no gráfico representam a média de três colônias isoladas com três repetições cada e os respectivos desvios padrões. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. (B) Fotografia representativa de cada amostra.

O teste de formação de biofilme *in vitro* mostrou que a estirpe Xacm1510 apresentou a maior quantidade de biofilme produzida ($p<0,05$) (Figura 10). As estirpes Xac306 e Xac828 apresentaram a mesma quantidade de biofilme ($p<0,05$), diferindo da estirpe Xac636, que por sua vez, produziu a mesma quantidade de biofilme que a estirpe XfaC1632 ($p<0,05$). A estirpe XfaC1630 apresentou a menor formação de biofilme *in vitro* ($p<0,05$).

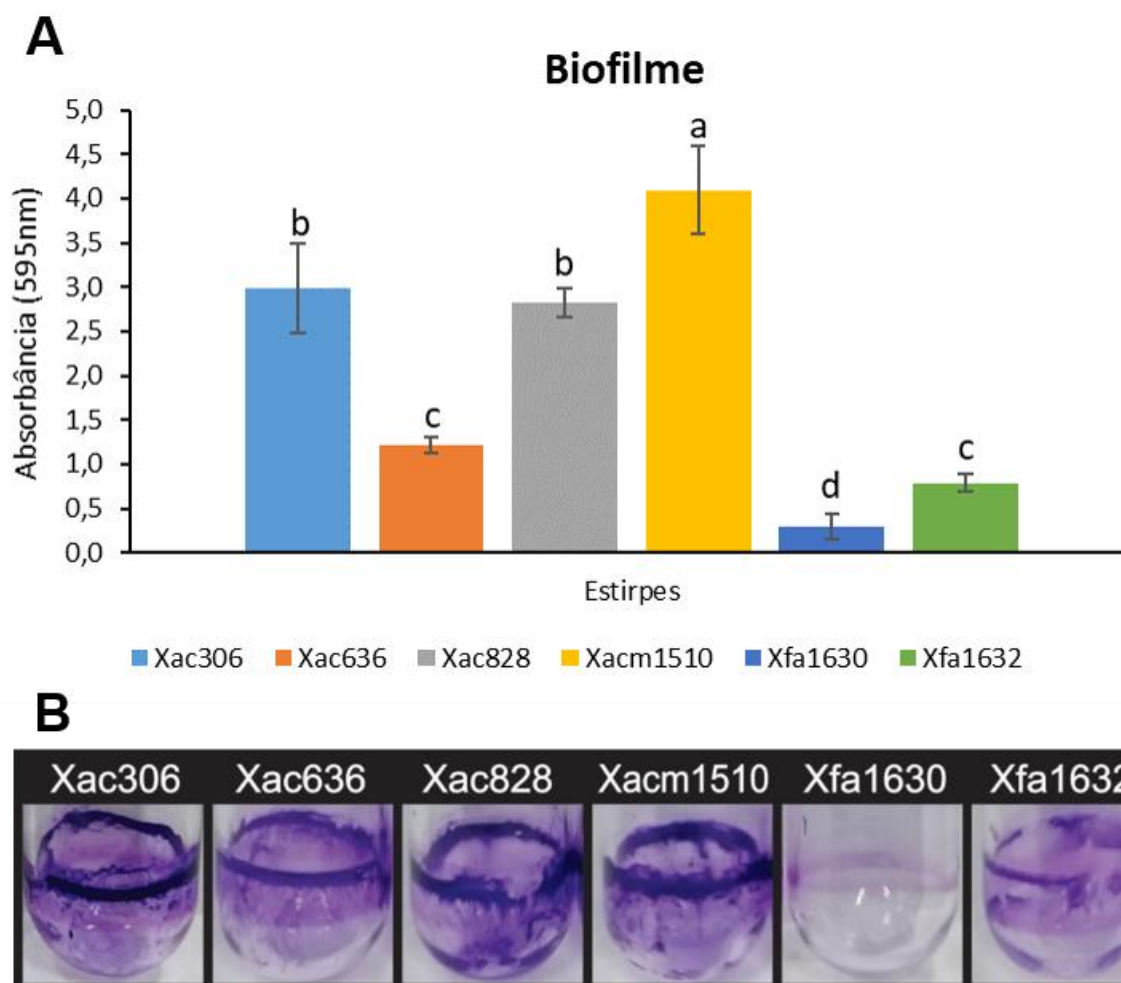


Figura 10 – Teste de formação de biofilme *in vitro* pelas estirpes de *Xanthomonas* em tubos de vidro de borosilicato, corados com cristal de violeta a 0,1%. (A) Quantificação da absorbância (DO_{595nm}) do biofilme das estirpes solubilizado com solução álcool-acetona (80:20, v/v). As barras no gráfico representam a média de quatro colônias isoladas com três repetições cada e os respectivos desvios padrões. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. (B) Fotografia representativa do resultado de cada estirpe.

Os resultados do teste de auto agregação revelaram dois tipos de comportamento (Figura 11). As estirpes Xac306, Xac828 e Xacm1510 tiveram um comportamento de auto agregação semelhante entre si ($p < 0,05$). Essas estirpes apresentaram rápida auto agregação, atingindo em 6 h de teste, 0,2 de absorbância (DO_{600nm}), reduzindo acentuadamente a turbidez do meio de cultura. Já as estirpes Xac636, XfaC1630 e XfaC1632, não apresentaram diferenças entre si ($p < 0,05$) e revelaram não possuírem alta capacidade de auto agregação. Essas estirpes apresentaram pouca ou quase nenhuma redução da turbidez do meio de cultura, mantendo-se com uma alta concentração de células durante o tempo do teste.

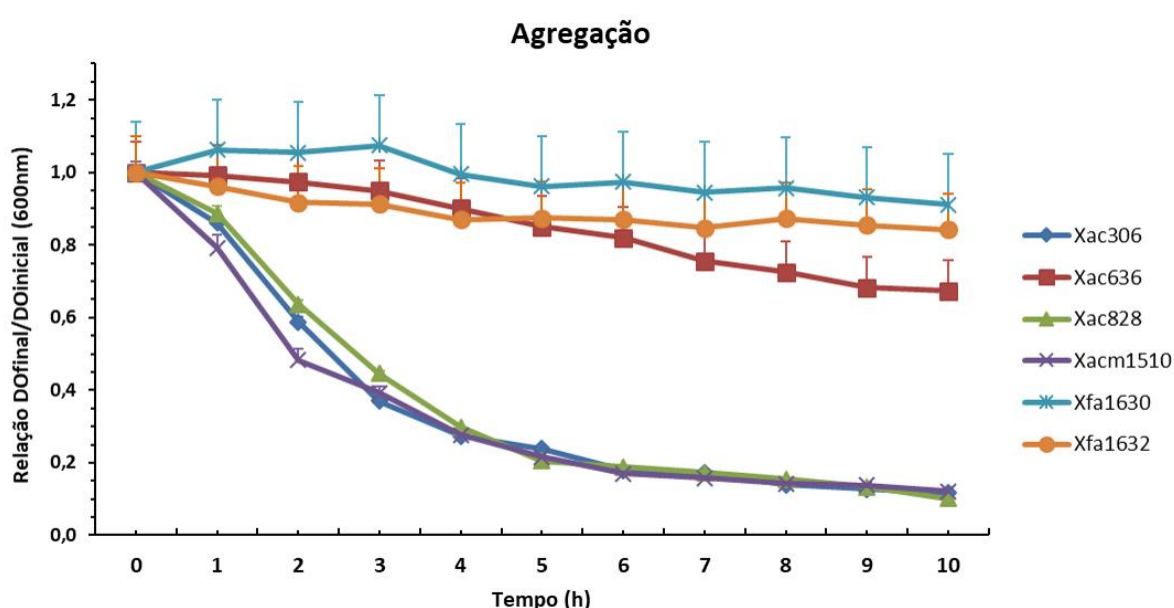


Figura 11 – Teste de auto agregação das estirpes de *Xanthomonas*. As linhas no gráfico representam a média entre a DO_{600nm} final e a DO_{600nm} inicial da absorbância de três colônias isoladas e os respectivos desvios padrões ao longo de 10 horas de teste.

5.4. Análise comparativa da infecção de Xac306, XfaC1632 e XfaC1630 em diferentes variedades de citros por técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão

O processo de infecção de duas espécies de *Xanthomonas*: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306, causadora do cancro cítrico e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C, estirpes 1630 e 1632, causadoras da cancrose cítrica, foi

analisado em dois períodos de infecção, aos 5 e aos 20 dias após a inoculação (dai) em duas variedades de citros contrastantes, laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego'. A análise foi feita pela microscopia de luz, que permitiu a caracterização anatômica da região sintomática do tecido vegetal infectado, e pela microscopia eletrônica de varredura e transmissão, que permitiu a identificação de alterações em nível intracelular do tecido do hospedeiro infectado.

5.4.1. Microscopia de luz

5.4.1.1. Folhas sadias

A análise do limbo foliar de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' em secção transversal mostraram semelhanças anatômicas (Figura 12). Ambas as espécies apresentaram limbo dorsiventral, epiderme unisseriada coberta por uma camada de cutícula proeminente. A camada de células epidérmicas na face superior (adaxial) apresentou-se maior e com formato tendendo a retangular, em comparação às camadas de células epidérmicas na face inferior (abaxial). Os estômatos estavam presentes somente na face abaxial (hipostomáticos) e classificados como paracíticos, isto é, células-guarda acompanhadas de cada lado por uma ou mais células subsidiárias posicionadas de forma que o seu eixo longitudinal fica paralelo ao ostíolo (ESAU, 2006).

Vários idioblastos de cristais romboédricos foram encontrados distribuídos entre o parênquima paliçádico e a epiderme adaxial, e outros, presentes entre o parênquima lacunoso e a epiderme abaxial. Observou-se cavidades lisígenas secretoras de óleos essenciais, nas faces abaxial e adaxial, localizadas entre a epiderme e o parênquima.

O parênquima paliçádico apresentou de dois a três estratos de células alongadas e justapostas. As células possuíam o núcleo evidente, localizado na posição central lateral e o citoplasma denso. Entre o parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso notou-se uma camada de células coletoras, que possuíam formatos que variaram de alongado a esférico. O parênquima lacunoso apresentou células de formato e tamanho variáveis, com projeções laterais, conectadas às

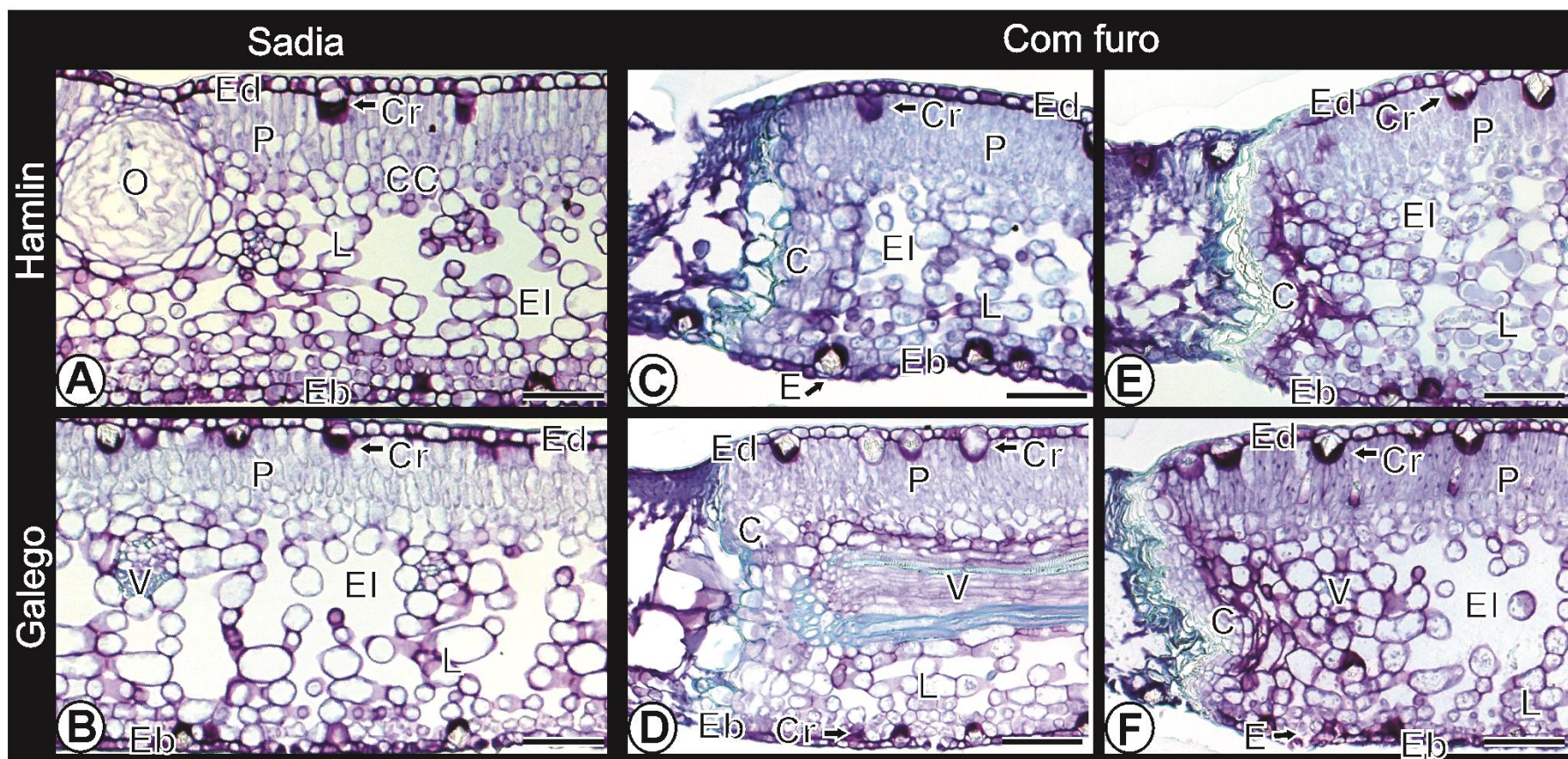


Figura 12 – Microscopia de luz. Folhas controle (sem inoculação) de laranja doce ‘Hamlin’ (A) e de lima ácida ‘Galego’ (B). Folhas controle inoculadas por furo com agulha de laranja ‘Hamlin’ aos 5 dias após inoculação (dai) (C) e aos 20 dai (E), e de lima ácida ‘Galego’ aos 5 (D) e aos 20 dai (F). P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; CC: células coletoras; EI: espaço intercelular; Ed: epiderme da face adaxial (superior); Eb: epiderme da face abaxial (inferior); O: cavidade secretora de óleo; V: feixes vasculares; C: camada de cicatrização; E: estômatos; Cr: cristais romboédricos. Barra = 50 μ m.

células adjacentes, delimitando grandes espaços intercelulares. Os feixes vasculares foram observados circundados por uma bainha de fibras gelatinosas que acompanhavam colateralmente a região do floema.

Nas folhas de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' inoculadas com água observou-se a formação de uma camada de células de cicatrização no ponto de ferimento com a agulha, constituída por três a quatro camadas de células, retangulares, justapostas. Nessa região, observou-se intensa divisão celular, em cuja parede houve deposição, provavelmente, de suberina.

5.4.1.2. Folhas infectadas

A análise por microscopia de luz permitiu identificar diferenças nas alterações anatômicas de duas variedades contrastantes de citros, laranja doce 'Hamlin', menos susceptível à infecção de *Xac* e não hospedeira de *XfaC*, e lima ácida 'Galego', mais suscetível à infecção de *Xac* e susceptível à infecção de *XfaC* (Tabela 3).

Tabela 3 – Intensidade das alterações observadas por microscopia de luz em folhas de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego', decorrentes da infecção com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C estirpes 1632 e 1630.

Alterações observadas	Hamlin			Galego		
	Xac306	XfaC1632	XfaC1630	Xac306	XfaC1632	XfaC1630
Hiperplasia	+	+	+	+++	++	++
Hipertrofia	+	+++	-	+++	++	++
Rompimento da epiderme	-	-	-	+	-	+
Bactérias no esp. intercelular	+	-	-	+++	+	+++
EPS (goma xantana)	+	-	-	++	+	++
Compostos Fenólicos	+	++	+	++	++	++

++++: muito alta; +++: alta; ++: intermediária; +: baixa; -: ausência da alteração.

5.4.1.3. Folhas de laranja ‘Hamlin’ inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630

O limbo foliar de laranja doce ‘Hamlin’ inoculado com Xac306 apresentou aos 5 dai hiperplasia e hipertrofia das células do parênquima lacunoso (Figura 13A). Intensa divisão celular foi observada nas células do parênquima lacunoso próximo à região de inoculação. As células do parênquima paliçádico ainda se encontraram intactas e a estrutura em camadas inalterada. Com o avanço da infecção, houve intensificação de hipertrofia sendo os espaços intercelulares ocupados pelas células hipertrofiadas, no entanto, não se observou rompimento da epiderme. Houve degradação de parede celular, notada pela modificação da coloração da região afetada e adelgaçamento da parede. A camada de cicatrização proeminente, com três a quatro camadas de células, apresentou-se separada da região de células degradadas e suberificadas da região do mesofilo alterada, porém com células vegetais vivas (Figura 13B).

A inoculação com XfaC1632 revelou, no primeiro tempo de coleta, hiperplasia das células do parênquima com menor intensidade em relação a Xac306. As células mais próximas ao local de inoculação sofreram modificações no conteúdo citoplasmático, apresentando vacúolos subdivididos e deposição de uma substância de natureza polissacarídica. As alterações nesse tecido foram concentradas na região mais próxima do ponto de inoculação, sendo possível observar o tecido ainda sadio na região mais afastada do ponto de inoculação (Figura 13C). Aos 20 dai, ainda se observou hiperplasia e, também, intensa hipertrofia celular. O mesofilo, incluindo as células dos feixes vasculares, encontraram-se corados com uma substância de natureza polissacarídica. Observou-se, também, na região de inoculação, a possível suberização do tecido morto (Figura 13D). No interior das células do parênquima paliçádico observou-se o acúmulo de substâncias com aspecto granulado, de coloração esverdeada, provavelmente, compostos fenólicos.

As folhas de laranja doce ‘Hamlin’ inoculadas com XfaC1630 apresentaram no tempo inicial de infecção, hipertrofia e hiperplasia das células parenquimáticas. O citoplasma apresentou muitos vacúolos e apresentou-se denso e com acúmulo de polissacarídeos, incluindo as células dos feixes vasculares. Essas alterações foram

observadas na região mais próxima do local do furo (Figura 13E). Aos 20 dai, observou-se intensa hiperplasia das células, que preencheram os espaços intercelulares. A camada de cicatrização bem espessa, com no mínimo seis camadas de células, foi observada, separando a região, possivelmente suberizada, com células degradadas (Figura 13F).

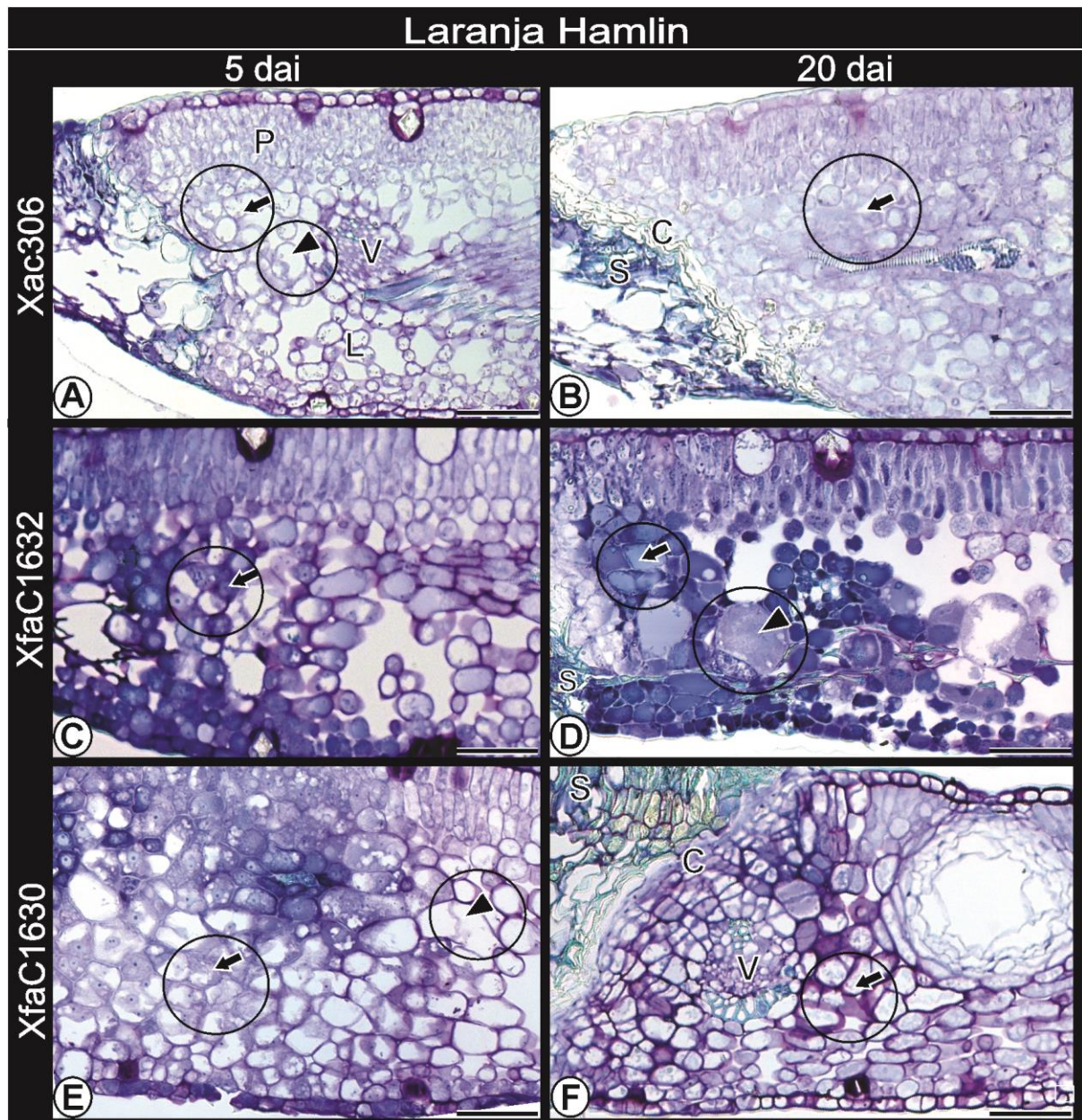


Figura 13 – Microscopia de luz. Folhas de laranja doce ‘Hamlin’ aos 5 e 20 dias após inoculação (dai). Alterações na anatomia decorrentes da infecção com as bactérias Xac306: (A) hiperplasia e hipertrofia das células parenquimáticas, (B) intensificação da hiperplasia e separação do tecido vegetal morto pela camada de cicatrização; XfaC1632: (C) hiperplasia celular e acúmulo de substância, provavelmente, polissacarídeos, no citoplasma, (D)

hiperplasia e intensa hipertrofia celular e células com acúmulo de uma substância de natureza polissacarídica; e XfaC1630: (E) hipertrofia e hiperplasia e células afetadas com vacúolos subdivididos, (F) hiperplasia celular e suberização do tecido no local do furo. P: parênquima paliádico; L: parênquima lacunoso; V: feixes vasculares; C: camada de cicatrização; S: súber; Seta: hiperplasia; Cabeça de seta: hipertrofia. Barra = 50 µm.

5.4.1.4. Folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630

Os cortes transversais de folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com Xac306 apresentaram alterações distintas e mais intensas do que em laranja ‘Hamlin’. Observou-se, aos 5 dai, intensa hiperplasia e hipertrofia das células parenquimáticas em comparação com as folhas de laranja ‘Hamlin’, causando aumento dorsiventral do limbo e rompimento da epiderme, liberando as bactérias para a superfície externa. Os espaços intercelulares foram preenchidos por células degradadas e bactérias. Notou-se, em alguns pontos, o acúmulo de substâncias densas de natureza polissacarídica, que caracterizam a goma formada pela bactéria (Figura 14A).

Em geral, os feixes vasculares permaneceram intactos, mas em locais com muita degradação celular ao redor dos feixes, observou-se a desorganização das fibras gelatinosas e a desestruturação do floema e xilema. As células parenquimáticas encontraram-se com o citoplasma denso e com vacúolos subdivididos. Já aos 20 dai, houve o aumento da região com alterações no limbo foliar, devido a intensificação da hiperplasia e da degradação celular. Os espaços intercelulares encontraram-se preenchidos por goma e bactérias (Figura 14B).

A infecção com XfaC1632, aos 5 dai, induziu hiperplasia e hipertrofia celular com menor intensidade, em comparação às outras estirpes, assim, não se observou aumento dorsiventral do mesofilo. Próximo à região de inoculação, observou-se intensa divisão celular das células parenquimáticas e a presença de goma (Figura 14C). Com o avanço da infecção, observou-se aumento de hiperplasia e hipertrofia e pouco aumento dorsiventral, porém, sem ocasionar rompimento da epiderme. O citoplasma encontrou-se denso e com acúmulos de substâncias granulosas, provavelmente, compostos fenólicos (Figura 14D).

Já a infecção com XfaC1630 induziu hiperplasia aos 5 dai, levando ao rompimento da epiderme devido ao aumento dorsiventral do mesofilo. O citoplasma das células do parênquima encontrou-se denso e com acúmulo de vacúolos e observou-se a presença de goma e de bactérias nos espaços intercelulares (Figura 14E). Aos 20 dai, a hiperplasia tornou-se acentuada, levando ao aumento da espessura do limbo foliar, além disso, observou-se pouca hipertrofia e muitas células degradadas (Figura 14F).

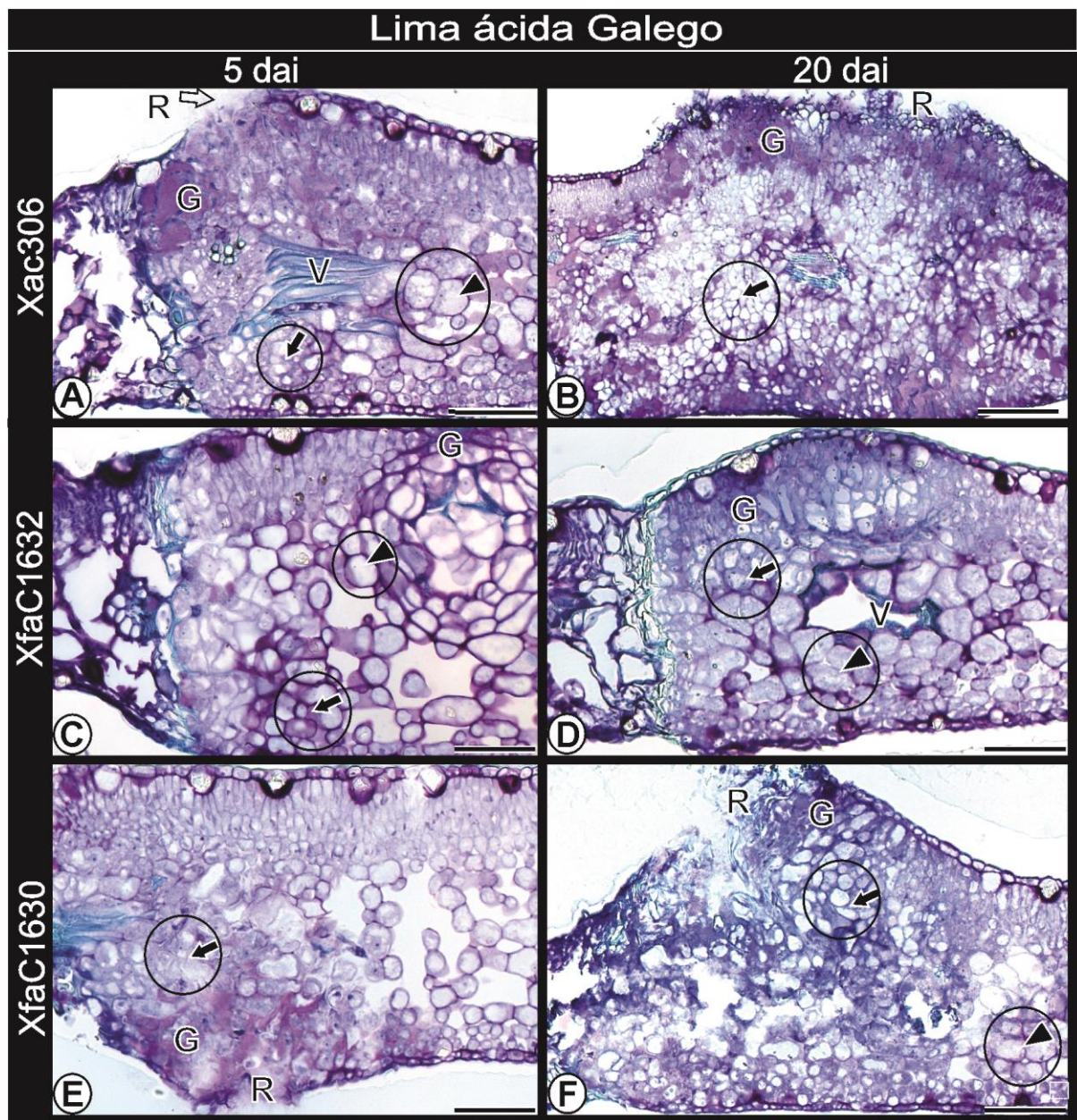


Figura 14 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 5 e 20 dias após inoculação (dai), evidenciando as alterações anatômicas decorrentes da infecção com as bactérias Xac306: (A) intensa hipertrofia e hiperplasia celular e presença de goma e bactérias nos espaços intercelulares, (B) aumento da espessura do limbo foliar devido à hiperplasia celular; XfaC1632: (C) hiperplasia e hipertrofia celular com menor intensidade, (D) leve aumento do limbo foliar e presença de goma nos espaços intercelulares; e XfaC1630: (E) hiperplasia celular e acúmulo de goma e bactérias nos espaços intercelulares, (F) intensificação da hiperplasia e pouca hipertrofia celular. V: feixes vasculares; G: goma xantana; R: área de rompimento da epiderme; Seta: hiperplasia; Cabeça de seta: hipertrofia. Barra = 50 µm.

5.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

5.4.2.1. Folhas sadias

As folhas usadas como controle (sadia e com furo) para a microscopia eletrônica de varredura estão representadas na Figura 15A e 15B, conforme descrição apresentada nos resultados de microscopia de luz.

5.4.2.2. Folhas infectadas

Nas folhas inoculadas com Xac306, observou-se a presença de bactérias na parede das células do parênquima (Figura 16A) e nos espaços intercelulares, envoltas por um denso material fibrilar, provavelmente goma xantana, formando grandes aglomerados com bactérias, que forma o biofilme (Figura 16B). As bactérias colonizaram os estômatos e a superfície foliar externa. Os aspectos observados nas duas variedades de citros, laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’, foram semelhantes entre si, nos dois tempos de coleta.

Nas folhas de laranja ‘Hamlin’ inoculadas com XfaC1632 e XfaC1630, observou-se bactérias somente na superfície foliar externa e nos estômatos, não sendo observado bactérias nos espaços intercelulares (Figuras 16C e 16E). Já em folhas de lima ácida ‘Galego’ inoculadas com as mesmas bactérias, em ambos os tempos de coleta, foram visualizadas bactérias colonizando os espaços

intercelulares, envoltas em goma (Figuras 16D e 16F). Também se observou bactérias colonizando os estômatos e a superfície foliar externa.

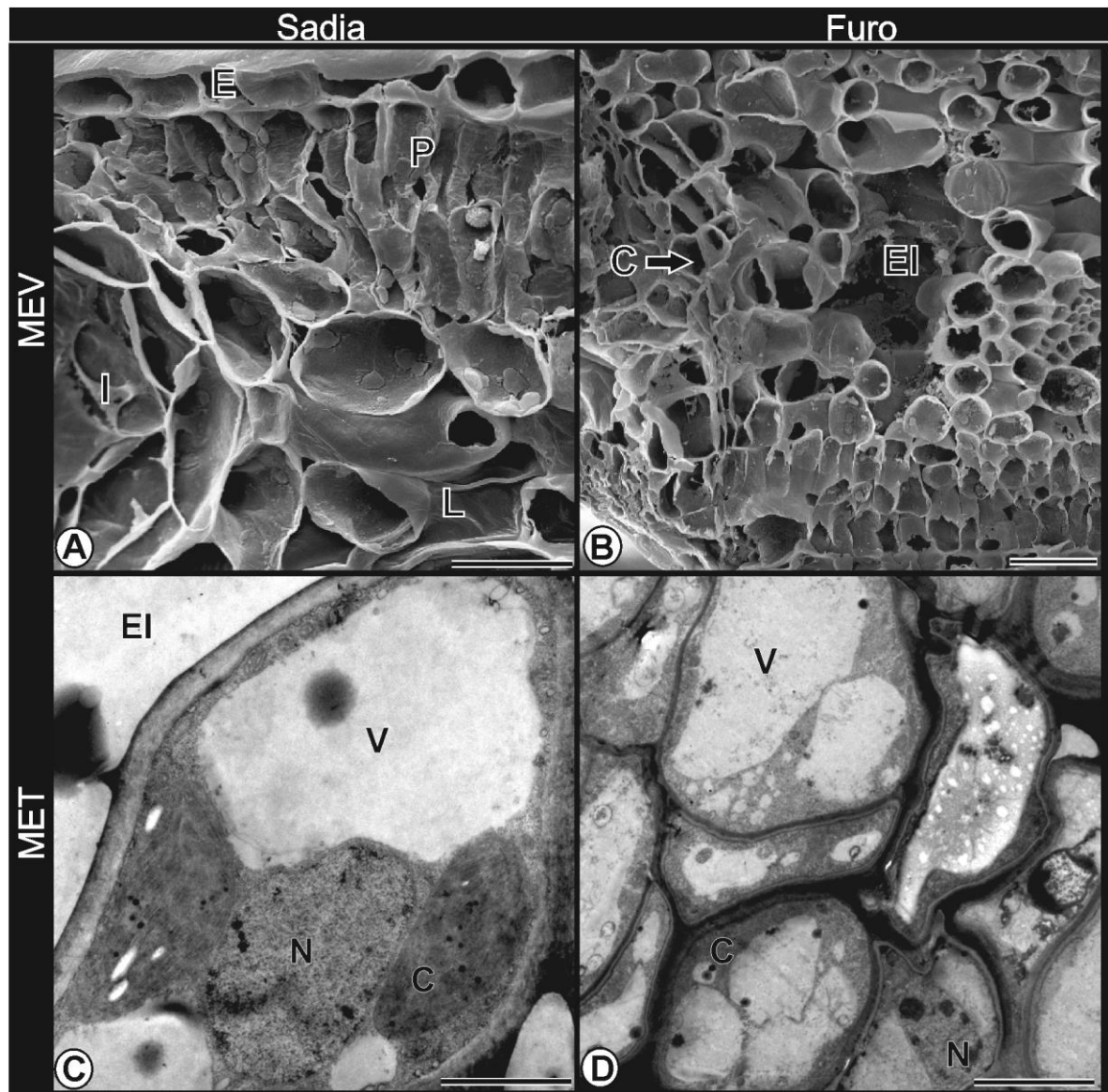


Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Folhas sadias de laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ usadas como controle: (A) mesofilo com características padrão da folha de citros. Barra = 20 μ m. (B) mesofilo evidenciando camada celular de cicatrização. Barra = 25 μ m. (C) aspecto normal de uma célula vegetal. Barra = 2 μ m. (D) células vegetais evidenciando vacúolos subdivididos. E: epiderme; P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; I: idioblastos; C: camada de cicatrização; EI: espaço intercelular; N: núcleo; C: cloroplasto; V: vacúolo.

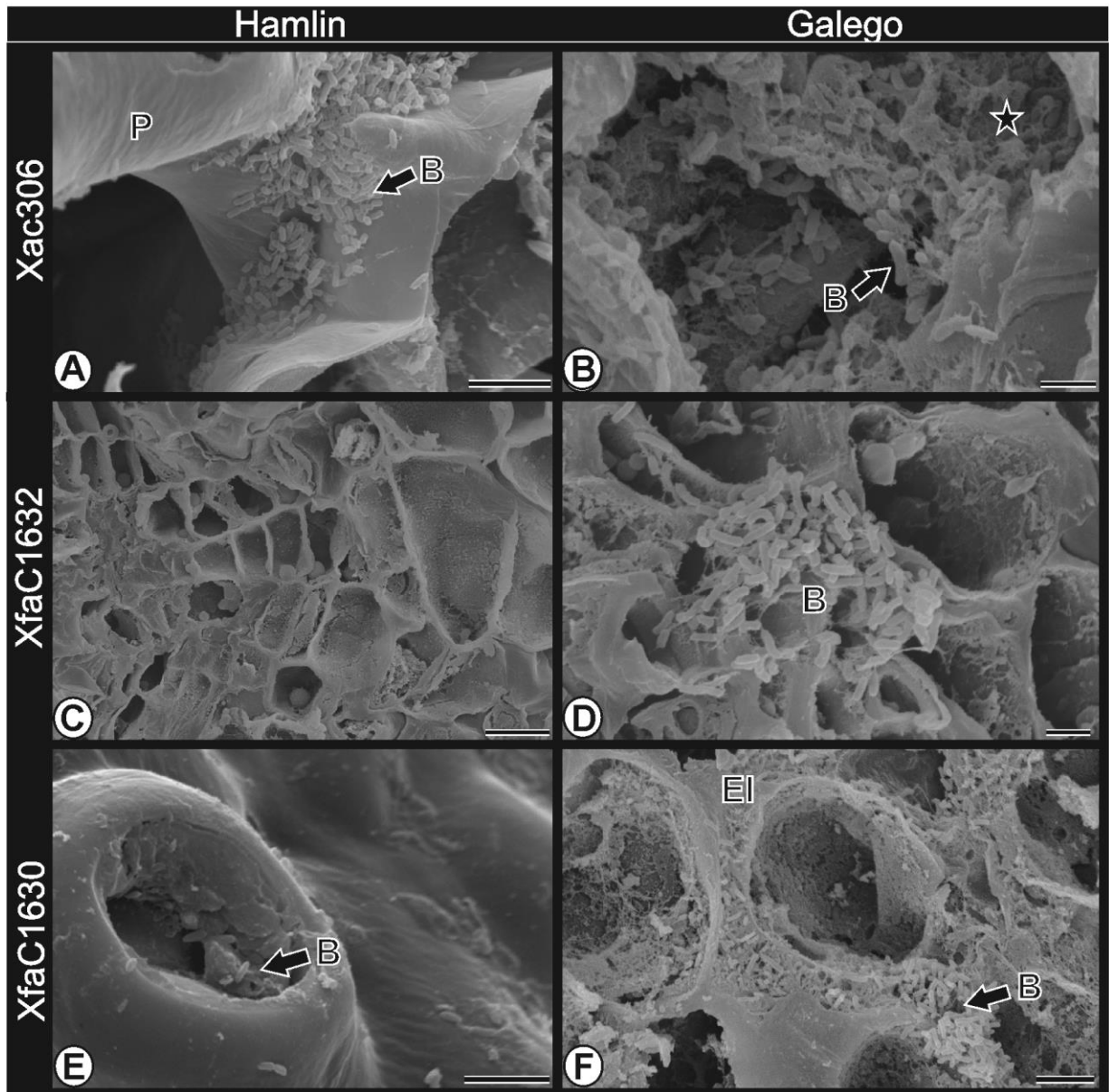


Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura. Folhas de laranja ‘Hamlin’ e lima ácida ‘Galego’ inoculadas com Xac306: (A) bactérias aderidas à parede celular do hospedeiro. Barra = 2 μ m. (B) bactérias envoltas em goma xantana. Barra= 10 μ m; XfaC1632: (C) mesofilo com ausência de bactérias. Barra = 10 μ m. (D) bactérias envoltas em goma, formando aglomerados. Barra = 10 μ m; e XfaC1630: (E) bactérias colonizando um estômato. Barra = 5 μ m. (F) bactérias preenchendo o espaço intercelular. Barra = 5 μ m. B: bactérias; EI: espaço intercelular; Estrela: goma xantana.

5.4.3. Microscopia eletrônica de transmissão

5.4.3.1. Folhas sadias

As folhas controle de laranja 'Hamlin' e de lima ácida 'Galego' apresentaram células com as características típicas de células saudáveis, como núcleo íntegro, organelas estruturadas e espaços intercelulares vazios (Figura 15C). Já as células vegetais das folhas perfuradas com agulha, apresentaram vacúolos subdivididos e acúmulo de substâncias com aspecto granuloso, provavelmente, em resposta à injúria causada pelo furo (Figura 15D).

5.4.3.2. Folhas de laranja doce 'Hamlin' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630

A análise dos cortes transversais de folhas de laranja 'Hamlin' inoculadas com Xac306 aos 5 dai revelou alterações celulares em relação às folhas sadias. O conteúdo citoplasmático apresentou-se eletrondenso, o núcleo hipertrofiado e organelas, como cloroplasto, mitocôndrias e retículo endoplasmático, desestruturadas. A degradação das paredes celulares foi observada em locais com presença abundante de bactérias. A degradação celular levou ao aumento dos espaços intercelulares e, por consequência, aumento da área colonizada por bactérias. As bactérias foram observadas colonizando os espaços intercelulares e imersas em um material fibrilar e eletrondenso, provavelmente goma xantana, formando aglomerados com bactérias (Figura 17A). Não foram observadas bactérias nos feixes vasculares, no entanto, células vizinhas às células do floema foram degradadas e colonizadas por bactérias. As bactérias aparentaram estar metabolicamente ativas, pelas características intracelulares observadas.

No segundo tempo de infecção, aos 20 dai, as bactérias aparentaram estar degeneradas, pois o citoplasma bacteriano encontrou-se desorganizado e as bactérias com perda do formato característico (Figura 17B). Observou-se aumento dos espaços intercelulares devido à degradação celular e as células vivas

apresentaram paredes mais espessadas e eletrondensas, além de vacúolos com acúmulo de substâncias resultantes da degradação celular.

As alterações observadas em folhas de laranja doce 'Hamlin' inoculadas com as estirpes XfaC1632 e XfaC1630, foram características de reação de hipersensibilidade (HR). Nas folhas inoculadas com a estirpe XfaC1632, a membrana plasmática foi vista em processo de degeneração, assim como a desorganização e consequente degeneração generalizada de organelas, como mitocôndrias e cloroplastos. O núcleo foi, inicialmente, encontrado hipertrofiado (Figura 18A e 18C). Os vacúolos foram observados contendo substância de aspecto granular e eletrondenso, prováveis compostos resultante de oxidação das substâncias acumuladas no vacúolo e os espaços intercelulares apresentaram-se vazios, ausentes de bactérias e de goma (Figura 17C, 17D, 18B). Células parenquimáticas foram vistas degeneradas, com vacúolos subdivididos (Figura 18C e 18D).

Nas folhas inoculadas com XfaC1630, observaram-se as mesmas características descritas acima. Foi possível observar a degeneração do citoplasma e de organelas nas células parenquimáticas. Dentro dos vacúolos notou-se a presença de substância de aspecto granular e eletrondenso, provavelmente, resultado de oxidação das substâncias acumuladas no vacúolo (Figura 17E, 17F, 19A e 19D). As mesmas características foram visualizadas na epiderme, visto pela câmara subestomática, indicando que a resposta de HR estendeu-se para além de células infectadas (Figura 19C). Observou-se, em um único local, a presença de bactérias degeneradas, imersas em goma xantana, com aspecto fibrilar e eletrondenso, formando um envoltório ao redor das bactérias (Figura 19B). Em geral, os espaços intercelulares encontraram-se ausentes de bactérias (Figura 17F), contudo, observou-se o acúmulo de uma substância eletrondensa nos espaços intercelulares, provavelmente, compostos fenólicos (Figura 19A e 19D).

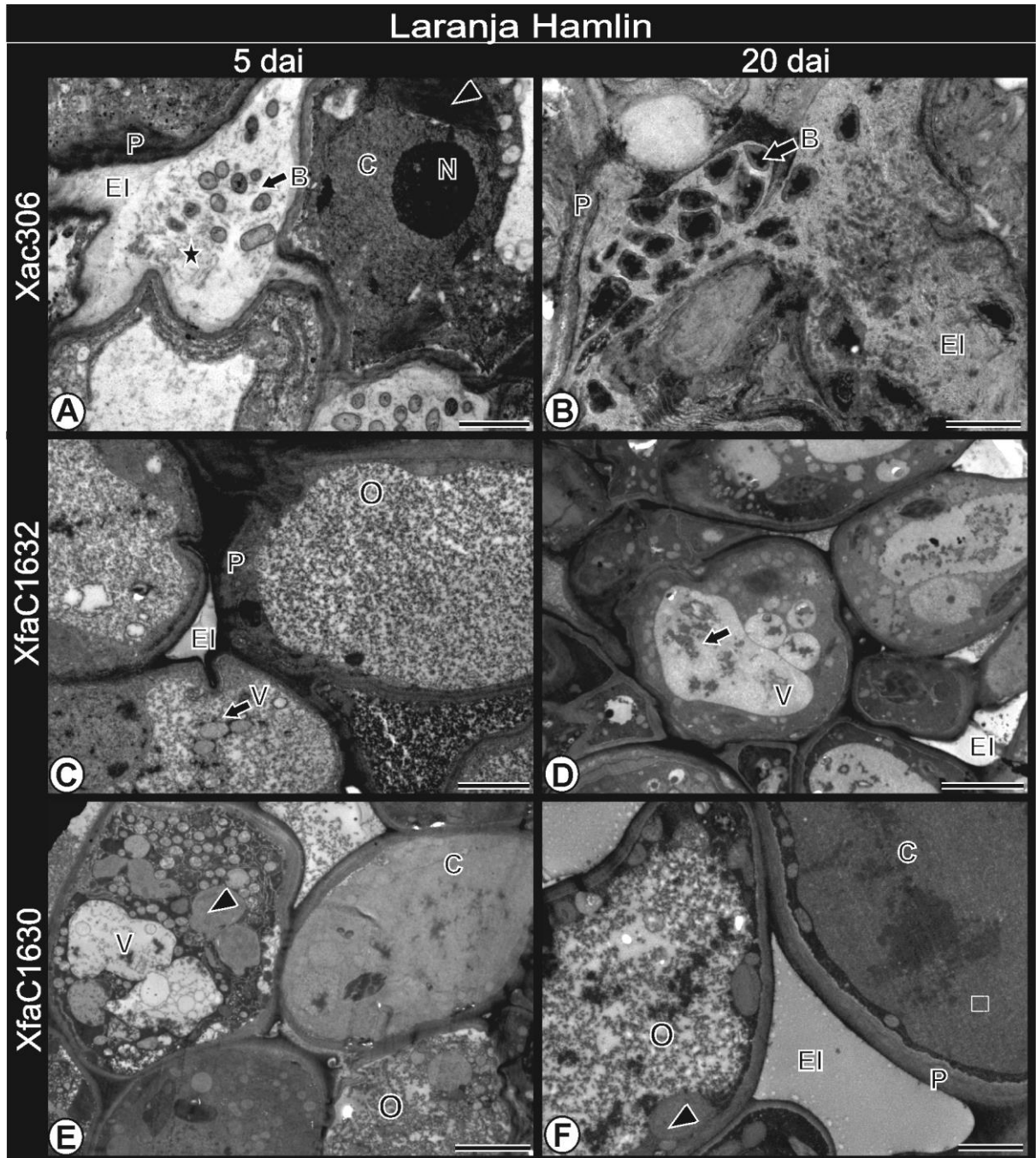


Figura 17 – Microscopia eletrônica de transmissão. Folhas de laranja ‘Hamlin’ aos 5 e 20 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) bactérias preenchendo os espaços intercelulares envoltas em goma; núcleo hipertrofiado e citoplasma degradado. Barra = 2 μ m. (B) bactérias degeneradas no espaço intercelular. Barra = 1 μ m; XfaC1632: (C) células com citoplasma e organelas degradadas e vacúolo com resíduos de provável oxidação. Barra = 2 μ m. (D) espaços intercelulares sem bactérias e vacúolos com substâncias de aspecto granuloso. Barra = 5 μ m; e XfaC1630: (E) citoplasma eletrondenso e degradado com muitos vacúolos subdivididos. Barra = 4 μ m. (F) espaços intercelulares vazios,

citoplasma degenerado. Barra = 2 μm . B: bactérias; EI: espaço intercelular; P: parede celular; C: citoplasma; N: núcleo; O: oxidação; V: vacúolo; Estrela: goma; Cabeça de seta: cloroplasto.

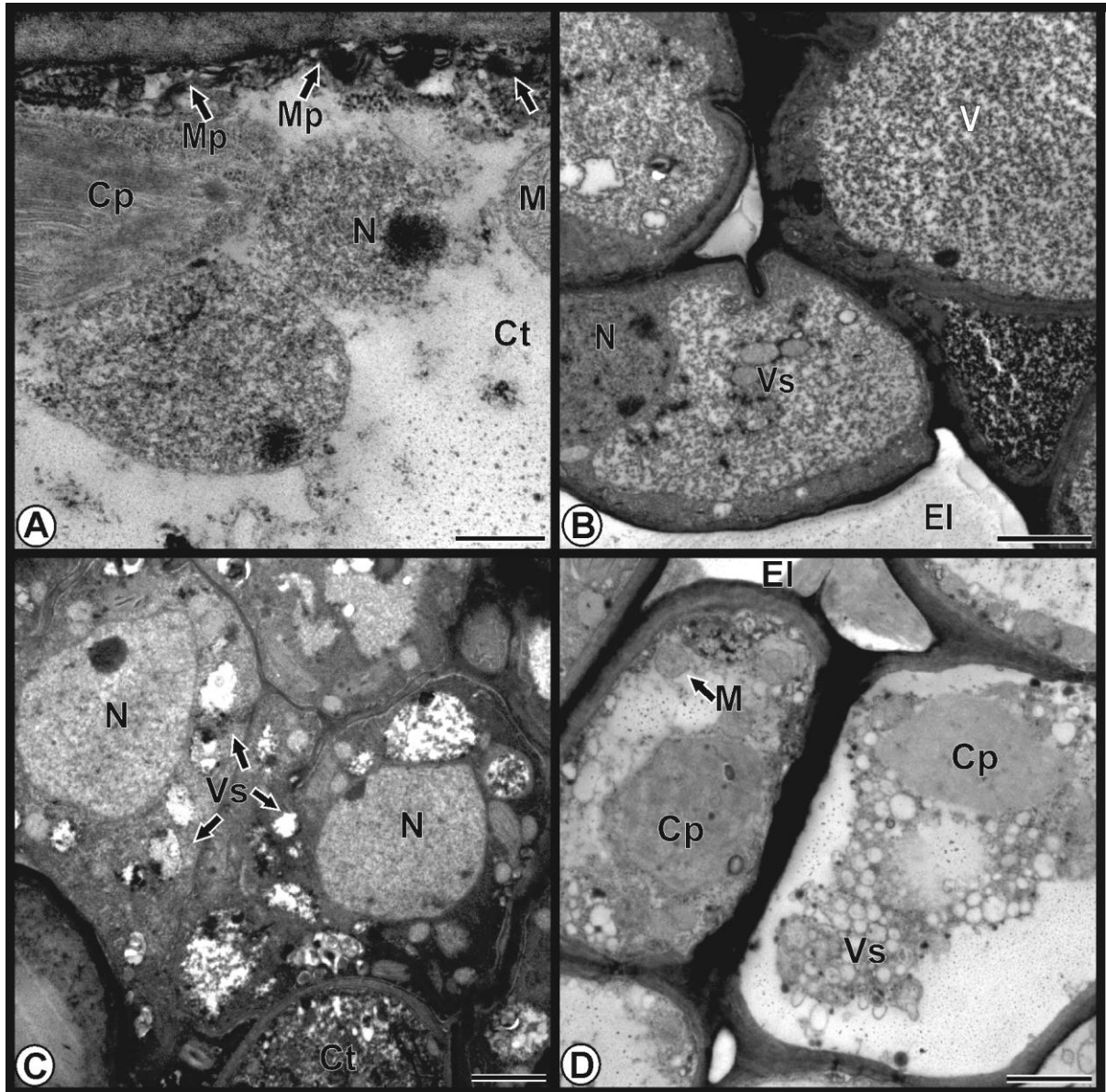


Figura 18 - Microscopia eletrônica de transmissão. Reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de laranja doce 'Hamlin' inoculadas com XfaC1632: (A) Desestabilização da membrana plasmática, cloroplasto, mitocôndrias e núcleo celular degenerados. Barra = 0,4 μm . (B) Células parenquimáticas com núcleo degenerado e vacúolos com substância com aspecto granular e espaços intercelulares vazios. Barra = 2 μm . (C) Células parenquimáticas com organelas degeneradas, subdivisão do vacúolo e núcleos hipertrofiados. Barra = 2 μm . (D) Células parenquimáticas degeneradas e com vacúolos subdivididos, organelas

degeneradas e espaço intercelular vazio. Barra = 2 μm . Mp: membrana plasmática; V: vacúolo; M: mitocôndria; Cp: cloroplasto; Ct: citoplasma; N: núcleo; Vs: vacúolo subdividido; EI: espaço intercelular.

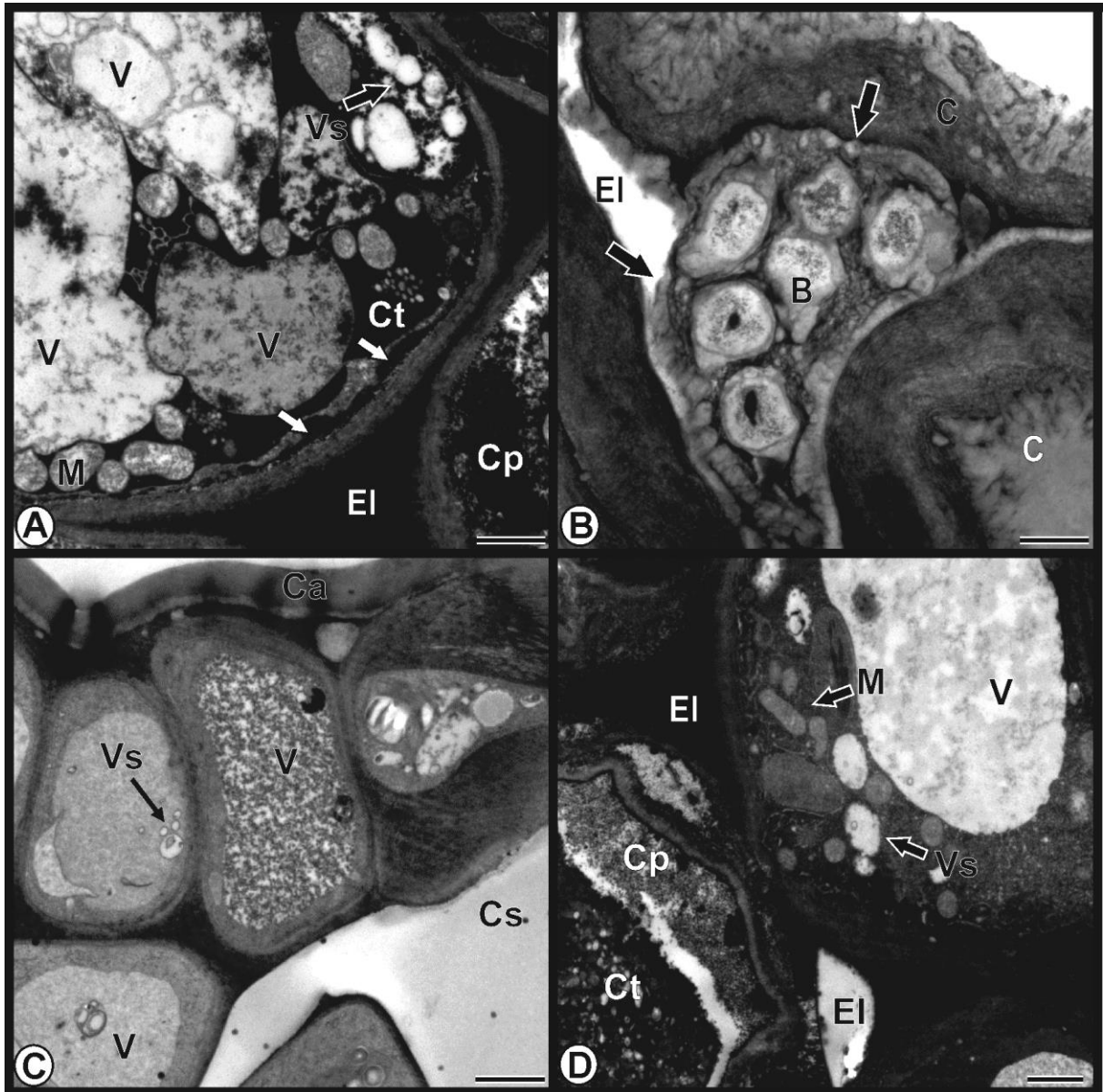


Figura 19 - Microscopia eletrônica de transmissão. Reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de laranja doce 'Hamlin' inoculadas com XfaC1630: (A) Célula parenquimáticas com mitocôndria e cloroplasto degenerados, subdivisão do vacúolo, desestabilização da membrana plasmática (setas brancas) e presença de substância eletrondensa nos espaços intercelulares. Barra = 1 μm . (B) Bactérias, provavelmente, mortas, envoltas por goma xantana no espaço intercelular e circundadas por células degeneradas. Barra = 0,5 μm . (C) Células da epiderme, mostrando câmara subestomática, subdivisão do vacúolo e a

presença de substâncias de aspecto granular no seu interior. Barra = 2 μm . (D) Células parenquimáticas com citoplasma e organelas degeneradas, subdivisão do vacúolo e espaços intercelulares vazios com substância eletrondensa. Barra = 1 μm . V: vacúolo; M: mitocôndria; Cp: cloroplasto; Ct: citoplasma; Vs: vacúolo subdividido; B: bactéria; C: célula; El: espaço intercelular; Ca: cutícula; Cs: câmara subestomática.

5.4.3.3. Folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630

As alterações observadas nos cortes transversais de folhas de lima ácida 'Galego' inoculadas com Xac306, XfaC1632 e XfaC1630 foram semelhantes a descrição da infecção de Xac306 em 'Hamlin'. Observou-se intensa degradação de parede celular pelas bactérias, colonização dos espaços intercelulares com bactérias envoltas em goma xantana e citoplasma eletrondenso (Figuras 20A, 20C e 20E). Já aos 20 dai, grande parte das bactérias observadas encontraram-se degeneradas e, aparentemente, imobilizadas em goma, que se apresentou mais eletrondensa (Figuras 20B, 20D e 20F).

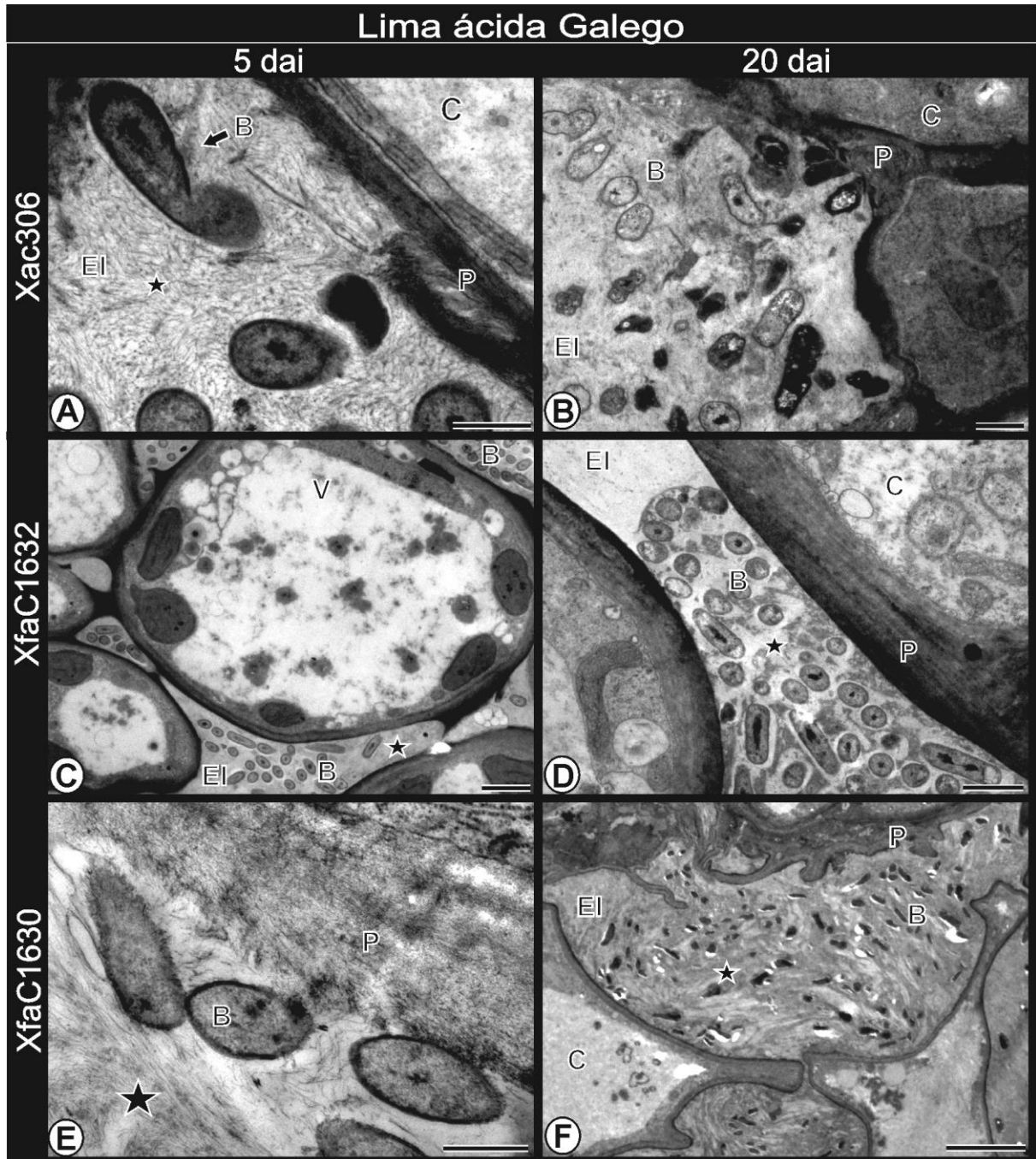


Figura 20 – Microscopia eletrônica de transmissão. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 5 e 20 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) bactérias envoltas em goma e degradação da parede celular. Barra = 0,5 μm . (B) bactérias vivas e degeneradas envoltas em goma com aspecto granular nos espaços intercelulares. Barra = 1 μm ; XfaC1632: (C) vacúolos com substância de aspecto granuloso e bactérias no espaço intercelular. Barra = 2 μm . (D) bactérias em aglomerados, envoltas em goma. Barra = 1 μm ; e XfaC1630: (E) bactérias envoltas em goma e degradação da parede celular. Barra = 0,5 μm . (F) bactérias vivas e degeneradas envoltas em goma com aspecto granular nos espaços intercelulares.

Barra = 4 μ m. B: bactérias; EI: espaço intercelular; P: parede celular; C: citoplasma; V: vacúolo; Estrela: goma xantana.

5.5. Análise comparativa da infecção de diferentes estirpes de *Xanthomonas* em lima ácida ‘Galego’ por técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e de transmissão

O processo de infecção causado por cinco estirpes de *Xanthomonas* patogênicas a citros, inoculadas em folhas de lima ácida ‘Galego’, foi avaliado por diferentes técnicas de microscopia aos 40, 70 e 120 dias após a inoculação (dai).

5.5.1. Microscopia de luz

5.5.1.1. Folhas inoculadas com Xac306

O limbo foliar inoculado com Xac306 apresentou, aos 40 dai, hiperplasia e hipertrofia das células do parênquima lacunoso e espessamento do limbo foliar. As bactérias colonizaram todo o mesofilo e em vários locais, observou-se a presença de goma preenchendo os espaços intercelulares e as células rompidas (Figura 21A). As células do parênquima paliçádico adjacente às células coletoras foram danificadas pela ação das bactérias, no entanto, a camada de células adjacente à epiderme ainda não revelou danos no primeiro tempo de coleta. Foi observada a presença de prováveis compostos fenólicos, acumulados no interior de células ainda vivas (Figura 21A). Aos 70 dai, houve intensificação da hiperplasia e hipertrofia e espessamento do limbo foliar, levando ao rompimento da epiderme (Figura 21B). Observou-se o aumento de espaços vazios devido a intensa degradação de células, além de presença abundante de bactérias e goma nos espaços intercelulares (Figura 22B). As folhas desse tratamento tiveram abscisão antes de 120 dai.

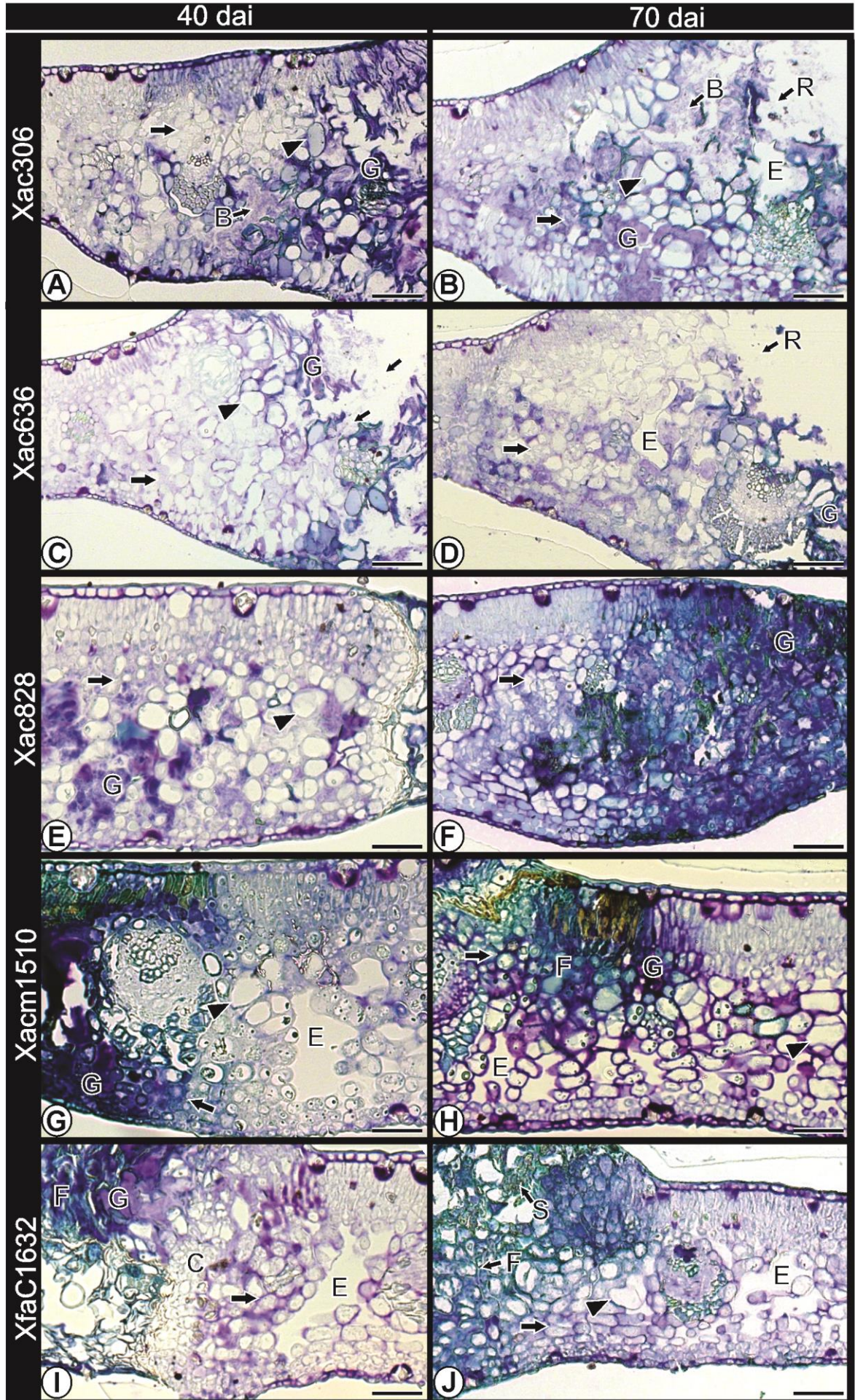


Figura 21 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 40 e 70 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) hiperplasia e hipertrofia celular e presença de bactérias e goma xantana nos espaços intercelulares. (B) hiperplasia e hipertrofia celular, espessamento do limbo foliar e rompimento da epiderme; Xac636: (C) hiperplasia e hipertrofia celular que levaram ao espessamento do limbo foliar e rompimento da epiderme, além da presença de goma nos espaços intercelulares. (D) hiperplasia celular; Xac828: (E) hiperplasia e hipertrofia celular e presença de bactérias e goma xantana nos espaços intercelulares. (F) hiperplasia celular e a presença acentuada de goma; Xacm1510: (G) intensa hiperplasia, pouca hipertrofia celular e presença de goma nos espaços intercelulares. (H) espaços intercelulares vazios e prováveis compostos fenólicos acumulados no interior das células parenquimáticas; XfaC1632: (I) hiperplasia celular, presença de goma e bactéria nos espaços intercelulares e prováveis compostos fenólicos na região do furo. (J) hiperplasia e hipertrofia, espaços intercelulares vazios e suberização do tecido na região do furo. B: bactérias; G: goma xantana; R: rompimento da epiderme; E: espaço intercelular; C: camada de cicatrização; F: compostos fenólicos; Seta: hiperplasia; Cabeça de seta: hipertrofia. Barra = 50 μ m.

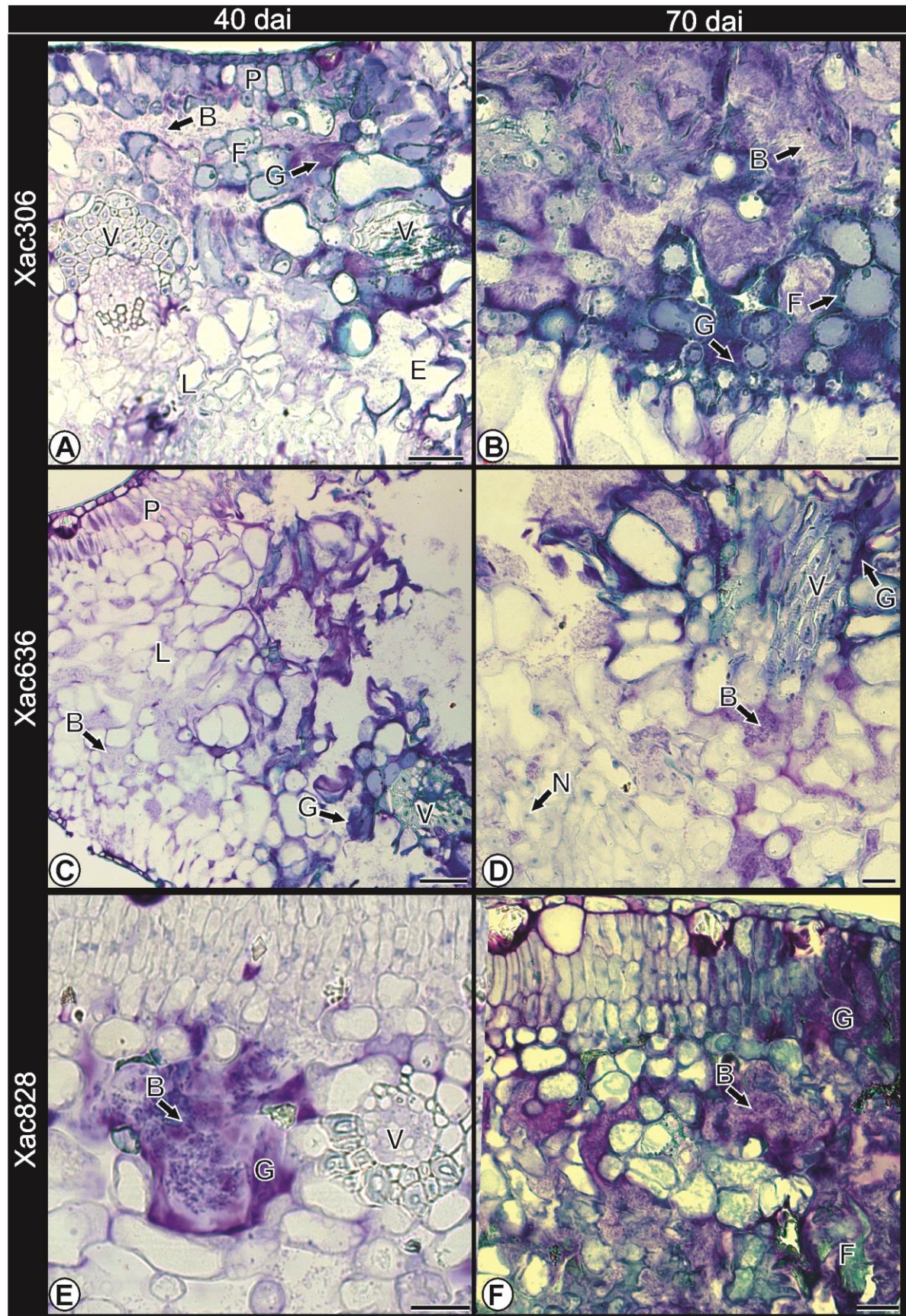


Figura 22 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 40 e 70 dias após inoculação (dai), inoculadas com Xac306: (A) e (B) bactérias e goma nos espaços intercelulares e prováveis compostos fenólicos na parede e citoplasma de algumas células. Barra = 50 μm e 20 μm , respectivamente; Xac636: (C) degradação de células do parênquima lacunoso e células intactas no parênquima paliçádico. Barra = 20 μm . (D) bactérias e goma nos espaços intercelulares e degradação de células ao redor dos feixes vasculares. Barra = 20 μm ; Xac828: (E) bactérias e goma nos espaços intercelulares. Barra = 50 μm . (F) acúmulo de prováveis compostos fenólicos no citoplasma celular. Barra = 20 μm . P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; B: bactéria; E: espaço intercelular; G: goma xantana; F: compostos fenólicos; N: núcleo; V: feixes vasculares.

5.5.1.2. Folhas inoculadas com Xac636

As secções transversais do limbo foliar inoculado com Xac636 revelaram que no primeiro tempo de coleta, houve espessamento do limbo foliar devido à hipertrofia e hiperplasia. Observou-se, também, a presença de goma nos espaços intercelulares (Figura 21C). Houve degradação das células do parênquima lacunoso, enquanto que o parênquima paliçádico foi menos afetado, apresentando camadas de células não degradadas (Figura 22C), visto pelo núcleo periférico de células do parênquima lacunoso (Figura 22D). Aparentemente, a capacidade de degradação de Xac636 foi menor comparada com Xac306. Aos 70 dai, observou-se intensa hiperplasia das células do parênquima lacunoso e presença de bactérias nos espaços intercelulares (Figura 21D), além da degradação de células ao redor dos feixes vasculares. Em todos os tempos de coleta, observou-se a presença de goma e bactérias no tecido parenquimático.

5.5.1.3. Folhas inoculadas com Xac828

O limbo foliar de lima ácida ‘Galego’ inoculado com Xac828 apresentou, aos 40 dai, hipertrofia e intensa hiperplasia, apesar dessas alterações, não se observou espessamento do limbo foliar e rompimento da epiderme (Figura 21E). Foi observada a presença de bactérias nos espaços intercelulares, envoltas em goma (Figura 22E). Já aos 70 e 120 dai, observou-se acentuada presença de goma e de

bactérias nos espaços intercelulares (Figura 21F). Notou-se que a degradação do parênquima lacunoso atingiu os feixes vasculares e dentro das células desse parênquima ocorreu a deposição de substâncias, provavelmente compostos fenólicos, tal fato pode ser observado conforme indicação na Figura 22F.

5.5.1.4. Folhas inoculadas com Xacm1510

A análise do limbo foliar inoculado com Xacm1510 mostrou pouca hipertrofia e hiperplasia e ausência do rompimento da epiderme (Figura 21G). Observou-se acúmulo de goma e a presença de bactérias nos espaços intercelulares, além da degradação celular e o acúmulo de substâncias, prováveis compostos fenólicos (Figura 23A). Com o avanço da infecção, observou-se hiperplasia mais intensa (Figura 23B) e espaços intercelulares vazios, sem bactérias e goma, diferentemente das demais estirpes (Figura 21H).

5.5.1.5. Folhas inoculadas com XfaC1632

A inoculação com XfaC1632 induziu a formação de uma camada de cicatrização bem definida, com no mínimo 5 camadas de células. A intensa hiperplasia do parênquima levou ao espessamento do limbo foliar, acarretando no rompimento da epiderme (Figura 21I). Observou-se goma e bactérias nos espaços intercelulares e dentro de células rompidas (Figura 23C). Assim como observado na inoculação com Xacm1510, observou-se espaços intercelulares sem a presença de bactérias e de goma (Figura 21J). A infecção com XfaC1632 induziu a produção de substâncias, provavelmente compostos fenólicos, e a suberização do tecido, que constitui a coloração parda, observada macroscopicamente nos sintomas (Figura 21J). Observou-se, também, o aumento dos espaços intercelulares devido ao rompimento das células degradadas do parênquima (Figura 23D).

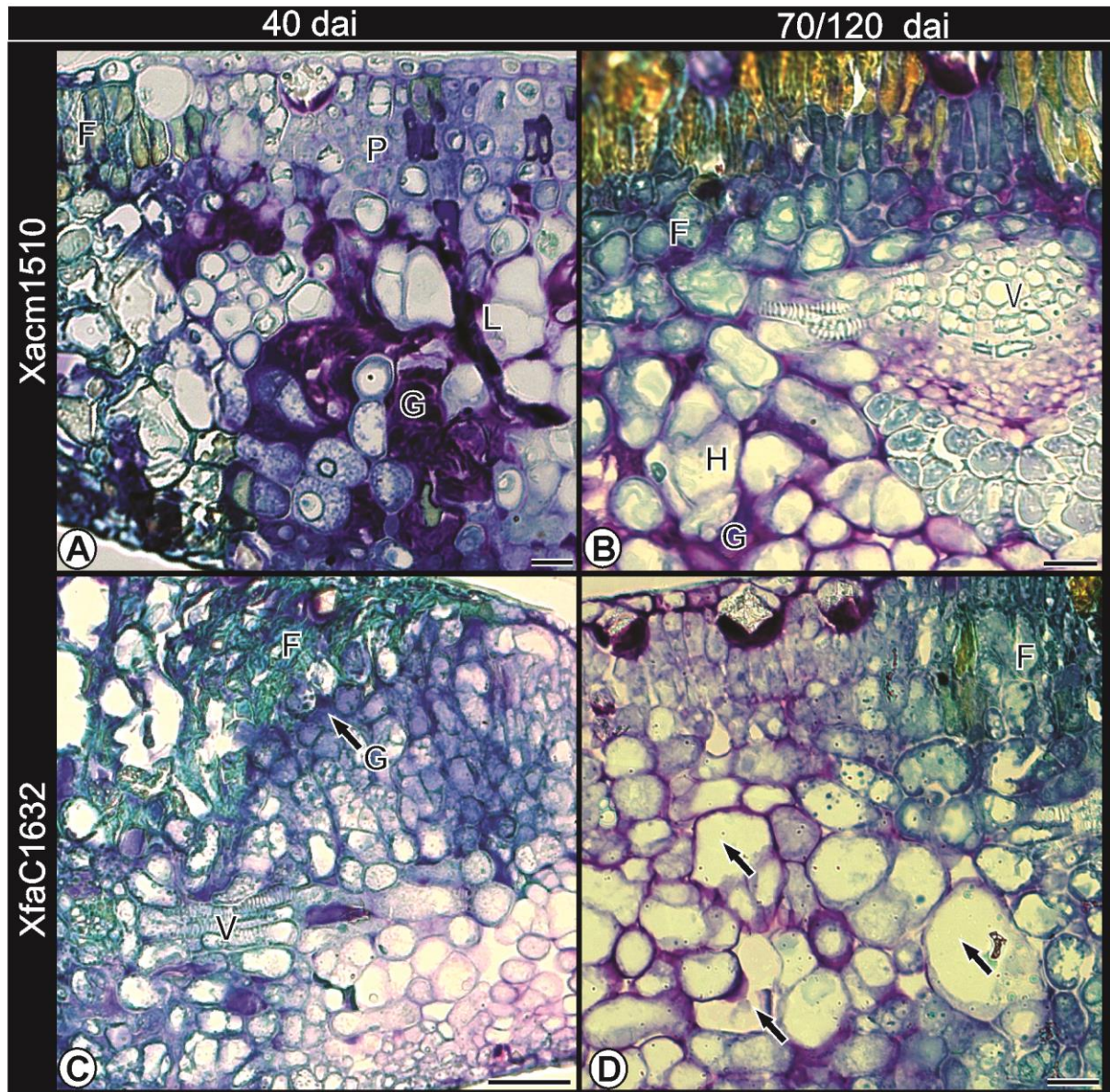


Figura 23 – Microscopia de luz. Folhas de lima ácida ‘Galego’ aos 40 dai, 70 e 120 dai, inoculadas com Xacm1510: (A) bactérias e goma nos espaços intercelulares. Barra = 20 μ m. (B) hipertrofia celular e acúmulo, provavelmente, de compostos fenólicos no citoplasma das células do parênquima. Barra = 20 μ m; XfaC1632: (C) presença de goma nos espaços intercelulares e em células degradadas. Barra = 50 μ m. (D) aumento dos espaços intercelulares devido ao rompimento das células do parênquima. Barra = 50 μ m. P: parênquima paliçádico; L: parênquima lacunoso; G: goma xantana; F: compostos fenólicos; V: feixes vasculares; H: hipertrofia; Seta: espaços intercelulares.

O tecido vegetal sofreu modificações na sua anatomia decorrentes da infecção com as diferentes espécies de *Xanthomonas*. Em nível de comparação, foi

possível observar alguns aspectos comuns a todos os tratamentos, com diferentes intensidades, mostrados na Tabela 4 e descritos anteriormente para cada tratamento.

Tabela 4 – Intensidade dos aspectos observados por microscopia de luz em folhas de lima ácida ‘Galego’ decorrentes da infecção com as estirpes de *Xanthomonas*.

Aspectos observados	Estirpes				
	Xac306	Xac636	Xac828	Xacm1510	XfaC1632
Hiperplasia	+++	+++	+++	-	+++
Hipertrofia	+++	+++	+	-	+
Rompimento da epiderme	+++	+++	-	-	+++
Bactérias no espaço intercelular	+++	++	++	+	+
Biofilme	++	+	+++	+++	+
Compostos Fenólicos	++	+	+++	+++	+++

++++: muito alta; +++: alta; ++: intermediária; +: baixa; -: ausência da alteração.

5.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

A análise das amostras em microscópio eletrônico de varredura revelou aspectos em comum para todas as estirpes estudadas: Xac306, Xac636, Xac828, Xacm1510 e XfaC1632. Observou-se, em todos os tratamentos, presença de bactérias nos estômatos e na superfície externa do tecido vegetal (Figura 24A). No mesofilo, foram encontradas bactérias aderidas à parede celular e envoltas em um material fibrilar eletrondenso, provavelmente goma, preenchendo os espaços intercelulares (Figura 24B). Visualizou-se bactérias dentro de células rompidas (Figura 24C) e aglomerados de bactérias envoltos em goma, em vários locais do mesofilo (Figuras 24D e 24F). Em tempos de coleta mais avançados, aos 70 e aos 120 dai, as bactérias aparentaram estar imobilizadas na malha fibrilar (Figura 24E).

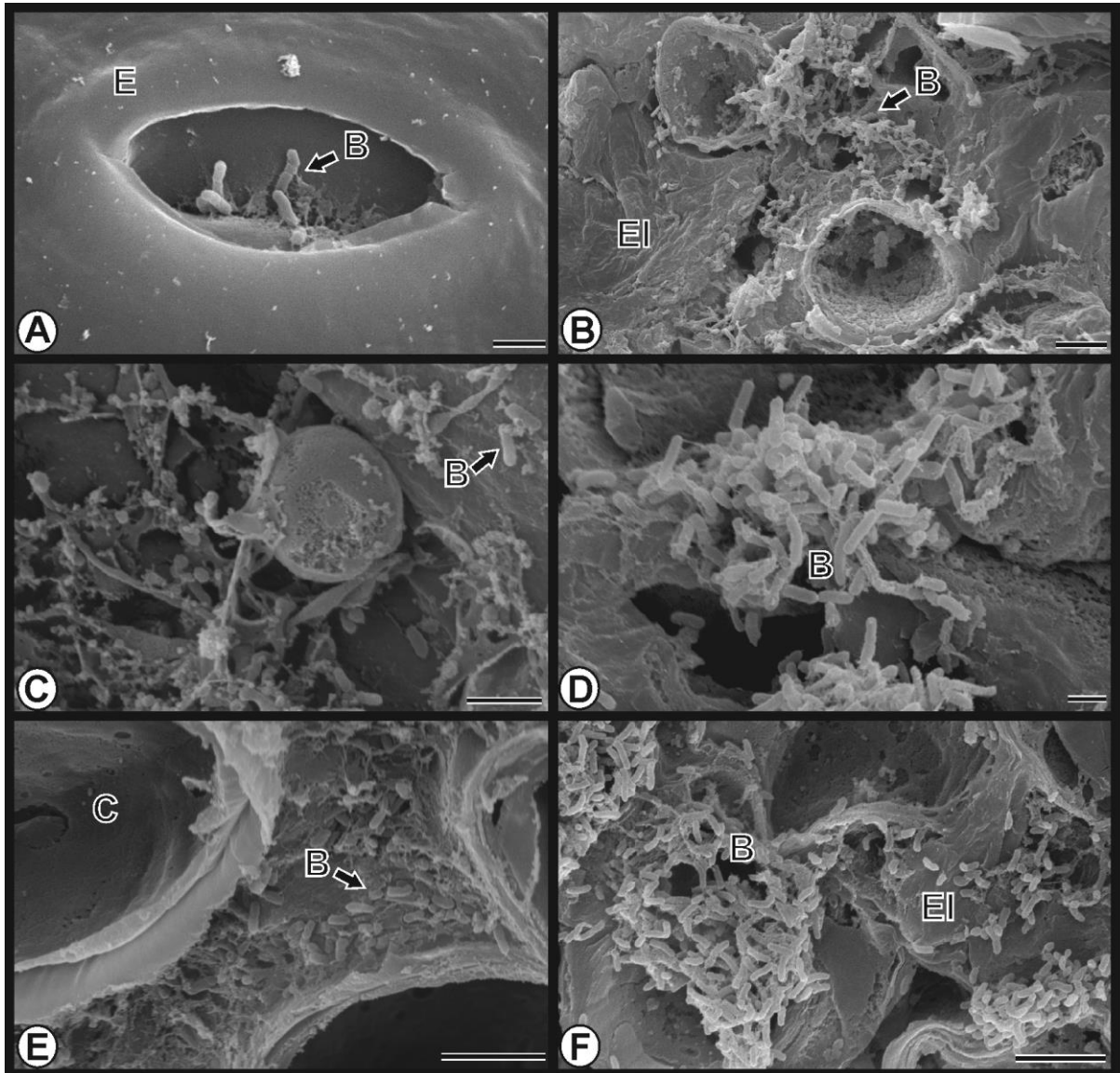


Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura de folhas de lima ácida ‘Galego’, inoculadas com Xac306: (A) bactérias colonizando os estômatos. Barra= 2 μ m; (B) bactérias aderidas à parede celular e envoltas em goma xantana. Barra = 5 μ m; Xac636: (C) bactérias dentro de uma célula rompida. Barra = 2 μ m; Xac828: (D) bactérias formando aglomerados, envoltas em goma. Barra = 1 μ m; Xacm1510: (E) bactérias aparentemente imobilizadas em goma xantana. Barra = 4 μ m; XfaC1632: (F) bactérias preenchendo os espaços intercelulares. Barra = 5 μ m. B: bactérias; E: estômato; EI: espaço intercelular; C: célula.

5.5.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Nos cortes transversais de folhas de lima ácida ‘Galego’ infectadas, a degradação celular, resultante da infecção com todas as estirpes, foi observada pelo

conteúdo citoplasmático degenerado e pela desestruturação de organelas, como cloroplastos, retículo endoplasmático e mitocôndrias (Figura 25A). Observou-se, também, o rompimento celular, o consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático e a invasão de bactérias no seu interior (Figura 25B). A análise dos cortes revelou a degradação da parede celular secundária, em locais onde a bactéria estava presente, levando ao afinamento da parede (Figura 25C).

As bactérias aparentaram estar metabolicamente ativas, porque foi possível observar a multiplicação por fissão binária e o material genético enovelado no citoplasma bacteriano (Figura 25D). No entanto, para as estirpes Xac828, Xacm1510 e XfaC1632, mesmo nos primeiros tempos de coleta, a maioria das bactérias observadas preenchendo o espaço intercelular encontravam-se degeneradas ou mortas, visto seu citoplasma degenerado e a perda do seu formato característico (Figura 25D).

Nos cortes com Xacm1510, observou-se muitos vacúolos subdivididos dentro das células e muitos vacúolos nos espaços intercelulares, provenientes de células rompidas (Figura 25E). Os cortes dos tempos de infecção mais avançados revelaram que a goma que preenchia o espaço intercelular apresentou-se com aspecto granular e houve retração da mesma em torno das bactérias, formando uma espécie de envoltório ao redor das bactérias (Figura 25F).

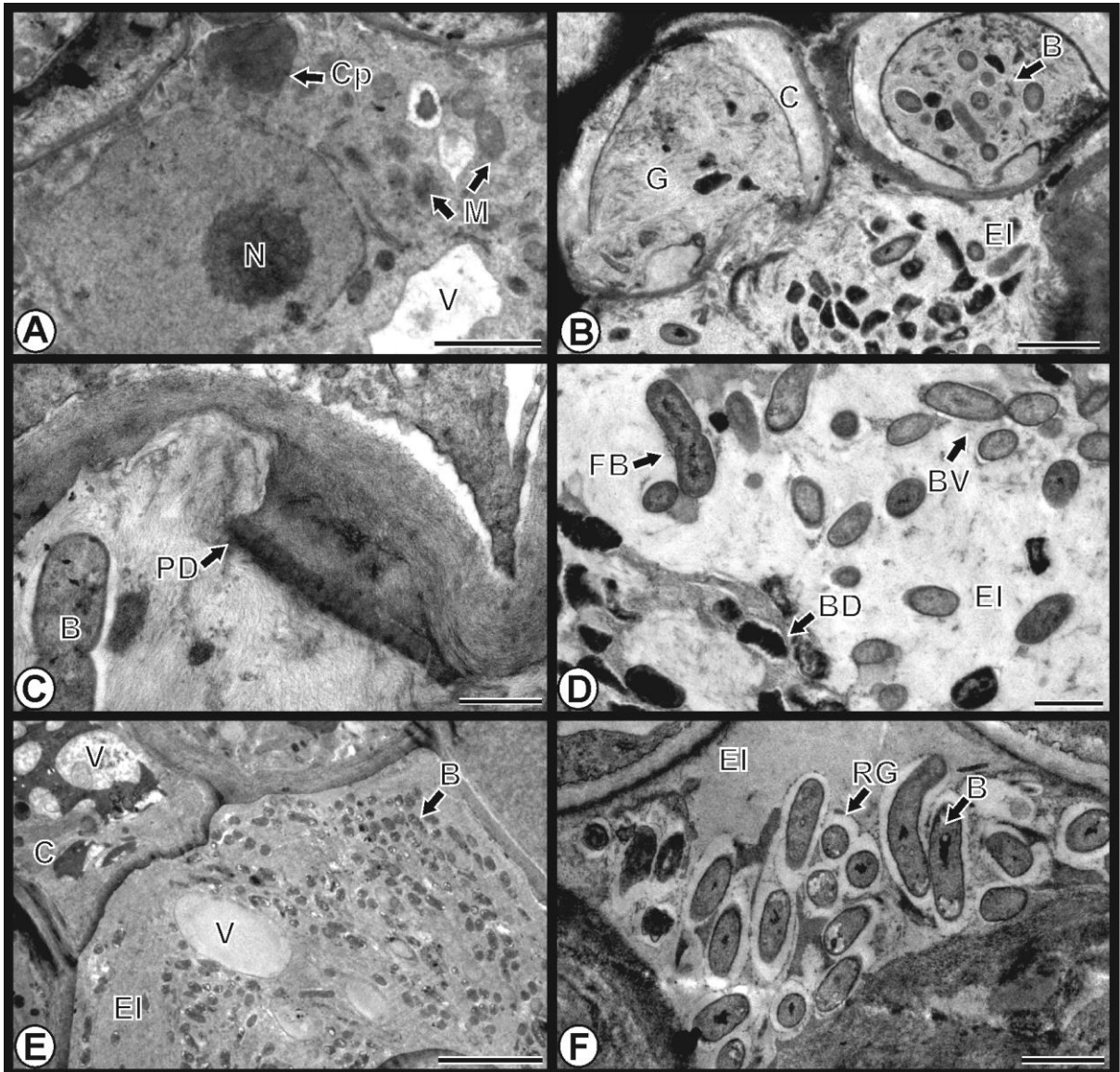


Figura 25 – Microscopia eletrônica de transmissão. Folhas de lima ácida ‘Galego’, inoculadas com Xac306: (A) degradação celular. Barra = 2 μ m. (B) colonização de bactérias dentro de células rompidas. Barra = 2 μ m; Xac636: (C) degradação da parede celular. Barra = 0,5 μ m. (D) bactérias degeneradas no espaço intercelular. Barra = 1 μ m; Xacm1510: (E) vacúolos nos espaços intercelulares, provenientes de células rompidas. Barra = 4 μ m; XfaC1632: (F) bactérias imersas em goma com aspecto granular e com retração da mesma ao redor das bactérias. Barra = 1 μ m. N: núcleo; V: vacúolo; M: mitocôndria; Cp: cloroplasto; PD: parede degradada; B: bactérias; G: goma; C: célula; EI: espaço intercelular; BD: bactéria degenerada; BV: bactéria viva; FB: fissão binária; RG: retração da goma.

5.6. Análise comparativa dos efetores de virulência de *Xanthomonas*

As *Xanthomonas* possuem 62 efetores de virulência identificados, dos quais 40 estão presentes em pelo menos uma das estirpes estudadas de Xac, XfaC e Xacm, como apresentado na Tabela 5. Xac306 e Xac828 possuem 37 efetores, Xac636 possui 36 efetores, Xacm1510, 17 e XfaC1632, 19. As três estirpes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* possuem, basicamente, o mesmo conjunto de genes efetores de virulência, com algumas exceções, discutidas na próxima seção.

A comparação dos efetores de virulência das estirpes de *Xanthomonas*, revelou 18 efetores que estão ausentes nas estirpes Xacm1510 e XfaC1632 em relação a Xac306. Esses efetores são: XopC2, XopE2, XopG2, XopI1, XopJ1, XopM, XopS, XopT, XopZ1, XopAA, XopAD, XopAI, XopAL1, XopAP, XopAU, XopAW, XopAY e XopAZ; e um efector presente em comum nessas duas estirpes e ausente em Xac306, o efector XopO. Contudo, Xacm1510 e XfaC1632, possuem efetores exclusivos em cada uma. Xacm1510 é a única espécie dentre as demais com ausência dos efetores AvrBs3, XopE3 e HrpW, enquanto a estirpe XfaC1632 não possui os efetores XopL, XopV e XopAE. XfaC1632 possui, exclusivamente, os efetores XopJ5 e XopAG.

Tabela 5 – Presença (P) ou ausência (A) de efetores de virulência de *Xanthomonas*, no genoma das estirpes estudadas (Xac306, Xac636, Xac828, Xacm1510 e XfaC1632).

Estirpes Efetores	Xac306	Xac636	Xac828	Xacm1510	XfaC1632
AvrBs1	A	A	A	A	A
AvrBs2	P	P	P	P	P
AvrBs3	P	P	P	A	P
XopB	A	A	A	A	A
XopC1	A	A	P	A	A
XopC2	P	P	P	A	A
XopD	A	A	A	A	A
XopE1	P	P	P	P	P
XopE2	P	A	P	A	A
XopE3	P	P	P	A	P
XopF1	P	P	P	P	P
XopF2	P	P	P	P	P
XopG1	A	A	A	A	A
XopG2	P	P	P	A	A
XopH1	A	A	A	A	A
XopI1	P	P	P	A	A

Estirpes Efetores	Xac306	Xac636	Xac828	Xacm1510	XfaC1632
XopJ1	P	P	P	A	A
XopJ2	A	A	A	A	A
XopJ3	A	A	A	A	A
XopJ4	A	A	A	A	A
XopJ5	A	A	A	A	P
XopK	P	P	P	P	P
XopL	P	P	P	P	A
XopM	P	P	P	A	A
XopN	P	P	P	P	P
XopO	A	A	A	P	P
XopP	P	P	P	P	P
XopQ	P	P	P	P	P
XopR	P	P	P	P	P
XopS	P	P	P	A	A
XopT	P	P	A	A	A
XopU	A	A	A	A	A
XopV	P	P	P	P	A
XopW	A	A	A	A	A
XopX	P	P	P	P	P
XopY	A	A	A	A	A
XopZ1	P	P	P	A	A
XopAA	P	P	P	A	A
XopAB	A	A	A	A	A
XopAC	A	A	A	A	A
XopAD	P	P	P	A	A
XopAE	P	P	P	P	A
XopAF1	A	A	A	A	A
XopAG	A	A	A	A	P
XopAH	A	A	A	A	A
XopAI	P	P	P	A	A
XopAJ	A	A	A	A	A
XopAK	P	P	P	P	P
XopAL1	P	P	P	A	A
XopAL2	A	A	A	A	A
XopAM	A	A	A	A	A
XopAP	P	P	P	A	A
XopAU	P	P	P	A	A
XopAW	P	P	P	A	A
XopAX	A	A	A	A	A
XopAY	P	P	P	A	A
XopAZ	P	P	P	A	A
XopA	P	P	P	P	P
HpaA	P	P	P	P	P
HrpW	P	P	P	A	P
AvrXccA1	A	A	A	A	A
AvrXccA2	A	A	A	A	A

5.7. Análise de dados do transcriptoma de laranja doce 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' infectadas com XfaC

Em um trabalho anterior do nosso laboratório, a expressão diferencial de genes de lima ácida 'Galego' e de laranja doce 'Hamlin' infectados com XfaC1632 foi analisada para compreender as diferenças de susceptibilidade entre essas espécies

cítricas (DA SILVA, 2015). As modificações microscópicas observadas em tecido infectado de 'Hamlin' e 'Galego' relatadas aqui, foram relacionadas com a expressão dos genes diferencialmente expressos (GDEs) de 'Hamlin' aos 5 dai, com maior expressão diferencial (fold-change) e com significância estatística ($p\text{-value} \leq 0,05$).

Foram encontrados 59 GDEs em plantas inoculadas de lima ácida 'Galego' em comparação com o controle. Em plantas inoculadas de laranja doce 'Hamlin', foram encontrados um número maior de GDEs, correspondente a 2851 genes, dos quais 39 são comuns a ambas as espécies. Também foram identificados 613 GDEs em 'Hamlin' e 13 em 'Galego' envolvidos em processos biológicos, como processos catabólicos, parede celular, processos biossintéticos, componente celular, atividade transmembrana e resposta ao estresse. Em 'Hamlin', encontramos 32 GDEs relacionados com a defesa, mas apenas 4 em 'Galego' (Tabela 6).

XfaC regulou positivamente 32 transcritos de proteínas PR em 'Hamlin' e apenas 6 em 'Galego'. Entre as famílias de PR induzidas por XfaC em citros estão: quitinases classe I e endoquitinases (PR-3, -4 -8 e -11), proteínas semelhantes a taumatina-(TLP) (PR-5), peroxidase (PR-9) e proteína SRG-1 (PR-10). XfaC regulou em 'Hamlin', mas não em 'Galego', muitos genes relacionados ao reforço da parede celular, como genes relacionadas à síntese de lignina (ácido cafeico 3-O-metiltransferase), suberina (proteína eceriferum), polissacarídeos da parede celular (inositol oxigenase) e deposição de sílica (proteína rica em prolina).

Tabela 6 – Genes de laranja doce ‘Hamlin’ e de lima ácida ‘Galego’ modulados 5 dias após infecção com XfaC1632.

	Hamlin		Galego		
GeneID	Fold-change	p-valor	Fold-change	p-valor	Função predita
orange1.1g020187m.g	999,365	9,729E-27	20,429	1,564E-04	basic endochitinase
orange1.1g011801m.g	960,027	1,176E-04	-	-	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1-like
orange1.1g032636m.g	786,965	1,321E-17	20,688	3,79E-03	chitinase CHI1 (CHI1)
orange1.1g022160m.g	385,004	1,011E-07	-	-	SRG1-like (LOC102630196)
orange1.1g016531m.g	296,545	6,211E-05	-	-	ECERIFERUM 1-like
orange1.1g026037m.g	228,115	5,416E-24	26,742	4,11E-07	thaumatin-like protein 1b
orange1.1g010421m.g	215,579	2,411E-13	-	-	flavin-containing monooxygenase 1
orange1.1g011108m.g	161,186	2,768E-10	22,413	0,012	serine carboxypeptidase-like 23
orange1.1g018077m.g	145,253	1,556E-27	-	-	feruloyl CoA ortho-hydroxylase 1
orange1.1g032285m.g	141,043	3,234E-14	-	-	pathogenesis response protein (PR-4)
orange1.1g028062m.g	120,799	8,433E-04	-	-	proline-rich protein
orange1.1g012212m.g	120,157	4,125E-19	-	-	UDP-glycosyltransferase
orange1.1g032847m.g	87,067	1,470E-06	-	-	NIM1-INTERACTING 2
orange1.1g004023m.g	80,419	1,611E-42	-	-	potassium transporter 5
orange1.1g021203m.g	78,001	5,832E-04	-	-	inositol oxygenase 2
orange1.1g033647m.g	74,045	2,572E-18	-	-	caffeic acid 3-O-methyltransferase-like
orange1.1g006446m.g	55,869	5,639E-20	-	-	L-type lectin-domain containing receptor kinase
orange1.1g021960m.g	54,112	7,734E-04	-	-	short-chain dehydrogenase reductase 2a
orange1.1g017448m.g	43,511	1,948E-30	-	-	12-oxophytodienoate reductase 11
orange1.1g020449m.g	39,289	1,274E-03	-	-	peroxidase 55
orange1.1g020078m.g	32,254	2,002E-10	-	-	wall-associated receptor kinase-like 16
orange1.1g013225m.g	30,948	6,067E-12	-	-	ethylene-responsive transcription factor ERF110
orange1.1g002907m.g	5,165	7,020E-08	-	-	glycine-rich domain-containing protein 1

6. DISCUSSÃO

Interações planta-patógeno são extremamente variáveis, pois dependem de combinações específicas de uma espécie de hospedeiro ou de uma estirpe de patógeno (LEE et al., 2009). Esse trabalho fornece a descrição comparativa do processo infeccioso de diferentes estirpes de *Xanthomonas* causadoras de doenças em citros, inoculadas em duas variedades cítricas, além da análise *in vitro* de importantes fatores de virulência dessas estirpes. Além disso, dados de expressão gênica de citros são relacionados com as alterações macro e microscópicas para explicar a diferença de susceptibilidade de diferentes variedades de citros a XfaC.

6.1. Compreensão do processo de infecção de diferentes estirpes de *Xanthomonas* em lima ácida ‘Galego’

A interação compatível de *Xanthomonas*-citros foi avaliada pela inoculação das estirpes patogênicas Xac306, Xac636, Xac828, Xacm1510, XfaC1632 e XfaC1630, em lima ácida ‘Galego’, enquanto a interação incompatível foi avaliada pela inoculação de XfaC1632 e XfaC1630 em laranja doce ‘Hamlin’. A infecção em condições naturais acontece com a entrada da bactéria por estômatos, hidatódios ou ferimentos (GRAHAM et al., 2004). Existe uma etapa de colonização epifítica, previamente à entrada do patógeno no mesófilo, em que a formação do biofilme e a produção de goma influenciam diretamente o desenvolvimento da doença (RIGANO et al., 2007).

Neste trabalho, as bactérias foram inoculadas no mesófilo foliar por ferimento com agulha, imersa em suspensão bacteriana. As modificações na anatomia causadas pelo furo com agulha foram desconsideradas, a fim de não influenciar na interpretação dos dados provenientes da infecção. Grande parte das bactérias foi diretamente inoculada dentro do mesófilo, apesar disso, a colonização da superfície epifítica e dos estômatos foi observada pela microscopia eletrônica de varredura, em todas as estirpes. Isso aconteceu, provavelmente, por bactérias que se depositaram na superfície foliar ou liberadas para a superfície com o rompimento da epiderme.

Dentro do mesofilo, a bactéria se locomove no apoplasto com auxílio do flagelo e se adere à superfície celular, por meio de proteínas especializadas, chamadas adesinas, pela pili do sistema de secreção do tipo VI ou do *hrp* (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; GOTTIG et al., 2009). Após a multiplicação celular atingir certa densidade, a movimentação flagelar auxilia as bactérias que, até então, se encontravam em estado planctônico, a se aglomerarem, dando início à formação do biofilme, envoltas em goma xantana, LPS, proteínas e DNA extracelular (LI, WANG, 2011; FERENCE et al., 2017).

A microscopia de luz e as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão permitiram a visualização da goma xantana, polissacarídeo extracelular produzido pelas bactérias do gênero *Xanthomonas*, envolvendo as bactérias e preenchendo os espaços intercelulares e células rompidas. Na microscopia de luz, a goma xantana foi observada pela coloração típica de material polissacarídico corado com azul de toluidina, que varia de rosa a vermelho (WATT, McCULLY, JEFFREE, 1993), também observado por Pruvost e colaboradores (2002). Na microscopia eletrônica, foi observada como um material eletrondenso e fibrilar, com estruturas semelhantes às fibrilas provenientes da parede celular do hospedeiro (LEE et al., 2009).

Grande quantidade de bactérias imersas em goma xantana foi observada em lesões antigas de cancro cítrico de mais de seis meses, indicando que as bactérias estavam ativas e, sugere, que sua liberação para o ambiente externo não está diretamente relacionada com a idade da lesão (PRUVOST et al., 2002). Semelhantemente, foi possível observar em lesões de, aproximadamente, dois a quatro meses de idade, bactérias ainda vivas nos espaços intercelulares, imersas em goma xantana.

O biofilme é considerado um importante fator de virulência para Xac e é imprescindível para a adesão de Xac nas superfícies de folhas e frutos (SENA-VELÉZ et al., 2015). A lima ácida ‘Galego’, como um hospedeiro compatível, produz fatores que podem ativar a formação de biofilme em *Xanthomonas* patogênicas a citros, visto que estas podem colonizar tanto a superfície interna quanto externa do tecido do hospedeiro (SENA-VELÉZ et al., 2015). Para todas as bactérias inoculadas em ‘Galego’, foram visualizados aglomerados de bactérias envoltas em

goma xantana, que constitui o biofilme, nas superfícies externas e aderidas à parede da célula hospedeira.

Em contato com a parede celular, a bactéria ativa o T3SS e através do pilus *hrp* injeta a proteína PthA para dentro da célula hospedeira. O PthA pertence à família de genes *avrBs3/pthA* e, quando injetado, se direciona ao núcleo e ativa a expressão do promotor do gene da planta *upa20*, responsável por regular o tamanho celular no genoma do hospedeiro (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; KAY et al., 2007; FERENCE et al., 2017). Dessa forma, Xac induz a hiperplasia e hipertrofia celular que leva a formação de lesões cancrosas, típicas da doença. O *pthA* é considerado o gene determinante da patogenicidade de Xac, visto que a inserção desse gene em outras *Xanthomonas* não causadoras de cancro, induz a divisão, aumento e morte das células do hospedeiro, levando à formação de lesões cancrosas em citros (SWARUP et al., 1991; DUAN et al., 1999; BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Com o progresso da infecção, a hiperplasia e hipertrofia celular levam a redução do espaço intercelular, que é preenchido com goma xantana, produzida pela bactéria, e as lesões de cancro causam o rompimento da epiderme, permitindo a liberação de bactérias para a superfície foliar (SWARUP et al., 1991; BRUNINGS; GABRIEL, 2003). A hiperplasia e hipertrofia celular, o espessamento do limbo foliar, o rompimento da epiderme, assim como a presença de bactérias e de goma xantana nos espaços intercelulares, são alterações descritas na literatura para o cancro cítrico (LAWSON; DIENELT; CIVEROLO, 1989; SWARUP et al., 1991; BOHER et al., 1996; PRUVOST et al., 2002). Todas essas alterações foram observadas por meio da microscopia de luz em folhas de lima ácida 'Galego' infectadas com Xac306, Xac636 e XfaC1632, com diferentes intensidades, enquanto que, as estirpes Xac828 e Xacm1510 induziram pouco espessamento do limbo foliar, mas que não ocasionou em rompimento da epiderme.

A multiplicação celular e a colonização no mesofilo são seguidas pela gradual degeneração do tecido vegetal (RUDOLPH, 1993). A maioria das *Xanthomonas* produzem enzimas hidrolíticas como celulasas, pectinases, xilanases e proteinases, que podem ser as responsáveis por causar a desorganização gradual das células parenquimáticas e a degradação da parede celular (BOHER et al., 1996; PRUVOST

et al., 2002), vista pela microscopia de luz e eletrônica de transmissão, na infecção com todas as estirpes.

Nos cortes de microscopia de luz de folhas de 'Galego' infectadas, observou-se o acúmulo de uma substância no citoplasma das células do mesofilo, com características de compostos fenólicos, indicados pela coloração azul esverdeado, corado com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER, McCULLY, 1964). Contudo, houve diferença na intensidade produzida dessa substância em cada tratamento. Aparentemente, as estirpes Xac828, Xacm1510 e XfaC1632 induziram a produção de maior quantidade dessa substância do que as estirpes Xac306 e Xac636, sendo aquelas estirpes possivelmente menos virulentas do que estas.

Os compostos fenólicos são produzidos pela planta como resposta de defesa em situações de estresse ou ataque de patógenos (SCHMITZ-HOERNER; WEISSENBOCK, 2003; CLÉ et al., 2008; BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010). É provável que a infecção com as estirpes menos agressivas Xac828, Xacm1510 e XfaC1632, tenha favorecido a ativação mais prontamente da resposta de defesa inicial da planta, levando ao acúmulo desses compostos no interior das células.

Pruvost e colaboradores (2002), observaram em lesões de cancro cítrico de quatro e seis meses de idade, possível acúmulo de compostos fenólicos pelo hospedeiro e a impregnação desses compostos na matriz polissacarídica, envolvendo as bactérias no ambiente intercelular, visto pela autofluorescência desses tecidos. A presença desses compostos, semelhantes a lignina, sugeriu que as bactérias ficam presas nessa estrutura. Isso pode explicar a imobilização de bactérias no espaço intercelular, observada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 23E) e transmissão (Figura 24F) em lesões com mais de 40 dai.

Xac306 tem uma ampla gama de hospedeiros, acometendo todas as variedades comerciais de citros (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Os sintomas causados por Xac306 em folhas de lima ácida 'Galego' e laranja doce 'Hamlin' revelaram a grande agressividade dessa estirpe em comparação com as demais, como também relatado por Jaciani (2012) e Brunings e Gabriel (2003). A análise em nível estrutural (anatômico) revelou que a estirpe Xac306 é a mais agressiva dentre

as estirpes estudadas, visto pela intensidade da indução da hiperplasia e hipertrofia celular.

A estirpe Xac306 teve a maior produção de goma e a segunda maior formação *in vitro* de biofilme entre as estirpes e sua motilidade flagelar foi intermediária. Formou agregados em ensaio *in vitro* de auto agregação celular, similarmente às estirpes Xac828 e Xacm1510. Em Xac, a síntese da goma xantana desempenha um importante papel no desenvolvimento da formação de biofilme, pois oferece suporte estrutural, sendo essencial para a formação de microcolônias e o desenvolvimento de estruturas mais complexas, em que as bactérias estão firmemente empacotadas e separadas por canais cheios de água (RIGANO et al., 2007).

A goma, também, atua na sobrevivência epifítica do patógeno, uma vez que permite que a bactéria retenha água, resista aos estresses abióticos e aos compostos antimicrobianos produzidos pela planta, como o peróxido de hidrogênio (DUNGER et al., 2007; RIGANO et al., 2007). Além disso, facilita a dispersão da bactéria formada nas lesões na superfície, formando envoltórios ao seu redor (GRAHAM et al., 2004), como observado pela microscopia eletrônica de transmissão.

Em comparação com Xac306, a estirpe Xac636 possui reduzida gama de hospedeiros. Quando inoculada em diferentes genótipos de citros, essa estirpe produziu sintomas com níveis de agressividade distintos em 60% das variedades testadas (JACIANI, 2012). Nesse trabalho, a estirpe Xac636 produziu sintomas similares aos de Xac306, em laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego', porém, atenuados. No entanto, a produção de goma e a motilidade flagelar dessa estirpe foram os segundos valores menores dentre as estirpes, a formação *in vitro* de biofilme foi intermediária e essa bactéria não formou agregados celulares em teste *in vitro*.

A estirpe Xac828 produziu sintomas com lesões achatadas em folhas de lima ácida 'Galego'. Semelhantemente, em um trabalho anterior, essa estirpe produziu o mesmo tipo de sintoma nas variedades 'Swingle', limão 'Cravo', tangerinas 'Ponkan' e 'Cravo', laranja 'Hamlin' e pomelo 'Grapefruit', com diferentes níveis de agressividade (JACIANI, 2012). A estirpe Xac828 apresentou a maior capacidade de

motilidade flagelar entre as estirpes, a segunda maior produção de goma, a formação *in vitro* de biofilme foi intermediária e formou agregados celulares em teste *in vitro*. A presença do flagelo e a produção de goma estão relacionadas com o desenvolvimento de um biofilme maduro (RIGANO et al., 2007; MALAMUD et al., 2010), no entanto, não houve relação direta dessas características testadas em Xac636 e Xac828. A variação genômica e transcriptômica pode explicar as diferenças *in vivo* e *in vitro* desses fatores de virulência como observado por Sena-Veléz e colaboradores (2015). Esses autores observaram que estirpes de *Xanthomonas citri* e outras *Xanthomonas* patogênicas a citros apresentaram comportamentos diferentes em relação a adesão, formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* e motilidade.

Xacm produziu em lima ácida ‘Galego’ lesões achatadas, porém, distintas das lesões de Xac828. A formação de lesões semelhantes foi produzida por Xacm inoculada em ‘Swingle’, limão ‘Cravo’, limas ácidas ‘Galego’ e ‘Tahiti’, e tangerina ‘Cravo’ (JACIANI, 2012). Xacm foi a estirpe que mais formou biofilme *in vitro* e apresentou elevados valores de produção de goma e motilidade flagelar. Essa estirpe obteve um comportamento de auto agregação celular semelhante a Xac306 e a Xac828.

Estirpes de *Xanthomonas* com estrita gama de hospedeiros, assim como Xacm, que naturalmente infecta somente citrumelo ‘Swingle’, produzem mais biofilme em meio mínimo e tem maior capacidade de motilidade (*swimming*) em relação a estirpes com ampla gama de hospedeiros, provavelmente, devido à sua baixa capacidade de adaptação a estresses bióticos e abióticos (SENA-VELÉZ et al., 2015). Esta pode ser uma vantagem de adaptação de Xacm no ambiente intercelular pobre, visto que a ausência de efetores de virulência importantes para a patogenicidade, como o PthA, limita sua virulência.

As estirpes 1630 e 1632 de XfaC induziram HR quando inoculadas em laranja ‘Hamlin’ e, em lima ácida ‘Galego’ o desenvolvimento dos sintomas típicos de cancro foi mais lento do que de Xac. Os sintomas provocados por XfaC1630 foram mais amenos em comparação com a estirpe XfaC1632. Isso corrobora com o fato que estirpes de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C produtoras de pigmento em meio de cultura sólido, como a XfaC1630, são menos agressivas que as estirpes

não produtoras de pigmento, como a XfaC1632 (NOCITI et al., 2006). Com exceção da produção de goma, que foi de valores intermediários, a estirpe XfaC1630 apresentou os menores valores de motilidade flagelar e de formação *in vitro* de biofilme, o que corrobora com sua baixa agressividade. Já a estirpe XfaC1632, produziu valores intermediários de biofilme e de motilidade, enquanto que sua produção de goma foi a menor das estirpes. Ambas as estirpes não formaram agregados celulares.

A análise por microscopia da interação *Xanthomonas*-citros mostrou que apesar das diferenças nas alterações morfológicas observadas no tecido foliar infectado de lima ácida 'Galego', que produziu diferentes sintomas, não houve diferença nas alterações em nível intracelular entre as estirpes, observadas pelas microscopias eletrônicas de varredura e transmissão. Contudo, as alterações morfológicas, visualizadas pela microscopia de luz, não são suficientes para explicar as diferenças na gama de hospedeiros e virulência de cada estirpe. Essas podem ser explicadas pelo conjunto de efetores de virulência presentes em cada espécie ou estirpe e pela variação no genoma e no transcriptoma (JALAN et al., 2011) (Tabela 5).

Xac306, possui 37 efetores de virulência identificados, dentre os quais, quatro são diretamente envolvidos com a virulência: *pthA4* (PthA4), *avrXacE1* (XopE1), *avrXacE2* (XopE3) e *Xac3090* (XopL). O *pthA4* é essencial para o desenvolvimento dos sintomas de cancro, por ser responsável pela indução das modificações celulares características da doença, como hipertrofia e hiperplasia (SWAMP et al., 1991; YAN; WANG 2012; JALAN et al., 2014). O *avrXacE1* atua no núcleo da célula hospedeira, onde interage com fatores de transcrição e proteínas de ligação ao DNA e RNA, envolvidas, por exemplo, na regulação do "splicing". O *avrXacE2*, pode ser encontrado no núcleo ou no citoplasma da planta e, aparentemente, está envolvido com lesões que estimulam a morte celular. O *Xac3090* se direciona ao cloroplasto, interagindo com proteínas desta organela (DUNGER et al., 2012).

As três estirpes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* possuem, basicamente, o mesmo conjunto de genes efetores de virulência, com algumas exceções. A estirpe Xac828, não apresenta o efector XopT e é a única das três estirpes com a presença do efector XopC1, enquanto a estirpe Xac636 não apresenta o efector XopE2,

presente nas demais. A estirpe Xac306 possui 4 cópias do gene *pthA*, em cada plasmídeo (DA SILVA et al., 2002), enquanto que as estirpes Xac636 e Xac828 possuem somente duas cópias desse gene, em cada plasmídeo (MOREIRA, dados não publicados). Essas diferenças podem ser determinantes na virulência dessas estirpes e explicar a variação na indução de sintomas.

XopT é um efector não-TAL do T3SS, que possui distribuição limitada entre as *Xanthomonas* (WHITE et al., 2009). Os efetores não-TAL estão relacionados com a supressão da imunidade inata do hospedeiro, possivelmente, interferindo com eventos de sinalização (SINHA et al., 2013). A função do XopT ainda não foi determinada, contudo, sua ausência em Xac828 pode influenciar a virulência desta estirpe, visto que as estirpes mais agressivas possuem esse efector. Já o efector XopC1, presente somente em Xac828, é um dos dois efetores que diferencia XacA (tipo selvagem) das estirpes XacA^w e XacA^{*} e, comprovadamente, não está relacionado com a virulência nem com a determinação da gama de hospedeiros (DUNGER et al., 2012; ESCALON et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

Xac636 não possui o efector XopE2, uma possível transglutaminase pertencente à família HopX, que tem como alvo a membrana plasmática das células hospedeiras (THIEME et al. 2007). Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, a miristoilação (uma modificação pós-traducional) desse efector é necessária para a indução do fenótipo da doença (SALOMON et al., 2010).

A comparação dos efetores de virulência das estirpes mostrou que Xacm e XfaC compartilham 14 efetores em comum com as outras estirpes, tendo um conjunto de efetores muito mais semelhantes entre si em relação às estirpes de Xac, sendo que o efector XopO é encontrado exclusivamente em Xacm e XfaC. XopO é um efector da parte variável do T3SS e que não possui função determinada, podendo ser efector com função redundante (HAJRI et al., 2012), mas que ainda não foi estudado em Xacm e XfaC. Além disso, Xacm1510 e XfaC1632 possuem 3 efetores exclusivos. Xacm1510 é a única espécie dentre as demais com ausência dos efetores AvrBs3, XopE3 e HrpW, enquanto a estirpe XfaC1632 não possui os efetores XopL, XopV e XopAE. Essas diferenças, juntamente com a diferença de crescimento e a produção de goma e biofilme, podem explicar os sintomas e a limitada gama de hospedeiros dessas estirpes.

Analisando o genoma de Xacm, observa-se que esta espécie é filogeneticamente mais próxima de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) do que de Xac e que Xacm não possui plasmídeos, enquanto que Xac contém dois, comprovadamente importantes para sua patogenicidade (JALAN et al., 2011). Em relação aos efetores do T3SS, Xacm1510 não possui o efector AvrBs3/PthA, conhecido por ser responsável pelos sintomas de lesões salientes do cancro, o que explica a não erupção da epiderme nos sintomas produzidos por Xacm (JALAN et al., 2011). Além disso, essa estirpe não possui os efetores XopE3, envolvido com lesões que estimulam a morte celular, e o efector HrpW, uma proteína de fusão com um gancho péptico liase secretada pelo T3SS, juntamente, com o efector Hpa1. Esse efector é um componente do core do T3SS de vários organismos, como *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (DA SILVA et al., 2002; WHITE et al., 2009).

A ausência desses efetores pode contribuir para a baixa virulência dessa estirpe, o que corrobora com as análises macro e microscópicas. A limitação nas alterações celulares induzidas por essa estirpe, como pouca ou quase nenhuma hipertrofia e hiperplasia, que produzem lesões achatadas, pode favorecer a resposta de defesa da planta, visto pela alta produção de compostos fenólicos nessa interação.

Diferentemente de Xacm, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C possui o gene efector de virulência, *pthA4*, apresentando sintomas semelhantes aos de Xac em lima ácida, contudo, genes exclusivos dessa espécie são essenciais para explicar as diferenças na virulência e gama de hospedeiros dessas estirpes (MOREIRA et al., 2010). Xfa (tipos B e C) possui algumas famílias de efetores exclusivos, ausentes em Xac: XopB, XopAF, XopAG, XopE4, XopJ (MOREIRA et al., 2010). Comparando o conjunto de efetores de XfaC1632 com as demais estirpes estudadas, identificou-se o efector XopO, presente em XfaC e Xacm1510 e dois efetores exclusivos: XopAG e XopJ5.

O efector AvrGf2 é o homólogo em XfaC do efector XopAG, e é responsável pela rápida indução da resposta de hipersensibilidade (HR) de XfaC em algumas espécies cítricas e por limitar sua gama de hospedeiros (GOCHEZ et al., 2015). XfaC é a única estirpe de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* que possui cópia

funcional do gene *avrGf2*. Esse gene está presente em XfaB, porém, possui um “transposon” em sua sequência que inativa sua função. Isso sugere uma relação evolutiva entre essas duas estirpes, no qual XfaC seria a linhagem progenitora, além de poder explicar a maior abrangência na gama de hospedeiros de XfaB (MOREIRA et al., 2010; GOCHEZ et al., 2015). Já o efector XopJ5 é um componente da parte variável do T3SS e, em *X. campestris* pv. *campestris*, foi associada com a patogenicidade em *Arabidopsis* (GUY et al., 2013). Sua função em XfaC ainda não está determinada, sendo um importante alvo para pesquisa.

XfaC1632 não possui três efetores encontrados em Xac306: XopL, XopV e XopAE. XopAE é um efector não-TAL do T3SS e assim como XopV, possui um domínio rico em leucina. XopAE foi descrito em *X. euvesicatoria* como um efector envolvido na diminuição da deposição de calose na parede celular e no desenvolvimento dos sintomas da doença. Além disso, ele atua como um inibidor da ativação do gene repórter induzido pela flag22 (POPOV et al., 2016). A ausência desses efetores, certamente, influencia na baixa virulência dessa estirpe.

6.2. Processo de infecção de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* em diferentes variedades cítricas

As variedades de citros possuem níveis variados de resistência ao cancro cítrico. A laranja doce ‘Hamlin’ é considerada susceptível, enquanto que, a lima ácida ‘Galego’ é considerada altamente susceptível (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Por meio da microscopia de luz, foi possível identificar alterações no tecido infectado por Xac e XfaC dessas variedades que ressaltaram a diferença de susceptibilidade. Em geral, as alterações no tecido foliar de ‘Galego’ foram mais intensas do que em ‘Hamlin’. Aos 5 dai, o mesófilo de lima ácida se encontrava com intensas hiperplasia e hipertrofia, presença de goma xantana e degradação celular, enquanto que, em laranja, a intensificação dessas características só foi observada aos 20 dai, indicando que o processo de infecção em ‘Hamlin’ foi mais lento do que em “Galego”.

Alterações na anatomia do tecido de lima ácida, como hiperplasia e hipertrofia foram observadas tanto na infecção com Xac, quanto com XfaC. Porém, o processo

de infecção com as estirpes de XfaC foi mais lento e menos severo do que com Xac (Figura 13). Isso pode ser explicado pelo fato do crescimento das estirpes de XfaC *in vitro* (demonstradas nesse trabalho) e *in planta*, ser mais lento do que de Xac (CERNADAS et al., 2008), o que pode fazer com que a resposta de defesa da planta seja mais eficaz, tornando a infecção por XfaC menos severa. As modificações ultraestruturais provocadas pela infecção com Xac e XfaC em ‘Galego’ e com Xac em ‘Hamlin’, foram semelhantes aos aspectos descritos no item 6.1.

XfaC tem gama de hospedeiros restrita a lima ácida ‘Galego’ e citrumelo ‘Swingle’, causando reação de hipersensibilidade (HR) nas outras variedades cítricas (CERNADAS et al., 2008; MOREIRA et al., 2010). A HR em XfaC foi relatada há mais de 30 anos e, há 10 anos, foi comprovada por meio de estudos de dinâmica de população e vazamento de eletrólitos, em pomelo e lima ácida (GOACHEZ et al., 2008; GOACHEZ et al., 2015). Neste trabalho traz a caracterização ultraestrutural da HR induzida por estirpes de XfaC, em laranja doce ‘Hamlin’. Macroscopicamente, a HR é identificada pela coloração parda e de aspecto ressecado na região de inoculação, que caracteriza o tecido morto, cercada por tecido vivo (RUDOLPH, 1993; LEVINE et al., 1994), como observado na inoculação de XfaC1632 e XfaC1630, em folhas de laranja ‘Hamlin’. Microscopicamente, foi possível observar alterações distintas daquelas observadas para a infecção com Xac ou com as estirpes de XfaC em ‘Galego’. O tecido foliar infectado de ‘Hamlin’ apresentou, aos 5 dai, hiperplasia e hipertrofia das células parenquimáticas, mas com menor intensidade que em ‘Galego’, sem resultar no espessamento do limbo foliar e rompimento da epiderme. Essas alterações podem ter sido desencadeadas pelo patógeno previamente à indução da HR, como também observado por Cernadas e colaboradores (2008) em folha de laranja doce ‘Pera’ inoculada com XfaC.

Uma das principais características da HR é a explosão oxidativa, que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, gerando superóxido e, o consequente acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DOKE, 1983). Observou-se, a partir de 5 dai, o acúmulo de prováveis compostos resultantes de oxidação, em folhas inoculadas com XfaC1632 e XfaC1630. Na microscopia de luz, esses compostos foram observados, principalmente, nas células do parênquima paliádico, com coloração roxa escura corada com azul de toluidina, enquanto que, na microscopia

eletrônica de transmissão, esses compostos foram visualizados dentro dos vacúolos, como substâncias eletrondensas e granuladas.

Além da presença de compostos resultantes de oxidação, foi possível observar por microscopia eletrônica de transmissão, outras características de HR em folhas de laranja 'Hamlin' infectadas com estirpes de XfaC. Os vacúolos encontraram-se subdivididos no citoplasma, a membrana plasmática desestruturada, o citoplasma e as organelas degeneradas. Em muitos locais, o espaço intercelular encontrou-se com acúmulo de substâncias eletrondensas, provavelmente compostos fenólicos. Poucas células degeneradas de XfaC1630 foram visualizadas no espaço intercelular, imersas em goma xantana, com aspecto fibrilar e eletrondenso, formando um envoltório ao seu redor. Essas alterações estão de acordo com as observações feitas por Bestwick, Benett e Mansfield (1995), em infecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em alface e Greenberg e Yao (2004), em infecção de *P. syringae* em *Arabidopsis*, comprovando ultraestruturalmente a ocorrência de HR em laranja doce por estirpes de XfaC.

6.3. Resposta de defesa de laranja 'Hamlin' sob infecção de XfaC

O reconhecimento de um patógeno pela planta é compreendido, basicamente, por dois tipos de sistemas: os receptores de reconhecimento padrão ("Pattern Recognition Receptors" - PRR), responsáveis pela detecção de efetores ou padrões no apoplasto, como a flagelina, que ativam a imunidade desencadeada por PAMP ("PAMP-triggered immunity" - PTI). E as proteínas com ligação a nucleotídeos e domínios repetitivos ricos em leucina ("nucleotide-binding, leucine-rich repeat domains" - NLRs), responsáveis pelo reconhecimento citoplasmático dos efetores de virulência liberados pelo patógeno, que ativa a imunidade desencadeada por efetores ("Effector Triggered Immunity" - ETI). As NLRs são codificadas pela maioria dos genes R e sua ativação resulta na resistência a doença e na resposta de hipersensibilidade no local da infecção (JONES; DANGL, 2006; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015; TANG; WANG; ZHOU, 2017).

XfaC modulou a expressão de 32 transcritos NLR em 'Hamlin', enquanto em 'Galego', somente 3. Além das NLRs, as proteínas de resistência podem ser de

outra classe de proteínas, receptoras na superfície celular: proteínas receptoras do tipo quinase (“receptor-like kinases” - RLK) e proteínas do tipo receptoras (“receptor-like proteins” - RLP) (JONES; DANGL, 2006). Em ‘Hamlin’, 31 transcritos RLP e 2 RLK foram identificados. Além disso, um receptor LRR serina treonina proteína quinase fls2 (FLS2), que reconhece a flg22, um peptídeo conservado da flagelina da bactéria (JONES; DANGL, 2006), foi identificado em ‘Hamlin’, porém, não em ‘Galego’, sugerindo que o reconhecimento do patógeno na espécie resistente é muito mais eficiente que na susceptível.

O gene orange1.1g006446m.g codifica uma proteína com domínio lectina tipo L contendo receptor quinase, que são uma classe de proteínas do tipo receptoras quinase (RLK), caracterizadas por um domínio extracelular de lectina (BARRE et al., 2002). Essa proteína foi superexpressa em ‘Hamlin’ (fold-change = 55,87), mas não teve alteração significativa em ‘Galego’. Várias funções em processos biológicos têm sido atribuídas a essas proteínas, sendo a mais mencionada a transdução de sinais em oligossacarídeos extracelulares (BARRE et al., 2002; ANDRE et al., 2005; WANG et al., 2013). Contudo, já foi relatada a participação essencial dessa proteína na resposta a doenças por diferentes patógenos (BOUWMEESTER et al., 2011; WANG et al., 2013). Plantas de *Arabidopsis* com a superexpressão dessa proteína, demonstraram aumento de resistência a infecção com *Botrytis cinerea* e maior expressão de um grupo de genes relacionados a defesa (WANG et al., 2013).

Outra proteína RLK, associada à parede (“cell wall-associated kinase” - WAK), é codificada pelo gene orange1.1g020078m.g e foi expressa em ‘Hamlin’, mais de 30 vezes do que na condição controle, enquanto que, em ‘Galego’, a expressão desse gene não sofreu alteração. As WAKs ligam fisicamente a parede celular ao compartimento interno e transmitem sinais através da membrana na resposta de defesa da planta (LI et al., 2009). Elas estão envolvidas na expansão celular, na tolerância a metais pesados e já foram relatadas tendo envolvimento na resistência de plantas a bactérias e fungos em algumas plantas como *Arabidopsis*, milho e arroz (LALLY et al. 2001; HE et al. 1998; HOU et al. 2005; LI et al., 2009; HURNI et al., 2015).

O aumento do influxo de cálcio citoplasmático é observado em resposta a várias PAMPs (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). Identificou-se proteínas de

membrana ATPase transportadoras de cálcio, em 'Hamlin' aos 5 dai. A despolarização da membrana e o influxo de outros íons, como K^+ , Cl^- e NO_3^- são consideradas respostas rápidas a PAMPs (WU; SHAN; HE, 2014). O potássio é um nutriente essencial e desempenha um papel crucial em vários processos biológicos (MARSCHNER, 2012). Já foi reportado que a quantidade de potássio tem relação direta com a resistência de plantas a doenças (WANG et al., 2013). Altas concentrações de potássio diminuem a competição interna de patógenos por nutrientes e permitem que as plantas desloquem mais recursos para a defesa, como no reforço das paredes celulares (HOLZMUELLER; JOSE; JENKINS, 2007; WANG et al., 2013). O gene orange1.1g004023m.g codifica um transportador de potássio e está superexpresso (fold-change = 80,4) em 'Hamlin', aos 5 dias de infecção, porém, sem alteração em 'Galego', o que indica que a superexpressão desse gene está envolvido na resistência de laranja a XfaC.

Após o reconhecimento do patógeno ocorre a sinalização celular, em que as plantas induzem inúmeros mecanismos para defesa, como: fechamento estomático; produção e secreção de compostos antimicrobianos e moléculas relacionadas a defesa, como PR1; biossíntese de hormônios de defesa; produção de espécies reativas de oxigênio; reforço da parede celular; e a resposta de hipersensibilidade (HR) no local da infecção (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). Essas respostas são desencadeadas pela cascata MAPK, um dos primeiros eventos de sinalização, que modulam a imunidade da planta, pela fosforilação dos fatores de transcrição, como WRYK e ERF (MENG; ZHANG, 2013; WU; SHAN; HE, 2014). As proteínas F-box também fazem parte da sinalização de fitormônios e da defesa da planta (LIU et al., 2002). Em 'Hamlin', foram identificados 21 transcritos F-box e 2 transcritos MAPK diferencialmente expressos, enquanto que em 'Galego', nenhum.

XfaC regulou em 'Hamlin', mas não em 'Galego', muitos genes relacionados ao reforço da parede celular, envolvidos na síntese de lignina, suberina, de polissacarídeos de parede, etc. Esse fato também foi relatado por Cernadas e colaboradores (2008) em infecção de XfaC em laranja 'Pêra', que observaram que entre os genes em comum de Xac e XfaC, Xac induziu a expressão de muitos genes relacionados com a síntese de lignina, porém, com menor expressão. Isso sugere

um papel fundamental desses genes na resistência de citros não-hospedeiros à infecção de XfaC.

A resposta de defesa também pode ser feita pela ativação das principais vias de sinalização hormonal: ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (SCHENK et al., 2000). Com isso, os patógenos desenvolveram estratégias por meio dos efetores para driblar ou interferir nos fitormônios (KAZAN; LYONS, 2014). A infecção com XfaC modulou a expressão de vários genes que interferem diretamente nessas vias ou em suas comunicações cruzadas, como a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACC), precursor do etileno (PIETERSE et al., 2001); a proteína putativa 12-oxofitodienoato redutase (OPR), envolvida na biossíntese do ácido jasmônico (AJ) (FARMER et al. 2003; SASAKI-SEKIMOTO et al. 2005; TAKI et al. 2005; TANI et al., 2008); o fator de transcrição responsivo ao etileno ERF110; a UDP-glicosiltransferase (UGT), um metabólito secundário de plantas, relatada ser participante da comunicação cruzada da sinalização de ácido jasmônico e ácido salicílico (VON SAINT PAUL, et al., 2011). Todos esses genes foram encontrados superexpressos em 'Hamlin', porém, inalterados em 'Galego'.

A transcrição de genes relacionados a defesa e de genes relacionados a patogênese (PR) são essenciais para que as respostas de defesa da planta contra-ataque o patógeno. Existem várias classes de PR, classificadas de acordo com a sequência de aminoácido que elas compartilham, com a relação sorológica e/ou atividade biológica ou enzimática. As PRs são induzidas sistemicamente, em associação com o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida ('systemic acquired resistance' - SAR) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). XfaC modelou a expressão de 32 transcritos de proteínas PR em 'Hamlin', e somente 6 em 'Galego'.

O gene orange1.1g010421m.g, codifica uma mono oxigenase 1 contendo flavina e apresentou superexpressão (fold-change = 215,58) em 'Hamlin', aos 5 dias de infecção, enquanto que, em 'Galego', não teve alteração da sua expressão, em condições infectantes. Esse gene foi mostrado ser essencial para o estabelecimento da via de Resistência Sistêmica Adquirida ("Systemic Acquired Resistance" – SAR) e de respostas de defesa sistêmicas, provavelmente, pela síntese de um metabólito necessário para a transdução ou amplificação de um sinal durante as fases iniciais do estabelecimento da SAR (MISHINA, ZEIER, 2006).

A via SAR está associada a plantas que, geralmente, são resistentes a uma ampla gama de hospedeiros. Essa via é dependente da via do Ácido Salicílico (“Salicylic Acid” – SA) e está associada com o aumento sistêmico de níveis do AS e da expressão de genes PR (RYALS et al., 1996; MISHINA, ZEIER, 2006). A via SAR é ativada em resposta a patógenos que causam lesões necróticas, podendo ser resultante de uma resposta de hipersensibilidade (HR) ou do desenvolvimento de sintomas de uma interação compatível (HAMMERSCHMIDT, 1999; MISHINA, ZEIER, 2006).

Outros genes que regulam a via SAR foram identificados em ‘Hamlin’, como o gene que codifica a proteína NIM1 (não induzível de imunidade) que regula a via SAR, numa posição “downstream” do acúmulo de ácido salicílico e “upstream” da indução e expressão de resistência do gene SAR. O NIM1 participa da expressão de resistência determinada geneticamente, pois plantas mutantes *nim1* permitem o crescimento de patógenos incompatíveis, além de não induzirem a expressão de genes PR nem a resistência de doenças em plantas infectadas (DELANEY; FRIEDRICH; RYALS, 1995; WEIGEL et al., 2001). Esse gene foi superexpresso em ‘Hamlin’ (fold-change = 87,06) e não teve sua expressão alterada em ‘Galego’, aos 5 dias após infecção.

O gene *orange1.1g018077m.g* codifica a feruloil CoA ortohidroxilase 1, superexpressa em ‘Hamlin’, porém, inalterada em ‘Galego’, aos 5 dias após a infecção com XfaC. Esse gene foi identificado como um gene metabólico, regulado positivamente em diversas condições infectantes, como um mediador do peróxido de hidrogênio na morte celular programada (JIANG, HE, ZHANG, 2017) e, em amendoim, infectado com o fungo *Metarhizium anisopliae*, como participante do processo de oxidação-redução (HAO et al., 2017). A resposta de hipersensibilidade induzida por XfaC em ‘Hamlin’ é resultante da produção de peróxido de hidrogênio no interior da célula vegetal, podendo essa enzima ser participante desse processo.

Os transcritos relacionados à fotossíntese em ‘Hamlin’ foram reprimidos, enquanto em ‘Galego’ nenhum transcrito relacionado à fotossíntese apresentou expressão alterada em relação ao controle. O avanço da infecção leva a degradação proteica e a degeneração de organelas, incluindo cloroplastos, o que resulta na diminuição da taxa fotossintética (RUDOLPH, 1993; CERNADAS et al., 2008).

Cernadas e colaboradores (2008) relataram a repressão ou não expressão diferencial de transcritos de laranja 'Pêra' relacionados à fotossíntese em infecção com XfaC. No caso em que a infecção bacteriana leva ao extravasamento do conteúdo celular, ocorre o preenchimento dos espaços intercelulares pelos polissacarídeos extracelulares produzidos pela bactéria, macroscopicamente visto como encharcamento, o que diminui a taxa fotossintética, causando danos à planta (RUDOLPH, 1993).

Durante a infecção, a célula vegetal necessita realocar recursos e energia para gerar rápida e efetivamente respostas de imunidade ao ataque do patógeno (CERNADAS et al., 2008). A regulação negativa dos genes relacionados à fotossíntese é um bom indicativo que a planta está respondendo à infecção. Além de que a reação de hipersensibilidade (HR) desencadeada pela presença de XfaC, leva à morte celular programada localizada e ao consequente desligamento de todo o maquinário do metabolismo. Em 'Galego', não foram identificados transcritos diferencialmente expressos relacionados à fotossíntese, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Este fato sugere que essa variedade responde tardiamente à presença do patógeno (DA SILVA, 2015).

A diferença na susceptibilidade entre laranja 'Hamlin' e lima ácida 'Galego' pode ser atribuída a uma resposta de defesa mais consistente e rápida em 'Hamlin' do que em 'Galego'. 'Hamlin' possui um sistema mais eficiente de reconhecimento do patógeno, que permite que os mecanismos de defesa sejam prontamente ativados. Além disso, uma grande quantidade de genes relacionados à parede celular foi regulada positivamente em 'Hamlin', significando que o reforço e modulação da parede celular é uma ótima estratégia para prevenir o progresso da infecção. A partir disso, foi proposto um modelo de resposta de defesa da laranja doce à infecção com XfaC (Figura 26).

Em 'Galego', não houve a expressão de muitos genes de defesa e nem a alteração da expressão da maioria dos genes metabólicos em uma resposta inicial. Isto permite que as bactérias suprimam a primeira resposta imune, PTI, e alterem a transcrição dos genes de defesa, para favorecer seu desenvolvimento e progressão da doença.

Apesar de Xac ser mais agressiva que XfaC, ambas bactérias têm o mesmo comportamento dentro do tecido de lima ácida: produzem goma xantana e biofilme, degradam a parede celular hospedeira que leva a um extravasamento citoplasmático e ruptura celular. Contudo, a maior agressividade de Xac, entre outros fatores, está relacionada a um T3SS mais completo e potente do que nas demais estirpes, que permite a bactéria driblar e suprimir o PTI, resultando na progressão dos sintomas e desenvolvimento da doença, como observado por Cernadas e colaboradores (2008).

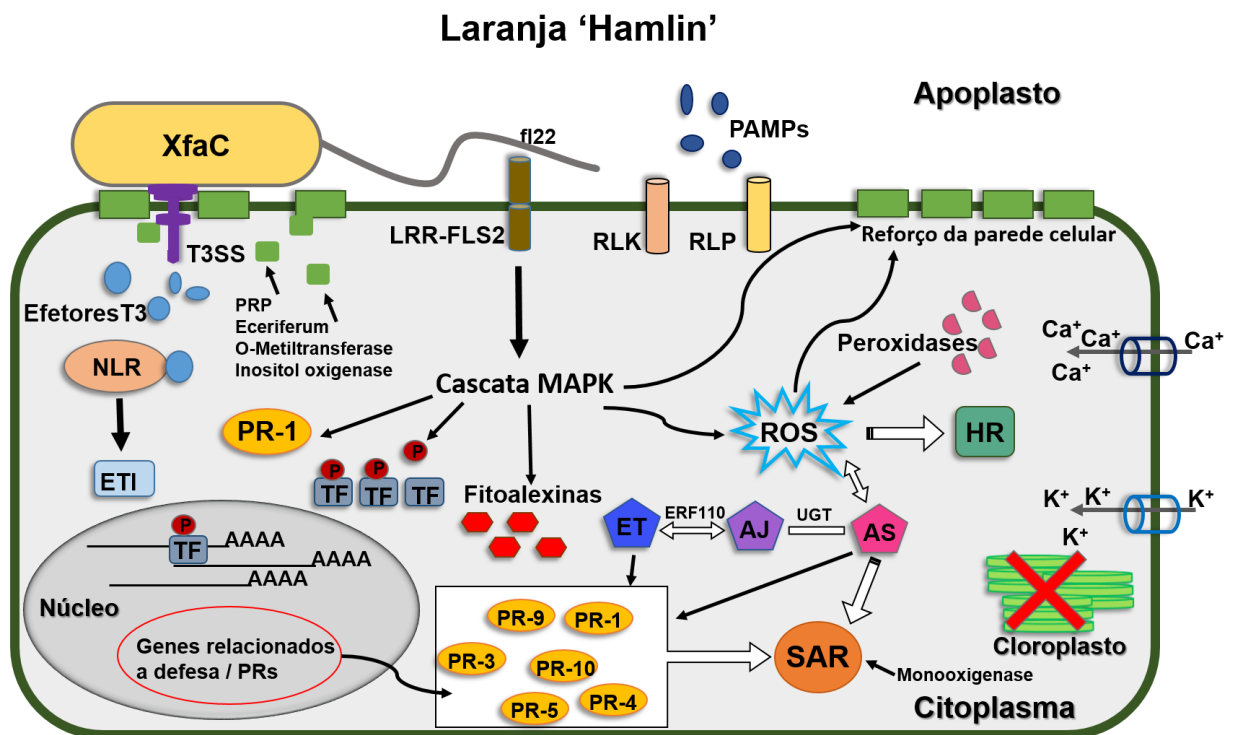


Figura 26 – Modelo da resposta de defesa da laranja doce 'Hamlin' à infecção por XfaC. O patógeno se adere à parede celular da planta e libera efetores no apoplasto celular através do T3SS. A célula vegetal reconhece os PAMPs do patógeno pelas proteínas NLR no citoplasma, ou pelas proteínas RLK/RLP na membrana plasmática e ativa a ETI e as vias de sinalização, que regulam a expressão de genes relacionados à defesa no núcleo. O influxo de íons importantes, como o Ca^{2+} e o K^{+} , bem como a regulação negativa dos genes da fotossíntese, ajudam a planta a realocar energia para responder à infecção. Uma via de sinalização importante é a cascata MAPK que induz vários mecanismos de defesa: produções de fitoalexinas e de ROS, fosforilação dos fatores de transcrição, expressão de PR-1, reforço de parede celular. As vias de sinalização hormonal via ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) também são ativadas e induzem diversas alterações. O

AS pode induzir diretamente a expressão de PRs e ROS e a Resposta Sistêmica Adquirida (SAR), que também pode ser induzida por PRs. Diversas enzimas participam do reforço da parede celular, também induzidas por ROS. As ROS geram uma resposta rápida à infecção e levam a PCD (morte celular programada) ou a HR (resposta de hipersensibilidade), para conter a progressão da infecção.

7. CONCLUSÃO

O processo de infecção no hospedeiro susceptível (lima ácida 'Galego') é semelhante em todas as estirpes de *Xanthomonas* estudadas. Todas as estirpes induzem hiperplasia, hipertrofia, porém, em diferentes intensidades, sendo que as alterações provocadas pelas estirpes Xac828 e Xacm1510 não resultaram no rompimento da epiderme; todas as estirpes produzem goma que envolve as bactérias e favorece a colonização no ambiente intercelular e o desenvolvimento da infecção. Xac306 é a estirpe mais agressiva dentre as demais, visto pelos sintomas e pela intensidade das alterações anatômicas no tecido de 'Hamlin' e 'Galego'.

Não foi possível estabelecer uma relação direta entre os testes de formação *in vitro* de biofilme, produção de goma e motilidade "swimming" das estirpes, com a análise das imagens de microscopia. As diferenças na gama de hospedeiros e virulência dessas estirpes é explicada pelas variações no genoma, pelo conjunto de efetores de virulência, pela expressão gênica em condições de infecção e pela diferença de produção de goma e de crescimento.

A resposta de defesa de laranja 'Hamlin' contra XfaC é uma resposta rápida e eficiente que leva a indução de HR, que em última instância, contém a infecção, pela morte celular programada no local da infecção. A HR induzida por estirpes de XfaC foi caracterizada ultraestruturalmente por microscopia eletrônica de transmissão. Os genes relacionados a resposta de defesa e a indução de resistência com maiores níveis de expressão em 'Hamlin' infectada com XfaC estão, ou inalterados, ou com baixa expressão diferencial em 'Galego', sendo, portanto, determinantes para a maior susceptibilidade dessa variedade à infecção de XfaC.

O processo de infecção de um patógeno e a resposta de defesa da planta são processos complexos que interligam diversos fatores e variáveis. A compreensão desses processos em sua totalidade requer a sobreposição de diferentes abordagens. Esse trabalho traz contribuições para o estudo da interação *Xanthomonas*-citros, fornecendo informações sobre a interação de diferentes estirpes com o hospedeiro suscetível e a resposta de defesa de laranja sob infecção de XfaC.

REFERÊNCIAS

- ABE, V. Y.; BENEDETTI, C. E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. *Molecular Plant Pathology*, 2015.
- ADRIKO, J.; MBEGA, E. R.; MORTENSEN, C. N. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 293–306, 2014.
- AGUSTÍ, M. **Citricultura**. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 2000. 416p.
- AL-SAAD, A.; REDDY, J. D.; DUAN, Y. P.; BRUNINGS, A. M.; YUAN, Q.; GABRIEL, D. W. All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 20, n. 8, 2007.
- ALVES, P. R. B.; MELO, B. Cultura dos Citros. **Núcleo de estudo em fruticultura no cerrado**. Universidade Federal de Uberlândia. 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>>. Acesso em: 23/03/2012.
- AMARAL, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília, DF, **EMBRAPA - Comunicado Técnico**, n. 86, 2003.
- ANDRE, S.; SIEBERT, H. C.; NISHIGUCHI, M.; TAZAKI, K.; GABIUS, H. J. Evidence for lectin activity of a plant receptor-like protein kinase by application of neoglycoproteins and bioinformatic algorithms, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1725, p. 222–232, 2005.
- BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review Phytopathology**, v. 33, p. 299–321, 1995.
- BARRE, A.; HERVE, C.; LESCURE, B.; ROUGE, P. Lectin receptor kinases in plants, **Critical Review of Plant Science**, v. 21, p. 379–399, 2002.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JUNIOR, J. Ciclo da doença e epidemiologia. In: **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara, SP: Fundecitrus. 2014. p.20-28.
- BESTWICK, C. S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in Lettuce. **Plant Physiology**, v. 108, p. 503-516, 1995.

BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; VITALY CITOVSKY, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 705–719, 2010.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). **Molecular Plant**, v. 8, p. 521–539, 2015.

BITANCOURT, A. A. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.

BOCH, J.; SCHOLZE, H.; SCHORNACK, S.; LANDGRAF, A.; HAHN, S.; KAY, S.; LAHAYE, T.; NICKSTADT, A.; BONAS, U. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. **Science**, v. 326, 2009.

BOGDANOVE, A. J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 394–401, 2010.

BOHER, B.; BROWN, I.; NICOLE, M.; KPÉMOUA, K.; VERDIER, V.; BONAS, U.; DANIEL, J. F.; GEIGER, J. P.; AND MANSFIELD, J. Histology and cytochemistry of interactions between plants and xanthomonads. Pages 193-210 in: **Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant–Microorganism Interactions**. M. Nicole and V. Gianinazzy-Pearson, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1996.

BOUWMEESTER, K.; SAIN, M.; WEIDE, R.; GOUGET, A.; KLAMER, S.; CANUT, H.; GOVERS, F. The lectin receptor kinase LecRK-I.9 is a novel *Phytophthora* resistance component and a potential host target for a RXLR effector. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 10–16, 2014.

BRADBURY, J. F. Genus II *Xanthomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 199-210.

BRANDA, S. S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L. Biofilms: the matrix revisited. **Trends of Microbiology**, v. 13, p. 20–26, 2005.

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

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 34, p. 107-133, 2010.

CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, 2015.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, L. R.; BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas*

axonopodis pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 609-631, 2008.

CHEN, C. Y.; HEATH, M. C. Cytological studies of the hypersensitive death of cowpea epidermal cells induced by basidiospores-derived infection by the cowpea rust fungus. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1199-1206, 1991.

CLÉ, C.; HILL, L. M.; NIGGEWEG, R.; MARTIN, C. R.; GUISEZ, Y.; PRINSEN, E.; JANSEN, M. A. K. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2149–2156, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Laranja - Análise Mensal - fevereiro/2017**. Brasília, DF, p. 1-7, 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira. Laranja, safra 2013/2014. Terceiro Levantamento - São Paulo e Triângulo Mineiro**. Brasília, DF, p. 1-11, dez. 2013.

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 JR., L. M. C. et al. Comparison of genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, 417, p. 459-463, 2002.

DA SILVA, C. F. **Análise do transcriptoma da interação *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C e plantas cítricas**. 2015. 158f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, 2001.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 401–22, 2007.

DAS, A. K. Citrus Canker. A review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p.52-60, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras. Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 60 p. Editora: EDIPUCRS, Porto Alegre, 2007.

DELANEY, T. P.; FRIEDRICH, L.; RYALS, J. A. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 6602-6606, 1995.

DENNY, T. P. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 417–430, 1999.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. **Physiology and Plant Pathology**, v. 23, p. 345–347, 1983.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.1-18.

DUAN, Y. P.; CASTANEDA, A. L.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D. W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 12, p. 556–560, 1999.

DUNGER, G.; GAROFALO, C. G.; GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; ROSA, M. C. P.; FARAH, C. S.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 865–876, 2012.

DUNGER, G.; GUZZO, C. R.; ANDRADE, M. O. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 27, p. 1132–1147, 2014.

DUNGER, G.; M. RELLING, V. M.; TONDO, M. L.; BARRERAS, M.; IELPI, L.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Arch Microbiology**, v. 188, p. 127–135, 2007.

ESCALON, A.; JAVEGNY, S.; VERNIERE, C.; NOEL, L. D.; VITAL, K.; POUSSIER, S.; HAJRI, A.; BOUREAU, T.; PRUVOST, O.; ARLAT, M.; GAGNEVIN, L. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 483–496, 2013.

FARMER, E. E.; ALMERAS, E.; KRISHNAMURTHY, V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 372–378, 2003.

FAVARO, M. A.; MICHELOUD, N. G.; ROESCHLIN, R. A.; CHIESA, M. A.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; GMITTER JR., F. G.; GADEA, J.; RISTA, L. M.; GARIGLIO, N. F.; MARANO, M. R. Surface barriers of mandarin cv. 'Okitsu' leaves make a major contribution to canker disease resistance. **Phytopathology**, v. 104, n. 9, p.970-6, 2014.

REFERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, 2017.

FRANCO, A. S. M. O suco de laranja brasileiro no mercado global. **Análise Conjuntural**, v. 38, n. 11, 2016.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e Cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro. Fundecitrus. 56 p. 2017.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). MAPA oficializa sistema de mitigação de risco de cancro cítrico em São Paulo, 2017b. **Comunicação**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/mapa-oficializa-sistema-de-mitigacao-de-risco-de-cancro-citrico-em-sao-paulo/525>.

GALLETI, S. R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, v.65, n.1/2, p.33-35, 2003.

GOCHEZ, A. M.; MINSAVAGE, G. V.; POTNIS, N.; CANTEROS, B. I. A functional XopAG homologue in *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* strain C limits host range. **Plant Pathology**, v. 64, p. 1207–1214, 2015.

GOCHEZ, A.; RINSDAHL-CANAVOSIO, M.; CANTEROS, B. **Pathogenicity of strains of the C group and B group of *Xanthomonas axonopodis* in Duncan grapefruit (*Citrus paradisi*) and Key lime (*C. aurantifolia*)**. In: Deng X, ed. Proceedings of the 11th International Citrus Congress, 2008. Wuhan, China: International Society of Citriculture, 3, 2008.

GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 189–215, 2008.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 6, 2002.

GOODMAN, R. N.; NOVACKY, A. J. **The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens**. APS Press, St. Paul, MN, 1994.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. **Plos One**, v. 4, n. 2, 2009.

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

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

GRANT, M. R.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Exploiting pathogens' tricks of the trade for engineering of plant disease resistance: challenges and opportunities. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 212–222, 2013.

GREENBERG, J. T.; YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 201–211, 2004.

GUY, E.; GENISSEL, A.; HAJRI, A.; CHABANNES, M.; DAVID, P.; CARRERE, S.; LAUTIER, M.; ROUX, B.; BOUREAU, T.; ARLAT, M.; POUSSIER, S.; NOËL, L. D. Natural genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity on *Arabidopsis* revealed by association and reverse genetics. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.

HAJRI, A.; BRIN, C.; ZHAO, S.; DAVID, P.; FENG, J.; KOEBNIK, R.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; BOUREAU, T.; POUSSIER, S. Multilocus sequence analysis and type III effector repertoire mining provide new insights into the evolutionary history and virulence of *Xanthomonas oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 3, p. 288–302, 2012.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77–84, 1999.

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

HAO, K.; WANG, F.; NONG, X.; MCNEILL, M. R.; LIU, S.; WANG, G.; CAO, G.; ZHANG, Z. Response of peanut *Arachis hypogaea* roots to the presence of beneficial and pathogenic fungi by transcriptome analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 964, 2017.

HE, Z-H.; HE, D.; KOHORN, B. D. Requirement for the induced expression of a cell wall-associated receptor kinase for survival during the pathogen response. **Plant Journal**, v.14, p. 55–63, 1998.

HEATH, M. C. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 117–124, 1998.

HOLZMUELLER, E. J.; JOSE, S.; JENKINS, M. A. Influence of calcium, potassium, and magnesium on *Cornus florida* L. density and resistance to dogwood anthracnose. **Plant Soil**, v. 290, p. 189–199, 2007.

HOU, X-W.; TONG, H-Y.; SELBY, J.; DEWITT, J.; PENG, X-X.; HE, Z-H. Involvement of a cell wall-associated kinase, WAKL4, in *Arabidopsis* mineral responses. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1704–1716, 2005.

HUANG, J-S. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 141-57, 1986.

HURNI, S.; SCHEUERMANN, D.; KRATTINGER, S. G.; KESSEL, B.; WICKERA, T.; HERREN, G.; FITZEA, M. N.; BREEN, J.; PRESTERL, T.; OUZUNOVA, M.; KELLER, B. The maize disease resistance gene Htn1 against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. **PNAS**, v. 112, n. 28, 2015.

JACIANI, F. J. **Diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, caracterização molecular e patogênica de *Xanthomonas fuscans* subsp. *auratifolii* e detecção de *Xanthomonas alfalfae* em citrumelo ‘swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil.** 2012. 169f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

JALAN, N.; ARITUA, V.; KUMAR, D.; YU, F. H.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. G.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* Fl, which causes citrus bacterial spot disease, and related strains provides insights into virulence and host specificity. **Bacteriology**, v. 193, p. 6342-6357, 2011.

JALAN, N.; YAN, Q.; KOGENARU, S.; GUO, Y. Genomics of *Xanthomonas citri* and related species. In: Gross DC, Lichens-Park A, Kole C. **Genomics of Plant-Associated Bacteria**, Berlin Heidelberg: Springer, eds, p. 151-176, 2014.

JIANG, B. L.; HE, Y. Q.; CEN, W. J.; WEI, H. Y.; JIANG, G. F.; JIANG, W.; HANG, X. H.; FENG, J. X.; LU, G. T.; TANG, D. J.; TANG, J. L. The type III secretion effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence. **Research Microbiology**, v. 159, p. 216–220, 2008.

JIANG, W.; JIANG, B. L.; XU, R. Q.; HUANG, J. D.; WEI, H. Y.; JIANG, G. F.; CEN, W. J.; LIU, J.; GE, Y. Y.; LI, G. H.; SU, L. L.; HANG, X. H.; TANG, D. J.; LU, G. T.; FENG, J. X.; HE, Y. Q.; TANG, J. L. Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 22, p. 1401–1411, 2009.

JIANG, Z.; HE, F.; ZHANG, Z. Large-scale transcriptome analysis reveals *Arabidopsis* metabolic pathways are frequently influenced by different pathogens. **Plant Molecular Biology**, 2017.

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

KANG, Y.; SAILE, E.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Quantitative immunofluorescence of regulated eps gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*. **Applied Environment Microbiology**, v. 65, p. 2356–2362, 1999.

KAY, S.; HAHN, S.; MAROIS, E.; HAUSE, G.; BONAS, U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. **Science**, v. 318, 2007.

KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. **The Plant Cell**, v. 26, p. 2285–2309, 2014.

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant -pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24, p. 447-63, 1990.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I. E. Defense responses of plants to pathogens. **Advances in Botanical Research**, v. 21, p. 2–33, 1995.

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

LALLY, D.; INGMIRE, P.; TONG, H-Y.; HE, Z-H. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. **Plant Cell**, v. 13, p. 1317–1331, 2001.

LAWSON, R. H.; DIENELT, M. M.; CIVEROLO, E. L. Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: light and scanning electron microscopy. *Citology and Histology*, v. 79, n. 3, 1989.

LEE, I. J.; KIM, K. W.; HYUN, J. W. Comparative ultrastructure of nonwounded Mexican lime and Yuzu leaves infected with the citrus canker bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **Microscopy Research and Technique**, v.72, p. 507–516, 2009.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. **Cell**, v. 79, p. 583-593, 1994.

LI, H.; ZHOU, S. Y.; ZHAO, W. S.; SU, S. C.; PENG, Y. L. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, OsWAK1, plays important roles in rice blast disease resistance. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 3, p. 337–346, 2009.

LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **Plos One**, v. 6; n. 7, 2011b.

LI, J.; WANG, N. The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 381–96, 2011.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; SERINO, G.; DENG, X.W.; DINESH-KUMAR, S.P. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to tobacco mosaic virus. **Plant Cell**, v.14, p.1483–1496, 2002.

LO, Y. M.; YANG, S. T.; MIN, D. B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 689-694, 1997.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, p. 819–29, 2010.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; CARVALHO, M. L. V.; RODRIGUES NETO, J.; ROSSETTI, V.; NOGUEIRA, E. M. C.; PALAZZO, D. A. Reaction of different Citrus and relatives to bacterial canker C [*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]. **Proceedings Congress of the International Society of Citriculture**. v. 1, p. 363-364, 1987.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**, 3rd ed.; Academic Press: London, UK, p. 178–189, 2012.

MAY, M. J.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1367-1379, 1996.

MENG, X.; ZHANG, S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 245–266, 2013.

MENSI, I.; VERNEREY, M-S.; GARGANI, D.; NICOLE, M.; ROTT, P. Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. **Open Biology**, v. 4, p. 130116, 2014.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase fmo1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1666–1675, 2006.

MOREIRA L. M.; SOUZA, R. F. de; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annuals Reviews Phytopathology**. Virginia, USA, v. 42, p. 163-184. 2004.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA Jr., N. F.; POTNIS N., DIGIAMPIETRI L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; SILVA, A. S. da, SILVA, A. M. da, MORAES, F. E.; OLIVEIRA, J. C.; SOUZA, R. F. de, FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAKIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE Jr, R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; NETO, J. R.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROKI, E. H.;

PEREIRA Jr, H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 238, 2010.

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

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **Centro de pesquisa e projetos em marketing e estratégia**. 2010. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com.br/citrusbr/assuntos/retrato-da-citricultura.asp>>.

NEWMAN, M. A.; DOW, J. M.; MOLINARO, A.; PARRILLI, M. Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Journal of Endotoxin Research**, v. 13, p. 69–84, 2007.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.. Agressividade de Linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C em Lima Ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, p. 140-146, 2006.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964.

OLIVEIRA, R. P. de; UENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C.; ROCHA, P. S. G. da. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. **Embrapa Clima Temperado. Documentos 23**, Pelotas, 2008.

ORCE, I. G.; DEBES, M.; SENDÍN, L.; LUQUE, A.; ARIAS, M.; VOJNOV, A.; MARANO, M.; CASTAGNARO, A.; FILIPPONE, M. P. Closely-related *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates trigger distinct histological and transcriptional responses in *Citrus limon*. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 6, p. 552-558, 2016.

PIETERSE, C. M.; PELT, J. A. V.; WEES, S. C. W.; Léon-KloosterzielJoost, J. T. M.; KEURENTJES, B. J.; VERHAGEN, B. W. M.; KNOESTER, M.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P. A. H. M.; VAN LOON, L. C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 51-61, 2001.

POPOV, G.; FRAITURE, M.; BRUNNER, F.; SESSA, G. Multiple *Xanthomonas euvesicatoria* type III effectors. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 29, n. 8, p. 651–660, 2016.

PRUVOST, O.; BOHER, B.; BROCHERIEUX, C.; NICOLE, M.; CHIROLEU, F. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, 2002.

PRUVOST, O.; ROBENE, I.; ESCALON, A.; LEDUC, A. The dynamic world of the genus *Xanthomonas*. In: Wang N, Jones JB, Sundin GW, White FF, eds. **Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, p. 381-385. ISBN 978-0-89054-444-0, 2015.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208–212, 1963.

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

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*, p. 193-264. In J. G. Swings and E. L. Civerolo (ed.), **Xanthomonas**. Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1993.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 8, p. 1809–1819, 1996.

RYAN, E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell of Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–212, 1963.

RYAN, R. P.; VORHOLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M. A. V.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews**, v. 9, p. 344-355, 2011.

SALOMON, D.; DAR, D.; SREERAMULU, S.; SESSA, G. Expression of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type III effectors in yeast affects cell growth and viability. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 24, n. 3, p. 305–314, 2011.

SASAKI-SEKIMOTO, Y.; TAKI, N.; OBAYASHI, T.; AONO, M.; MATSUMOTO, F.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; HIRAI, M. Y.; NOJI, M.; SAITO, K.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K.; SHIBATA, D.; OHTA, H. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 44, p. 653–668, 2005.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I. V. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 690–695, 2006.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 11655–11660, 2000.

SCHMITZ-HOERNER, R.; WEISSENBOCK, G. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. **Phytochemistry**, v. 64, p. 243–255, 2003.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, v. 64, p. 767–775, 2015.

SINHA, D.; GUPTA, M. K.; PATEL, H. K.; RANJAN, A.; SONTI, R. V. Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the Type 3 Secretion System effectors XopN, XopQ, XopX and XopZ of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

SOBRINHO, A. P. C.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. **Cultura dos citros**. 1 ed. Brasília: Embrapa, v.1, p. 13-14, 2013.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 399–420, 1991.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SWARUP, S.; DE FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker-like lesions on citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 81, n. 7, 1991.

TAKI, N.; SASAKI-SEKIMOTO, Y.; OBAYASHI, T.; KIKUTA, A.; KOBAYASHI, K.; AINAI, T.; YAGI, K.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, Y.; OHTA, H. 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1268–1283, 2005.

TALON, M.; GMITTER JR., F. G. Citrus Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, p. 1-17, 2008.

TANG, D.; WANG, G.; ZHOU, J. Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. **Plant Cell**, v. 29, n. 4, p. 618-637, 2017.

TANI, T.; SOBAJIMA, H.; OKADA, K.; CHUJO, T.; ARIMURA, S.; TSUTSUMI, N.; NISHIMURA, M.; SETO, H.; NOJIRI, H.; YAMANE, H. Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. **Planta**, v. 227, p. 517–526, 2008.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; CAROLIN BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; SABINE KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; MCHARDY, A. C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D. H.; NIESBACH-KLÖSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S. C.; VORHÖLTER, F.-J.; WEBER, E.; PÜHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D.; KAISER. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7254-7266, 2005.

THIEME, F.; SZCZESNY, R.; URBAN, A.; KIRCHNER, O.; HAUSE, G.; BONAS, U. New type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* trigger plant reactions dependent on a conserved N-myristoylation motif. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 20, p. 1250-1261, 2007.

THULEAU, P.; ALDON, D.; COTELLE, V.; BRIÈRE, C.; RANTY, B.; GALAUD, J.-P.; MAZARS, C. Relationships between calcium and sphingolipid-dependent signalling pathways during the early steps of plant-pathogen interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 7, p. 1590-1594, 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Citrus: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service. 2018. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIENT, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85–97, 1999.

VASSE, J.; DE BILLY, F.; TRUCHET, G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*—alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. **The Plant Journal**, v. 4, n. 3, p. 555-566, 1993.

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 90, p. 677–682, 2000.

VOJNOV, A. A.; SLATER, H.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 768–774, 2001.

VON SAINT PAUL, V.; ZHANG, W.; KANAWATI, B.; GEIST, B.; FAUS-KEßLER, T.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; SCHÄFFNER, A. R. The *Arabidopsis* glucosyltransferase ugt76b1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. **The Plant Cell**, v. 23, p. 4124–4145, 2011.

WANG, M.; ZHENG, Q.; SHEN, Q.; GUO, S. The critical role of potassium in plant stress response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 7370-7390, 2013.

WANG, Y.; FU, X-Z.; LIU, J-H.; HONG, N. Differential structure and physiological response to canker challenge between 'Meiwa' kumquat and 'Newhall' navel orange with contrasting resistance. **Scientia Horticulturae**, n. 128, p. 115–123, 2011.

WATT, M.; MCCULLY, M. E.; JEFFREE, C. E. Plant and bacterial mucilages of the maize rhizosphere: Comparison of their soil binding properties and histochemistry in a model system. **Plant and Soil**, v. 151, n. 2, p. 151-165, 1993.

WEIGEL, R. R.; BÄUSCHER, C.; PFITZNER, A. J. P.; Pfitzner, U. M. NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 143–160, 2001.

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

WU, S.; SHAN, L.; HE, P. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. **Plant Science**, v. 228, p. 118–126, 2014.

YAN, Q.; HU, X.; WANG, N. The novel virulence-related gene *nlxA* in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 923–934, 2012.

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

YANG, B.; WHITE, F. F. Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 1192-1200, 2004.

ZHANG, Y.; JALAN, N.; ZHOU, X.; GOSS, E.; JONES, J. B.; SETUBAL, J. C.; DENG, X.; WANG, N. Positive selection is the main driving force for evolution of citrus canker-causing *Xanthomonas*. **The ISME Journal**, v. 9, p. 2128–2138, 2015.

ZHAO, S.; MO, W-L.; WU, F.; TANG, W.; TANG, J-L.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; KOEBNIK, R.; FENG, J-X. Identification of non-TAL effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Chinese strain 13751 and analysis of their role in the bacterial virulence. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 733–744, 2013.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 414–420, 2009.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, p. 10–16, 2008.